

Denise Olkoski

**FILOGEOGRAFIA E DINÂMICA DA DIVERSIDADE  
GENÉTICA DE *Acca sellowiana* (O. BERG) BURRET  
(MYRTACEAE)**

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Recursos Genéticos  
Vegetais da Universidade Federal de  
Santa Catarina para obtenção do grau  
de Doutor (a) em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rubens O.  
Nodari

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre  
Magno Sebbenn

Florianópolis  
2014

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

Olkoski, Denise

Filogeografia e dinâmica da diversidade genética de *Acca sellowiana* (O.Berg) Burret (Myrtaceae) / Denise Olkoski ; orientador, Rubens Onofre Nodari ; coorientador, Alexandre Magno Sebbenn. - Florianópolis, SC, 2014.  
162 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Feijoa. 3. filogeografia. 4. diversidade genética. 5. fluxo gênico. I. Nodari, Rubens Onofre. II. Sebbenn, Alexandre Magno. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Filogeografia e dinâmica da diversidade genética de *Acca sellowiana*  
(O. Berg) Burret (Myrtaceae)

por

Denise Olkoski

Tese julgada e aprovada em 30\09\2014, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA\UFSC.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Presidente – CCA-UFSC)

---

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon (Titular – UNIPAMPA-RS)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Mariana Pires de Campos Telles (Titular – UFG-GO)

---

Prof. Dr. Adelar Mantovani (Titular – CCA- UFSC)

---

Prof. Miguel Pedro Guerra (Titular – CCA-UFSC)

---

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, setembro de 2014



Dedico à minha família,  
meu porto seguro



## AGRADECIMENTOS

Impossível resumir aqui todos os agradecimentos destes últimos quatro anos de muito aprendizado e crescimento tanto pessoal quanto profissional.

Aos meus queridos pais Eduardo e Irelde e minhas irmãs Mabel e Louise por entenderem minha ausência, impulsionarem meus sonhos e apoiarem minhas decisões.

Ao Daniel (amigo, namorado, colega de trabalho), pelas intermináveis discussões e contribuições estatísticas, pelas correções e revisões, pelo companheirismo de todos os momentos, principalmente nos intermináveis finais de semana no laboratório.

Ao meu Orientador Rubens Nodari por me aceitar sem ao menos me conhecer, e depositar em minhas mãos este trabalho. Obrigada pela confiança e pelos grandes ensinamentos.

Ao meu coorientador Alexandre Sebbenn pelas dicas durante o desenvolvimento do trabalho e ajuda nas análises de dinâmica da diversidade. Ao Nelson Fagundes pelas grandes dicas sobre filogeografia e ajuda nas análises.

A todos do LFDGV: Sarah, Vinícius, Rafael, Fernando, Gustavo, Luciano, Vanessa, Carina, Maria Carolina, Clarissa, Daniela, Lilian, Montagna, Ramon, Yohan, Glauco, Samantha, Domingas, Thiago... por terem me recebido tão bem, por compartilharem comigo o chimarrão, me fazerem gostar um pouco mais de café, tornarem os dias intermináveis de trabalho mais divertidos e menos cansativos.

Ao Gustavo Klabunde pela grande paciência que teve comigo, a quem devo grande parte do meu aprendizado no laboratório, do gel de agarose ao sequenciamento de DNA. Sem ele certamente tudo teria sido muito mais difícil. Ao Tiago Montagna pela enorme ajuda na montagem da parcela e coleta do material no PNSJ, e por ser um dos responsáveis por fazer eu me sentir mais perto de casa, com os churrascos, chimarrão e sempre abrindo as portas da sua casa para as jantadas da ‘salômica’!

Ao grupo de trabalho da Feijoa: Karine; Clarissa; Lido; Juan; Samira; Hellen, Joel, Lilian...onde cada um contribuiu um pouco para o conhecimento que estamos acumulando sobre esta espécie. Em especial ao Joel Donazzolo, por me apresentar a feijoa e o trabalho direto com os agricultores. Ao Juan Manuel pela companhia em todas as coletas de campo.

À Vanessa, pela grande amizade e indispensável ajuda. Sem toda sua energia para por a mão na massa as atividades no laboratório teriam sido muito mais cansativas. Você fez muita falta neste último ano

amiga! Aos demais bolsistas que também auxiliaram: Vinícius, Thiago, Gregório e José Henrique.

Ao grupo de pesquisa da Professora Mercedes Rivas pelas populações uruguaias.

A todas as pessoas que conheci e que contribuíram com seus conhecimentos em todas as coletas de campo feitas neste trabalho: agricultores, donas de casa, funcionários do ICMBIO...sem eles nada disso poderia ter sido feito.

Ao RGV e seus professores e ao Newton e a Berna, sempre dispostos a resolverem meus problemas.

Ao CNPQ, à FAPESC e à CAPES por fornecer apoio financeiro para o desenvolvimento dos trabalhos.

## RESUMO

*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret, conhecida comumente como goiabeira-serrana ou feijoa, é uma Myrtaceae que ocorre na região neotropical da América do Sul. A espécie possui potencial como frutífera, ainda pouco explorado no Brasil, mas bem difundido no exterior. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética em nível de sequências de DNA de cloroplasto (cpDNA) e marcadores microssatélites nucleares (nSSRs) e, com base nesses dados, determinar relações filogeográficas, quantificar diversidade genética, avaliar estrutura genética espacial intrapopulacional, fluxo gênico e o sistema de cruzamento, a fim de compreender o cenário evolutivo da espécie e contribuir para sua conservação e melhoramento. Para filogeografia foram sequenciados os espaçadores intergênicos plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG* em 32 populações, gerando 10 haplótipos. Oito haplótipos estão localizados ao norte da distribuição natural da espécie, em latitudes inferiores a 29°32'S e altitude superior a 500 m, sendo este o centro de maior diversidade da espécie. Foram encontrados indícios de expansão recente na distribuição meridional da espécie, mas isto deve ser comprovado com estudos adicionais, em razão do baixo polimorfismo das sequências analisadas. Visando elucidar esta possível expansão são indicadas análises com marcadores nSSRs. Foram encontrados dois padrões de distribuição da diversidade: i) na região com latitude inferior a 29°32'S a espécie é encontrada em altitude superior a 500 m em associação com a Mata de Araucária, a diversidade é maior e não apresenta expansão recente; ii) a partir de latitudes maiores que 29°65'S, a espécie ocorre abaixo de 400 m, a diversidade é menor e apresenta indícios de expansão recente. Para futuros estudos mais aprofundados em filogeografia foram desenvolvidos 10 novos locos nSSRs. Os novos marcadores apresentaram polimorfismo suficiente para análises genéticas, além de alguns deles serem transferíveis para outras espécies de Myrtaceae. Amostras de plantas de feijoa introduzidas e cultivadas fora da região de ocorrência natural foram caracterizadas através de nSSRs e mostraram uma diversidade restrita, evidenciando um gargalo genético decorrente da dispersão global da espécie a partir de poucos genótipos. Com base nessas análises foi possível verificar a similaridade dos acessos introduzidos com populações que ocorrem na região sul da distribuição natural da espécie. Oito nSSRs apresentaram equilíbrio genotípico e padrão de herança mendeliana, além de ligação genética não significativa, indicando o potencial deste conjunto de locos para a realização de análises como

fluxo gênico e sistema de cruzamento. Esses mesmos marcadores foram utilizados para as análises intrapopulacionais, sendo confirmado que a espécie é preferencialmente alógama ( $t_m = 0,895$ ); porém, a área estudada indicou cruzamento entre parentes, que juntamente com o restrito fluxo gênico, levou à distribuição não aleatória dos genótipos e o agrupamento de indivíduos aparentados. Esses fatores contribuíram para a uma significativa estrutura genética espacial (até 54 m). Os resultados demonstram que os níveis atuais de fluxo gênico não são suficientes para evitar efeitos de deriva genética na população analisada. Em conclusão, este estudo gerou conhecimento sobre a história evolutiva de *A. sellowiana*, assim como sobre sua área de ocorrência, seu possível centro de origem e diversidade, e sua dinâmica da diversidade genética, nos níveis inter- e intra-populacional, trazendo novas informações com grande potencial de contribuir para novos estudos, programas de melhoramento e conservação da espécie.

**Palavras-chave:** cpDNA, feijoa, fluxo gênico, marcadores microssatélites, sistema de cruzamento.

## ABSTRACT

*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret, known as feijoa or pineapple-guava, is a Myrtaceae species from the neotropical region of South America. The species has potential for fruit production, which is underexploited in Brazil, but widespread in other countries. The objective of this study was to characterize the genetic diversity at the chloroplast DNA (cpDNA) sequence and nuclear microsatellite marker (nSSR) levels and, based on these data, to determine phylogeographic relations, estimate the genetic diversity, and evaluate intra-population spatial genetic structure, gene flow and mating system, in order to comprehend the species' evolutionary process and contribute to its conservation and breeding. For the phylogeography purposes the plastidial intergenic spacers *trnH-psbA* and *trnS-trnG* from plants of 32 populations were sequenced, generating 10 haplotypes. Eight haplotypes were found in the northern area of the species' natural distribution, at latitudes lower than 29°32'S and altitudes higher than 500 m, characterizing the region with the highest genetic diversity. Signatures of recent expansion in the southern portion of the species' distribution were detected, but this should be confirmed with additional studies, due to the low polymorphism of the analyzed sequences. To address this possible expansion, further analyses with SSR markers are suggested. Two distinct patterns of diversity distribution were found: i) in lower latitudes (<29°32'S) the species is found at altitudes above 500 m, in association with the Araucaria Forest, the genetic diversity is higher and the populations do not show recent expansion; ii) in latitudes higher than 29°65'S, the species occurs at altitudes below 400 m, diversity is lower and there are signatures of recent expansion. Ten new nSSR loci were developed, and these new markers showed sufficient polymorphism for genetic analyses, with some of them being transferable to other Myrtaceae species. Samples of feijoa introduced and cultivated outside the region of natural occurrence were characterized through nSSR markers. The obtained data showed restrict genetic diversity, which indicates the existence of a genetic bottleneck in the global dispersion of the species, which probably started with few genotypes. In addition, it was possible to verify similarity between the introduced material and populations located at the southern portion of the species' natural occurrence. To characterize intra-population spatial genetic diversity, gene flow and mating system, eight nSSRs were used. These nSSRs presented genetic equilibrium and mendelian inheritance, coupled to negligible genetic linkage, evidencing the potential of this set of loci for

the proposed studies. The intra-population analyses confirmed that the species has outcrossing mating system ( $t_m = 0.895$ ). However, crossings between relatives were found in the studied population, and that coupled to restrict gene flow led to a non-random distribution of genotypes and the clustering of related plants. These results reflect a significant spatial genetic structure (up to 54 m). In addition, the results indicate that current observed levels of gene flow are not sufficient to prevent genetic drift effects in the studied population. In conclusion, this study provided knowledge about the evolutionary history of *A. sellowiana*, including information about its area of occurrence, its possible center of origin and diversity, the natural populations in which it occurs, and the dynamics of its genetic diversity, at the inter- and intra-population level, ultimately bringing new information with great potential to contribute to the species' study, breeding and conservation programs.

