

Jussara Fernanda Santos

**CERTIFICAÇÃO DA ORIGEM HÍBRIDA DO  
MORFOTIPO BIFOLIOLADO E  
PARÂMETROS GENÉTICOS  
MOLECULARES INTRA E  
INTERESPECÍFICOS EM *Euterpe* spp.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutora em Agroecossistemas.

Orientador: Prof. Dr. Giorgini Augusto Venturieri.

Coorientador: Dr. Keny Henrique Mariguele.

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Jussara Fernanda  
Certificação da Origem Híbrida do Morfotipo  
Bifoliolado e Parâmetros Genéticos Moleculares Intra  
e Interspecíficos em *Euterpe* spp / Jussara  
Fernanda Santos ; orientador, Giorgini Augusto  
Venturieri, coorientador, Keny Henrique Mariguele,  
2019.  
108 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Agroecossistemas. 2. Agroecossistemas. 3.  
Agroecologia. I. Venturieri, Giorgini Augusto . II.  
Mariguele, Keny Henrique. III. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Agroecossistemas. IV. Título.

# "Certificação da Origem Híbrida do Morfotipo Bifoliolado e Parâmetros Genéticos Moleculares Intra e Interespecíficos em *Euterpe spp.*"

*Por*

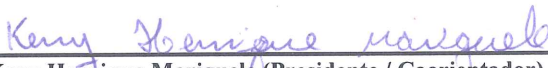
**JUSSARA FERNANDA SANTOS**

Tese julgada adequada, em 04/04/2019, e aprovada em sua forma final, pelo Orientador, Coorientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutora em Agroecossistemas. Área de Concentração Agroecologia, no Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias/UFSC.



Prof. Dr. Arcangelo Loss (Coordenador do Programa)

Banca Examinadora:



Keny Henrique Mariguelé (Presidente / Coorientador)



Fernanda Amatto Gaiotto (Titular Externo/Universidade Estadual de Santa Cruz / UESC) – via videoconferência.

Prof. Dr. Arcangelo Loss  
Coordenador do PPG Agroecossistemas

Port. 1332/2017/GR  
Período: 12/06/2017



Valéria Aparecida Modolo (Titular Externo/Instituto Agrônomo/IAC)



Leila Sobral Sampaio (Titular Interno/Universidade Federal Rural da Amazônia/UFRA; Pós-Doc. PPGA/UFSC)

Candidata ao título:



JUSSARA FERNANDA SANTOS

Florianópolis, 04 de abril de 2019



Dedico esta tese aos meus pais, Antonio Landin Santos e Maria Tereza de Paula Santos e ao meu orientador, prof. Dr. Giorgini Augusto Venturieri (In memoriam).



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao programa de pós-graduação em Agroecossistemas pela oportunidade de cursar o doutorado, ao coordenador do curso, o professor Arcângelo Loss, pelo apoio na finalização do curso, à Capes pela concessão da bolsa, à FAPESC pelo financiamento da pesquisa e à EPAGRI pela disponibilidade de equipe de apoio e infraestrutura.

Ao prof. Dr. Giorgini Augusto Venturieri (In memorian) por ter me recebido, orientado e se esforçado em viabilizar o desenvolvimento dessa pesquisa. Agradeço pela convivência e amizade e principalmente por toda empolgação transmitida em tudo o que fazia. Agradeço ainda a sua companheira Adenilse Venturieri pela agradável companhia nas expedições de campo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma durante o desenvolvimento desse trabalho, em especial o Sr. Jorge Tuzino Leite e seus funcionários. Ao agricultor Marcos Menkel e sua família, a professora Fernanda Amatto Gaiotto e sua família e a seu então doutorando Alessandro Souza Santos e demais colegas e funcionários da UESC que me receberam. A Dra. Valéria Modolo e equipe do IAC unidade Pariqueçu. A Dra. Leila Sampaio por ter aceitado fazer parte da banca.

A toda equipe de apoio e infraestrutura da EPAGRI em especial o pessoal de campo do projeto Flora Catarinense. A pesquisadora responsável pelo laboratório de biologia molecular da EPAGRI-EEI, Adriana Pereira e às demais colaboradoras desta unidade, por todo apoio prestado durante a realização análises com marcadores microssatélites.

Ao pesquisador da EPAGRI Dr. Gustavo Henrique Klabunde por todo apoio durante execução do trabalho, além da preciosa participação na banca de qualificação. Ao coorientador Dr. Keny Henrique Mariguele pela orientação e toda ajuda durante todo o processo, por ter dividido seus conhecimentos com humildade e paciência e me servido de exemplo profissional e pessoal. Aos estimados colegas da UFSC, professores e funcionários, em especial os colegas da pós-graduação em recursos genéticos - RGV.

Aos que me foram tão importantes nessa jornada, os pais, Antonio Landin Santos e Maria Tereza de Paula Santos e aos irmãos Juliane Roberta Santos e Robson Fernando Santos. Aos amigos, Felipe Tiago de Jesus, Sofia Zutin Gasparoto, Suzana Cristina Lourenço e Alana Casagrande, pela agradável convivência, aventuras e boas recordações. Agradeço ainda as professoras da UFSCar-Araras, Roberta Cornélio Nocelli e Kayna



Agostini, orientadora e coorientadora do mestrado.



# **Certificação da origem híbrida do morfotipo bifoliolado e parâmetros genéticos moleculares intra e intergrupos em *Euterpe* spp.**

## **Resumo**

Híbridos entre açaizeiros (*Euterpe oleracea* Martius), espécie do bioma Amazônico, e a juçara (*Euterpe edulis* Martius) espécie do bioma Mata Atlântica, vem sendo formados espontaneamente através de sistemas de consórcios promovidos por agricultores, extensionistas e pesquisadores em Santa Catarina. No entanto, são muitas as lacunas a respeito dessa atividade, sendo escassas informações sobre a correta classificação do morfotipo bifoliolado, os estoques iniciais de diversidade, o funcionamento do sistema de fecundação e a diversidade entre e dentro das populações de progênies formadas por estes cruzamentos. Esta pesquisa teve como objetivos, a partir da aplicação de marcadores microsatélites, estudar os acessos adultos da coleção de germoplasma de *Euterpe* spp. da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Estação Experimental de Itajaí e identificar grupos divergentes para obtenção de combinações com alta diversidade. Caracterizar o sistema de fecundação e realizar um teste de paternidade em três populações de progênies

de *E. oleracea* submetidas a hibridação interespecífica espontânea com *E. edulis*, identificação dos doadores de pólen e híbridos bífoliolados. Além de avaliar a variabilidade e estrutura genética dessas populações e gerar informações úteis para programas de melhoramento de *Euterpe* spp. em clima subtropical. Para tal, foram testados 18 marcadores microssatélites, previamente desenvolvidos para *E. edulis*. Seis deles - EE03, EE45, EE47, EE52, EE54 e EE59 - foram eficientes e empregados na obtenção das estimativas desejadas. Para o estudo com grupos de acessos adultos o conteúdo de informação polimórfica (PIC) médio variou de 0,305 a 0,835. A partir da AMOVA, foram obtidos valores de variação de 13% entre grupos, 47 e 40% entre e dentro dos acessos, respectivamente. O Método bayesiano indicou a formação de quatro grupos e a partir do dendograma com o método Ward, com 50% do valor de dissimilaridade foi possível ilustrá-los, além de indicar os acessos com dissimilaridade baixa ( $\leq 10\%$ ). A diversidade encontrada possibilita a orientação de cruzamentos dirigidos, tanto para formação de híbridos intra e interespecíficos, como para retrocruzamentos. Para o estudo com os grupos de progênies, constatou-se que estes possuem um sistema de fecundação misto com predomínio de alogamia ( $t_m$  e  $t_s = 1,0$ ), sendo a correlação de autofecundação ( $r_f$ )

igual a 0,110. Foram constatados diferentes graus de parentescos, sendo 15,5 a 26,1% de irmãos completos. A paternidade foi atribuída para 51% e 24% das progênies, com 80 e 95% de confiança respectivamente. Foram identificados 22 doadores de pólen e uma autofecundação. Quatro progênies bifolioladas foram identificadas como híbridos interespecíficos. Foram detectados em média 7 a 12,3 alelos por loco e uma heterozigiosidade média observada ( $H_o$ ) entre 0,382 a 0,898 e a esperada ( $H_e$ ) entre 0,354 a 0,693. Os índices de fixação ( $f$ ) foram entre -0,053 a -0,319. A variação entre os grupos foi de 5%, sendo 95% dentro dos grupos de das progênies e 0% entre progênies. Considerando a escassez de estudos relacionados aos aspectos ecológicos e genéticos da hibridação espontânea entre açazeiros e palmiteiros juçara, os resultados obtidos nos dois estudos são importantes por servirem como base de comparações para estudos futuros, além de permitirem a orientação de cruzamentos dirigidos para formação de híbridos interespecíficos e retrocruzamentos, a correta classificação dos genótipos híbridos bifoliolados que são idênticos aos genitores maternos. Além disso, possibilitaram inferir que os estoques de diversidade gerados a partir da combinação inter e intragrupos por polinização aberta são altos, indicando boas perspectivas de seleção

de genótipos para formação de cultivares melhorados.

Palavras-chave: Juçara; Açáí; Híbrido interespecífico; Microssatélites; Germoplasma.

**Certification of the hybrid origin of the  
bipolar morphotype and inter and  
intragroup molecular genetic parameters in  
*Euterpe* spp.**

**Abstract**

Hybrids between açazeiros (*Euterpe oleracea* Martius), an Amazonian biome species, and juçara (*Euterpe edulis* Martius) an Atlantic Forest biome species, have been spontaneously formed by farmers, extensionists and researchers in Santa Catarina. However, there are many gaps regarding this activity, like little information on the morphotypes classification, initial stocks of diversity, on the accesses fertilization system functioning involved in the crosses and about the diversity between and within the progeny populations formed by these crosses. This research has the following objectives: to study the adult accesses of *Euterpe* spp. germoplasm collection from the Agricultural Research and Rural Extension Company of Santa Catarina - Itajaí Experimental Station by using microsatellite markers, to identify divergent groups to obtain combinations with high diversity, to characterize the fertilization system and perform a paternity test in three populations of *E. oleracea* progenies submitted to spontaneous interspecific hybridization with *E. edulis*, to identify pollen

donors and bifoliolate hybrids, to evaluate the variability and genetic structure of these populations and to generate useful information for *Euterpe* breeding programs in subtropical climates. Therefore, 18 microsatellite markers previously developed for *E. edulis* were tested. Six of them - EE54, EE59, EE03, EE45 and EE52 - were efficient and used to obtain the desired estimates. For the adult access groups study the average polymorphic information content (PIC) varied from 0.305 to 0.835. Through the AMOVA, variation values of 13% were obtained between the groups, 40 and 47% within and between the accessions. The Bayesian Method indicated the formation of four groups and from the dendrogram with the Ward method, 50% of the dissimilarity value was possible to illustrate them, besides indicating the accesses with low dissimilarity ( $\leq 10\%$ ). The diversity found allows the orientation of directed crosses, both for intra and interspecific hybrids formation and for backcrossing. For the progeny study, it was found that they have a mixed fertilization system and an allogamia predominance ( $tm$  and  $ts = 1,0$ ). The self-fertilization ( $rt$ ) correlation is equal to 0.110. Different degrees of kinship were found, between 15.5 and 26.1% of complete siblings. Paternity was attributed to 51% and 24% of progenies, with 80 and 95% confidence, respectively. Twenty-



two pollen donors and one self-pollination were identified. Four bifoliolate progenies were identified as interspecific hybrids, which implies the possibility of early hybrid accesses selection with regular tillering characters. An average of 7 to 12.3 alleles per loci, an average heterozygosity ( $H_o$ ) between 0.382 and 0.898 and the expected heterozygosity ( $H_e$ ) between 0.354 and 0.693 were detected. The indexes of fixation ranged between -0,053 and -0,319. The variation between the populations was of 5%, being 95% within the progenies. The results indicate good prospects for future work related to the prediction of genetic gains from the selection among and within progenies, families and populations. Considering the scarcity of studies related to the spontaneous hybridization between açazeiros and juçara palms ecological and genetic aspects, the results obtained are very important, serving as a basis for future studies comparisons, besides allowing inferences about the collection genotypes initial stocks, the best combination strategies for directed crosses and the correct hybrid genotypes classification, that are identical to the maternal parents. In addition, it was possible to infer that the diversity stocks generated through open pollination with intra and intergroup combination are high, indicating good prospects of genotypes selection for improved

cultivars cultivation in subtropical climate conditions.

Keywords: Juçara; Acai; Interspecific hybrid; Microsatellites; Germoplasm.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Açai melhorado e híbridos no Centro de Educação Ambiental Jorge Tuzino Leite.....	24
Figura 2- Agrupamento dos acessos para K = 4.....	49
Figura 3- Agrupamento pelo método Ward entre acessos de <i>Euterpe</i> spp. da coleção da EPAGRI - EEI. Grupos formados a partir de 50% de dissimilaridade.....	50
Figura 4- Morfotipos de progênies <i>E. oleracea</i> consorciadas com <i>E. edulis</i> classificadas de acordo com a partição dos folíolos.....	77
Figura 5- Sucesso reprodutivo dos doadores de pólen (SRP) para três matrizes de <i>E. oleracea</i> (EO) sujeitas a hibridação espontânea com <i>E. edulis</i> (EE) em Itajaí-SC.....	87



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Estimativas de parâmetros genéticos em três grupos de acessos de <i>Euterpe</i> spp. a partir de seis loci microssatélites.....	48
Tabela 2-Resumo da análise de variância molecular (AMOVA).....	49
Tabela 3- Estimativas do sistema de fecundação de três grupos de progênies de <i>E. oleracea</i> de polinização aberta em Itajaí-SC.....	85
Tabela 4-Resumo das atribuições de doadores de pólen para três matrizes maternas de <i>E. oleracea</i> .....	86
Tabela 5-Teste de paternidade em progênies bifolioladas de polinização aberta de <i>E. oleracea</i> .....	88
Tabela 6-Variabilidade genética em três grupos de progênies de <i>E. oleracea</i> produto da hibridação espontânea com <i>E. edulis</i> em Itajaí-SC.....	89
Tabela 7-Resumo da análise de variância molecular (AMOVA).....	89

## SUMÁRIO

Introdução geral.....	20
Variabilidade genética entre e dentro de grupos de <i>Euterpe</i> spp. com base em microssatélites .....	36
Parâmetros genéticos e teste de paternidade em progênies de <i>Euterpe oleracea</i> produto da hibridação espontânea com <i>Euterpe edulis</i> em clima subtropical.....	66
Conclusão geral .....	106

## INTRODUÇÃO GERAL

As palmeiras são plantas monocotiledôneas que pertencem à família Arecaceae, que são distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Henderson & Galeano, 1996). No Brasil estas espécies são abundantes, amplamente utilizadas em várias regiões, servindo como alimento para muitas populações locais, geralmente nas formas de óleos, polpas e palmito. Servem também como matéria prima para construção, paisagismo, artesanato entre outros (Clement et al., 2005).

