

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

Santos, Jussara Fernanda^{1,3}; Keny Henrique Mariguele²; Adriana Pereira²; Fabio Martinho Zambonim²; Giorgini Augusto Venturieri¹

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil;

²Estação Experimental de Itajaí, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil; ³jussaraflo@yahoo.com.br

Santos, Jussara Fernanda; Keny Henrique Mariguele; Adriana Pereira; Fabio Martinho Zambonim; Giorgini Augusto Venturieri (2020) Parâmetros genéticos e teste de paternidade em progênes de *Euterpe oleracea* produto da hibridação espontânea com *Euterpe edulis* em clima subtropical. Rev. Fac. Agron. Vol 119 (1): 1-10. <https://doi.org/10.24215/16699513e036>

O objetivo deste estudo foi avaliar o sistema de fecundação e a distribuição da variabilidade molecular entre e dentro de três grupos de progênes 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 bifolioladas. Para tal, foram utilizados seis loci microssatélites em 306 amostras. Os grupos de progênes 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 (rp), 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 bifoliolado não é garantia de cruzamento intraespecífico, já que quatro progênes foram identificadas como híbridos interespecíficos. Foram detectados em média 7 a 12,3 alelos por locus 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 progênes.

Palavras chave: açaí melhorado, juçara, microssatélites, teste paternidade, polinização aberta

Santos, Jussara Fernanda; Keny Henrique Mariguele; Adriana Pereira; Fabio Martinho Zambonim; Giorgini Augusto Venturieri (2020) Genetic parameters and paternity test in progenies of *Euterpe oleracea* originated from spontaneous hybridization with *Euterpe edulis* in subtropical climate. Rev. Fac. Agron. Vol 119 (1): 1-10. <https://doi.org/10.24215/16699513e036>

The objectives of this study were to analyze the mating 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, with allogamy (tm and $ts = 1$), and self-fertilization correlation (rt) of 0.110. Different degrees of kinship were found (rp), with complete siblings between 15.5 a 26.1%. Paternity was assigned 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 a 12.3 to 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 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.

<https://revistas.unlp.edu.ar/revagro>

Recibido: 17/09/2019

Aceptado: 29/11/2019

Disponibile on line: 01/07/2020

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

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 et al., 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 progênies 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 agrônômicas 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 (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; Ballvé, 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 bifolioladas 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 progênies 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 progênies 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 & Higa, 1990; Paula et al., 2002).

Neste contexto, os marcadores microsatélites, 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* 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 progênies 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) para o conjunto de progênies avaliadas (Figura1).

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 foi medida em biophotometer (Eppendorf, Germany) e foram 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 MgCl₂, 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 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).

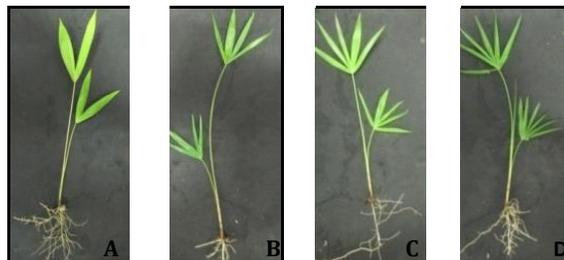


Figura 1. Morfotipos de progênies *E. oleracea* consorciadas com *E. edulis* classificadas de acordo com a partição dos folíolos; A) dois folíolos (bifoliolados); B) quatro folíolos; C) cinco folíolos; D) seis folíolos. Foto: Zambonim et al. (2016).

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 bífidas, 29 com quatro folíolos, 40 com cinco e 6 com 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 locus, a heterozigidade 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 progênies 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 e 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 fórmula;

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

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 a 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 medias da variabilidade intrapopulacional, juntamente com erros padrões, quais sejam; número de alelos por locus (N_a), a heterozigidade observada (H_o), calculada pela proporção entre o número de heterozigotos em cada locus (HL) e o número total de indivíduos amostrados (N), a heterozigidade esperada (H_e) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, calculada a partir da frequência alélica (p);

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

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 (r_p) indicou ocorrência de 15 a 26,6% de irmãos completos nos grupos três e dois respectivamente (Tabela 1).

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 2).

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 2).

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 3).

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 4).

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 5).

Tabela 1. Estimativas do sistema de fecundação de três grupos de progênies de *E. oleracea* de polinização aberta em Itajaí -SC. Referencias: *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.

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

Tabela 2. Resumo das atribuições de doadores de pólen para três matrizes maternas de *E. oleracea* sujeitas a hibridação espontânea com *E. edulis* em Itajaí-SC.

Simulações	Confiança	Delta crítico	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%