**Keywords:** cpDNA, feijoa, gene flow, mating system, microsatellite markers.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1** - Indivíduo adulto de *A. sellowiana* (A); Detalhe da flores (B) e dos Frutos (C). Fotos: Juan Manuel Otalora.....26
- FIGURA 4.1** - Gel de quantificação de DNA (agarose 1%) contendo três padrões ( $\lambda$  200 ng/ $\mu$ l,  $\lambda$  100 ng/ $\mu$ l e  $\lambda$  50 ng/ $\mu$ l) e cinco amostras de DNA de *A. sellowiana*..... 60
- FIGURA 4.2** - Rede de haplótipos (*median-joining network*) construída com base na análise das duas regiões de cpDNA (*trnH-psbA* e *trnS-trnG*) em *A. sellowiana*. Os círculos representam os haplótipos e o tamanho dos círculos a frequência dos mesmos. Os números indicam os passos mutacionais..... 66
- FIGURA 4.3** – Mapa de distribuição dos 10 haplótipos nas 30 populações analisadas de *A. sellowiana* com os marcadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. As cores correspondem aos haplótipos apresentados na rede de haplótipos (Figura 4.2). ..... 67
- FIGURA 4.4**- Gráfico de barras gerado pelo programa baps (5.1) com as 32 populações analisadas. Cada cor representa um agrupamento e cada população é separada por uma barra escura..... 70
- FIGURA 4.5** - Distribuição espacial das 32 populações de *A. sellowiana* de acordo com os nove grupos formados pela Análise Bayesiana (BAPS 5.1). Cada célula representa uma população e as cores correspondem aos grupos indicados no gráfico de barras (Figura 4.4).....70
- FIGURA 4.6** – Mapa de distribuição dos nove grupos formados. Populações com a mesma cor pertencem ao mesmo grupo de acordo com a Análise Bayesiana; elipses maiores delimitam os dois putativos super grupos (SG – I Super Grupo I; SG – II Super Grupo II)..... 72
- FIGURA 5.1** – Mapa da América do Sul com destaque para o sul do Brasil e a localização de 4 populações de *A. sellowiana*: Ipê (1), Urubici (2), Bituruna (3) e Guarapuava (4).....86

**FIGURA 7.1** - Árvore *Neighbor-joining* (NJ) construída a partir de alelos compartilhados entre as 15 amostras de populações de *A. sellowiana* analisadas. As amostras correspondem àquelas apresentadas na Tabela 7.1.....119

**FIGURA 7.2** - Árvore *Neighbor-joining* (NJ) construída a partir de alelos compartilhados entre as 161 amostras de *A. sellowiana* analisadas. Ramos em cinza representam agrupamento formado pelas populações introduzidas.....120

**FIGURA 8.1** Imagem de satélite indicando a área de estudo no Parque Nacional de São Joaquim, Urubici, Santa Catarina. Fonte: *GoogleEarth*.....133

**FIGURA 8.2** – Detalhe da parcela estudada no Parque Nacional de São Joaquim (PNSJ), Urubici, Santa Catarina. .... 134

**FIGURA 8.3** - Distribuição espacial das plantas de *A. sellowiana*, com destaque para as plantas matrizes na parcela no Parque Nacional de São Joaqui, PNSJ, Urubici, Santa Catarina..... 134

**FIGURA 8.4** – Estrutura genética espacial nos adultos de *A. sellowiana* na área amostrada no PNSJ, Urubici. A linha contínua refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se ao intervalo de confiança a 95% do erro padrão da média das estimativas para hipótese de ausência de estrutura genética espacial ( $H_0: \theta_{xy} = 0$ )..... 150

**FIGURA 8.5** – Frequências de distâncias de dispersão efetiva de pólen (barras escuras) e frequências de distâncias entre as plantas de *A. sellowiana* (barras claras) amostradas na área estudada no PNSJ.....153

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 4.1** – Identificação das populações, número de indivíduos amostrados (N), origem, coordenadas geográficas e altitude de 32 populações de *A. sellowiana*. ..... 56
- TABELA 4.2** - Pares de iniciadores universais de cpDNA testados (DEMASURE *et al.*, 1995; HAMILTON, 1999) com suas respectivas temperaturas de anelamento. .... 58
- TABELA 4.3** - Haplótipos amostrados pelos dois marcadores plastidiais (*trnH-psbA* e *trnS-trnG*) e seus respectivos sítios polimórficos.....61
- TABELA 4.4** – Populações, tamanho amostral (N), haplótipos, diversidade de haplótipos (*Hd*) e de nucleotídeos ( $\pi$ ) e testes de neutralidade em 32 populações de *A. sellowiana*. .....63
- TABELA 4.5** - Análise molecular da variância (AMOVA) entre o total de populações amostradas de *A. sellowiana*. ..... 68
- TABELA 4.6** - Nove grupos evidenciados pela Análise Bayesiana (BAPS 5.1), as respectivas populações e testes de neutralidade.....69
- TABELA 4.7** – Análise molecular da variância (AMOVA) para a hipótese de nove grupos formados pela Análise Bayesiana.....71
- TABELA 4.8** – Bioma, altitude, latitude, diversidade haplotípica (*Hd*), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), testes de neutralidade (D de Tajima e *F<sub>s</sub>* de Fu) e coeficientes de correlação (*r*) do teste de Mantel que diferem entre o Super Grupo I e o Super Grupo II. .... 71
- TABELA 5.1**– Localização, coordenadas geográficas e *voucher* das populações depositadas no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, (FLOR). .....86
- TABELA 5.2** – Características dos 10 locos microssatélites desenvolvidos para *A. sellowiana*. tam. (pb) = tamanho do fragmento em

pares de base; Ta = temperatura de anelamento; \* número do acesso no genbank. .... 88

**TABELA 5.3** – Caracterização de 10 SSRs específicos para *A. sellowiana* em quatro populações. .... 90

**TABELA 6.1** – Teste de herança mendeliana em oito locos microssatélites de *A. sellowiana* ..... 99

**TABELA 6.2** – Testes *G* para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1: 1: 1: 1) em *A. sellowiana* ..... 102

**TABELA 6.3** – Teste de equilíbrio genotípico entre oito locos nSSRs em *A. sellowiana* (10.000 permutações; após correção de Bonferroni o teste foi considerado significativo se  $p < 0,000179$ ). .... 106

**TABELA 7.1** - Código de identificação, local e tamanho amostral (N) das populações de *A. sellowiana*. .... 114

**TABELA 7.2** – Sequência e temperatura de anelamento dos dez marcadores SSRs utilizados no presente estudo. .... 114

**TABELA 7.3** – Caracterização dos dez marcadores SSRs utilizados em *A. sellowiana*. .... 116

**TABELA 7.4** - Diversidade genética nas 15 amostras de populações de *A. sellowiana* com base em dez marcadores SSRs. .... 118

**TABELA 8.1** - Relação das oito matrizes com seus respectivos frutos e número de progênies analisadas. .... 135

**TABELA 8.2** - Sequência e temperatura de anelamento dos oito locos nSSRs para *A. sellowiana* utilizados. .... 137

**TABELA 8.3** – Índices de diversidade genética e de fixação (*f*) em oito locos microssatélites de adultos e progênies de uma população de *A. sellowiana*. .... 143

**TABELA 8.4** – Parâmetros do sistema reprodutivo de *A. sellowiana*. Valores entre parênteses indicam desvio padrão após 1000 reamostragem *bootstrap*. .... 144

**TABELA 8.5** - Diversidade genética e endogamia de oito matrizes de polinização aberta de *A. sellowiana*. ..... 146

**TABELA 8.6** – Parâmetros do sistema reprodutivo de oito matrizes de polinização aberta de *A. sellowiana*.....149

**TABELA 8.7** - Tamanho total da amostra de adultos, estimativa de coancestria de grupo ( $\Theta$ ), tamanho efetivo da população ( $N_e$ ) e relação entre o tamanho efetivo e o número censo ( $N_E/N$ ). ..... 150



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ESPÉCIE.....	25
2.2 MARCADORES MOLECULARES.....	28
2.2.1 DNA plastidial (cpDNA) .....	28
2.2.2 DNA nuclear.....	30
2.3 FILOGEOGRAFIA.....	31
2.4 SISTEMA DE REPRODUÇÃO, ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
3 OBJETIVOS .....	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4. CAPÍTULO I – ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE <i>ACCA SELLOWIANA</i> (O.BERG) BURRET .....	51
4.1 INTRODUÇÃO.....	51
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.4 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
5. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE 10 NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES NUCLEARES (SSR) PARA <i>ACCA SELLOWIANA</i> (MYRTACEAE).....	83
5.1 INTRODUÇÃO.....	83
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	83
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
5.4 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
6. CAPÍTULO III - HERANÇA MENDELIANA, LIGAÇÃO GENÉTICA E DESEQUILÍBRIO GENOTÍPICO EM OITO LOCOS MICROSSATÉLITES DE <i>ACCA SELLOWIANA</i> (O. BERG) BURRET.....	95
6.1 INTRODUÇÃO.....	95
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	95

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
6.4 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
7. CAPÍTULO IV – PERCEPÇÕES MOLECULARES SOBRE A ORIGEM E DIVERSIDADE DE FEJOA ( <i>ACCA SELLOWIANA</i> (O. BERG) BURRET) EM REGIÕES INTRODUZIDAS .....	111
7.1 INTRODUÇÃO.....	111
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	113
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	118
7.4 CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
8. CAPÍTULO V - SISTEMA REPRODUTIVO, ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E FLUXO GÊNICO EM <i>ACCA SELLOWIANA</i> (O. BERG) BURRET.....	131
8.1 INTRODUÇÃO.....	131
8.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	132
8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	139
8.4 CONCLUSÕES.....	152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	153
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	161

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O sul do Brasil possui uma riqueza muito grande de espécies vegetais com potencial de uso que permanece sem ser explorada e valorizada. Um exemplo desta riqueza de diversidade é a família Myrtaceae, com várias espécies frutíferas nativas com potencial de uso, entre elas, *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret, conhecida popularmente pelos nomes de goiabeira-serrana, goiabeira-do-mato, goiabeira-da-serra, feijoa, entre outros.

Os frutos da feijoa podem ser consumidos *in natura* ou processados de várias maneiras. A espécie apresenta ainda potencial ornamental, medicinal, e para reflorestamento de áreas degradadas. Apesar de ser cultivada em outros países há várias décadas, ela ainda é pouco conhecida e explorada comercialmente no Brasil. Por ocorrer naturalmente na região do Planalto Catarinense e Norte do Rio Grande do Sul a espécie apresenta alto potencial para o desenvolvimento da fruticultura no sul do país, aonde pouco a pouco vem sendo explorada.

Visando a conservação, o avanço no conhecimento científico, o manejo da diversidade genética ainda existente e a viabilização de seu cultivo no Brasil, surgiu o projeto de domesticação da feijoa, uma cooperação entre a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Este projeto foi iniciado a partir do levantamento da diversidade existente em Santa Catarina, resultando na implantação de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG). Desde então, muitos projetos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de avançar no conhecimento e uso da espécie, dentre eles estudos nas áreas de melhoramento genético, micropropagação, adaptabilidade, controle de pragas e doenças, biologia reprodutiva, conservação de germoplasma, armazenamento de frutos e domesticação.

A espécie ocorre na Floresta Ombrófila Mista, prolongando-se para áreas de campos nos refúgios vegetacionais conhecidos como capões, e para área de campo no extremo sul do Brasil, chegando ao Uruguai, ou seja, engloba os biomas Mata Atlântica e Pampa. Estas regiões vêm perdendo grande parte da diversidade pela expansão de fronteiras agrícolas, exploração florestal e desenvolvimento das cidades. A conservação das espécies que ocorrem nestes biomas tão ameaçados depende diretamente dos níveis de diversidade genética das populações de interesse, sendo que, pelo nível de destruição das áreas de ocorrência da espécie em questão, conhecer, acessar e compreender esta diversidade é cada vez mais urgente. Além disso, a Mata Atlântica é um

dos principais *hotspots* de biodiversidade do mundo e sofreu grandes interferências nos períodos glaciais e interglaciais que afetaram a atual distribuição da diversidade ali existente. Estudos de filogeografia de espécies que ocorrem nestas regiões são escassos e vêm a contribuir para o melhor entendimento das características biogeográficas da região.

A região serrana catarinense, os campos de altitude do sul do Paraná e a serra do sudeste do Rio Grande do Sul apresentam grande diversidade de *A. sellowiana*, sendo considerada por muitos como um dos principais centros de diversidade da espécie. No entanto, estas informações sobre centro de origem e diversidade são meramente especulativas e estudos mais aprofundados são necessários para verificar a natureza desses centros, se eles já formaram um contínuo da distribuição da espécie e como esta distribuição ocorreu.

Recentemente o conhecimento da biologia evolutiva passou a ser valorizado na identificação de áreas prioritárias para conservação. Muitos planos de conservação têm como objetivo a manutenção da diversidade genética, tendo em vista os processos evolutivos. Dessa forma é importante caracterizar as relações filogeográficas de populações naturais de *A. sellowiana* analisando um número abrangente de populações em toda área de ocorrência natural da espécie, utilizando análises com elevado poder analítico como sequências de DNA plastidial, proporcionando uma imagem ampla da atual diversidade genética e sua relação com a distribuição geográfica da espécie.