Entre as espécies de palmeiras do gênero *Euterpe*, as que mais se destacam são a *E. oleracea*, conhecida como açazeiro e o *E. edulis*, conhecido como palmito juçara (Clement et al., 2005). Ambas são muito semelhantes, porém apresentam algumas particularidades morfoagronômicas, além de apresentarem distribuição geográfica distinta. A juçara (*E. edulis*) distribuiu-se naturalmente pela Costa Atlântica, do Nordeste e ao Sul do Brasil (Hederson, 2000). Desde 1960, tem sido um dos principais produtos florestais não madeireiros da Mata Atlântica, devido à exploração para a extração do palmito (Reis, 2000; Matos & Bovi, 2002). O açazeiro é uma palmeira de ocorrência natural nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e Amapá (Henderson & Galeano, 1996) com grande

importância econômica para o desenvolvimento da região Amazônica.

O primeiro registro da introdução de açazeiros no Sudeste é da década de 50, quando foi cultivado no Instituto Agrônomo de Campinas, na unidade experimental de Ubatuba e simultaneamente na propriedade particular de Jose F. Pegorelli, em Caraguatatuba no estado de São Paulo. Inicialmente foi uma planta disseminada apenas como ornamental (Bovi, 1984).

A partir de 1969 a juçara passou a ser explorada em seu bioma natural predatoriamente para extração do palmito, sendo que o seu corte para a indústria de palmito suscetibilizou a sua quase extinção, pois por ser uma palmeira de estipe único, que não emite brotações laterais e não formam touceiras, o seu uso para palmito exige o corte e impossibilita a sua regeneração (Bovi et al., 1987; Reis, 2000; Matos & Bovi, 2002). Já o açazeiro, por formar touceiras, mesmo com o corte de alguns de seus estipes maduros, ainda é capaz de se regenerar, o que levou esta espécie ser cogitada como fonte de matéria prima para o palmito, em substituição a juçara da Mata Atlântica.

As primeiras comparações quanto à produtividade de palmito entre as espécies constataram que o açazeiro produz palmitos em diâmetros bem inferiores e de



características organolépticas menos delicadas que as do palmitreiro juçara, contudo a característica de perfilhamento é uma grande vantagem agrônômica para o manejo do palmito (Bovi, 1984). A partir disso, as pesquisas do IAC voltaram-se para a obtenção, reconhecimento e manejo dos híbridos formados entre as duas espécies (Bovi, 1984; Bovi et al., 1987; Balvé, 1988; Campos et al., 1991).

Os híbridos foram obtidos por diferentes técnicas de polinização, entre polinização natural, assistida e controlada. A principal forma utilizada foi a partir de técnicas de retirada e armazenamento de pólen e emasculação e proteção das ráquias (Bovi, 1984; Bovi et al., 1987a). Constatou-se que o pegamento dos frutos formados por este sistema variava entre 43 e 89%, sendo correlacionado com o tempo de armazenamento do pólen e com o manuseio da inflorescência (Bovi et al., 1987a). Constatou-se ainda que o amadurecimento das sementes híbridas formadas por este sistema dava-se no mesmo período da formação das sementes autofecundadas, ambas ocorrendo entre 150 e 160 dias (Bovi et al., 1987a).

Por esta técnica foram obtidos êxito três tipos de cruzamentos: *E. oleracea* x *E. edulis*, o seu recíproco (*E. edulis* x *E. oleracea*) e o retrocruzamento do híbrido (*E.*

*oleracea* x *E. edulis*) x *E. edulis* (Bovi et al., 1987b; Campos et al., 1991). Com esses cruzamentos e avaliações a partir de descritores morfoagronômicos percebeu-se que a característica de perfilhamento ocorre apenas quando *E. oleracea* é o genitor feminino, sendo irregular com uma frequência de 70 a 80%, o que levou a suspeita de que a herança dessa característica seja materna (Bovi, 1984; Bovi et al., 1987b). Através dessas pesquisas foi constatado que esses híbridos são precoces e rústicos, toleram maiores níveis de insolação e são mais resistentes a doenças, quando comparados com seus genitores (Bovi, 1984; Bovi et al., 1987a; Bovi et al., 1987b; Campos et al., 1991).

A experiência de hibridação entre as duas espécies também ficou conhecida através de um agricultor do Vale do Ribeira chamado Jorge Tuzino, que promoveu plantios de consórcios entre as duas espécies na década de 1970, na sua propriedade localizada em Miracatu-SP, nos quais foram utilizadas procedências de açaizeiros de Tucuruí-PA como genitores maternos, sendo a polinização aberta e o consorcio com apicultura o sistema utilizado para os cruzamentos (Informação pessoal Jorge Tuzino em 15/09/2015).

Ele utilizou a mesma classificação do IAC, através da partição dos folíolos, e todas

as progênies com mais de três folíolos foram reconhecidas como híbridos. As progênies com apenas dois folíolos ela chamou de “açai melhorado”, pois apresentava os folíolos como nos açazeiros, porém mais largos, que formavam plantas tolerantes a insolação, sombreamento e encharcamento, sendo mais vigorosas que os açazeiros da Amazônia e a juçara da Mata Atlântica (Campanelli, 2005; Venturieri et al., 2016) (Figura 1).



Figura 1. Açai melhorado e híbridos no Centro de Educação Ambiental Jorge Tuzino Leite – Miracatu - SP. A; Jussara Fernanda Santos, Jorge Tuzino Leite e prof. Giorgini Augusto Venturieri, juntos a um “açai melhorado” adulto. B; Progênies com morfotipos com mais de três folíolos e bifoliolados. C; Progênies de “açais melhorados” em área alagada.

Apesar desses híbridos terem sido estudados nas unidades do IAC, o que possibilitou a certificação genética de alguns

dos morfotipos quando foram formados por polinização controlada (Balvé, 1988; Sawazaki et al., 1998), ainda existem muitas lacunas sobre a formação deles por polinização aberta, principalmente em relação a correta classificação do morfotipo conhecido como “açai melhorado”, que é fenotipicamente idêntico ao genitor feminino, mas apresenta vigor e boa adaptação às condições climáticas, com temperaturas mais amenas, o que levantou a suspeita de que também possam ser híbridos (Venturieri et al., 2016; Zambonim et al., 2016). A dificuldade na classificação dessas progênies dificulta todo o processo de melhoramento de *E. oleracea* por hibridação espontânea com *E. edulis*, pois se forem híbridos interespecíficos, as condições biológicas e agrônômicas são distintas das espécies biológicas (Tibério et al., 2012).

No estado de Santa Catarina a experiência de hibridação entre as duas espécies, por polinização aberta, vem sendo desenvolvida por agricultores que se dedicam ao cultivo e extração de palmito, principalmente nos municípios de Urussanga, Guaruva e Joinville. No entanto, esta atividade ainda é cercada de lacunas, pois depende da associação de muitos fatores bióticos e abióticos e não existem informações sobre os estoques iniciais de diversidade disponíveis em coleções de germoplasma de *Euterpe* spp. localizadas nessas regiões, tão pouco sobre o

funcionamento do sistema de fecundação de açazeiros quando submetidos à hibridação espontânea com palmeira juçara em condições de clima subtropical, o que torna impossível prever o sucesso da hibridação e as combinações dos genótipos. Diante disso, a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI - SC iniciou estudos com experimentos de caracterização, manejo e melhoramento genético com espécies e híbridos desse gênero (Zambonim et al., 2016).

Até recentemente, nas regiões sul e sudeste brasileiras, as iniciativas de melhoramento e hibridação entre açazeiros e juçaras focaram apenas o aproveitamento do palmito, mas atualmente existe forte tendência do mercado para o consumo dos frutos dessas espécies em forma de polpa, devido à grande quantidade de antocianina que contém (Bobbio et al., 2000; Menezes et al., 2008), o que tem despertado a atenção das instituições de pesquisa detentoras de banco de germoplasma dessas espécies, voltada para produção de frutos (Zambonim et al., 2016).

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites, ou sequências de repetição simples (SSR), vêm sendo empregados com sucesso na caracterização de coleções de germoplasma de diversas espécies de interesse econômico e ecológico (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Gaiotto et al., 2003; Aguiar

et al., 2007; Weiler et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Reis et al., 2011). Foram desenvolvidos 18 marcadores desse tipo para *E. edulis*, dos quais sete foram transferidos para *E. oleracea* (Gaiotto et al., 2001), o que possibilitou a aplicação deles em diferentes populações e grupos de genótipos desse gênero (Gaiotto et al., 2001; Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2012; Azevedo et al., 2018).

Esta pesquisa justifica-se pela importância da caracterização de germoplasma em programas de melhoramento, foi concebida a partir da necessidade de preencher lacunas sobre a formação por polinização aberta dos híbridos entre açaizeiros e juçaras, aferir os estoques de diversidade da coleção de germoplasma de *Euterpe* spp., que compõe a coleção da EPAGRI-EEI, além de elucidar alguns aspectos biológicos básicos envolvidos nessa prática. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram;

- A partir de microssatélites, estudar os acessos adultos da coleção de germoplasma de *Euterpe* spp. da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Estação Experimental de Itajaí (EPAGRI-EEI) e

identificar grupos divergentes para obtenção de combinações com alta diversidade.

- Caracterizar o sistema de fecundação e realizar um teste de paternidade em três grupos de progênies de *E. oleracea* submetidas a hibridação interespecífica espontânea com *E. edulis* e identificar os doadores de pólen e os híbridos bífoliolados, além de avaliar a variabilidade e estrutura genética dos grupos e gerar informações úteis para programas de melhoramento de *Euterpe* ssp. em clima subtropical.

Os objetivos são apresentados em capítulos distintos, os quais são referentes a dois artigos submetidos à Revista de La Facultad de Agronomía, La Plata – ISSN-0041-8676. Por conveniência, esta tese foi formatada a partir das normas desta revista.

## REFERÊNCIAS

Aguiar, M.S., D.F. Ferreira, A.M. Aguiar, O. Bison, G.D.S.P. Rezende & D. Grattapaglia. 2007. Potencial de híbridos entre clones-elite de eucalipto por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 7: 1007-1012.

Azevedo, H.D.S., P.B. Rufino, L.D.N. Cavalcante, J.M.A. de Azevedo, L.D.O. Wadt, & T.D. Campos. 2018. Avaliação da transferibilidade para *Euterpe precatória* de marcadores microssatélites desenvolvidos para *Euterpe edulis*. In: Congresso Norte - Nordeste de pesquisa e Inovação.

Ballvé, R.M.L. 1988. Isoenzimas como marcadores genéticos em palmitero (*Euterpe* spp.). Dissertação de Mestrado em Biologia, IB-UNICAMP, Campinas, Brasil. 116 pp.

Bobbio, F.O., J.I. Druzian, P.A. Abrão, P.A. Bobbio & S. Fadelli. 2000. Identification and quantification of the anthocyanins from the fruit of açai (*Euterpe oleracea*) Mart. *Food Science and Technology* 20: 388-390.

Bovi, M.L.A. 1984. Pesquisas em desenvolvimento com o açazeiro no Instituto Agrônomo, Estado de São Paulo. O Agrônomo, publicação técnica N° 2. 178pp.



Bovi, M.L.A., G. Godoy-Júnior & L.A. Saes, 1987a. Pesquisas com os gêneros *Euterpe* e *Bactris* no Instituto Agronômico de Campinas. O agrônomo 39: 129-174.

Bovi, M.L.A., G.G. Júnior & L. A. Sáes. 1987b. Híbridos interespecíficos de palmitheiro (*Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*). Bragantia 2: 343-363.

Campanili, M. 2005. Jorge Tuzino e o Palmito no Vale do Ribeira. Fundação S.O.S. Mata Atlântica, RR Donnelley – serviços gráficos, São Paulo, 93 pp.

Campos, D.S., M.L.A. Bovi & M. Laderoza. 1991. Caracterização do palmito obtido de algumas combinações híbridas entre Açaí e Juçara cultivadas sob diferentes condições. Pesquisa Agropecuária Brasileira 5: 637-646.

Clement, C.R., E. Lleras, J. Van Leeuwen. 2005. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. Agrociência 9: 67-71.

Ferreira, M.E. & D. Grattapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasília, 220 pp.

Gaiotto, F.A., R.P.V. Brondani & D. Grattapaglia, 2001. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae). Molecular Ecology Notes 1:86-88.

Gaiotto, F.A., D. Grattapaglia & R. Vencovsky. 2003. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). Journal of Heredity 5: 399-406.

Henderson, A. & G. Galeano, 1996. *Euterpe*, *Prestoea*, and *Neonicholsonia* (Palmae). Flora Neotropica 72: 1-89.

Henderson, A. 2000. The genus *Euterpe* in Brasil. In: M.S. Reis & A. Reis (Eds.). *Euterpe edulis* Martius - (Palmitreiro) biologia, conservação e manejo. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, SC. 335p.