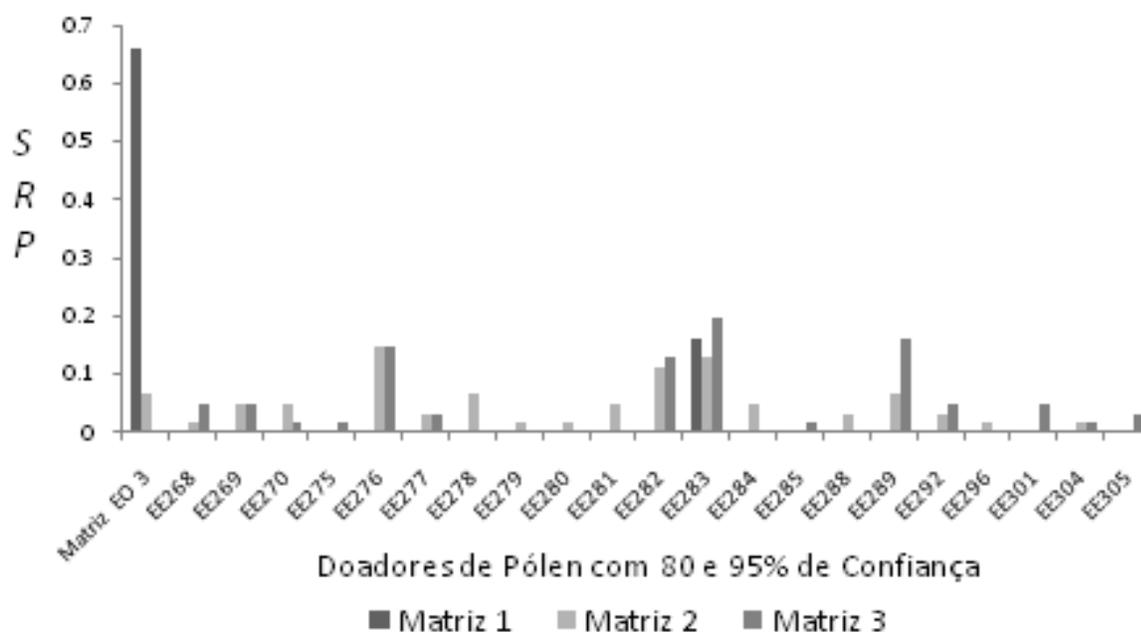


Figura 2. Sucesso reprodutivo dos doadores de pólen (SRP) para três matrizes de *E. oleracea* (EO) sujeitas a hibridação espontânea com *E. edulis* (EE) em Itajai-SC.

Tabela 3. Teste de paternidade em progênies bifolioladas de polinização aberta de *E. oleracea* (M1, M2, M3) sujeitas à hibridação com *E. edulis* (EE). Referências: *autofecundação; Negrito indicam os bifoliolados híbridos interespecíficos.

Progênies	Matriz materna (<i>E. oleracea</i>)	Doador de pólen	Delta crítico	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%
5	M2	EE281	8,84	95%
7	M2	M3	5,29	80%
92	M2	EE284	6,01	80%
211	M2	M3	5,29	80%
212	M2	M3	5,66	80%
9	M3	EE289	6,34	80%
11	M3	EE292	1,71+0001	95%

Tabela 4. Variabilidade genética em três grupos de progênies de *E. oleracea* produto da hibridação espontânea com *E. edulis* em Itajai-SC. Referências: número médio de alelos (N_a); heterozigosidade média observada (H_o); heterozigosidade média esperada (H_e); Índice de Fixação (F_{is}); erro padrão (se).

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)

Tabela 5. Resumo da análise de variância molecular (AMOVA).

Fonte da Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	Estatística de variação	% Variação
Entre Grupos	2	23738.697	11869.349	73.221	5%
Dentro de grupos de progênes	266	386758.296	1453.979	1453.979	95%
Entre as progênes	263	101318.401	385.241	0.000	0%
Total	531	511815.395		1527.199	100%

DISCUSSÃO

As estimativas das taxas de cruzamento foram altas e superiores às 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, 2014) e equivalentes as estimativas com emprego de isoenzimas (Conte et al., 2008). No entanto, segundo Sebbenn 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 safra 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 (r_t) 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 progênes 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 a 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 progênes, o que implica na geração de estratégias para seleção inter e intrapopulacional, com a prévia definição dos esquemas dos testes de progênes, 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 progênes 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 progênes bifolioladas, pois implica diretamente na correta classificação de genótipos que possuem fenótipos idênticos, considerando a comparação da segmentação do limbo foliar. As plantas bifolioladas 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). No entanto, a porcentagem de

progênies bifolioladas 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 (Ballvé, 1988; Bovi et 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 (Ballvé, 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 distâncias (Gaiotto et al., 2003), que é possível principalmente pela possibilidade de ocorrência de anemofilia (Dorneles et al., 2013).

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 os grupos de progênies e devem ser consideradas nesta etapa (Rodrigues, 2006). Contudo, as estimativas de variabilidade inter e intragrupos indicam que a seleção de genótipos entre e dentro deles 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 as 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 distâncias 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.

Agradecimentos

A Capes pela concessão da bolsa de doutorado, a FAPESC pelo financiamento do trabalho, a EPAGRI-EEI e ao programa de pós-graduação em Agroecossistemas da UFSC-SC pelo apoio e estrutura disponibilizada.

REFERÊNCIAS

- Ballvé, R.M.L.** 1988. Isoenzimas como marcadores genéticos em palmeiro (*Euterpe* spp.). Tesis. 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 açazeiro no Instituto Agrônomo, Estado de São Paulo. O Agrônomo. Publicação técnica N° 2. 178 pp.
- Bovi, M.L.A., G.G. Júnior & L.A. Sáes.** 1987. Híbridos interespecíficos de palmeiro (*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 Açai 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 palmito 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. Tesis. 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 Nº 39. 117 pp.
- Oliveira, M.D.S.D., J.D. Carvalho & W.D. Nascimento.** 2000. Açaí (*Euterpe oleracea* Martius). Funep, Jaboticabal. Publicação técnica Nº 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 microsatélites. *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 Palmito *E. edulis* Martius - Arecaceae. En: *Euterpe edulis* Martius – (Palmito) biologia, conservação e manejo. M.S. dos Reis & A. Reis (coordenadores). *Herbário Barbosa Rodrigues.* pp: 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 progênies elites de Pupunheira Inerme (*Bactris gasipaes* Kunth.) com marcadores microsatélites: Implicações para o melhoramento do palmito. Tese de Doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 106 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.
- 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.** 2005b. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Martius. *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-Documentos URPFCS.* Publicação técnica Nº 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 Luis, Maranhão.