Análises com microssatélites nucleares levarão a um melhor entendimento sobre o modo de reprodução da espécie e de que forma a diversidade genética está distribuída na população, o que está diretamente ligado ao fluxo gênico. Estas informações devem ser consideradas quando se definem estratégias de manejo com o objetivo de se utilizar de forma sustentável e preservar os recursos genéticos.

Obter conhecimento dos níveis e padrões de distribuição espacial da diversidade genética de espécies vegetais é uma questão atual muito relevante, uma vez que o entendimento dos padrões evolutivos, inter e intrapopulacionais, fornecem subsídios importantes para a elucidação não só da estruturação genética e história de colonização da planta, mas também contribui para a história evolutiva e geológica da área de ocorrência.

O presente trabalho está organizado em cinco capítulos, precedidos por uma revisão bibliográfica. O primeiro capítulo abrange as questões filogeográficas, baseadas nas análises de sequências de cpDNA. O segundo trata do desenvolvimento de novos marcadores SSRs. O terceiro capítulo avalia oito SSRs quanto à herança

mendeliana, ligação e desequilíbrio genotípico. O quarto capítulo se refere à aplicação de marcadores SSRs para fazer inferências sobre a origem de populações cultivadas em regiões onde a espécie foi introduzida. O quinto capítulo utiliza os marcadores SSRs para estudar sistema reprodutivo, a estrutura genética espacial e o fluxo de pólen em uma população de *A. sellowiana*.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características gerais da espécie

Segundo Cronquist (1981), a família Myrtaceae compreende 102 gêneros, com 3.024 espécies descritas, sendo a maior família da ordem Myrtales. Govaerts *et al.* (2008) estimaram cerca de 140 gêneros e 5.600 espécies para o grupo. Para o Brasil, Landrum & Kawasaki (1997) citam cerca de 1.000 espécies, dentro de 23 gêneros, todos pertencentes à Tribo Mirteae (WILSON *et al.*, 2005). A família ocorre principalmente no hemisfério sul, tendo centros de diversidade nos trópicos úmidos, particularmente na América do Sul, Austrália e Ásia tropical, sendo comumente encontrada em muitos dos *hotspots* de biodiversidade do mundo, entre eles a Mata Atlântica (GOVAERTS *et al.*, 2008).

O gênero *Acca* O. Berg compreende três espécies com distribuição disjunta. Duas delas ocorrem na região Andina, *A. lanuginosa* (Ruiz e Pavon ex G. Don) McVaugh e *A. macrostema* (Ruiz e Pavon ex G. Don) McVaugh; e *A. sellowiana* ocorre no sul do Brasil, Uruguai e Argentina. Rambo (1956) e Safford (2007) reconheceram alta similaridade florística e compartilhamento de gêneros entre regiões de altitude do Sul do Brasil e a região Andina, indicando uma possível rota de colonização englobando os Andes e regiões do Paraguai, Bacia do Paraná e Norte da Argentina.

Coletada em 1819 por Sellow, a feijoa foi inicialmente descrita por Berg como gênero *Acca* em 1856 e gênero *Feijoa* em 1859. Como os dois gêneros não apresentam diferenças que justifiquem a sua separação, atualmente se aceita o nome *Acca sellowiana*, por ser o mais antigo (MATTOS, 1986; CACIOPPO, 1988, DUCROQUET *et al.*, 2000).

*A. sellowiana* é um arbusto ou árvore pequena de dois a seis metros de altura, existindo grande diversidade no porte da espécie, porém raramente ultrapassando os cinco metros (Figura 2.1 A). A coloração interna das pétalas é predominantemente púrpura, assim como os estames e o estigma (Figura 2.1 B) (DUCROQUET & RIBEIRO, 1991; FINATTO, 2008), o que leva a sua utilização como ornamental devido à beleza da floração, além do potencial para consumo humano em razão do agradável sabor das pétalas (SAZIMA & SAZIMA, 2007).

A espécie é diplóide ( $2n=22$ ) (VIJAYAKUMAR & SUBRAMANIAN, 1985; OLKOSKI *et al.*, 2011) considerando  $x=11$  o número básico descrito para a família (ATCHINSON, 1947; RAVEN, 1975). É hermafrodita, predominantemente alógama com tendências a

dicogamia por protoginia e possui autoincompatibilidade tardia (FINATTO *et al.*, 2011).

O fruto (Figura 2.1 C) é semelhante à goiaba comum em aparência, tamanho e consistência, mas a polpa de cor gelo possui sabor diferenciado, doce-acidulado e aromático (MATTOS, 1986; DUCROQUET & RIBEIRO, 1991). Ducroquet *et al.* (2000), relataram que o fruto apresenta uma diversidade muito grande com relação ao peso, formato e maturação, que pode ocorrer entre final de fevereiro e final de maio, se estendendo por cerca de três a quatro semanas.

Além do consumo *in natura*, os frutos podem ser processados e utilizados na produção de sucos, geleias e sorvetes (SHARPE *et al.*, 1993), tornando-se uma excelente alternativa para a agricultura familiar na região de ocorrência (SANTOS *et al.*, 2009). Já foram comprovadas inúmeras propriedades farmacológicas para espécie, como: ação antioxidante (KELES *et al.*, 2011); antibacteriana e antifúngica (BASILE *et al.*, 2010); aumento da mineralização óssea (prevenção e tratamento da osteoporose) (AYOUB *et al.*, 2009); ação antimicrobiana e antioxidante (BASILLE *et al.*, 1997; VUOTTO *et al.*, 2000); regulação pró-apoptótica em células cancerosas (BONTEMPO *et al.*, 2007); ação anti-inflamatória (ROSSI 2007; MONFORTE *et al.*, 2013); e imunoproteção (IELPO *et al.*, 2000). Weston (2010) apresentam uma ampla revisão sobre as propriedades químicas da espécie e seu potencial uso comercial nutracêutico.



Figura 2.1 - Indivíduo adulto de *A. sellowiana* (A); Detalhe de flores (B) e frutos (C). Fotos: Juan Manuel Otalora.

Segundo Marchiori & Sobral (1997), no Brasil, a ocorrência da espécie concentra-se nas regiões fisiográficas da Serra do Sudeste, Planalto Médio e Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul, no Planalto Serrano Catarinense e Campos de Altitude do Paraná, onde habita a orla da mata e vegetações de fisionomia savânica. Ocorre também no norte do Uruguai (LEGRAND, 1936; MATTOS, 1986; THORP & BIELESKI, 2003) e alguns autores afirmam a presença no Paraguai (MORTON, 1987) e na Argentina (KELLER & TRESSENS, 2007). A ocorrência natural da feijoa pode estar associada a determinadas condições ecológicas e edafoclimáticas dependentes da altitude, latitude, relevo, clima e tipologia vegetal (DUCROQUET *et al.*, 2000) que ainda não se encontram bem elucidadas. Este campo é ainda pouco explorado e não existe um mapeamento concreto da área de distribuição da espécie.

Devido à grande variação fenotípica, a espécie pode ser dividida em dois ‘Tipos’, que apresentam características bem distintas (FRANÇA, 1991). O grupo típico, ou ‘Tipo Brasil’ apresenta plantas com folhas de face abaxial verde-clara, pilosidade esbranquiçada curta e rala e sementes grandes (0,45 a 0,60 g para 100 sementes). Este ‘Tipo’ é encontrado nos bosques e capões de encosta que caracterizam as áreas de Campos de Altitude do Brasil meridional, entre 1.200 e 1.600 m de altitude e acima de 1.000 m de altitude no Rio Grande do Sul (DUCROQUET *et al.*, 2000). Nesses locais, geadas e temperaturas de até -10°C podem ocorrer, com temperatura média anual abaixo ou próxima de 16°C e o relevo favorecendo a formação de bosques e matas ralas de *Araucária*, onde abaixo do pinheiro se desenvolve uma submata rala (MARCHIORI, 2002). À medida que diminui a altitude, a Mata de Araucária cede lugar à Mata Subtropical Alta e Mista e vão desaparecendo os campos de altitude. A floresta se torna mais densa, exuberante e diversificada, e abaixo de 800 a 900 m, dependendo da latitude, desaparece a feijoa por falta principalmente de luz no interior das matas densas (DUCROQUET *et al.*, 2000).

O ‘Tipo Uruguai’ apresenta plantas com folhas de face abaxial branco-cinza com densa pilosidade branca e sementes pequenas (0,20 g para 100 sementes) (DUCROQUET *et al.*, 2000). Ocorre principalmente nas áreas de maior relevo no Norte do Uruguai, com temperatura média anual também por volta dos 16°C, além de bosques da serra do sudeste do Rio Grande do Sul (NODARI *et al.*, 1997; DUCROQUET *et al.*, 2000). Berg descreveu inicialmente estes dois ‘Tipos’ como duas espécies distintas: *Feijoa sellowiana* (‘Tipo Uruguai’) e *Feijoa obovata* (‘Tipo Brasil’). As diferenças expostas por Berg, embora não tenham

justificado a distinção em nível de espécie, foram confirmadas e complementadas ao longo do tempo. Ducroquet *et al.* (2000) caracterizaram os dois grupos efetivamente como duas populações delimitadas geograficamente. Thorp (1988) também diferencia duas populações: uma delas ocorrente no planalto meridional brasileiro, com solos de origem basáltica (Serra do Nordeste do Rio Grande do Sul e Serras e Planaltos de Santa Catarina e sul do Paraná); outra associada às áreas de origem cristalina de menor altitude das encostas do sudeste do Rio Grande do Sul e Uruguai.

Pelo que se sabe a distribuição global da espécie teve início quando ela foi levada da área de ocorrência natural em 1890 pelo botânico André, que levou para França poucas plantas do Uruguai (SHARPE *et al.*, 1993) que acabaram por se espalhar pela Itália, Rússia, Estados Unidos, Nova Zelândia, Israel e Colômbia (THORP & BIELESKI, 2003).

## 2.2 Marcadores Moleculares

### 2.2.1 DNA plastidial (cpDNA)

Para a Biologia Molecular e a Genética, o desenvolvimento de técnicas como a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS *et al.*, 1986) e o sequenciamento (SANGER *et al.*, 1977) permitiram que informações em nível de DNA pudessem ser observadas mais profundamente, possibilitando que informações de DNA organelar sejam cada vez mais utilizadas, especialmente em estudos evolutivos.

A amplificação de sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) é muito útil para elucidar questões filogeográficas entre os animais (ZINK *et al.*, 2006), mas são pouco informativas quando se trata de plantas (DUMINIL *et al.*, 2002; DAMBROSTKA & QIU, 2004). Atualmente, sequências de DNA de cloroplasto (cpDNA) são as mais utilizadas para inferir padrões evolutivos em plantas, podendo ser comparadas apenas com o sequenciamento de regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (SHAW *et al.*, 2005).

Genomas de organelas são usados porque, na maioria das vezes, são herdados uniparentalmente nas plantas com semente, e assim passam a ter um grande número de vantagens sobre os marcadores nucleares, que são herdados de forma biparental (PLEINES *et al.*, 2009). A principal vantagem é que, tipicamente, tem-se um alelo por célula, não ocorrendo recombinação. Devido a diferentes distâncias na dispersão, genomas herdados de maneira materna, paterna e

biparentalmente também apresentam diferenças da estruturação genética entre as populações, especialmente marcadores herdados maternalmente, que mostram uma subdivisão populacional muito maior (PETIT *et al.*, 2005).

No entanto, o DNA do cloroplasto foi por um longo tempo considerado muito conservado para estudos intraespecíficos (BANKS & BIRKY, 1985). Isso começou a mudar no início da década 90 (SOLTIS *et al.*, 1992), depois que estudos encontraram variação intraespecífica e mesmo intrapopulacional em cpDNA (WAGNER *et al.*, 1987; MILLIGAN, 1991), possibilitando estudos populacionais sobre fluxo gênico (McCAULEY, 1994). Polimorfismos de cpDNA em regiões não codificadoras vêm sendo amplamente utilizados, exibindo variabilidade intraespecífica suficiente para analisar relações filogenéticas de subespécies, variedades e formas domesticadas ou para analisar estrutura de populações (PLEINES *et al.*, 2009).