Kiyuna, I.,M.M.D. Santiago & M.L.A. Bovi. 1997. Simulação da viabilidade econômica da cultura do palmitreiro híbrido (*Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*) no estado de São Paulo. Informações Econômicas 4: 25-40.

Mac Fadden, J. 2005. A produção de açaí a partir do processamento dos frutos do palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius) na Mata Atlântica. Dissertação de Mestrado em

Agroecossistemas, UFSC, Florianópolis, Brasil. 100 pp.

Matos, D.M.S & M.L. Bovi. 2002. Understanding the threats to biological diversity in southeastern Brazil. *Biodiversity & Conservation* 11:1747-1758.

Menezes, E.M.S., A.T. Torres, A.U.S. Srur. 2008. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) liofilizada. *Acta Amazônica* 38: 311-316.

Nogueira, A.K.M., A.C. de Santana & W.S. Garcia. 2015. A dinâmica do mercado de açaí fruto no Estado do Pará: de 1994 a 2009. *Ceres* 60: 324-331.

Oliveira, M.S.P & K.J.D.E. Silva. 2008. Diferenciação genética entre procedências de açaizeiro por marcadores RAPD e SRR. *Revista Brasileira de Fruticultura* 30: 438-443.

Oliveira, M.S.P., S. Mochiutti & J.T. Farias Neto. 2009. Domesticação e melhoramento do Açaí. Em: Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas. A. Borém, M.T.G. Lopes & C.R. Clement (coordenadores). Viçosa, MG. 207-236 pp.

Oliveira, M.S.P., J.B. Santos, E.P. Amorim & D.F. Ferreira. 2010. Variabilidade genética

entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. *Ciência Agrotécnica* 34: 1253 -1260.

Oliveira, M & E. Sanches. 2012. Diversidade genética em genótipos de açaizeiro tipo violáceo e tipo branco por marcadores SSR. Congresso Brasileiro de Fruticultura, Bento Gonçalves. Anais Sociedade Brasileira de Fruticultura.

Reis, M.S. 2000. *Euterpe edulis* Martius- (Palmiteiro): biologia, conservação e manejo. Herbário Barbosa Rodrigues.

Reis, R.V.D., E.J.D. Oliveira, A.P. Viana, T.N.S. Pereira, M.G. Pereira & M.G.D.M. Silva. 2011. Genetic diversity in recurrent selection of yellow passion fruit detected by microsatellites markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 51-57.

Rogez, H. 2000. Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação. Belém, PA:Universidade Federal do Pará.

Resende, M.D.V., A.R. Higa. 1990. Estratégias de melhoramento para eucaliptos visando à seleção de híbridos. *Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo. Publicação técnica* N° 21. 49-60 pp.

Sawazaki, H.E., M.L.A. Bovi, L. Sodek & C.A. Colombo. 1998. Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD. *Revista Brasileira de Biologia* 58: 681-691.

Trevisan, A.C.D., A.C. Fantini, A.L. Schmitt-Filho & J. Farley. 2015. Market for Amazonian açai (*Euterpe oleraceae*) stimulates pulp production from Atlantic Forest juçara berries (*Euterpe edulis*). *Agroecology and Sustainable Food Systems* 39: 762-781.

Weiler, R.L., E.C. Brugnara, M. Bastianel, M.A. Machado, P.V.D. de Souza & S.F. Schwarz. 2009. Teste de paternidade e avaliações agrônômicas de possíveis híbridos de tangerineira 'Sunki'. *Scientia Agraria* 10:429-435.

Venturieri, G.A., J.F. Santos, F.M. Zambonim & P.R.M. Miller. 2016. Histórico e metodologia usadas para formar os híbridos de *Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis* pelo agricultor Jorge Leite Tuzino. Congresso Brasileiro de Fruticultura, São Luiz, Maranhão. Anais Sociedade Brasileira de Fruticultura.

Zambonim, F.M., G.A. Venturieri, K.H. Mariguele, P.R.M. Miller & J.F. Santos. 2016. Frequência de morfotipos de plântulas obtidas da hibridação espontânea entre *Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis* em clima

subtropical. Congresso Brasileiro de Fruticultura, São Luis, Maranhão. Anais Sociedade Brasileira de Fruticultura.

## **Variabilidade genética entre e dentro de grupos de *Euterpe* spp. com base em microssatélites**

### **Resumo**

Objetivou-se neste trabalho estudar a diversidade entre e dentro de acessos da coleção de *Euterpe* spp. da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Estação Experimental de Itajaí (EPAGRI-EEI) e identificar grupos dissimilares que possam orientar cruzamentos dirigidos para obtenção de combinações genotípicas desejáveis. Para tal, foram testados 18 marcadores microssatélites, previamente desenvolvidos para *Euterpe edulis* Mart. Seis deles – EE54, EE59, EE03, EE45, EE52 e EE59 – foram eficientes e empregados na obtenção das estimativas desejadas. Foram revelados em média 15 a 4 alelos por grupo, sendo que o conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,305 a 0,835. A partir da AMOVA, foram obtidos valores de variação de 13% entre grupos, 47 e 40% entre e dentro dos acessos, respectivamente. O Método bayesiano indicou a formação de quatro grupos, a partir do dendrograma com o método Ward, com 50% do valor de dissimilaridade foi possível ilustrar os quatro grupos formados entre os acessos, além de indicar os acessos com

dissimilaridade baixa ( $\leq 10\%$ ). A diversidade encontrada possibilita a orientação de cruzamentos dirigidos, tanto para formação de híbridos intra e interespecíficos, como para retrocruzamentos.

Palavras-chave: Juçara; Açai; Híbridos; AMOVA; Ward.



## **Genetic variability between and within groups of *Euterpe* spp. based on microsatellites**

### **Abstract**

The objective of this article is to study the diversity between and within groups of accesses of the *Euterpe* spp. germoplasm collection of the Agricultural Research and Rural Extension Company of Santa Catarina - Itajaí Experimental Station and to identify dissimilar groups that could guide targeted crosses in order to obtain desirable genotypic combinations. Therefore, 18 microsatellite markers, previously developed for *Euterpe edulis* Mart., were tested. Six of them - EE03, EE45, EE47, EE52, EE54 and EE59 - were efficient and used to obtain the desired estimates. The average polymorphic information content varied from 0.305 to 0.835. Through the AMOVA, variation values of 13% were obtained between the groups, 40 and 47% within and between the accessions. The Bayesian Method indicated the formation of four groups and from the dendrogram with the Ward method, 50% of the dissimilarity value was possible to illustrate them, besides indicating the accesses with low dissimilarity ( $\leq 10\%$ ). The diversity found allows the orientation of directed crosses, both for intra

and interspecific hybrids formation and for backcrossing.

Keywords: Juçara; Acai; Interspecific hybrid; AMOVA; Ward.

## INTRODUÇÃO

As hibridações intra e interespecíficas são técnicas amplamente utilizadas por melhoristas e tem como objetivo principal potencializar a variabilidade genética das espécies vegetais de interesse econômico (Bovi et al., 1987; Cruz et al., 2008). As combinações intraespecíficas no gênero *Euterpe* vêm sendo estudadas tanto para obtenção de palmito como para frutos, o que culminou, por exemplo, com o lançamento da variedade de *E. oleracea* denominada BRS Pará (Oliveira et al., 2011). A hibridação interespecífica no gênero teve o objetivo de obter a associação das características desejáveis das espécies, como no caso dos híbridos *E. oleracea* x *E. edulis*, que reúnem a característica de perfilhamento de *E. oleracea* e o sabor do palmito de *E. edulis* (Bovi, 1984; Venturieri et al., 2016).

A técnica foi aprimorada utilizando a polinização controlada em cruzamentos interespecíficos, recíprocos e retrocruzamentos (Bovi et al., 1987; Campos et al., 1991). A superioridade dos híbridos (*E. oleracea* x *E. edulis*) em relação aos seus parentais foi constatada a partir da heterose (Bovi, 1984; Bovi et al., 1987), qualidade do palmito (Campos et al., 1991) e viabilidade econômica (Kiyuna et al., 1997). Outra combinação obtida foi o híbrido *E. precatória* x

*E. spiritosantenses* (Oliveira et al., 2010). Inicialmente estas hibridações foram desenvolvidas apenas para aproveitamento do palmito (Bovi, 1984; Bovi et al., 1987) e atualmente são cogitadas como uma possibilidade de desenvolvimento de genótipos melhorados para produção de frutos (Zambonim et al., 2016).

Quando as combinações de genótipos ocorrem por polinização controlada, geralmente os cruzamentos são orientados por informações baseadas na variabilidade das características fenotípicas dos acessos, sendo mensurada principalmente por índices de diversidade, pela predição de valores genéticos e capacidade específica de combinação (Rocha et al., 2007). Quando os cruzamentos ocorrem por polinização aberta ficam sujeitos ao acaso, sendo impossível prever os genótipos que serão formados. O sucesso dessas combinações está diretamente relacionado com a manutenção da diversidade e a obtenção de melhores gerações que apresentem junção de atributos desejáveis (Lanza et al., 2000). Neste contexto, o prévio conhecimento sobre a distribuição da variabilidade genética entre e dentro grupos e acessos torna-se fundamental (Aguiar et al., 2007; Furlan et al., 2007; Oliveira et al., 2007).

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites, ou sequências de repetição

simples (SSR), vêm sendo empregados com sucesso em espécies florestais de interesse econômico (Aguiar et al., 2007; Oliveira et al., 2010). Estes marcadores são úteis para gerar informações que embasam estratégias de conservação (Gaiotto et al., 2003) e de melhoramento (Chagas et al., 2005; Manfio et al., 2012). Por isso, foram desenvolvidos 18 marcadores desse tipo para *E. edulis*, dos quais sete foram transferidos para *E. oleracea* (Gaiotto et al., 2001) o que possibilitou a aplicação de alguns deles nesta espécie (Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2010). A partir desses marcadores, a divergência genética entre os acessos de açazeiros e dos híbridos *E. precatória* x *E. espiritosantenses* foi estimada com sucesso, sendo a informação útil para quantificação dos estoques de diversidade e previsão das melhores combinações entre os acessos (Oliveira et al., 2010).

O constante crescimento do mercado de palmito e o atual cenário de expansão do mercado de frutos de *E. oleracea* para fabricação da polpa de açaí, conseqüentemente promove a expansão das áreas cultivadas com esta espécie, diante disso fica evidenciada a necessidade do desenvolvimento de genótipos melhorados e adaptados as condições ambientais de outras localidades. O prévio conhecimento sobre os estoques de diversidade torna-se relevante

para condução de estratégias de cruzamentos e combinações, sendo uma ferramenta importante que pode determinar o sucesso do programa de melhoramento. Portanto, objetivou-se neste trabalho estudar os acessos da coleção de plantas de *Euterpe* spp. da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Estação Experimental de Itajaí (EPAGRI-EEI) e identificar grupos divergentes para obtenção de combinações com alta diversidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na EPAGRI – EEI (26° 57' 06" S 48° 45' 38" W), na coleção de plantas de *Euterpe* spp. que é composta por 81 indivíduos adultos, divididos em três grupos: 48 acessos de *E. edulis* (EE), 15 acessos de *E. oleracea* (EO) e 18 acessos de híbridos *E. oleracea* x *E. edulis* (H).

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da EEI. O DNA genômico foi extraído do tecido foliar fresco das 82 amostras, seguindo o protocolo definido por Doyle (1991), com alterações na adição de SDS na etapa de lise e acetato de sódio 3M na etapa de precipitação do DNA. A quantidade e a qualidade do DNA foram medidas em biophotometer (Eppendorf, Germany) e foram preparadas soluções de

trabalho na concentração de 20ng de DNA por mililitro. Dezoito marcadores, os quais foram desenvolvidos previamente para *E. edulis* (Gaiotto et al., 2001), foram testados para as amostras de *E. oleracea* e híbridos previamente. Para as reações de PCR foi utilizada a técnica do iniciador M13 (Schuelke, 2000). As reações continham 40ng de DNA, PCR buffer 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,20 mM de cada dNTP, 0,40 µM de iniciador reverso, 0,10 µM de iniciador frontal e 0,4 µM de iniciador M13 marcado com fluorescência, 1,0 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), com volume final de 20µL. Três diferentes fluoróforos foram usados (6-FAM, VIC e PET – Applied Biosystems, Germany).

As reações foram realizadas em um termociclador Veriti (Applied Biosystems) com o seguinte programa: desnaturação inicial por 5 min a 94°C, 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a temperatura de anelamento sugerida por Gaiotto et al. (2001), com exceção do loco EE52 que foi 58°, e 1 min a 72°C, 8 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 53°C, e 1 min a 72°C e uma extensão final de 30 min a 72°C. A análise dos padrões de fragmentos amplificados foi realizada em analisador genético automático AB 3130 (Applied Biosystems) com capilar de 36 cm e polímero POP7 seguindo as recomendações do fabricante. Os dados de amplificação de bandas foram anotados em número de pares

de bases (pb), conforme a genotipagem fornecida pelo programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

O programa GenAlex (Peakall & Smouse, 2006) foi usado para a avaliação da variabilidade dentro e entre os grupos e acessos, com a significância testada a partir de 999 permutações para a obtenção das seguintes estimativas: número de alelos por loco ( $N_a$ ), número efetivo de alelo ( $N_e$ ) alelos privados ( $A_p$ ). Com este mesmo programa foi estimada a matriz de distância genética entre os acessos.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) (Weir, 1996) foi estimado para cada loco com auxílio do programa Cervus 3.0 (Marshall et al., 1998, Kalinowski et al., 2010):

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \left( \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \right)$$

O modelo bayesiano implementado pelo programa Structure (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) foi aplicado para inferir o número de grupos. Para a inferência populacional produzida foi executada com a informação das populações pré-definidas, para o modelo misto e com frequência correlacionada. A análise do número de grupos (K) foi executada para valores que variaram de 1 a 20 com dez cadeias



independentes, cada cadeia com um comprimento de 50.000 iterações, seguida por 100.000 repetições do número de MCMC (cadeia de Markov e Monte Carlo).

O agrupamento entre os acessos foi construído a partir da matriz estandardizada de divergência genética previamente estimada no GenAlex (Peakall & Smouse, 2006) e gerado a partir do método Ward, usando distancia euclidiana, com a consistência dos nós testada por 999 permutações sobre todos os locos, com auxílio do programa Past (Hammer et al., 2001).

## RESULTADOS

Entre os 18 SSR testados em *E. oleracea* e nos híbridos, seis (EE03, EE45, EE47, EE52, EE54, EE59) foram transferidos para as amostras utilizadas e todos foram altamente polimórficos, com PIC foi acima de 0,5, em *E. edulis* e nos híbridos, exceto EE45 em *E. edulis* que teve valor de 0,489. Com exceção do EE54 que foi altamente polimórfico em todos os grupos, os demais SSR foram menos polimórficos em *E. oleracea*, sendo o EE52 monomórfico para este grupo de genótipos (Tabela 1).

A partir do conjunto dos grupos de acessos foram revelados em média 10 alelos e 5 alelos efetivos por loco. Quanto à frequência de alelos privados, no grupo de

acessos de *E. oleracea* foi de 0,033 e 0,167, em *E. edulis* variou de 0,01 a 0,177 e nos híbridos de 0,2 a 0,088. Enquanto que, em cada grupo os valores de  $N_a$  de 12, 15 e 4 para H, EE e EO, respectivamente. Houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) das fontes de variação da AMOVA, cuja a variação foi composta por 13% entre os grupos e 47 e 40% entre os acessos e dentro dos acessos, respectivamente (Tabela 2).

Na matriz de distância genética formada pelos 81 acessos foram obtidos valores heterogêneos, indo desde muito similares (1) a dissimilares (22). Os acessos mais divergentes foram EO299/EE351 (22), enquanto que os acessos mais divergentes para retrocruzamentos foram H309/EE284 (17) e H324/EO250 (14) no caso de combinações com *E. oleracea*. Considerando os cruzamentos intraespecíficos, a combinação com maior divergência entre os acessos de *E. edulis* seria EE351/EE342(19) e entre os acessos de *E. oleracea* seriam EO250/EO244, EO250/EO252 e EO250/EO254 (10).

Tabela 1. Estimativas de parâmetros genéticos em três grupos de acessos de *Euterpe* spp. a partir de seis locos microsatélites.

Grupos	Locos	Amplitude (P <sub>b</sub> )	N <sub>a</sub>	N <sub>e</sub>	A <sub>p</sub>	PIC
Híbridos	EE03	118-253	12	3,2	2	0,681
	EE45	111-247	9	2,0	4	0,489
	EE47	113-276	15	5,7	5	0,814
	EE52	221-269	14	4,0	3	0,739
	EE54	138-181	13	9,5	-	0,886
	EE59	96-181	13	8,2	4	0,868
<b>Média</b>			<b>12,6</b>	<b>5,46</b>		<b>0,746</b>
<i>E. edulis</i>	EE03	217-251	16	10,96	6	0,901
	EE45	104-132	9	2,80	4	0,619
	EE47	237-286	16	7,97	7	0,862
	EE52	221-280	20	10,0	9	0,893
	EE54	128-179	20	10,1	5	0,894
	EE59	96-128	9	6,96	2	0,841
<b>Média</b>			<b>15</b>	<b>8,14</b>		<b>0,835</b>
<i>E. oleracea</i>	EE03	214-217	2	1,38	1	0,239
	EE45	111-113	2	1,22	-	0,164
	EE47	233-237	2	1,64	-	0,315
	EE52	221	1	1	-	0,0
	EE54	138-181	13	9,37	1	0,884
	EE59	106-167	4	1,32	-	0,232
<b>Média</b>			<b>4</b>	<b>2,65</b>		<b>0,305</b>

*P<sub>b</sub>*= pares de base; *N<sub>a</sub>*= número de alelos; *N<sub>e</sub>*= número efetivo de alelos; *A<sub>p</sub>*= alelos privado; *PIC*= conteúdo de informação polimórfica.

Tabela 2. Análise de variância molecular

Fonte	GL	SQ	QM	Estatística de variação	% Variação
Entre grupos	2	79043,391	39521,695	688,775	13
Entre acessos	79	578064,798	7317,276	2565,300	47
Dentro acessos	82	179307,500	2186,677	2186,677	40
Total	163	836415,689		5440,751	100

*GL grau de liberdade; SQ soma dos quadrados; MQ média dos quadrados.*

A utilização do modelo com base em estatística bayesiana permitiu identificar quatro grupos (Figura 2) com um valor  $F_{st}$  igual 0,4214.

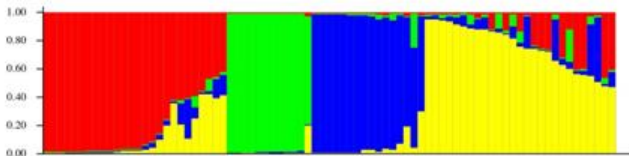


Figura 2. Agrupamento dos acessos para K = 4

O dendrograma gerado apresentou correlação fonética de 0,805 ( $p < 0,0001$ ). Com 50% do valor de distância, possibilitou averiguar quais acessos formaram os quatro grupos, que foram assim representados: I – O maior grupo com 35 acessos, sendo 15 de EO, 16 de H e 4 de EE; II – 12 acessos de EE;

III – 16 acessos de EE e IV com 18 acessos, sendo 16 de EE e dois de H. Com 0,5% de dissimilaridade foram agrupados 16 pares de acessos, além de que no grupo I três subgrupos com até três acessos de *E. oleracea* foram formados, indicando a baixa divergência entre eles (Figura 3).

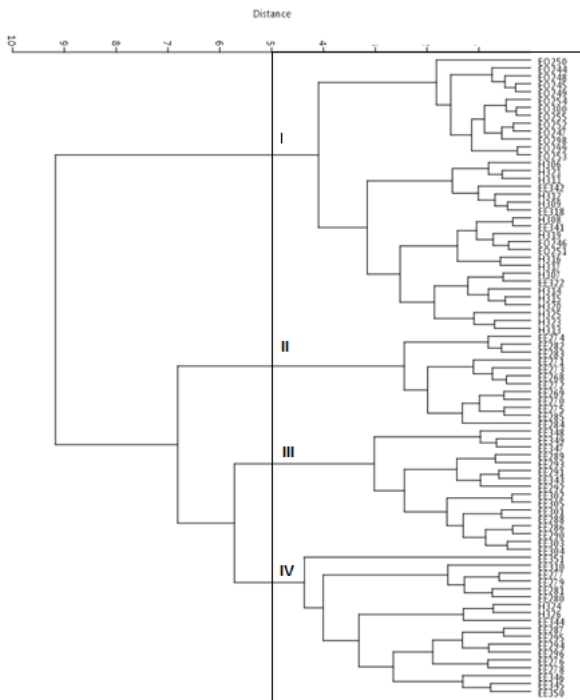


Figura 3. Agrupamento pelo método Ward entre acessos de *Euterpe* spp. da coleção da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina- Estação

Experimental de Itajaí – EPAGRI – EEI. Grupos formados a partir de 50% de dissimilaridade.

## DISCUSSÃO

Entre os SSR transferidos para *E. oleracea* no presente estudo, quatro deles (EE45, EE47, EE52 e EE59) nunca haviam sido empregados nesta espécie, sendo os locos EE2, EE3, EE8, EE15, EE23, EE43 e EE54 os únicos que já foram utilizados anteriormente (Gaiotto et al., 2001; Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2010). Azevedo et al. (2018) confirmaram a eficiência dos 18 locos em *E. precatória*, sendo que entre estes, EE2, EE3, EE8, EE15 e EE43 também já foram empregados com sucesso em acessos da cultura do dendê (*Elalis guinensis*) (Costa et al., 2012).

A transferência desses marcadores é possível devido à conservação de sítios que flanqueiam os microssatélites (Ferreira & Gratapaglia, 1998; Alves, 2002; Pinto, 2007). No gênero *Euterpe*, Oliveira et al. (2016) constataram que *E. precatória* possui um genoma maior que o de *E. edulis* e *E. oleracea*, sendo os arranjos estruturais dos cromossomos as principais forças de evolução que atuam sobre o cariótipo, o que faz com que as espécies possuam um nível

intermediário de evolução dentro da família. Esta é uma característica desejável, principalmente tratando-se de espécies com potencial econômico ou ecológico, pois diminui o tempo e os custos empregados nas análises (Ferreira & Gratapaglia, 1998; Alves, 2002; Pinto, 2007).

Os seis locos transferidos detectaram níveis heterogêneos de variação genética molecular nos grupos avaliados. A variabilidade alélica foi inferior em *E. oleracea*, sendo que entre os quatro alelos revelados nesse grupo, dois foram privados e apresentaram frequências superiores a 0,03, portanto contribuíram para as estimativas de diversidade. O PIC também foi inferior nesse grupo, segundo Botstein et al. (1980) valores de PIC acima de 0,5 são altamente satisfatórios e representam o alto poder discriminatório do marcador, enquanto que valores entre 0,5 e 0,3 são medianos e menores que 0,200 são baixos e indicam baixo poder discriminatório dos locos. A partir dessa abordagem, com exceção do EE54 e EE47, os demais locos foram pouco polimórficos, com baixo poder de discriminação. Além disso, nesses acessos o EE52 foi monomórfico, segundo Azevedo et al. (2018) isso pode ser uma consequência de que o loco seja parte de fragmentos de genes conservados.

Para os demais grupos de acessos, os níveis de variabilidade alélica e polimorfismos foram altos em todos os locos, equivalentes ou superiores ao detectado em populações e acessos de *E. oleracea* localizados na região amazônica (Oliveira et al., 2010; Costa et al., 2012; Benvindo et al., 2018; Azevedo et al., 2018) e populações naturais de *E. edulis* (Gaiotto et al., 2003; Conte et al., 2005). Os resultados indicam que o número de amostras pode ter sido limitado para detectar alelos com frequências baixas nos acessos de *E. oleracea*, o que provavelmente não ocorreu nos demais grupos.

A partir da AMOVA constatou-se diferença significativa entre os três grupos, indicando estruturação genética, que pode ser atribuída à divergência genética que existe entre as espécies *E. oleracea* e *E. edulis*, que possuem origens e perfis genéticos distintos (Sawazaki et al., 1998; Martins et al., 2007). No entanto, a maior variabilidade está distribuída entre e dentro dos acessos que compõem os três grupos. Os resultados obtidos a partir da abordagem bayesiana corroboram com resultados da AMOVA, pois, a formação de quatro grupos fortalece a hipótese de existência de estruturação genética, sendo que o conjunto dos genótipos avaliados pode ser considerado diversificado e promissor para formação de combinações para programas de melhoramento.



A correlação cofenética foi alta, indicando concordância entre os valores de dissimilaridade e matriz usada para o agrupamento pelo método Ward. Quando cortado a partir de 50% do valor de dissimilaridade a formação dos quatro grupos fica visível, sendo condizente com resultado obtido pelo método com estatística bayesiana. Os resultados obtidos permitem inferir que existe sub estruturação dentro do grupo de acessos de *E. edulis* que compõe a coleção da EEI. Estes resultados indicam também uma maior similaridade entre os acessos de *E. oleracea* e híbridos, o que levou a maioria deles pertencerem a um único grupo. Resultado similar foi obtido com emprego de isoenzimas em *Euterpe* spp. da coleção de germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas, na qual os híbridos também se apresentaram mais próximos de *E. oleracea*, espécie utilizada como progenitor feminino (Sawasaki et al., 1998).

Os resultados possibilitam a instrução das combinações com maior divergência, sendo o cruzamento mais divergente entre acessos das distintas espécies, como já era esperado. No entanto, a alta divergência entre os acessos de *E. edulis* e a sub estruturação desse grupo indica o potencial dos cruzamentos intraespecíficos entre acessos dessa espécie. A alta diversificação entre e dentro de indivíduos dessa espécie é

corriqueiramente relatada em estudos desenvolvidos em populações naturais, sendo relacionada a diversos os fatores: funcionamento do sistema reprodutivo, padrões de dispersão de pólen e sementes, grau de fragmentação e conservação de remanescentes florestais, além da procedência geográfica (Gaiotto et al., 2003; Seoane et al., 2005; Conti et al., 2008). Pode-se considerar que esse grupo de genótipos atende o objetivo inicial da formação da coleção de campo da EEI com esta espécie.

Os cruzamentos entre acessos da espécie *E. oleracea* seriam os com menor divergência, o que pode ser justificado pela característica dos acessos estudados, que já passaram por algum processo de seleção antes de serem introduzidos nessa região. Os retrocruzamentos com esta espécie seriam menos divergentes em comparação com os retrocruzamentos com acessos de *E. edulis*. Apesar de não terem sido detectados acessos idênticos, são desestimuladas as combinações que apresentaram alta proximidade genética ( $\geq 10$ ), conforme anteriormente sugerido para coleções de germoplasma de açaizeiros da Amazônia (Oliveira et al., 2010).

Apesar dos híbridos *Euterpe* comercialmente cultivados nas regiões sul serem formados por polinização aberta, através do consórcio entre açaizeiros e

palmeira juçara (Venturieri et al., 2016; Zambonim et al., 2016), o retrocruzamento por polinização controlada é relatado por Campos et al. (1991), com a formação do híbrido (*E. oleracea* x *E. edulis*) x *E. edulis*, indicando que esta já foi uma possibilidade testada para combinação e fixação de caracteres desejáveis. Neste contexto, os resultados obtidos são importantes para instrução das melhores combinações entre os acessos das espécies com os híbridos, indicam que neste caso, a maior heterozigosidade pode ser obtida a partir do uso de alguns acessos de *E. edulis* como genitores.

## **CONCLUSÃO**

Os seis marcadores foram polimórficos para o conjunto de acessos avaliados. Sendo, portanto, eficientes para estimar a variabilidade entre e dentro dos grupos, permitindo a distinção dos genótipos mais similares e mais divergentes. A diversidade encontrada possibilitará a orientação de cruzamentos dirigidos, tanto para formação de híbridos intra e interespecíficos como para retrocruzamentos.