Na grande maioria das angiospermas o cpDNA é herdado maternalmente e, neste caso, é possível um estudo direto de dispersão medida por semente, possibilitando inferir sobre rotas de colonização (DULMOLIN-LAPEQUE *et al.*, 1997). Assim como, devido ao seu modo clonal de transmissão e à baixa taxa de mutação, as variações encontradas em sequências de cpDNA permitem a elucidação de fatores históricos que influenciam padrões de distribuição (SCHAAL *et al.*, 1998). O tamanho reduzido da população de genomas haplóides, combinado com a natureza restrita do fluxo de genes por meio de dispersão, faz marcadores de organelas herdados maternalmente mais propensos do que os marcadores nucleares para registrar os efeitos da história populacional presentes nos padrões genéticos (PLEINES *et al.*, 2009). Embora o fluxo contemporâneo de genes também possa influenciar a distribuição de variação do DNA organelar, o padrão de distribuição muitas vezes permite a diferenciação dos efeitos de fatores históricos daqueles de origem recente (SCHAAL *et al.*, 1998).

A herança do DNA plastidial em *A. sellowiana* não está definida; no entanto, em estudos com Myrtaceae dos gêneros *Chamelaucium* (MA *et al.*, 2004) e *Eucalyptus* (BYRNE *et al.*, 1993; MCKINNON *et al.*, 2001), o cloroplasto tem herança materna, assim como na maioria das plantas com sementes. Apesar de não existirem dados em outros gêneros, é razoável especular que um padrão semelhante será encontrado no restante da família (GRATAPAGLIA *et al.*, 2012).

Vários estudos vêm evidenciando que a utilização de cpDNA é uma rica fonte de marcadores para análises filogenéticas, filogeográficas e populacionais em estudos comparativos nos principais gêneros de

Myrtaceae (GRATAPAGLIA *et al.*, 2012). Já foi demonstrada a eficiência do DNA plastidial em análises filogenéticas na família Myrtaceae baseado em *matK* (gene da maturase K) e *psbA-trnH*, incluindo *A. sellowiana* (WILSON *et al.*, 2005; LUCAS *et al.*, 2005; LUCAS *et al.*, 2007).

Entre as mirtáceas o gênero *Eucalyptus* é o mais estudado. Steane (2005) sequenciou o genoma completo do cloroplasto de *E. globulus*, enquanto Byrne & Hopper (2008) utilizaram sequências de cpDNA para análise filogeográfica de *E. caesia*. Mais recentemente *Syzygium cumini* (L.) também teve o genoma do cloroplasto sequenciado (ASIF *et al.*, 2013). Turchetto-Zolet *et al.* (2011) apresentaram análise filogeográfica de *Eugenia uniflora*, uma Myrtaceae da Mata Atlântica utilizando dois marcadores intergênicos plastidiais.

Pares de iniciadores universais de regiões conservadas de cpDNA estão atualmente disponíveis para gerar informações que possam auxiliar estudos evolutivos (TABERLET *et al.*, 1991; DEMESURE *et al.*, 1995; HAMILTON, 1999; SHAW *et al.*, 2005; SHAW *et al.*, 2007), o que torna análises de sequências de regiões não codificadoras uma metodologia acessível.

### 2.2.2 DNA nuclear

Microsatélite, ou “*simple sequence repeat*” (SSR), é um marcador amplamente aplicado em estudos genéticos, inclusive em conservação genética, caracterização de cultivares, melhoramento molecular e testes de paternidade. Essa ampla aplicação se deve ao fato de que os SSRs são codominantes e multialélicos, altamente reprodutíveis, têm ampla resolução e são baseados na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Sua aplicação resulta em dados sobre a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações naturais, que são essenciais para a adoção de medidas de conservação tanto *ex situ* quanto *in situ*.

Normalmente, os locos microsatélites exibem um grande número de alelos que faz com que eles sejam especialmente úteis para análises de identificação individual e em estudos genéticos populacionais de modo geral (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Também são ideais para se avaliar o fluxo gênico através da dispersão de pólen e de sementes. Isto por causa do alto poder de exclusão por probabilidade na análise de parentesco, devido ao seu alto polimorfismo em termos de número de alelos nos locos. Uma maneira de avaliar o fluxo gênico através de marcadores genéticos é identificar as árvores maternas e paternas de

cada indivíduo juvenil. Consequentemente o fluxo gênico pode ser estimado com base na proporção de juvenis que não tiveram seus pais encontrados na área e que, portanto, são oriundos de pólen ou sementes advindos de fora da área (BURCZYK *et al.*, 2004).

Análises por marcadores microssatélites (SSRs) em *A. sellowiana* foram realizadas primeiramente a partir da transferência de iniciadores do gênero *Eucalyptus* por Santos *et al.* (2007) para avaliar a progênie de três cruzamentos (Tipo Brasil x Tipo Uruguai, Tipo Uruguai x Tipo Uruguai, Tipo Brasil x Tipo Brasil). Nesse estudo os acessos do Tipo Uruguai apresentaram menor diversidade genética comparativamente aos acessos do Tipo Brasil.

Santos *et al.* (2008) desenvolveram e caracterizaram 13 locos microssatélites específicos para *A. sellowiana*. Destes marcadores desenvolvidos, 12 foram utilizados por Santos (2009) para avaliar indivíduos de três procedências diferentes: indivíduos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG/EPAGRI), indivíduos do Parque Nacional de São Joaquim/SC, e indivíduos provenientes de propriedades rurais. Os resultados desse trabalho demonstraram similaridade entre a diversidade genética mantida no BAG, *on farm* e na Unidade de Conservação estudada. Dos marcadores disponíveis nove deles têm sido utilizados com frequência em análises genéticas (VILPERTE *et al.*, 2011; DONAZZOLO, 2012).

### 2.3 Filogeografia

O termo filogeografia foi estabelecido por Avise *et al.* (1987) e trata-se de um campo de estudo que leva em consideração princípios e processos que regem a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies estreitamente relacionadas. Aborda componentes históricos e filogenéticos da estrutura das populações, incluído como estes podem ter sido afetados pelas forças evolutivas (AVISE, 2000; 2009).

As contribuições mais importantes da filogeografia para a biologia estão em enfatizar aspectos de estrutura de populações, microevolução e esclarecer conexões que inevitavelmente existem entre a demografia populacional e a genealogia histórica, construindo pontes conceituais entre os campos anteriormente separados da genética de populações e da biologia filogenética (AVISE, 2004).

Inferências filogeográficas podem contribuir para um amplo estudo de ecologia e evolução em vários aspectos. Podem fornecer um contexto evolutivo e geográfico para as espécies e populações,

compreendendo as comunidades ecológicas, permitindo a determinação de influências históricas e espaciais e podendo orientar estratégias e prioridades para conservação (YOUNG, 1996; MORITZ, 2002), fornecendo a identificação de áreas geográficas contendo alta riqueza genética ou distintas unidades evolutivas (PLEINES *et al.*, 2009).

Os primeiros estudos de biologia evolutiva levavam em consideração a morfologia para estabelecer relações entre organismos, deduzindo aspectos sobre origem e evolução. Com o desenvolvimento científico e tecnológico muitas metodologias surgiram. Atualmente, estudos filogeográficos podem ser realizados através da utilização de marcadores moleculares, que podem revelar padrões evolutivos entre espécies ou populações detectando variação em nível de DNA. Para estudos filogeográficos e filogenéticos em plantas, marcadores plastidiais e nucleares são os principais (AVISE, 2004; YUAN *et al.*, 2008).

Nos últimos anos muitos trabalhos sobre filogeografia vêm sendo publicados; porém, se observa uma necessidade de mais estudos de espécies do hemisfério sul. Menos de 7% dos estudos desta área incluem espécies sul-americanas (BEHEREGARAY, 2008). Turchetto-Zolet *et al.* (2012) afirmam que mais recentemente um número crescente de trabalhos sobre espécies dessa região têm sido publicados, no entanto, 89% deles se referem a animais. Gratapaglia *et al.* (2012) destacam que a família Myrtaceae, com sua forte distribuição e alta diversidade na América do Sul, oferece muitos bons candidatos para análises filogeográficas.

## **2.4 Sistema de reprodução, estrutura genética e fluxo gênico**

A diversidade genética existente em populações naturais deve ser quantificada e avaliada quanto à distribuição entre e dentro de populações. A distribuição dessa diversidade pode apresentar grande variação por ser influenciada pelo tamanho efetivo populacional, pela ocorrência geográfica das espécies, pelo modo de reprodução, pelo sistema de cruzamento e pelos mecanismos de dispersão de sementes e polens (BAWA, 1992). Ou seja, muitos fatores influenciam a estrutura genética de populações.

Modelos clássicos de genética de populações que descrevem a estruturação genética de populações de plantas assumem que a atual estrutura genética reflete um equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico (WRIGHT, 1951). Contudo, a troca genética é restrita em muitos

grupos, tanto pela larga distribuição geográfica da espécie, quanto pela limitada dispersão de pólen e/ou sementes (EHRlich & RAVEN, 1969). Nesses casos, eventos históricos como expansão, fragmentação e efeito gargalo, serão fortes fatores determinantes da estrutura genética atual dessas populações (HEWITT, 2000; AVISE, 2000). Uma das principais inferências feitas em genética populacional é como a variação genética é distribuída entre e dentro de populações naturais de organismos para estudar fluxo gênico, deriva genética, sistemas de reprodução, taxas de mutação e a seleção natural (TEMPLETON *et al.*, 1995).

O sistema de reprodução de uma espécie tem influência predominante na estrutura genética de espécies vegetais, já que determina como as informações genéticas são transferidas de uma geração à outra (SILVERTOWN, 2008). O modo de reprodução de uma espécie é controlado pelo sistema sexual, sistema de reprodução, mecanismos de autoincompatibilidade, padrões de florescimento e síndromes de polinização (HOLSINGER, 2000).

O sistema de reprodução refere-se à autofecundação e cruzamentos, podendo ser classificado de acordo com a taxa de cruzamento em: sistema de cruzamento (taxa de cruzamento acima de 80%); sistema misto de reprodução (taxa de cruzamento entre 20 e 80%) ou; sistema de autofecundação (taxa de cruzamento abaixo de 20%). A maior parte das espécies de plantas estudadas apresenta sistema de cruzamento ou sistema misto (GOODWILLIE *et al.*, 2005).

O sistema de reprodução de uma espécie pode ser estudado utilizando marcadores genéticos como SSRs. Uma das abordagens pode ser através de análise de paternidade, comparando o genótipo materno com a segregação de sua progênie (COATES *et al.*, 2007). Outra abordagem baseia-se no Equilíbrio de Wright ou de endogamia, em que a taxa de cruzamento é estimada pelo coeficiente de endogamia (DAVID *et al.*, 2007). Uma terceira abordagem refere-se ao modelo misto, que separa indivíduos de uma progênie em oriundos de autopolinização ou de fecundação cruzada (RITLAND & JAIN, 1981; RITLAND 2002).

Quando um indivíduo migra de uma população para outra, ele carrega genes que são representativos de sua população ancestral para a população recipiente. Caso ele tenha sucesso em seu estabelecimento e realize cruzamentos, ele irá transmitir esses genes entre as populações, sendo que essa transferência é chamada de fluxo gênico. O fluxo gênico é o fator evolutivo responsável pela homogeneização, compensando os efeitos da deriva genética e seleção (RIDLEY, 2006).

O fluxo gênico é uma importante fonte de variação genética dentro das populações, porque equilibra os efeitos prejudiciais de deriva genética, mantém tamanhos efetivos de população, e tem importantes implicações para a gestão e conservação dos recursos genéticos (FENART, *et al.*, 2007; LYNCH, 2010). Até pouco tempo atrás se achava que o fluxo gênico não era alto o suficiente para ser considerado uma força evolutiva significativa, porém, segundo Ellstrand (2014), o aumento de estudos sobre esse tema tem comprovado que o fluxo de genes em plantas varia, mas é frequentemente alto o suficiente para ser evolutivamente significativo. A pesquisa sobre o fluxo de genes em plantas está viva e em crescimento no século 21, onde o fluxo gênico está começando a obter o respeito que merece na biologia evolutiva (ELLSTRAND, 2014).