## REFERÊNCIAS

Aguiar, M.S., D.F. Ferreira, A.M. Aguiar, O. Bison, G.D.S.P. Rezende & D. Grattapaglia. 2007. Potencial de híbridos entre clones-elite de eucalipto por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 7: 1007-1012.

Alves, R.M. 2002. Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos. Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 146 pp.

Azevedo, H.D.S., P.B. Rufino, L.D.N. Cavalcante, J.M.A. Azêvedo, L.D.O. Wadt & T.D. Campos. 2018. Avaliação da transferibilidade para *Euterpe precatória* de marcadores microssatélites desenvolvidos para *Euterpe edulis*. Congresso Norte - Nordeste de pesquisa e Inovação, Porto Velho, Rondônia.

Benvindo, F.D., I.D.N. Cavalcante, H.D.S. Azevedo & T.D. Campos. 2017. Diversidade genética de açazeiro (*Euterpe precatória*) no município de Feijó, Acre. Seminário de

Iniciação Científica da UFAC, Rio Branco, Acre.

Bovi, M.L.A. 1984. Pesquisas em desenvolvimento com o açaizeiro no Instituto Agrônômico, Estado de São Paulo. O Agrônômico. Publicação técnica Nº 2. 178 pp.

Bovi, M.L.A., G.G. Júnior & L.A. Sáes. 1987. Híbridos interespecíficos de palmito (*Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*). *Bragantia* 2: 343-363.

Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, & R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 3: 314.

Cavalcante, L.D.N., H.D.S. Azêvedo & T.D. Campos. 2018. Utilização de marcadores microssatélites heterólogos de açaí solteiro. Reunião anual da SBPC UFAL, Maceió, Alagoas.

Campos D.S., M.L.A. Bovi & M. Laderoza. 1991. Caracterização do palmito obtido de algumas combinações híbridas entre Açaí e Juçara cultivadas sob diferentes condições. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 5: 637-646.

Chagas, P.T.K., R.F. Sousa, C.G. Fajardo & F. Almeida Vieira. 2015. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. Revista Brasileira de Ciências Agrárias 10.

Conte, R., M.S. dos Reis, A. Mantovani & R. Vencovsky. 2008. Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. populations: A comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. Journal of Heredity 5: 476-482.

Costa, M., M. Oliveira, S.V. do Nascimento, & C.D.A. Silva. 2012. Transferibilidade de iniciadores microssatélites de açazeiro (*Euterpe oleracea*) para dendazeiro (*Elaeis guineensis*). Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos. Anais da Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, Belém, Pará.

Cruz, T. V., M.M. Souza, F.A. Roza, A.J.C. Viana, G.O. Belo, & J.W.S. Fonseca. 2008. Germinação in vitro de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. Revista Brasileira de Fruticultura 30: 875-879.

Doyle J. 1991. DNA protocols for plants. Molecular techniques in taxonomy. Heidelberg 57: 283-293.

Falush, D., M. Stephens & J.K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.

Ferreira, M.E & Grattapaglia, D. 1998. Introdução al uso de marcadores moleculares em el análisis genético. Brasília. 220 pp.

Furlan, R.D.A., E.S. Mori, E.V. Tambarussi, C.B.D. Moraes, F.A.D. Jesus & L. Zimback. 2007. Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus caribaea* var. hondurensis por meio de marcadores microsatélites. *Bragantia* 553-563.

Kiyuna, I., M.M.D. Santiago & M.L.A. Bovi. 1997. Simulação da viabilidade econômica da cultura do palmitero híbrido (*Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*) no estado de São Paulo. *Informações Econômicas* 4: 25-40.

Gaiotto, F.A., R.P.V. Brondani & D. Grattapaglia. 2001. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes* 2: 86-88.

Gaiotto, F.A., D. Grattapaglia & R.Vencovsky, 2003. Genetic structure, mating system, and

long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity* 5: 399-406.

Hammer, Ø., D.A. Harper & P.D. Ryan, 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1-9.

Henderson, A & G. Galeano. 1996. *Euterpe*, *Prestoea*, and *Neonicholsonia* (Palmae). *Flora Neotropica* 1-89.

Kalinowski, S.T., M.L. Taper & T.C. Marshall. 2010. Corrigendum. *Molecular Ecology* 19: 1265-1514.

Lanza, M. A., C.T. Guimarães & I. Schuster. 2000. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Informe Agropecuário* 21: 97-108.

Manfio, C.E., S.Y. Motoike, M.D.V. de Resende, C.E.M. dos Santos & A.Y. Sato. 2012. Avaliação de progênies de macaúba na fase juvenil e estimativas de parâmetros genéticos e diversidade genética. *Pesquisa Florestal Brasileira* 69: 63.

Marshall, T.C., J.B.K.E. Slate, L.E. Kruuk & J.M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in



natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.

Martins, C.C., M.L.A. Bovi, E.S. Mori & J. Nakagawa. 2007. Isoenzimasna diferenciação de sementes de três espécies do gênero *Euterpe*. *Revista Árvore*31: 51-57.

Oliveira, M.S.P & K.J.D.E. Silva. 2008. Diferenciação genética entre procedências de açazeiro por marcadores RAPD e SRR. *Revista Brasileira de Fruticultura* 30: 438-443.

Oliveira, M.S.P., J.B. Santos, E.P. Amorim & D.F. Ferreira. 2010. Variabilidade genética entre acessos de açazeiro utilizando marcadores microssatélites. *Ciência Agrotécnica* 34: 1253 -1260.

Oliveira, M.S.P., J. Pérez-Jiménez, S. Arranz, R. E. Alves, E.S. de Brito, M.S. Oliveira & F. Saura-Calixto.2011. Açai (*Euterpe oleracea*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International* 7: 2100-2106.

Oliveira, M & E. Sanches. 2012. Diversidade genética em genótipos de açazeiro tipo violáceo e tipo branco por marcadores SSR. *Congresso Brasileiro de Fruticultura. Anais*

Sociedade Brasileira de Fruticultura, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul.

Oliveira, L.C., M.D.S.P. de Oliveira, L.C. Davide & G.A. Torres. 2016. Karyotype and genome size in *Euterpe* Mart. (Arecaceae) species. *Comparative Cytogenetics* 10:17-25.

Peakall, R.O.D & P.E. Smouse. 2006. Genalex 6.0 genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology notes* 1: 288-295.

Pinto, M.F.F.C. 2007. Caracterização de locos microssatélites em duas de abelhas espécies da região amazônica: *Melipona compressipes* e *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). Dissertação de Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil. 66 pp.

Pritchard, J.K., M. Stephens & P.J. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Rocha, M.D.G., I.E. Pires, R.B. Rocha, A. Xavier & C.D. Cruz, 2007. Seleção de genitores de *Eucalyptus grandis* e de *Eucalyptus urophylla* para produção de híbridos interespecíficos utilizando

REML/BLUP e informação de divergência genética. *Revista Árvore* 31: 977-987.

Sawazaki, H.E., M.L.A. Bovi, L. Sodek & C.A. Colombo. 1998. Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD. *Revista Brasileira de Biologia* 58: 681-691.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.

Weir, B.S. 1996. Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates. Sunderland. 377 pp.

Venturieri, G.A., J.F. Santos, F.M. Zambonim & P.R.M. Miller. 2016. Histórico e metodologia usadas para formar os híbridos de *Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis* pelo agricultor Jorge Leite Tuzino. Congresso Brasileiro de Fruticultura. Anais Sociedade Brasileira de Fruticultura, São Luiz, Maranhão.

Zambonim, F.M., G.A. Venturieri, K.H. Mariguele, P.R.M. Miller & J.F. Santos. 2016. Frequência de morfotipos de plântulas obtidas da hibridação espontânea entre *Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis* em clima subtropical. Congresso Brasileiro de

Fruticultura. Anais Sociedade Brasileira de Fruticultura, São Luis, Maranhão.

**Parâmetros genéticos e teste de paternidade em progênies de *Euterpe oleracea* produto da hibridação espontânea com *Euterpe edulis* em clima subtropical**

**Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar o sistema de fecundação e a distribuição da variabilidade molecular entre e dentro de três grupos de progênies de polinização aberta de *Euterpe oleracea*, além de realizar um teste de paternidade para identificação dos genitores masculinos e promover a certificação genética das plântulas bífolioladas. Para tal, foram utilizados seis loci microssatélites em 306 amostras. Os grupos de progênies são resultado de um sistema misto de fecundação, com ausência de cruzamentos entre aparentados, sendo alógamos ( $tm$  e  $ts = 1,0$ ), com correlação de autofecundação ( $rt$ ) igual a 0,110. Foram constatados diferentes graus de parentescos, entre 15,5 a 26,1% de irmãos completos. A paternidade foi atribuída para 51% e 24% das amostras, com 80 e 95% de confiança respectivamente. Foram identificados 22 doadores de pólen e uma autofecundação, verificou-se que o morfotipo bífoliolado não é garantia de cruzamento intraespecífico, já que quatro progênies foram identificadas como híbridos interespecíficos. Foram detectados

em média 7 a 12,3 alelos por locu e uma heterozigosidade média observada entre 0,382 a 0,898 e a esperada entre 0,354 a 0,693. O índice de fixação foi entre -0,053 a -0,319. A variação entre os grupos foi de 5%, sendo 95% dentro deles. Os resultados indicam boas perspectivas para realização de trabalhos futuros relacionados à predição de ganhos genéticos a partir da seleção entre e dentro dos grupos de progênies.

Palavras chave; açaí melhorado, juçara, microssatélites, teste paternidade, polinização aberta.

**Genetic parameters and paternity test in progenies of *Euterpeoleracea* originated from spontaneous hybridization with *Euterpeedulis* in subtropical climate**

**Abstract**

The objectives of this study were to analyze the breeding system and the distribution of molecular variability among and within three groups of open pollinated progenies of *Euterpe oleracea*, in addition to performing a paternity test to identify the male parents and to further the genetic certification of the bifoliolate seedlings. With this purpose, we applied six microsatellite loci markers to 306 samples. The progeny groups are the result of a mixed breeding system, with no crosses between relatives, withal logamy ( $tm$  and  $ts = 1$ ), and self-fertilization correlation ( $rt$ ) of 0.11. Different degrees of kinship were found, with complete siblings between 15.5 and 26.1%. Paternity was attributed to 51% and 24% of the samples, with 80 % and 95% confidence, respectively. Twenty-two pollen donors and one self-fertilization were identified. We also found that the bifoliolate morphotype does not assure the occurrence of intraspecific crosses, since four progenies were identified as interspecific hybrids. A mean from 7 to 12.3 alleles per locus was detected. The average heterozygosity was observed between 0.382

and 0.898 and the expected heterozygosity between 0.354 and 0.693. The fixation index was estimated between -0.053 and -0.319. The variation between groups was estimated at 5% and within groups was 95%. The results indicate good prospects for future work related to the prediction of genetic gains from the selection among and within the progeny groups.

**Keywords;** Genetically improved açaí, Juçara, Microsatellites, Paternity test, Open pollination.



## INTRODUÇÃO

A espécie *Euterpe oleracea* Mart. é conhecida popularmente como açazeiro, sendo distribuída naturalmente por toda região amazônica (Henderson & Galeano, 1996). Devido ao seu potencial comercial, principalmente para oferta de produtos para as indústrias de palmito em conserva e polpa de frutos, sua introdução em várias regiões do Brasil e o estabelecimento de cultivares foi incentivado (Oliveira, 2000). O cultivo desta espécie na região sul apresenta limitações, devido à falta de adaptação a alguns fatores ambientais, como a ocorrência de geadas e fortes ventos. Uma opção de melhoramento dessa espécie para estas condições foi à sua hibridação com a espécie nativa da Mata Atlântica *Euterpe edulis* Mart. ou palmeira juçara, visando a produção de progênes F1 de híbridos interespecíficos com potencial de cultivo comercial (Bovi, 1984; Bovi et al., 1987; Venturieri et al., 2016; Zambonim et al., 2016).

As vantagens agronômicas dos híbridos *Euterpe* spp. foram obtidas a partir da reunião de determinadas especificidades fenotípicas de seus parentais, entre as quais, a capacidade de fixação do perfilhamento em alguns indivíduos e a heliofilia na fase juvenil da planta, características exclusivas do *E. oleracea*, com a qualidade organoléptica do palmito e a adaptação ao clima subtropical de

*E. edulis* (Bovi et al., 1987; Campos et al., 1991). Quando comparados com seus genitores, os híbridos apresentam melhor desenvolvimento vegetativo, maior produtividade de palmito por planta, alto potencial econômico conforme relatado por Bovi et al. (1987), Campos et al. (1991) e Kiyuna et al., (1997).

Estes híbridos podem ser formados através de duas técnicas que foram estudadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, a hibridação espontânea e a polinização controlada (Bovi, 1984). A técnica de hibridação espontânea é a mais utilizada entre os agricultores, sendo a mais difundida nas regiões do Vale do Ribeira-SP e litoral de Santa Catarina, na qual os produtores promovem a facilitação dos cruzamentos interespecíficos através do consórcio entre as duas espécies no mesmo pomar, a uma distância inferior a 10 metros (Venturieri et al., 2016).

Os cruzamentos espontâneos têm exclusivamente plantas de *E. edulis* como doadoras de pólen e plantas de *E. oleracea* como matrizes maternas (Venturieri et al., 2016). As progênies obtidas por este processo apresentam uma elevada variabilidade de morfotipos fenotipicamente observáveis, que podem ser classificados ainda na fase de plântula, a partir da comparação do nível de segmentação da primeira folha, pois *E.*

*edulis* apresenta a primeira folha com seis a oito folíolos com um aspecto palmado, enquanto que em *E. oleracea* a primeira folha é bifoliolada (Belin-Depoux & Queiroz, 1971; Queiroz, 2000; Bovi, 1984; Tibério et al., 2012; Zambonim et al., 2016).