Existem dois modos de se estudar os padrões de fluxo gênico em populações naturais: os métodos diretos e indiretos. Os métodos indiretos estão relacionados ao fluxo gênico histórico e são baseados na estrutura das populações, enquanto que os métodos diretos envolvem marcadores morfológicos e análise de paternidade e referem-se ao fluxo gênico contemporâneo. A análise de paternidade é uma excelente ferramenta para a definição do fluxo de pólen e, conseqüentemente, o fluxo gênico nas populações. É um método no qual, usualmente, se emprega marcadores multilocos para inferir os pais de progênies de sementes de mães conhecidas, fornecendo a descrição da estrutura individual com detalhes (ZUCCHI, 2003). Esta análise usa um conjunto de locos genético para identificar o mais provável pai de um conjunto de pais candidatos e, após a identificação deste, pode-se ter uma ideia do padrão de movimento do pólen na população.

Os primeiros estudos de análise de paternidade eram baseados apenas em métodos de exclusão de paternidade. Entretanto, este método pode atribuir erroneamente a paternidade a um candidato a pai, quando na realidade este indivíduo não é o verdadeiro pai, devido a não acomodar erros de genotipagem ou mutações (MARSHALL *et al.*, 1998). Para contornar este problema, outros modelos foram desenvolvidos, como o método de alocação categórica (MEAGHER 1986), que utiliza logaritmos de razões de probabilidades (conhecidas como *LOD scores*) para determinar o mais provável parental de um indivíduo do conjunto de candidatos a pais e acomoda erros de genotipagem ou mutações. Adicionalmente, Marshall *et al.* (1998) desenvolveu a estatística Delta, que nada mais é do que a subtração do *LOD score* do candidato mais provável do segundo mais provável candidato a parente. A análise considera o número de candidatos a pai, a

proporção de indivíduos amostrados e a falha ou erros nos dados genéticos. Segundo os autores o programa Cervus 3.0 é o mais indicado para as análises de paternidade utilizando marcadores codominantes.

Taxas de fluxo gênico de sementes por análise de parentesco continuam a ser raras em comparação com as taxas de fluxo gênico de pólen por meio de análise de paternidade. Estudos que medem o fluxo gênico por sementes ou pólen, identificando os pais de longa distância têm certas limitações. Por necessidade, eles se concentram em populações pequenas e relativamente isoladas ou em um conjunto de indivíduos espacialmente adjacentes que fazem parte de uma grande população. Os custos e tempo envolvidos na genotipagem são limitantes e até microssatélites não oferecem resolução suficiente para distinguir entre milhares de pais candidatos (ELLSTRAND, 2014).

A estrutura genética espacial ou autocorrelação espacial refere-se à distribuição espacial dos genótipos de indivíduos dentro de uma população, sendo característica para cada espécie. Ela é determinada pelos padrões de dispersão de pólen e sementes, densidade de indivíduos adultos, seleção micro ambiental, regeneração e pelo sistema de reprodução (HAMRICK & LOVELESS, 1986; LOISELLE *et al.*, 1995; ODDOU-MURATORIO *et al.*, 2004). Em populações naturais de plantas, o padrão e distância de dispersão de pólen e sementes são os principais fatores que influenciam na estrutura genética espacial (HAMRICK *et al.*, 1993). A importância do conhecimento da estrutura genética espacial está relacionada com o estabelecimento de estratégias de amostragem em populações naturais, tanto para a conservação genética como para fins de melhoramento, possibilitando a formação de amostras mais significativas, e também para mitigar os efeitos de práticas de manejo. Em estudos populacionais, ela pode ser utilizada tanto para estimar o grau de isolamento de populações (GONZALES & HAMRICK, 2005), como em abordagens intrapopulacionais auxiliando na detecção de indivíduos aparentados (DOLIGEZ & JOLY, 1997), permitindo inferir sobre o alcance do fluxo gênico e o tamanho da vizinhança.

Com relação à caracterização da diversidade genética de *A. sellowiana* poucos trabalhos já foram realizados. Isoenzimas foram utilizadas para caracterização dos acessos do BAG de São Joaquim (NODARI *et al.*, 1997). Marcadores moleculares do tipo RAPD foram utilizados por Welter *et al.*, (1999). Na Itália, esses marcadores também foram utilizados para discriminar 25 acessos de cultivares de feijoa introduzidos naquele país (DETTORI & PALOMBI, 2000). Estudos com marcadores microssatélites foram iniciados (SANTOS *et al.*, 2007;

SANTOS *et al.*, 2008; SANTOS, 2009; SANTOS *et al.*, 2011; DONAZZOLO, 2012), mas ainda há muito a ser explorado com relação à espécie utilizando esse tipo de marcador.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYOUB, N.A.; HUSSEIN, S.A.; HASHIM, A.N.; HEGAZI, N.M.; LINSCHIED, M.; HARMS, M.; WENDE, K.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M.A. Bonemineralizationenhancing activity of a methoxyellagicacidglucosideform a *Feijoa sellowiana* leaf extract. **Pharmazie**, v.64, n.2, p.137-141, 2009.

ASIF, H.; KHAN, A.; IQBAL, A.; KHAN, I.A.; HEINZE, B.; AZIM, M.K. The chloroplast genome sequence of *Syzygium cumini* (L.) and its relationship with other angiosperms. **Tree Genetics & Genomes**. DOI 10.1007/s11295-0130604-1, 2013.

ATCHINSON, E. Chromosome numbers in the Myrtaceae. **American Journal of Botany**, v.34, p.159-164, 1947.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, Cambridge, MA, 2000.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. 2<sup>nd</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2004.

AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**,v.36, p.03-15, 2009.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A. SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p. 489–522, 1987.

BANKS, J.A.; BIRKY, C.W. Chloroplast DNA diversity is low in a wild plant *Lupinus texensis*. **Proc Naturalist AcadSci USA**, v.82, p.6950-6954, 1985.

BASILE, A.; VUOTTO, M. L.; VIOLANTE, U.; SORBO, S.; MARTONE, G.; CASTALDO-COBIANCHI, R. Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 8, n.3, p. 199–203, 1997.

BASILE, A.; CONTE, B.; RIGANO, D.; SANATORE, F.; SORBO, S. Antibacterial and antifungal properties of acetonic extract of *Feijoa sellowiana* fruits and its effect on *Helicobacter pylori* growth. **Journal of medicinal food**, v.13, n.1, p.189-195, 2010.

BAWA, K.S. Mating systems, genetic differentiation and speciation in tropical rain forest plants. **Biotropica**, v.34, n.2, p.250-255, 1992.

BEHEREGARAY, L. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges of the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, v.17, p.3754-3774, 2008.

BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A.; NEBBIOSO, A.; DE BELLIS, F.; CONTE, M.; MINICHELLO, A.; MANZO, F.; CARAF, V.; BASILE, A.; RIGANO, D.; SORBO, S. COBIANCHI, R.C.; SCHIAVONE, E.M.; FERRARA, F.; DE SIMONE, M.; VIETRI, M.T.; CIOFFI, M.; SICA, V.; BRESCIANI, F.; LERA, A.R.; ALTUCCI, L.; MOLINARI, A.M. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.1902-1914, 2007.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S.P.; ADAMS, W.T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel. **Forest Genetic**, v.11, p.1-14, 2004.

BYRNE, M.; HOPPER, S.D. Granite outcrops as ancient islands in old landscape: evidence from the phylogeography and population genetics of *Eucalyptus caesia* (Myrtaceae) in Western Australia. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.93, p.177-188, 2008.

BYRNE, M.; MORAN, G.F.; TIBBITS, W.N. Restriction map and maternal inheritance of chloroplast DNA in *Eucalyptus nitens*. **Heredity**, v.84, p.218-220, 1993.

CACIOPPO, O. **La feijoa**. Madri: Mundi-Prensa, 1988. 85p.

CRONQUIST, A. **An Integrate system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press. 1981, 519p.

COATES, D.J.; SAMPSON, J.F.; YATES, C.J. Plant mating systems and assessing populations persistence in fragmented landscapes. **Australian Journal of Botany**, v.55, p.239-249, 2007.

DAMBROSTKA, O.; QIU, Y-L. Distribution of introns in the mitochondrial gene *nad-1* in land plants: phylogenetic and molecular evolutionary implications. **Molphylogenet Evol**, v.32, p.246-263, 2004.

DAVID, P.; PUJOL, B.; VIARD, F.; CASTELLAS, V.; GOUDET, J. Reliable selfing rate estimates from imperfect population data. **Molecular Ecology**, v.16, p.2474-2487, 2007.

DEMASURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R.J.A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology**, v.4, n.1, p.129-131, 1995.

DETTORI, M.T.; PALOMBI, M.A. Identification of *Feijoa sellowiana* Berg accessions by RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, v.86, p.279-290, 2000.

DOLIGEZ, A.; JOLY, H. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapaprocera* (Meliaceae), in French Guiana. **Heredity**, v.79, p.72-82, 1997.

DONAZZOLO, J. **Conservação e domesticação da feijoa na Serra Gaúcha - RS**. 2012. 312p. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2012.

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. **Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*)**. Série frutas nativas 5. Jaboticabal: Funep, 2000, 66p.

DUCROQUET, J.P.H.J.; RIBEIRO, P. Goiabeira-serrana: velha conhecida, nova alternativa. **Agropecuária Catarinense**, v.4, n.3, p 27-29, 1991.

DULMOLIN-LAPEGUE, S.; DEMASURE, B.; FINESCHI, S.; CORRE, V.L.; PETIT, R.J. Phylogeographic structure of white oaks

throughout the European continent. **Genetics**, v.146, n.4, p.1475-1487, 1997.

DUMINIL, J.; PEMONGE, M-H.; PETIT, R.J. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.428-430, 2002.

EHRlich, P.R.; RAVEN, P.H. Differentiation of populations. **Science**, v.165, p.1228-1232, 1969.

ELLSTRAND, N.C. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? **American Journal of Botany**, v.101, n.5, p.737-753, 2014.

FENART, S.; AUSTERLITZ, F.; CUGUEN, J.; ARNAUD, J.F. Long distance pollen-mediated gene flow at landscape level: the weed beet as a case study. **Molecular Ecology**, v.16, p.3801-3813, 2007.

FINATTO, T. **Caracterização Morfofisiológica do Sistema de Incompatibilidade atuante em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) (Myrtaceae)**. 2008. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2008.

FINATTO, T.; DOS SANTOS, K.L.; STEINER, N.; BIZZOCCHI, L.; HOLDERBAUM, D. F.; DUCROQUET, J.P.H.J.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Late-acting self-incompatibility in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany** (Print), v. 59, p. 53-60, 2011.

FRANÇA, S. Fruteiras nativas: preservação e lucro. **Manchete rural**, v.4, p.30-32, 1991.

GONZALES, E.; HAMRICK, J.L. Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest herb, *Trillium reliquum*. **Heredity**, v.95, p.306-314, 2005.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C.G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations and empirical evidence. **Annual Review in Ecology, Evolution and Systematics**, v.36, p.47-79, 2005.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.F.; LUGHADHA, E.N.; PROENÇA, C.; SILVA, L.H.S.; WILAON, P.; LUCAS, E.. **World Checklist of Myrtaceae**. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew, 2008.

GRATAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R.E.; SHEPHERD, M.; THUMMA, B.R.; FOLEY, W.; KULHEIM, C.; POTTS, B.; MYBURG, A.A. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v.8, p.463-508, 2012.

HAMILTON, M.B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions whit intraspecific variation. **Molecular Ecology**, v.8, p.521-523, 1999.

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, A.; FLEMING, T.H. (Eds.). **Frugivores and Seed Dispersal**. Dordrecht: Junk Publishers, chap. 17, 1986, p. 211-223.

HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A.; AND NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, v.107/108, p.281–297, 1993.

HEWITT, G.M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature**, v.405, p.907–913, 2000.

HOLSINGER, K.E. Reproductive systems and evolution in vascular plants. **Proceedings of the national academy of sciences**, v.97, , n.13, p.7037-7042, 2000.

IELPO, M.T.L.; BASILE, A.; MIRANDA, R.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; SORBO, S.; LAGHI, E.; RICCIARDI, M.M.; RICCIARDI, L.; VUOTTO, M.L. Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v.71, p.101-109. 2000.

KELES, H.; INCE, S.; KÜÇÜKKURT, I.; TATLI, I.I.; AKKOL, E.K.; KAHRAMAN, C.; DEMIREL, H.H. The effects of *Feijoa sellowiana* fruits on the antioxidantdefense system, lipid peroxidation, and tissue morphology in rats. **PharmaceuticalBiology**, p.1-8, 2011.

KELLER, H.A.; TRESSSENS, S.G. Presencia en Argentina de dos espécies de uso múltiple: *Acca sellowiana* (Myrtaceae) y *Casearia lasiophylla* (Flacourtiaceae). **Darwiniana**, v.45, n.2, p.204-212, 2007.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, p.508-536, 1997.

LEGRAND, D. Las mirtáceas del Uruguay. **Anales Del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v.4. n.11, 1936, 65p.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.D.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v.11, p.1420-1425, 1995.

LUCAS, E.J.; BELSHAM, S.A.; NICLUGHADA, E.M.; ORLOVICH, D.; SAKURAGUI, C.; CHASE, M.; WILSON, P.G. Phylogenetics patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae - preliminary molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution**, v.251, p. 35-51, 2005.

LUCAS, E.J, HARRIS, S.A.; MAZINE, F.F.; BELSHAM, S.R.; NICLUGHADA, E.M.; TELFORD, A., GASSON, P.E.; MARK W.; CHASE, M.W. Suprageneric phylogenetics of Myrtales, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon**, v.56, n.4, p.1105-1128, 2007.

MA, X.; CONSIDINE, J.A.; YAN, G. Chloroplast DNA variation and inheritance in waxflowers (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, v.52, p.55-61, 2004.

MARCHIORI, J.N.C. **Fitogeografia do Rio Grande do Sul: enfoque histórico e sistemas de classificação**. Porto Alegre, RS: Est, 2002. 119p.

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

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUK, L.; PEMBERTON, J.M.. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7, p.639-655, 1998.

MATTOS, J.R. **A goiabeira-serrana**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis (publicação IPRNR, 19), 1986. 84p.

McCAULEY, D.E. Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphisms among local populations of *Silene alba*: implications for studying gene flow in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.17, p.8127–8131, 1994.

McKINNON, G.E.; VAILLANCOURT, R.E.; TILYARD, P.A.; POTTS, B.M. Maternal inheritance of the chloroplast genome in *Eucalyptus globulus* and interspecific hybrids. **Genome**, v.44, p.831–835, 2001.

MEAGHER, T.R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. **Am. Nat.**, v.28, p.199–215, 1986.

MILLIGAN, B.G. Chloroplast DNA diversity within and among populations of *Trifolium pratense*. **Curr Genet**, v.19, p.411–416, 1991.

MONFORTE, M.T.; FIMIANI, V.; LANUZZA, F.; NACCARI, C.; RESTUCCIA, S.; GALATI, E.M. *Feijoa sellowiana* Berg Fruit Juice: Anti-Inflammatory Effect and Activity on Superoxide Anion Generation. **Journal of Medicine Food**, v.0, p. 1-7, 2013.

MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. **Systematic Biology**, v. 51, p. 238-254, 2002.

MORTON, J.F. *Feijoa*. In: **Fruits of warm climates**. Miami: Julia F. Morton, p.367-370, 1987.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v.51, p.263–273, 1986.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P.; MELER, K.; DUCROQUET, J.P.H.J. Genetic variability of *Feijoa sellowiana* germoplasm. **Acta Horticulturae**, v.452, p.41-46, 1997.

ODDOU-MURATORIO, S; DEMESURE, M. B.; PÉLISSIER, R.; GOUYON, P.H. The roles of colonization and history in the local genetic structure of a scattered temperate tree species. **Molecular Ecology**, v.13, p.3689–3702, 2004.

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

OLKOSKI, D.; PETRY, V.S.; DONAZZOLO, J.; NODARI, R.O. Determination of chromosome number in *Acca sellowiana* (Berg) Burret. In: 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. **Anais do 57 Congresso Brasileiro de Genética**, p. 148-148, 2011.

PETIT, R.J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology**, v.14, p.689-701, 2005.

PLEINES, T.; JAKOB; S.S.; BLATTNER, F.R. Applications of non-coding DNA regions in intraspecific analyses. **Plant Systematic Evolution**, v.282, p. 281-294, 2009.

RAMBO, B. A flora fanerogâmica dos Aparados Riograndenses. **Sellowia**, v.7, p. 235-298, 1956.

RAVEN, P.H. The bases of angiosperm phylogeny: cytology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.62, p.724–764, 1975.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3ª.Edição, Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2006, 450p.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using independent locos. **Heredity**, v.88, p. 221-228, 2002.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequency using independent locos. **Heredity**, v.47, p.35-52, 1981.

ROSSI, A.; RIGANO, D.; PERGOLA, C.; FORMISANO, C.; BASILE, A.; BRAMANTI, P.; SENATORE, F.; SAUTEBIN, L. Inhibition of inducible oxidase synthase expression. By na acetonic extract from *Feijoa sellowiana* Berg. Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.55, p.-5053-5061, 2007.

SAFFORD, H.D. Brazilian paramos IV: phytogeography of the campos de altitude. **Journal of Biogeography**, v.34, p.1701-1722, 2007

SANGER, F.; NICKLEN S.; COULSO A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, K.L. **Diversidade cultural, genética e fenotípica da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*): implicações para a domesticação da espécie**. 163f. Tese (Doutorado em Ciências área de concentração: Recursos Genéticos Vegetais), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.

SANTOS, K.L.; SANTOS, M.O.; LABORDA, P.R.; SOUZA, A. P.; PERONI, N.; NODARI, R.O. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 73–79, 2007.

SANTOS, K.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; Caracterização genética de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) com marcadores microssatélites heterólogos. **Biotemas**, v. 24, n.4, p.75-83, 2011.

SANTOS, K.L.; SANTOS, M.O.; LABORDA, P.R.; SOUZA, A. P.; PERONI, N.; NODARI, R. O. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers in *Acca sellowiana* (Berg) Burret. **Molecular Ecology Notes**, v. 8, p. 998-1000, 2008.

SANTOS, K.L.; GURIES, R.P.; NODARI, R.O.; PERONI, N. Traditional knowledge and management of feijoa (*Accasellowiana*) in southern Brazil. **Economic Botany**, v.63, p.204-214, 2009.

SAZIMA, I.; SAZIMA M. Petiscos florais: pétalas de *Acca sellowiana* como fonte alimentar para aves em área urbana no Sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v.7, n.2, p.307-312, 2007.

SCHAAL, B.A.; HAYWORTH, D.A.; OLSEN, K.M.; RAUSCHER, J.T.; SMITH, W.A. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, v.7, p.465-474, 1998.

SHARPE, R.H.; SHERMAN, W.B.; MILLER, E.P. *Feijoa* history and improvement. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v.106, p.134-139. 1993.

SHAW, J.; LICKEY, E.B.; BECK, J.T; FARMER, S.B.; LIU, W.; MILLER, J.; SIRIPUN, K.C.; WINDER, C.T.; SCHILLING, E.E.; SMALL, R.L. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, v.92, p. 142-166, 2005.

SHAW, J.; LICKEY, E.B.; SCHILLING, E.E.; SMALL, R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, v.94, n.3, p. 275-288, 2007.

SILVERTOWN, J. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. **International Journal of Plant Science**, v.169, n.1, p. 157-168, 2008.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; MILLIGAN, B.G. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In: **Molecular Plants Sistematics** (eds. SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; DOYLE, J. J.), Chapman and Hall, New York, p.117-150, 1992.

STEANE, D.A. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the Tasmanian Blue Gum, *Eucalyptus globules* (Myrtaceae). **DNA Research**, v.12, p.215-220, 2005.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PATOU, G.; BOUVET, J. Universalprimers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. **Pl. Mol. Biol.**, v.17, p.1105-1109, 1991.

THORP, G. DSRI's feijoa breeding program goes to South America. **The Orchardist of New Zealand**, v.61, n.7, p.213-215, 1988.

THORP, G.; BIELESKI, R. **Feijoas: origins, cultivation and uses**. Auckland, N.Z.: HortResearch. Ed. David Bateman, 2003, 87p.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; SALGUEIRO, F.; CRUZ, F.; VETO, N.; MARGIS, R. Chloroplast DNA variation and phylogeography of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) in the Brazilian Atlantic forest. **BMC Proceedings**, v.5 (Suppl 7), p.19, 2011.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, p.01-21, 2012.

VIJAYAKUMAR, N.; SUBRAMANIAN, D. Cytotaxonomical studies in South Indian Myrtaceae. **Cytologia**, v.50, p.513-520, 1985.

VILPERTE, V.; OLKOSKI, D.; KLABUNDE, G.H.F.; PETRY, V.S.; NODARI, R.O. Analysis of genetic diversity in a natural population suggest long distance seed dispersal of *Acca sellowiana* (Berg) Burret. In: 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. **Anais do 57 Congresso Brasileiro de Genética**, p. 38, 2011.

VUOTTO, M. L.; BASILE A.; MOSCATIELLO, V.; DE SOLE, P.; CAS-TALDO-COBIANCHI, R.; LAGHI, E.; IELPO, M. T. L. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.13, p.197-201, 2000.

WAGNER, D.B.; FURNIER, G.R.; SAGHAI-MAROOF, M.A.; WILLIAMS, S.M.; DANK, B.P.; ALLARD, R.W. (1987) Chloroplast DNA polymorphisms in lodge pole and jack pines and their hybrids. **Proc Natl Acad Sci**, v.84, p.2097-2100, 1987.

WELTER, L.J.; BELÓ, A.; DUCROQUET, J.P.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Genetic characterization of the Goiabeira-Serrana (*Feijoa sellowiana* Berg) germoplasm. In: 45° Congresso Brasileiro de Genética, Gramado (RS), **Anais do 45° Congresso Brasileiro de**

**Genética**, Ribeirão Preto, SP, SBG, v.22, n.3, Supplement, p. 301, 1999.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v.121, p. 923-926, 2010.

WILSON, P.G.; O'BRIEN, M.M; HELSEWOOD, M.M; QUINN, C.J. Relationships within Myrtaceae sensulato based on *matK* phylogeny. **Plan Systematics and Evolution**, v.251, p.3-19, 2005.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann Eugen**, v.15, p.323–354, 1951.

YOUNG, K. R. Species diversity in ecological communities: historical and geographical perspectives. **Annals of the Association of American Geographers**, v.16, p.9-15, 1996.

YUAN, Q. J.; ZHANG, Z. Y.; PENG, H.; GE, S.; Chloroplast phylogeography of *Dipentodon* (Dipentodontaceae) in southwest China and northern Vietnam. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 1054-1065, 2008.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.V.; PINHEIRO, J.B.; COELHO, A.S.G.; CHAVES, L.J.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC. in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.449-458, 2003.

ZINK, R.M.; DROVETSKI, S.V.; ROHWER, S. Selective neutrality of mitochondrial ND2 sequences, phylogeography and species limits in *Sitta europaea*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.40, p. 679–686, 2006.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar, por meio de marcadores moleculares plastidiais e nucleares, a diversidade genética de *Acca sellowiana*, estabelecendo relações filogeográficas entre populações e analisando fluxo gênico, diversidade e estruturação genética intrapopulacional.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de sequências de cpDNA para estudos filogeográficos na espécie;
- Caracterizar a diversidade genética por meio de sequências de cpDNA;
  - Identificar o epicentro de diversidade da espécie;
  - Desenvolver novos marcadores SSR e testar a transferibilidade para outras espécies de Myrtaceae;
  - Testar herança mendeliana, ligação gênica e equilíbrio de ligação em marcadores SSRs;
  - Inferir sobre a diversidade e origem de amostras de *A. sellowiana* cultivadas em áreas introduzidas;
  - Investigar a ocorrência de estruturação genética espacial intrapopulacional;
  - Avaliar o padrão reprodutivo da espécie em uma população natural;
  - Comparar diversidade genética, estruturação genética espacial, endogamia e tamanho efetivo entre adultos e progênies;
  - Caracterizar padrões de distribuição de pólen.