Zambonim et al., (2016) observaram que a ocorrência de morfotipos provenientes de três matrizes de *E. oleracea*, submetidas a hibridação com *E. edulis*, variaram significativamente. Segundo esses autores, a ocorrência de progênies bifolioladas foi superior a todos os demais morfotipos, variando entre 27,5 e 97,4%, enquanto que as progênies com quatro folíolos ocorreram entre 0,8 e 6,7%, com cinco folíolos entre 0 e 12,7% e com seis folíolos entre 1,8 e 41,3% (Zambonim et al., 2016). As progênies com quatro a seis folíolos foram consideradas híbridos interespecíficos, pois apresentaram características do eófilo semelhantes ao *E. edulis*, doador do pólen (Bovi, 1984; Tibério et al., 2012; Zambonim et al., 2016). Enquanto que as progênies bifolioladas, considerando a similaridade com o genitor feminino, foram previamente classificadas como produto de autofecundação em *E. oleracea* (Bovi, 1984; Balvé, 1988; Tibério et al., 2012).

No entanto, estudos sobre o sistema de fecundação de populações de espécies do gênero *Euterpe* indicam que a autofecundação ocorre em proporções bem

menores, sendo questionável a relação previamente estabelecida entre a formação de progênies bífolioladas e este sistema de fecundação (Ballvé, 1988; Gaiotto et al., 2003; Seoane et al., 2005a; Lima, 2014). Além disso, estas progênies, popularmente conhecidas como “açais melhorados”, apresentam boa capacidade de germinação, alto vigor e adaptação às condições climáticas da região sul, o que leva a suspeitar que sejam fruto de cruzamentos interespecíficos (Zambonim et al., 2016; Venturieri et al., 2016). Já foi constatado que a segregação da herança da forma da folha pode ser controlada por genes com efeito aditivo, que levam à formação de híbridos com fenótipos extremos que são idênticos a um dos parentais (Oliveira et al., 2002). Assim, a prévia classificação dessas progênies como *E. oleracea*, produto de autofecundação, pode estar equivocada.

A dificuldade na classificação dessas progênies dificulta todo o processo de melhoramento de *E. oleracea* por hibridação espontânea com *E. edulis*, pois se forem híbridos interespecíficos, as condições biológicas e agrônômicas são distintas das espécies biológicas (Tibério et al., 2012). Isso influencia diretamente nas escolhas dos métodos a serem adotados para a exploração futura desses genótipos. A correta classificação dessas progênies está

relacionada à compreensão do funcionamento do sistema de fecundação das matrizes maternas, diante disso, o melhoramento de *E. oleracea*, por hibridação interespecífica com *E. edulis*, inicialmente deveria ser pautado pela determinação da forma preferencial de acasalamento, além da correta classificação das progênes com fenótipo idêntico ao do genitor feminino.

Além disso, o maior sucesso do melhoramento genético depende do conhecimento de vários aspectos, entre os quais a identificação dos genitores, o conhecimento das relações de parentesco das progênes e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das famílias (Lanza et al., 2000; Coelho et al., 2007; Grattapaglia et al., 2004). Estudos dessa natureza são úteis para auxiliar em diversas fases do melhoramento, como na seleção de matrizes e estratégias de combinação de genótipos, no desenho de esquemas de seleção e na escolha do melhor modelo a ser aplicado na seleção e na predição de ganhos genéticos (Resende et al., 1990; Paula et al., 2002).

Neste contexto, os marcadores microssatélites, ou sequências de repetições simples (SSR), apresentam-se como importantes ferramentas, pois são amplamente indicados para avaliação de diversos parâmetros genéticos em populações de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Para *E. edulis* foram desenvolvidos 18 SSR específicos, dos quais alguns foram transferidos com sucesso para *E. oleracea*, o que possibilitou a aplicação deles nas duas espécies mencionadas (Gaiotto et al., 2001; Oliveira et al., 2010). Considerando que os mercados de palmito e polpa de frutos estão em crescente expansão nos mercados nacional e exterior, o emprego desses marcadores pode ser utilizado para instruir táticas de melhoramento para atender demandas emergenciais de genótipos melhorados, conforme sugerido por Grattapaglia et al. (2004).

O objetivo deste estudo foi, a partir de SSR, caracterizar o sistema de fecundação e realizar um teste de paternidade em três grupos de progênies de *E. oleracea*, produto da hibridação interespecífica espontânea com *E. edulis*, para a identificação dos doadores de pólen e híbridos bifoliolados, além de avaliar a variabilidade e estrutura genética desses grupos e gerar informações úteis para programas de melhoramento de *Euterpe* spp. em clima subtropical.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Caracterização da área e famílias de polinização aberta

Este trabalho foi realizado na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/Estação Experimental de Itajaí (EEI) em Itajaí – SC - Brasil (26° 57' 06" S 48° 45' 38" W). O clima da região é Cfa, subtropical constantemente úmido, sem estação seca definida, com verão quente. A temperatura média da região é de 20°C, a média das máximas é de 27°C e a média das mínimas de 15°C Thomé et al., 1999). A precipitação média anual varia de 1.430 a 1.908 mm (Thomé et al., 1999).

A coleção de palmeiras do gênero *Euterpe* da EEI é composta por acessos de *E. oleracea*, que foram introduzidos na década de 1990 e por acessos de *E. edulis* de diferentes locais do estado de SC. Três plantas matrizes de *E. oleracea*, genitores femininos, foram estabelecidas em consórcio com os indivíduos adultos de *E. edulis* da coleção. Estes acessos estão dispostos em linhas, a uma distância menor que 10 metros entre si, compõem as matrizes maternas e paternas de *Euterpe* de melhoramento da EEI, ocupando uma área de 0,5 ha.

Em julho de 2015 foram coletados frutos formados a partir de polinização aberta,

das três matrizes de *E. oleracea*. Suas sementes foram germinadas na casa de vegetação da EEI, com ambiente controlado. As progênes obtidas foram separadas por matriz materna, denominados grupos um dois e três, respectivamente. Posteriormente foram classificadas em quatro morfotipos de acordo com a partição do limbo foliar da primeira folha fotossinteticamente ativa (eófilo), conforme previamente proposto por Bovi (1984) e Tibério et al. (2012) e realizado por Zambonim et al. (2016) neste mesmo conjunto de progênes (Figura 4).

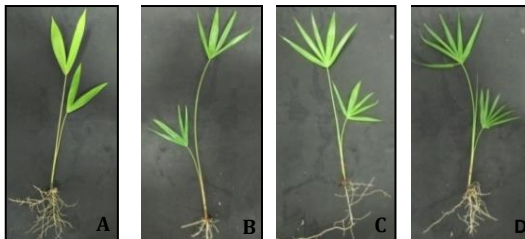


Figura 4. Morfotipos de progênes *E. oleracea* consorciadas com *E. edulis* classificadas de acordo com a partição dos folíolos; A) dois folíolos (bifoliolados); B) quatro folíolos; C) cinco folíolos; D) seis folíolos. Foto: Zambonim et al., 2016.



## **Análise molecular de microssatélites**

O DNA genômico foi extraído do tecido foliar fresco de um total de 306 amostras, sendo 266 progênies e 37 candidatos a genitores masculinos e três genitores femininos, seguindo o protocolo definido por Doyle (1991), com alterações na adição de SDS na etapa de lise e acetato de sódio 3M na etapa de precipitação do DNA. A quantidade e a qualidade do DNA foram medidas em biophotometer (Eppendorf, Germany) e preparadas soluções de trabalho na concentração de 20 ng de DNA por mililitro.

Foram usados os loci EE03, EE45, EE47, EE52, EE54 e EE59, desenvolvidos para *E. edulis* (Gaiotto et al., 2001). A amplificação deles foi a partir da técnica do iniciador M13 (Schuelke, 2000). As reações de PCR continham 40ng de DNA, PCR buffer 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,20 mM de cada dNTP, 0,40 μM de iniciador reverso, 0,10 μM de iniciador frontal e 0,4 μM de iniciador M13 marcado com fluorescência, 1,0 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), com volume final de 20μL. Três diferentes fluoróforos foram usados (6-FAM, VIC e PET – Applied Biosystems, Germany).

As reações foram realizadas em um termociclador Veriti (Applied Biosystems) com o seguinte programa: desnaturação inicial por 5 min a 94°C, 30 ciclos de 45s a 94°C, 45 s a

temperatura de anelamento sugerida por Gaiotto et al. (2001), com exceção do locus EE52 que foi 58°C, e 1 min a 72°C, 8 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 53°C, e 1 min a 72°C e uma extensão final de 30 min a 72°C. A análise dos padrões de fragmentos amplificados foi realizada em analisador genético automático AB 3130 (Applied Biosystems) com capilar de 36 cm e polímero POP7 seguindo as recomendações do fabricante. Os dados de amplificação de bandas foram anotados em número de pares de bases (pb), conforme a genotipagem fornecida pelo programa Gene Mapper 4.0 (Applied Biosystems).

### **Sistema de fecundação e teste de paternidade**

Foram analisadas 34, 134 e 94 indivíduos do grupo um dois e três, respectivamente. Para as estimativas do sistema de fecundação foram utilizados os modelos misto de reprodução e de cruzamentos correlacionados, os quais assumem que as progênies foram geradas por uma mistura de cruzamentos aleatórios e de autofecundação (Clegg, 1980; Ritland & Jain, 1981).

Através de estimativas de máxima verossimilhança (Ritland & Jain 1981), com o auxílio do programa MLTR, foram estimadas

para cada grupo de progênies as taxas de cruzamento multiloco ( $tm$ ) e unilocos ( $ts$ ), cruzamento entre aparentados ( $tm- ts$ ) correlação de autofecundação ( $rt$ ) e de paternidade ( $rp$ ) (Ritland, 2002). O erro padrão dessas estimativas foi calculado pelo método “bootstrap”, utilizando-se 1.000 permutações dentro das progênies (Ritland, 2002).

Para as análises de paternidade foram amostradas a três matrizes maternas de *E. oleracea*, além de 37 acessos de *E. edulis* candidatos a doadores de pólen. Da matriz um foram avaliadas 27 progênies bifolioladas, 4 progênies de quatro folíolos, 3 com seis folíolos. Da matriz dois foram avaliadas 30 progênies bifidas, 29 com quatro folíolos, 40 com cinco e seis folíolos. Da matriz três foram avaliadas 4 progênies bifolioladas, 14 com quatro folíolos, 39 com cinco folíolos e 36 com seis.

Os programas Cervus 3.0 (Marshall et al., 1998, Kalinowski et al., 2010) e GenAlex (Peakall & Smouse, 2006) foram utilizados para gerar estimativas de variabilidade e confirmar a eficiência dos marcadores antes da análise de paternidade e foram estimados o número médio de alelos por locu, a heterozigosidade média observada e esperada, o índice de fixação médio ( $F_{IS}$ ) além do conteúdo médio de informação polimórfica (PIC), calculado pela fórmula:

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \left( \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \right)$$

A probabilidade de um indivíduo ser atribuído como doador de pólen foi realizada a partir da comparação dos genótipos das progênes com os genótipos dos candidatos, através de exclusão de paternidade, com auxílio do programa Cervus 3.0 (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2010). A análise foi realizada a partir de duas simulações, uma sem informar o genitor feminino, outra informando. Em ambas, as três matrizes maternas foram incluídas como possíveis genitores masculinos.

Para cada locu e cada candidato a doador de pólen foi calculada a razão de máxima probabilidade de paternidade (LR), pela seguinte formula;

$$LR = \frac{H(1)}{H(0)}$$

Nesse modelo a hipótese H(1) assume que o candidato é o verdadeiro doador de pólen e a hipótese H(0) representa que o candidato é de ocorrência aleatória na amostragem. A probabilidade total de paternidade foi calculada pela multiplicação do LR de todos loci, assumindo o equilíbrio de

ligação. A partir daí foi calculado um logaritmo natural da probabilidade total, chamado LOD score. A partir da diferença dos valores dos LOD score do primeiro candidato com o do segundo candidato mais provável, foi calculado um delta crítico. A confiança do valor do delta crítico foi simulada com dois níveis, 80% e 95% (Marshall et al., 1998).

Para garantir a participação de todos os alelos revelados na simulação considerou-se a frequência alélica igual à zero, com 10.000 permutações, sendo 0,01 a proporção de erros de digitação, 0,99 a percentagem de locos digitados corretamente. Considerando a possibilidade de fluxo gênico em largas escalas usou-se como 50% a probabilidade de todos os candidatos terem sido amostrados.

A partir dos resultados da simulação com genitor feminino conhecido, foi calculado o sucesso reprodutivo dos doadores de pólen ( $Srp$ ), identificados com 80% de confiança em cada matriz, através pela razão entre número de progênies fecundadas pelo doador de pólen ( $npi$ ) e o número total de progênies com doador de pólen determinado ( $nd$ );

$$Srp = \frac{npi}{nd}$$

## Variabilidade e estrutura genética

Para a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre e dentro dos grupos de progênies formadas por polinização aberta, a partir de distintos cruzamentos em três matrizes de *E. oleracea*, foram empregados seis loci microssatélites. A amostragem dos grupos foi à mesma utilizada nas estimativas do sistema de cruzamento, no entanto, com seis marcadores microssatélites. O programa GenAlex (Peakall & Smouse, 2006) foi usado para obter as estimativas médias da variabilidade intrapopulacional, juntamente com erros padrões, quais sejam; número de alelos por locus ( $N_a$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ), calculada pela proporção entre o número de heterozigotos em cada locus (HL) e o número total de indivíduos amostrados (N), a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, calculada a partir da frequência alélica ( $p_i$ );

$$H_e = 1 - \left( \sum p_i^2 \right)$$

Para avaliar evidências de endogamia foi calculado o índice de fixação  $F_{IS}$ ;

$$F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro dos grupos de progênies foi estimada por análise de variância molecular (AMOVA), sendo a significância testada a partir de 999 permutações, com auxílio do programa GenAlex (Peakall & Smouse, 2006).