## 4. CAPÍTULO I – ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret

### 4.1 Introdução

Padrões geográficos de diversidade genética fornecem informações úteis sobre diferentes fatores que influenciaram a história de uma espécie (PETIT *et al.* 2003; HEUERTZ *et al.*, 2006) e são o produto de uma longa e complexa história das tendências evolutivas que envolvem processos ecológicos e as forças ambientais externas (RULL, 2011). Os atuais padrões de distribuição geográfica e evolução das plantas são o resultado de processos geológicos e eventos históricos (PIELOU, 2008).

Enquanto muitos estudos filogeográficos são realizados em plantas de clima temperado (PETIT *et al.* 2003), relativamente poucos têm sido realizados em espécies tropicais e subtropicais, apesar da importância para o conhecimento dos biomas dessa região. Menos de 7% dos estudos desta área incluem espécies sul-americanas (BEHEREGARAY, 2008). Turchetto-Zolet *et al.* (2012) relataram um crescimento no número de trabalhos sobre espécies dessa região, no entanto, apenas 11 % deles se referem a plantas. Gratapaglia *et al.* (2012) destacam que a família Myrtaceae, com sua forte distribuição e alta diversidade na América do Sul, possui espécies importantes para análises filogeográficas.

*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret é uma Myrtaceae que ocorre no sul do Brasil (MARCHIORI & SOBRAL, 1997), no Uruguai (LEGRAND, 1936; MATTOS, 1986; THORP & BIELESKI, 2003) e alguns autores afirmam a presença no Paraguai (MORTON, 1987) e na Argentina (KELLER & TRESSENS, 2007). Não existe um consenso sobre a distribuição da espécie, embora englobe os Biomas Pampa e Mata Atlântica.

A espécie é utilizada como ornamental devido à beleza da floração que também tem potencial para consumo humano e animal em razão do agradável sabor das pétalas (SAZIMA & SAZIMA, 2007). Já foram comprovadas inúmeras propriedades farmacológicas da espécie (BASILE *et al.*, 1997; VUOTTO *et al.*, 2000; IELPO *et al.*, 2000; BONTEMPO *et al.*, 2007; WESTON 2010; KELES *et al.*, 2011; MONFORTE *et al.*, 2013). Porém, seu maior potencial está nos frutos, fazendo com que seja produzida em diferentes países (e.g. Nova Zelândia, Estado Unidos, Colômbia) e seja uma opção de renda para fruticultura na região de ocorrência natural (SANTOS *et al.*, 2009),

podendo ser consumido *in natura* ou processado (SHARPE *et al.* 1993; SANTOS *et al.*, 2009).

Devido à grande variação fenotípica, a espécie pode ser dividida em dois ‘Tipos’, que apresentam características ditas distintas. O ‘Tipo Brasil’ apresenta maior porte, folhas de coloração mais escura e com menos pilosidade, sementes maiores e ocorre na região mais ao norte da distribuição natural da espécie (DUCROQUET *et al.*, 2000). O ‘Tipo Uruguai’ tem porte menor, plantas com folhas de aspecto mais acinzentado com densa pilosidade branca e sementes menores, ocorrendo na região mais ao sul (DUCROQUET *et al.*, 2000). Berg descreveu inicialmente estes dois ‘Tipos’ como duas espécies distintas: *Feijoa sellowiana* (‘Tipo Uruguai’) e *Feijoa obovata* (‘Tipo Brasil’). Thorp (1988) e Ducroquet *et al.* (2000) caracterizaram os dois grupos efetivamente como duas populações delimitadas geograficamente: uma delas ocorrente no planalto meridional brasileiro, com solos de origem basáltica (Serra do Nordeste do Rio Grande do Sul e Serras e Planaltos de Santa Catarina e sul do Paraná); outra associada às áreas de origem cristalina de menor altitude das encostas do sudeste do Rio Grande do Sul e Uruguai. Não existem estudos genéticos que demonstrem a diferenciação da espécie nesses ‘Tipos’.

Este é o primeiro estudo que aborda marcadores de sequência de DNA de cloroplasto para *A. sellowiana* e avalia um grande número de populações, na região de ocorrência da espécie. Este trabalho objetiva avaliar o potencial destes marcadores para estudos filogeográficos e assim identificar centros de diversidade e evidência sobre a dispersão da espécie.

## 4.2 Material e Métodos

Foram analisadas 32 populações distribuídas na área de ocorrência da espécie, totalizando 409 indivíduos (Tabela 4.1). Os locais das coletas foram estabelecidos de acordo com informações obtidas por meio de conhecimento pessoal, citações na literatura e levantamento em herbários, pelo fato de hoje a distribuição da espécie não ser completamente conhecida. A autorização para coleta do material vegetal, tanto em áreas particulares quanto em Unidades de Conservação, foi concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (Autorização – 27697).

As populações foram coletadas entre os anos de 2010 e 2012. Todos os indivíduos foram georeferenciados com auxílio de equipamento GPS (*Global Position System*). De cada planta foi obtida

amostra de tecido foliar jovem, acondicionada em tubo criogênico e imediatamente armazenada em nitrogênio líquido. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração do DNA. Amostras de quatro populações uruguaias foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa da Dra. Mercedes Rivas, da Faculdade de Agronomia da Universidad de la Republica (UdelaR), Montevideo.

Foi realizada extração de DNA vegetal segundo protocolo CTAB proposto por Doyle & Doyle (1990) com modificações. Em um cadinho de cerâmica foi colocado cerca de 100 mg de tecido e adicionado nitrogênio líquido para a maceração do material. Após foram adicionados em cada amostra 1,5 ml de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-Cl; 2% PVP e 3% 2-mercaptoetanol), transferindo a solução para microtubos de 2 ml e incubando-os em banho-maria ( $60^{\circ}\text{C}$ ) por 30 min, agitando as amostras a cada 10 min para a homogeneização. Após a retirada do banho-maria foram adicionados 600  $\mu\text{l}$  de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico), agitando cada amostra por inversão durante 5 min e centrifugando a 15.000g por 5 min. A fase superior aquosa foi transferida para um novo microtubo onde foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  de CTAB 10% com NaCl (1,4 M) e 600  $\mu\text{l}$  de CIA, agitando por inversão durante 5 min e centrifugando a 15.000g por mais 5 min. O sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo onde foram adicionados 2/3 do volume da solução de isopropanol gelado e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  por período não inferior a duas horas. As amostras foram submetidas à nova centrifugação (5.000 g por 5 min), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com 1 ml de solução de etanol 76% e acetato de amônio 10 mM por 1 min e uma vez em etanol 95% por 2 min, para limpeza e desidratação. Depois de seco, o *pellet* foi ressuscitado em 50  $\mu\text{l}$  de água ultra pura autoclavada com 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de RNase, as amostras incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 min para digestão de RNA e posteriormente armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

As amostras para as quais não foi possível a armazenagem em nitrogênio líquido foram mantidas em sacos hermeticamente fechados com sílica gel. Neste caso a extração de DNA se deu com kit de extração *NucleoSpin® Plant II* (Macherey-Nagel) conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

O DNA extraído foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (*Thermo Scientific*) e também gel de agarose 1%. As soluções de trabalho de cada amostra foram padronizadas diluindo a uma concentração de DNA final de 10 ng/ $\mu\text{l}$ .

Foi realizado um *screening* inicial com quatro iniciadores universais de cpDNA desenvolvidos por Demasure *et al.* (1995) e Hamilton (1999) (Tabela 4.2). Esse *screening* foi aplicado em dez indivíduos para estabelecer protocolos de amplificação dos fragmentos e identificar polimorfismos.

Os iniciadores tiveram suas condições de amplificação estabelecidas para um volume total de 20  $\mu\text{L}$  contendo: 20 ng de amostra de DNA, 0,1 mM de cada dNTP (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1U de Taq DNA Polymerase (Biolase), 1x Taq buffer, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  e 0,4 $\mu\text{L}$  de cada primer a 10 $\mu\text{M}$ . Termociclador Veriti (Life Technologies, Carlsbad, CA) foi utilizado para amplificação dos fragmentos utilizando: 96 °C por 5 min, com 35 ciclos de 96 °C por 45 s, temperatura de anelamento por 1 min, 72 °C por 30 s, e uma extensão final de 10 min a 72 °C.

Após a amplificação a purificação dos produtos de PCR foi realizada com polietilenoglicol (PEG) 20% de acordo com protocolo adaptado de Dunn & Blattner (1986). As amostras foram então quantificadas em gel de agarose 1% corado com GelRed (*Biotium*®), por comparação com o padrão de bandas do marcador 1 kb DNA ladder (*New England Biolabs*®).

Para reação de sequenciamento as regiões selecionadas foram amplificadas via PCR com a utilização do kit Dynamic ET Dye Terminator® (*GE Healthcare*) seguindo as instruções do fabricante, com modificações, sendo que para uma reação de 10  $\mu\text{L}$  foram utilizados 4  $\mu\text{L}$  de *DYEnamic<sup>ET</sup> terminatorsequencingpremix*; 0,45  $\mu\text{L}$  de cada primer a 10 $\mu\text{M}$  e aproximadamente 40 ng de produto de PCR purificado. As condições de amplificação da reação de sequenciamento foram: 30 ciclos compostos de 94° C por 30 s, 50° C por 60 s e 60° C por 1 min.

Os produtos da amplificação foram novamente purificados para retirada de iniciadores, dNTPs, ddNTPs não incorporados e sais que podem dificultar o sequenciamento. Para isso a cada amostra foi adicionado 1,0  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5 M e 27,5  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto e a placa foi agitada levemente para homogeneizar a solução. As placas foram mantidas por 20 min a -20° C para precipitação dos ácidos nucleicos e então centrifugadas (4° C) durante 30 min a 2.500 g. O sobrenadante foi removido por inversão e foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70% para a lavagem do *pellet*. As reações foram novamente centrifugadas (4° C) durante 20 min a 2.500 g, o sobrenadante foi removido por inversão e a placa mantida a temperatura ambiente para secar e eliminar os resíduos de álcool. Depois de seco o *pellet*

adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de *Loading Solution* (kit *Dynamic ET Dye Terminator*®) em cada amostra e a placa permaneceu a 4° C até o sequenciamento. Antes do sequenciamento as placas contendo as amostras ressuspensas em *Loading Solution* foram agitadas (*Vortex*®) durante 5 min. O sequenciamento foi realizado através de eletroforese capilar em sequenciador MegaBACE 1000 DNA Analysis System (*GE Healthcare*). As amostras foram eletro-injetadas (0,2  $\mu\text{L}$ ) em matriz LPA (poliacrilamida linear) a 3 kV durante 80 s e posteriormente eletro-eluídas a 9 kV durante 120 min a 45 °C.

Os dois marcadores que apresentaram maior qualidade de sequência e polimorfismo foram selecionados e então amplificados em todos os indivíduos. Foram realizadas reações em triplicatas (três reações para o iniciador direto e três para o reverso) para cada indivíduo, garantindo assim a fidelidade das sequências obtidas, além de uma amostra de DNA controle sequenciada com primer M13 em cada corrida de sequenciamento para garantir a qualidade do kit de sequenciamento e da eletroforese capilar.

Após o sequenciamento os eletroferogramas foram processados com a utilização da ferramenta Cifarrom 3.12, contida no *software* Sequence Analyzer v. 4.0 (*GE Healthcare*). As sequências foram alinhadas e corrigidas quando necessário utilizando o programa CodonCode Aligner v. 3.7.1 (CodonCode Corporation, Dedham MA), sendo gerado uma sequência consenso para cada indivíduo baseado no alinhamento das seis sequências obtidas inicialmente.

Os haplótipos foram gerados no programa DNAsp 5.0 (LIBRADO & ROZAS, 2009). A diversidade genética foi estimada calculando a diversidade de haplótipos (WATTERSON, 1975) e nucleotídeos (TAJIMA, 1983) no programa ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

A rede de haplótipos foi confeccionada pelo método *Median Joining* (BANDELT *et al.*, 1999) no programa NETWORK 4.6.1.1 (<http://www.fluxus-engineering.com>).