## RESULTADOS

A partir dos seis SSR empregados nas amostras de progênies e genitores (306), foram revelados 108 alelos, com média de 18 alelos por locus. Foram obtidas as seguintes estimativas; heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) 0,700, observada ( $H_o$ ) 0,789, o índice de fixação ( $F_{is}$ ) médio (-0,127), o conteúdo de informação polimórfica (PIC) médio (0,682). O locus EE54 foi o mais polimórfico (0,869) e o EE45 o menos (0,479).

Todos os loci estavam em equilíbrio de Hardy & Weinberg, sendo alto o número médio de alelos e as estimativas de diversidade. Apesar disso, o EE52 foi excluído das análises do sistema de fecundação, pois segundo Ritland & Jain (1981), para o locus ser eficiente ele necessariamente tem que apresentar no mínimo dois alelos iguais, com frequências menores que 0,1, o que não foi possível a partir das amostras utilizadas nesta fase do trabalho.

Foram revelados 83 alelos partir do emprego de cinco loci nas amostras de progênies, que foram suficientes para avaliar o funcionamento do sistema de fecundação dos três grupos. As taxas de cruzamentos multiloci e unilocus foram altas, sem diferença da unidade e indicaram ausência de cruzamentos entre aparentados, nos três grupos de progênies. A correlação de autofecundação foi significativa em todos os grupos e a correlação de paternidade (*rp*) indicou ocorrência de 15 a 26,6% de irmãos completos nos grupos três e dois respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas do sistema de fecundação de três grupos de progênies de *E. oleracea* de polinização aberta em Itajai-SC.

Estimativas	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>tm</i>	1,000 (0,0)	1,000 (0,0)	1,000 (0,0)
<i>ts</i>	1,000 (0,0)	1,000 (0,0)	1,000 (0,0)
<i>tm-ts</i>	0,0	0,0	0,0
<i>rp</i>	0,0	0,261 (0,02)	0,155 (0,01)
<i>rt</i>	0,110 (0,01)	0,110 (0,01)	0,110 (0,01)

*tm* taxa cruzamento multiloci; *ts* taxa de cruzamento unilocus; *tm - ts* taxa de cruzamento entre aparentados; *rp* correlação de paternidade; *rt* correlação de autofecundação, em parênteses o erro padrão.

As atribuições de doadores de pólen foram superiores ao que era esperado, considerando os dois níveis de confiança estimados para os valores do delta crítico. Os valores mais robustos para o delta crítico foram obtidos a partir da simulação com o



genitor feminino conhecido ( $\geq 4,81$  e  $\geq 7,75$ ), nas quais as atribuições foram entre 51% com confiança relaxada e 24% com confiança restrita (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo das atribuições de doadores de pólen para três matrizes maternas de *E. oleracea* sujeitas à hibridação espontânea com *E. edulis* em Itajaí-SC.

Simulações	Confiança	Delta	Atribuições Observadas	Atribuições Esperadas
Genitor feminino conhecido	80%	$\geq 4,81$	51%	10%
	95%	$\geq 7,75$	24%	2%
	Não atribuído		49%	90%
Genitor feminino desconhecido	80%	$\geq 3,88$	41%	0%
	95%	$\geq 5,28$	23%	1%
	Não atribuído		59%	99%

A partir da simulação com o genitor feminino conhecido e 80% de confiança, as matrizes um, dois e três tiveram 14,7, 23, 91 e 32,9% de progênies com atribuições de doadores de pólen. Apenas uma autofecundação foi detectada na matriz um, com 80% de confiança. Com confiança de 95% foram obtidas 2,9, 25,3 e 31,9% de atribuições respectivamente.

Dos 40 supostos genitores masculinos submetidos à análise de paternidade, 22 foram reconhecidos como doadores de pólen. Apenas o acesso EE283 foi compartilhado

entre as três matrizes. Foram detectados seis doadores exclusivos para matriz dois e quatro para matriz três. O sucesso reprodutivo deles foi variável entre as matrizes (Figura 5).

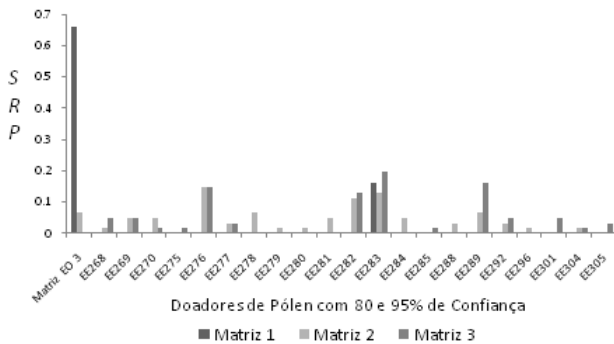


Figura 5. Sucesso reprodutivo dos doadores de pólen (*SRP*) para três matrizes de *E. oleracea* (EO) sujeitas a hibridação espontânea com *E. edulis* (EE) em Itajaí - SC.

Entre as 61 progênies bifolioladas analisadas, a paternidade foi determinada para 12 (19,67%) considerando 80 e 95% de confiança. Entre estes, foram detectados quatro híbridos interespecíficos, fruto dos cruzamentos entre a matriz dois com os acessos EE281 e EE284 e da três com acessos EE289 e EE292 (Tabela 5).

Tabela 5. Teste de paternidade em progênes bífidas de polinização aberta de *E. oleracea* (M1,M2,M3) sujeitas à hibridação com *E. edulis*(EE).

Progênes	Matriz materna ( <i>E. oleracea</i> )	Doador de pólen	Delta	Confiança
1	M1	M1*	5,22	80%
4	M1	M3	5,61	80%
95	M1	M3	5,29	80%
206	M1	M3	5,29	80%
207	M1	M3	5,29	80%
<b>5</b>	<b>M2</b>	<b>EE281</b>	<b>8,84</b>	<b>95%</b>
7	M2	M3	5,29	80%
<b>92</b>	<b>M2</b>	<b>EE284</b>	<b>6,01</b>	<b>80%</b>
211	M2	M3	5,29	80%
212	M2	M3	5,66	80%
<b>9</b>	<b>M3</b>	<b>EE289</b>	<b>6,34</b>	<b>80%</b>
<b>11</b>	<b>M3</b>	<b>EE292</b>	<b>1,71+00 01</b>	<b>95%</b>

\*autofecundação; **Negrito indicam os bífoliolados híbridos interespecíficos**

Alta variabilidade intrapopulacional foi detectada a partir das estimativas do número médio de alelos ( $N_a$ ), heterozigosidades médias esperadas ( $H_e$ ) e observadas ( $H_o$ ), sendo os valores médios do índice de fixação ( $F_{IS}$ ) negativos e significativos em todas as populações (Tabela 6).

Tabela 6: Variabilidade genética em três grupos de progênies de *E. oleracea* produto da hibridação espontânea com *E. edulis* em Itajai-SC.

Médias Grupos (se)	$N_a$	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$
Um	7 (1,21)	0,382 (0,125)	0,354 (0,105)	-0,053 (0,036)
Dois	12,3 (1,4)	0,824 (0,052)	0,623 (0,031)	-0,319 (0,021)
Três	10,83 (1,35)	0,898 (0,068)	0,693 (0,053)	-0,298 (0,044)
Média geral (se)	10,05 (0,906)	0,702 (0,073)	0,557 (0,052)	-0,223 (0,035)

*número médio de alelos ( $N_a$ ); heterozigosidade média observada ( $H_o$ ); heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ); Índice de Fixação ( $F_{is}$ ); erro padrão (se).*

Houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) das fontes de variação da AMOVA, constatou-se que 95% da variação esta dentro das progênies e 5% entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo da análise de variância molecular (AMOVA).

Fonte da Variação	GL	SQ	MQ	Estatística de variação	%
Entre Grupos	2	23738.697	11869.349	73.221	5%
Dentro de grupos	266	386758.296	1453.979	1453.979	95%
Entre as progênies	263	101318.401	385.241	0.000	0%
Total	531	511815.395		1527.199	100%

*GL grau de liberdade; SQ soma dos quadrados; MQ média dos quadrados.*

## DISCUSSÃO

As estimativas das taxas de cruzamento foram altas e superiores as estimativas obtidas com o mesmo conjunto de marcadores em *E. edulis* (Gaiotto et al., 2003; Seoane et al., 2005b; Conte et al., 2008) e em *Euterpe precatória* Mart. (Lima et al., 2014) e equivalentes as estimativas com emprego de isoenzimas (Conte et al., 2008). No entanto, segundo Seeben et al. (2000) altas taxas de cruzamento possivelmente são obtidas a partir da seleção contra genótipos formados por autofecundação ou cruzamentos entre aparentados, pois muitas sementes podem apresentar genes letais ou deletérios em homozigose, que são eliminados ou por aborto ou durante a germinação. Evidências sobre a ocorrência de autoincompatibilidade em alguns genótipos de *E. oleracea*, que não emitem frutos quando são cultivados isoladamente (Oliveira et al., 2000) e da ocorrência de 13,6% de perda de germinação das sementes destas mesmas safras de progênes, conforme relatado por Zambonim et al. (2016), corroboram com esta hipótese.

Pode-se considerar que estes aspectos são favoráveis ao melhoramento genético a partir da formação espontânea de híbridos interespecíficos entre as duas espécies. Contudo, os valores da correlação de autofecundação ( $rt$ ) indicam a ocorrência de

autofecundação em ambas populações, sugerindo que algumas sementes fruto de formadas por este sistema foram germinadas, o que denota que possuem um sistema misto de fecundação, com predomínio de alogamia.

A correlação de paternidade já foi previamente investigada em populações naturais de *E. edulis*, Conte et al. (2008) detectaram 10% de irmãos completos e Seoane et al. (2005a) entre 10 a 22%. No entanto, uma proporção de até 70% de irmãos completos já foi relatada por Gaiotto et al. (2003). Estes resultados, juntamente com os resultados obtidos no presente estudo, evidenciam que os cruzamentos biparentais ocorrem em diferentes intensidades, provavelmente, devido a uma combinação de fatores ambientais que variam entre os locais e entre os anos (Gaiotto et al., 2003; Seoane et al., 2005a; Conte et al., 2008). Uma análise temporal seria necessária para compreender se existe algum padrão na formação dessas famílias de polinização aberta.

Os resultados das análises de paternidade corroboram com isso, pois o sucesso reprodutivo dos doadores de pólen foi variável entre as matrizes maternas. O indivíduo EE283 foi o único compartilhado entre elas e o mais eficiente nas matrizes um e três, quando considerados apenas os cruzamentos interespecíficos. Os resultados sugerem que as progênies possuem

diferentes tipos de parentesco, podendo ser irmãos completos ou meio irmãos, gerados na maioria das vezes por cruzamentos. Gaiotto et al. (2003) discute que os principais aspectos que influenciam esse padrão são a visitação das abelhas e a deposição das cargas de pólen, além da superioridade reprodutiva de alguns genótipos. Conte et al. (2008) destacaram o papel da fenologia da floração nos indivíduos de *E. edulis* para ocorrência dos cruzamentos não aleatórios.

A porcentagem de atribuições constatadas foi superior ou equivalente à de outros testes de paternidade em populações de *E. edulis* que empregaram o mesmo conjunto de SSR, com confiança estatística entre 95 e 99% (Gaiotto et al., 2003; Seoane et al., 2005b). No entanto, esses autores afirmam em ambos os estudos, que não foi possível determinar com precisão o sexo dos genitores identificados (Gaiotto et al., 2003; Seoane et al., 2005b). Diante disso, pode-se considerar que o prévio conhecimento do genitor feminino foi uma vantagem metodológica em relação aos demais testes já realizados em *E. edulis*, pois ocasionou a obtenção de maiores proporções de atribuições de doadores de pólen, a partir de valores de delta mais robustos, além da identificação de uma autofecundação.

A identificação do maior número de genitores proporciona o conhecimento sobre o

parentesco das progênies, o que implica na geração de estratégias para seleção inter e intrapopulacional, com a prévia definição dos esquemas dos testes de progênies, que poderão ser de meio irmãos ou irmãos completos, sejam de autofecundação, cruzamentos controlados ou polinização aberta (Shimizu et al., 1982). Em pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth.), por exemplo, testes de progênies de meio irmãos foram eficientes na predição de ganhos genéticos relacionados ao peso, comprimento e diâmetro do palmito líquido, altura da planta e diâmetro a altura do colo (Neto, 1999).

Outro aspecto relevante do teste de paternidade foi o reconhecimento da hibridação em algumas progênies bífolioladas, pois implica diretamente na correta classificação de genótipos que possuem fenótipos idênticos, considerando a comparação da segmentação do limbo foliar. As plantas bífolioladas são relatadas como vigorosas e adaptadas a baixas temperaturas, além de possuírem a capacidade de perfilhamento regular na fase adulta (Zambonim et al., 2016; Venturieri et al., 2016), o que deve ser melhor estudado, pois essa pode ser uma vantagem em relação aos demais híbridos com mais de três folíolos, pois segundo Bovi (1984) o perfilhamento ocorre entre 70 e 80% nesses morfotipos, mas ainda é uma característica irregular.



No entanto, a percentagem de progênies bífolioladas com doador de pólen identificado foi baixa. Isto pode estar relacionado, provavelmente, ao fato da maior parte delas pertencerem à população um (27 indivíduos bifoliolados) que de forma geral teve um número limitado de amostras analisadas (34 indivíduos totais). Sugere-se neste caso, o emprego de outras técnicas complementares, que inclusive já são utilizadas por agricultores, técnicos e pesquisadores, como observações morfológicas nas fases juvenis e adultas, principalmente relacionadas ao vigor, inflorescências e frutificações, além da mensuração da heterose (Balvé, 1988; Boviet al., 1987; Tibério et al., 2012; Venturieri et al., 2016; Zambonim et al., 2016).

Todos os doadores de pólen reconhecidos para as progênies com mais de três folíolos foram da espécie *E. edulis*, confirmando a hibridação interespecífica nesses morfotipos. A certificação genética desses híbridos já foi realizada com emprego de isoenzimas e RAPD (Balvé, 1988; Sawazaki et al., 1998), o que leva a acreditar que a falta de atribuições de paternidade para as progênies com estes fenótipos ocorreu devido à amostragem utilizada, que considerou como prováveis genitores masculinos apenas os indivíduos adultos localizados no mesmo pomar, excluindo a

possibilidade do fluxo gênico em largas distancias, que é possível principalmente pela possibilidade de ocorrência de anemofilia (Dornelles et al., 2013; Gaiotto et al., 2003).

Para 49% das progênies que não obtiveram o doador de pólen atribuído, não é possível aplicar modelos de seleção baseados exclusivamente no parentesco das progênies. Sugere-se que nestes casos seja evitado o uso de modelos clássicos de predição de ganhos genéticos desenvolvidos exclusivamente para espécies alógamas, pois progênies de autofecundação e irmãos completos constituem as populações e devem ser consideradas nesta etapa (Rodrigues, 2006). Contudo, as estimativas de variabilidade inter e intrapopulacional indicam que a seleção de genótipos entre e dentro dos grupos pode ser promissora, mesmo sem o prévio conhecimento do parentesco entre as progênies.

Os grupos de progênies dois e três apresentaram alta variabilidade, sendo as estimativas de heterozigosidade equivalentes às obtidas em outros estudos em populações naturais de *E. edulis* e híbridos entre espécies do gênero (Gaiotto et al., 2001; Oliveira et al., 2010). Apesar dessas estimativas terem sido inferiores para o grupo um, o índice de fixação negativo é um indicativo de exogamia neste grupo. Para grupos dois e três os valores do índice de fixação ( $F_{IS}$ ) foram altos, negativos e

significativos, indicando ausência de endogamia, corroborando com as altas taxas de cruzamento. Sugerem, ainda, uma possível seleção a favor da heterozigosidade, ocasionada, provavelmente, pela migração de genes entre duas espécies distintas.

Os grupos de progênies apresentaram diferenças significativas entre si, segundo Conte et al., (2008) a existência de estrutura genética entre as populações de *E. edulis* ocorre a partir das divergências que são ocasionadas por maiores distancias geográficas entre elas. Neste contexto, as altas taxas de cruzamentos associada à diversificação da origem geográfica da população de adultos dessa espécie, que constitui a coleção de germoplasma da EEI, associado a diferenças no desempenho reprodutivo dos doadores de pólen em cada matriz materna, provavelmente, contribuíram para os resultados obtidos.

O sistema de consórcio entre *E. oleracea* e *E. edulis* na EEI apresenta grande potencial para geração de progênies F1 estruturadas, com alta capacidade de preservação da diversidade dentro dos grupos, podendo este ser um aspecto amplamente explorado em programas de melhoramento, pois diferentes graus de parentesco e diferentes grupos de genes podem influenciar a produtividade, sendo que os resultados abrem boas perspectivas para

os trabalhos de seleção de genótipos superiores.

## **CONCLUSÃO**

Os marcadores foram eficientes para as estimativas propostas. Os grupos de progênies possuem um sistema de fecundação misto, com predomínio de alogamia, favorecendo a hibridação interespecífica espontânea entre *E. oleracea* e *E. edulis*. São formadas por progênies com diferentes parentescos, com alta variabilidade, sendo possível no futuro estimar os ganhos de seleção entre e dentro de grupos de progênies. Além disso, a identificação de progênies bifolioladas que são híbridas implica na correta classificação dos genótipos e abrem perspectivas para estudos futuros sobre esse morfotipo.

## **REFERÊNCIAS**

Ballvé, R.M.L. 1988. Isoenzimas como marcadores genéticos em palmito (*Euterpe* spp.). Dissertação de Mestrado em Biologia, IB-UNICAMP, Campinas, Brasil. 116 pp.

Belin-Depoux, M & M.H. Queiroz. 1971. Contribution à l'étude ontogénique des palmiers. Quelques aspects de la germination

de *Euterpe edulis* Mart. Revue Générale de Botanique 78: 339-371.

Bovi, M.L.A. 1984. Pesquisas em desenvolvimento com o açaizeiro no Instituto Agronômico, Estado de São Paulo. O Agrônomo. Publicação técnica Nº 2. 178 pp.

Bovi, M.L.A., G.G. Júnior & L.A. Sáes. 1987. Híbridos interespecíficos de palmitero (*Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*). Bragantia 2: 343-363.

Campos, D.S., M.L.A. Bovi & M. Laderoza. 1991. Caracterização do palmito obtido de algumas combinações híbridas entre Açaí e Juçara cultivadas sob diferentes condições. Pesquisa Agropecuária Brasileira 5: 637-646.

Clegg, M.T. 1980. Measuring plantmating systems. Bioscience 30: 814-818.

Coelho, C.M.M., J.L.M. Coimbra, C.D. Souza, A. Bogo & A.F. Guidolin. 2007. Diversidade genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Ciência Rural 37: 1241-1247.

Conte, R., M.S. dos Reis, A. Mantovani & R. Vencovsky. 2008. Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. populations: A comparative analysis using

microsatellite and allozyme markers. *Journal of Heredity* 99:476-482.

Dorneles, L.L., M.T. Padilha, P.R.M. Miller, P. Faria, J. Steiner, A. Zillikens & T.N. Forschungszentrum. 2013. Polinização de *Euterpe edulis* (Arecaceae) por abelhas em sistema agroflorestal na ilha de Santa Catarina. *Iheringia Série Botânica* 1: 47-57.

Doyle J. 1991. DNA protocols for plants. *Molecular techniques in taxonomy*. Heidelberg 57: 283-293.

Ferreira, M.E & D. Grattapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasília. 220 pp.

Gaiotto, F.A., R.P.V. Brondani & D. Grattapaglia. 2001. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes* 1: 86-88.

Gaiotto, F.A., D. Grattapaglia & R. Vencovsky. 2003. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity* 5: 399-406.

Grattapaglia, D., V.J. Ribeiro & G.D. Rezende. 2004. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for Eucalyptus. *Theoretical and Applied Genetics* 109:192-199.

Kalinowski, S.T., M.L. Taper & T.C. Marshall. 2010. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 19: 1512-1512.

Kiyuna, I., M.M.D. Santiago & M.L.A. Bovi. 1997. Simulação da viabilidade econômica da cultura do palmiteiro híbrido (*Euterpe oleracea* X *Euterpe edulis*) no estado de São Paulo. *Informações Econômicas* 4: 25-40.

Henderson, A & G. Galeano. 1996. *Euterpe*, *Prestoea*, and *Neonicholsonia* (Palmae). *Flora Neotropica* 72: 1-89.

Lanza, M. A., C.T. Guimarães & I. Schuster. 2000. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Informe Agropecuário* 21: 97-108.

Lima, P.P.D. 2014. Caracterização da variabilidade genética, sistema de cruzamento e parâmetros de germinação e emergência de

*Euterpe precatória* Martius em populações do baixo rio Solimões. Dissertação de Mestrado em Agricultura e Trópico Úmido, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil. 55 pp.

Marshall, T.C., J.B.K.E. Slate, L.E.B. Kruuk, & J.M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.

Neto, J.T.D.F. 1999. Estimativas de parâmetros genéticos em progênies de meio-irmãos de pupunheira. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo. Publicação técnica N° 39. 117 pp.

Oliveira, M.D.S.D., J.D. Carvalho & W.D. Nascimento. 2000. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). Funep, Jaboticabal. Publicação técnica N° 7. 52 pp.

Oliveira, A.C., V.M. Novell, A.N. Garcia, M. Cristofan & M.A. Machado. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of a leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica* 128: 397-403.

Oliveira, M.S.P., J.B. Santos, E.P. Amorim & D.F. Ferreira. 2010. Variabilidade genética entre acessos de açazeiro utilizando



marcadores microssatélites. Ciência Agrotécnica 34: 1253 -1260.

Paula, R.C.D., I.E. Pires, R.D.C.G. Borges & C.D. Cruz. 2002. Predição de ganhos genéticos em melhoramento florestal. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37: 159-165.

Peakall, R.O.D & P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6.0 genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology notes 1: 288-295.

Queiroz, M.H. 2000. Biologia do Fruto, da Semente e da Germinação do Palmiteiro *E. edulis* Martius - Arecaceae. Em: *Euterpe edulis* Martius – (Palmiteiro) biologia, conservação e manejo. M.S. dos Reis & A. Reis (coordenadores). Herbário Barbosa Rodrigues 324-335.

Resende, M.D.V., Higa, A.R. 1990. Estratégias de melhoramento para eucaliptos visando à seleção de híbridos. Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo. Publicação técnica Nº 21. 60 pp.

Ritland, k & S. Jain. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. Heredity 47: 35-52.

Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using  $n$  independent loci. *Heredity* 88: 221-228.

Rodrigues, D.P. 2006. Diversidade genética e sistema de reprodução progênes elites de Pupunheira Inerme (*Bactris gasipaes* Kunth.) com marcadores microssatélites: Implicações para o melhoramento do palmito. Tese de Doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 106pp.

Sawazaki, H.E., M.L.A. Bovi, L. Sodek & C.A. Colombo. 1998. Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD. *Revista Brasileira de Biologia* 58: 681-691.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.

Sebbenn, A.M., P.Y. Kageyama, A. C.M.F. Siqueira & A.C.S. Zanatto. 2000. Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze: implicações para a conservação e o melhoramento genético. *Scientia Forestalis* 58: 25-40.

Seoane, C.E.S., A.M. Sebbenn & P.Y. Kageyama. 2005a. Sistema de reprodução em duas populações naturais de *Euterpe edulis*

M. sob diferentes condições de fragmentação florestal. *Forest* 69: 13-24.

Seoane, C.E.S., P.Y. Kageyama, A. Ribeiro, R. Matias, M.S. Reis, K. Bawa & A.M. Sebbenn. 2005. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. *Revista do Instituto Florestal* 17: 23-43.

Shimizu, J.Y., P.Y. Kageyama & A.R. Higa. 1982. Procedimentos e recomendações para estudos de progênies de essências florestais. Embrapa Florestas-Documents URPFCS. Publicação técnica N° 11 33 pp.

Tibério, F.C.S., T.A. Sampaio-e-Silva, P. Dodonov, V.A. Garcia & D.M.S. Matos. 2012. Germination and allometry of the native palm tree *Euterpe edulis* compared to the introduced *E. oleracea* and their hybrids in Atlantic rainforest. *Brazilian Journal of Biology* 4: 955-962.

Thomé, V.M.R., S.L. Zampieri, H.J. Braga & C. Pandolfo. 1999. Zoneamento agroecológico e socioeconômico do Estado de Santa Catarina. Epagri/Ciram, Florianópolis. 1015 pp.

Venturieri, G.A., J.F. Santos, F.M. Zambonim & P.R.M. Miller 2016. Histórico e metodologia

usadas para formar os híbridos de *Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis* pelo agricultor Jorge Leite Tuzino. Congresso Brasileiro de Fruticultura. Anais Sociedade Brasileira de Fruticultura, São Luiz, Maranhão.

Zambonim, F.M., G.A. Venturieri, K.H. Mariguele, P.R.M. Miller & J.F. Santos. 2016. Frequência de morfotipos de plântulas obtidas da hibridação espontânea entre *Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis* em clima subtropical. Congresso Brasileiro de Fruticultura. Anais Sociedade Brasileira de Fruticultura, São Luís, Maranhão.

## CONCLUSÃO GERAL

Os marcadores microsatélites transferidos entre as espécies foram altamente eficientes, apesar do monomorfismo do EE52 no grupo de genótipos de *E. oleracea* e a impossibilidade de usá-lo no estudo do sistema de fecundação, os níveis de variabilidade alélica e polimorfismos obtidos foram satisfatórios em ambos os estudos, indicando o alto potencial da aplicação desses locus em programas de melhoramento desse gênero.

As estimativas de diversidade obtidas para os grupos de genótipos que compõem a população base da coleção de germoplasma foram altas e indicaram que a diversidade encontrada possibilitará a orientação de cruzamentos dirigidos, para formação de híbridos interespecíficos ou para retrocruzamentos. Quando estas estimativas são comparadas com as obtidas para populações de progênies, constata-se que a população formada pela matriz um apresenta níveis muito similares com do grupo de *E. oleracea*, enquanto que as demais populações de progênies apresentam níveis similares aos dos grupos de *E. edulis* e híbridos (Tabelas 1 e 6). Este pode ser um indicativo de que o grupo um seja composto por um maior número de acessos da espécie *E. oleracea*, mesmo que exista a possibilidade de acessos bifoliolados

serem híbridos interespecíficos. Este fato poderia explicar também a menor porcentagem de doadores de pólen reconhecidos para as progênes bífolioladas, considerando que a maior amostragem desse morfotipo foi no grupo um. Os resultados obtidos a partir das AMOVAs foram condizentes com a característica de cada grupo/populações estudados, pois as variações foram menores entre as progênes (Tabela 7), as quais as possuem relações de parentesco comprovadas pela identificação de doadores de pólen comuns para todas as matrizes maternas avaliadas, sendo maiores quando os grupos comparados são compostos por acessos de espécies com perfis genéticos distintos (Tabela 2).

As estimativas do sistema de fecundação confirmaram as estimativas de diversidade obtidas entre e dentro dos grupos de progênes. Os resultados indicam que a predominância de alogamia favorece a hibridação espontânea entre as espécies quando são cultivados em proximidade, sendo esta uma vantagem para formação de progênes F1 estruturadas e com alta diversidade.

Considerando a escassez de estudos relacionados aos aspectos ecológicos e genéticos da hibridação espontânea entre açazeiros e palmiteiros juçara, os resultados obtidos servem como base de comparações

para estudos futuros, além de permitirem inferir que a diversidade gerada a partir da combinação inter e intragrupos de genótipos da coleção, as melhores combinações a partir de cruzamentos dirigidos, a correta classificação dos genótipos híbridos que são idênticos aos genitores maternos, os estoques de diversidade gerados a partir da combinação intra e intergrupos por polinização aberta, além das perspectivas de seleção de genótipos para formação de cultivares melhorados para as condições de clima subtropical.