Tabela 4.1 – Identificação das populações, número de indivíduos amostrados (N), origem, coordenadas geográficas e altitude de 32 populações de *A. sellowiana*.

<b>População</b>	<b>N</b>	<b>Origem</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>		<b>Altitude (m)</b>
LG_1	15	Lages/SC	27°80'01"S	50°09'95"W	1000
IPE	19	Ipê/RS	28°75'14"S	51°35'39"W	750
PAL	15	Palmas/PR	26° 50'36"S	51°67'05"W	1300
GUA	14	Guarapuava/PR	25°26'29"S	51°39'17"W	1100
PIN	4	Pinhão/PR	25°77'50"S	51°42'11"W	1040
BIT	10	Bituruna/PR	26°02'52"S	51°70'20"W	980
POV	24	Porto Vitória/PR	26°31'07"S	51°23'06"W	800
PAM	15	Passos Maia/SC	26°73'77"S	51°94'81"W	800
LG_2	8	Lages/SC	27°99'38"S	49°36'68"W	945
URB	10	Urubici/SC	28°04'18"S	50°29'70"W	1000
PAR	11	Paráí/RS	28°59'40"S	51°78'40"W	660
CBS	13	Campo Belo do Sul/SC	27°65'52"S	50°69'54"W	1015
CAP	10	Capinzal/RS	27°37'17"S	51°55'26"W	500
SOL	12	Soledade/RS	28°88'50"S	52°41'31"W	730
CAN	15	Canela/RS	29°32'31"S	50°81'65"W	840
SJA	19	São José dos Ausentes/RS	28°59'85"S	49°89'62"W	1200
RPA	5	Rio Pardo/RS	29°85'25"S	52°40'33"W	47
PEL	20	Pelotas/RS	31°58'82"S	52°47'30"W	300
CPV	10	Caçapava/RS	30°51'63"S	53°46'17"W	400
BAG	15	Bagé/RS	31°33'66"S	54°02'88"W	200
SSP	6	São Sepé /RS	30°17'80"S	53°62'90"W	90
ITA	10	Itaara/RS	29°65'53"S	53°77'39"W	380
SLI	20	Santana do Livramento/RS	30°86'72"S	55°11'43"W	210

Tabela 4.1 – Continuação. Identificação das populações, número de indivíduos amostrados (N), origem, coordenadas geográficas e altitude de 32 populações de *A. sellowiana*.

<b>População</b>	<b>N</b>	<b>Origem</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>		<b>Altitude (m)</b>
SLI	20	Santana do Livramento/RS	30°86'72"S	55°11'43"W	210
ROS	15	Rosário/RS	30°04'54"S	55°10'47"W	120
URCL	10	Cuchilla de Laurales/Uruguai	31°34'20"S	55°94'22"W	200
URO	10	Quebrada de los Cuervos/ Uruguai	32°79'88"S	54°15'85"W	230
URSR	10	Sierra del Ríos/Uruguai	32°14'22"S	53°97'20"W	120
URVE	12	Valle Éden/Uruguai	31°84'26"S	56°25'66"W	190
AR_1	10	Oberá/Argentina	27°24'33"S	55°06'41"W	300
AR_2	15	Oberá/Argentina	27°56'11"S	55°00'91"W	330
ERC	10	Erechim/RS	27°37'07"S	52°17'52"W	685
CAD	13	Cacique Doble/RS	27°46'07"S	51°41'21"W	623

Tabela 4.2 - Pares de iniciadores universais de cpDNA testados (DEMASURE *et al.*, 1995; HAMILTON, 1999) com suas respectivas temperaturas de anelamento.

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequências</b>	<b>Temperatura de Anelamento</b>
<i>trnK-trnK</i>	5'GGGTTGCCCCGGGACTCGAAC3' 5'CAACGGTAGAGTACTCGGCTTTTA3'	51° C
<i>trnD-trnT</i>	5'ACCAATTGAACTACAATCCC3' 5'CTACCACTGAGTTAAAAGGG3'	53° C
<i>trnH-psbA</i>	5'ACTGCCTTGATCCACTTGGC3' 5'CGAAGCTCCATCTACAAATGG3'	53° C
<i>trnS-trnG</i>	5'GCCGCTTTAGTCCACTCAGC3' 5'GAACGAATCACACTTTTACCAC3'	54° C

Para inferir sobre eventos com expansões populacionais ou gargalos, foi calculado o teste de neutralidade D de Tajima (TAJIMA, 1989), que se baseia no modelo de sítios infinitos sem recombinação (KIMURA, 1969), apropriado para sequências curtas de DNA e assumindo que a probabilidade de um mesmo sítio sofrer mutações duas vezes é infinitamente pequena. Também foi utilizado o teste  $F_s$  de Fu (1997) que também é baseado no modelo de sítios infinitos, levando em consideração os fatores temporais das mutações que geram sítios polimórficos, classificando-as como antigas e recentes. Ambos os testes foram realizados no programa ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005), sendo que, para o teste D de Tajima (1989) o valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo, enquanto que o valor de  $p < 0,02$  foi considerado para o  $F_s$  de Fu (1997) devido ao poder do teste (RAMOS-ONSINS & ROZAS, 2002).

Análise da Variância Molecular (AMOVA) foi utilizada para se detectar a presença e o nível de diferenciação entre as populações, levando em consideração a variação das frequências gênicas entre os haplótipos. A análise estima componentes de covariância e calcula o índice de fixação  $\phi_{ST}$ , análogo ao  $F_{ST}$  (WEIR & COCKERHAM, 1984) e foi realizada no programa ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

A correlação entre as distâncias genéticas e geográficas foi calculada no programa *Alleles in Space (AIS)* 1.0 (MILLER, 2005) pelo Teste de Mantel (MANTEL, 1967).

O agrupamento de populações foi avaliado por método bayesiano usando o programa BAPS (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) versão 5.1 (<http://web.abo.fi/fak/mnf//mate/jc/software/baps.html>), desenvolvido por Corander *et al.* (2007). O programa estima o número ideal de grupos baseado no menor valor do  $\log(lm)$ . Para executar este programa o número de K (grupos) foi ajustado entre um e 12 e a análise realizada 10 vezes. A partição que apresentou o maior valor de probabilidade marginal foi registrada e analisada. Uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) hierárquica com k grupos foi implementada no ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) para testar a significância da estrutura apresentada pela Análise Bayesiana.

### 4.3 Resultados e Discussão

As 32 populações analisadas englobam toda zona de ocorrência da espécie que se conhece até o momento, embora tal área ainda não esteja completamente elucidada. Concomitantemente a este trabalho está

sendo realizado um estudo aprofundado sobre a área de ocorrência da espécie. Entre as 32 populações, cinco delas se encontram no interior de Unidades de Conservação (PAL; PAM; URB; SJA; CAN). O número de indivíduos por população variou de quatro a 24, totalizando 409.

A qualidade e quantidade do DNA extraído avaliadas através de espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (*ThermoScientific*) e em gel de agarose 1% indicaram DNA de boa qualidade e quantidade suficiente para realização das análises (Figura 4.1).

Os marcadores plastidiais que demonstraram polimorfismo e melhor qualidade de sequencia foram o *trnH-psbA* e o *trnS-trnG*, sendo então os espaçadores escolhidos para análise filogeográfica. O marcador *trnH-psbA* é um dos mais utilizados em estudos filogeográficos (XU *et al.*, 2000) e, segundo Shaw *et al.* (2007), é uma das regiões não codificantes mais variáveis do cloroplasto. No entanto, por gerar um fragmento pequeno e muitas vezes caracteres informativos insuficientes, geralmente ele é utilizado em conjunto com outros marcadores (HAMILTON *et al.*, 2003). Alguns estudos também evidenciam o polimorfismo encontrado no marcador plastidial *trnS-trnG* quando comparado a outros espaçadores (XU *et al.*, 2000; PERRET *et al.*, 2003). Inclusive, dentro da ordem Myrtales, esse se apresenta mais informativo que *trnH-psbA*, *matK* e *atpB-rbcL* (SCHONENBERGER & CONTI, 2003).

O sequenciamento gerou um alinhamento concatenado de 1021 pb para os 409 indivíduos. Desses, 404 pb são referentes ao marcador *trnH-psbA* e 617 pb ao marcador *trnS-trnG*. Foram identificados 11 sítios polimórficos, sendo uma deleção e 10 substituições, das quais duas foram transições e oito transversões. Os 11 polimorfismos originaram 10 haplótipos (Tabela 4.3).

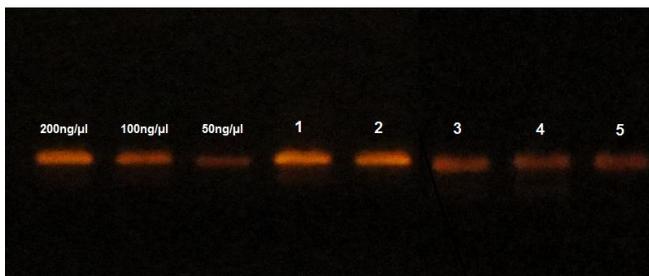


Figura 4.1 - Gel de quantificação de DNA (agarose 1%) contendo três padrões ( $\lambda$  200 ng/ $\mu$ l,  $\lambda$  100 ng/ $\mu$ l e  $\lambda$  50 ng/ $\mu$ l) e cinco amostras de DNA de *A. sellowiana*.

Tabela 4.3 - Haplótipos amostrados pelos dois marcadores plastidiais (*trnH-psbA* e *trnS-trnG*) e seus respectivos sítios polimórficos

Haplótipos	Posição dos Nucleotídeos										
	<i>trnH-psbA</i>					<i>trnS-trnG</i>					
	29	30	79	222	246	585	694	785	794	814	817
H1	T	A	T	C	A	A	A	G	T	C	T
H2	G	.	.	A	.	C	.	.	A	.	.
H3	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.
H4	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
H5	.	C	.	.	.	C	G	.	.	A	C
H6	.	.	.	.	.	.	.	-	.	A	C
H7	.	.	.	.	.	.	.	-	A	.	.
H8	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.
H9	.	C	.	.	.	.	.	-	.	.	.
H10	.	.	.	A	C	C	.	.	.	.	.

A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foi de 0,00211 ( $\pm$  0,00007), enquanto que a haplotípica ( $Hd$ ) foi de 0,817 ( $\pm$  0,011). As características das sequencias para cada população estão expostas na Tabela 4.4. A diversidade de haplótipos entre as populações variou de zero nas populações que apresentaram apenas um haplótipo, a 0,615 na população mais ao norte (GUA). Com relação à diversidade de nucleotídeos houve uma variação de zero a 0,00133 nas populações de Lages (LG\_2) e Campo Belo do Sul (CBS). Vale salientar que das 32 populações analisadas, 22 apresentaram um único haplótipo, ou seja, diversidade nucleotídica e haplotípica nulas.

Para *E. uniflora*, Turchetto-Zolet *et al.* (2011) encontraram uma variação de zero a 0,733 na diversidade haplotípica, similar aos resultados obtidos no presente trabalho para *A. sellowiana*. No entanto, a diversidade haplotípica total encontrada por eles foi menor (0,433). Com relação a diversidade de nucleotídeos os autores encontraram uma variação de zero a 0,00144 e um total de 0,00088, comportamento diferenciando com relação ao dados aqui obtidos que apresentaram uma diversidade nucleotídica entre as populações menor com relação a nucleotídica total, mostrando que, apesar da alta diversidade haplotípica os haplótipos de uma mesma população são muito similares.

Os testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu foram aplicados inicialmente para a espécie como um todo (englobando todas as populações) e não apresentaram valores significativos, D = 0,813 ( $p > 0,10$ ) e Fs = 0,984 ( $p > 0,10$ ), demonstrando que a espécie está em equilíbrio e não demonstra efeitos significativos de retração e expansão

populacional. O mesmo ocorreu com os testes de neutralidade quando aplicados a cada uma das populações (Tabela 4.4).

A rede de haplótipos confeccionada pelo método *Median Joining* (Figura 4.2) foi editada, sendo que o comprimento das linhas não indica o número de mutações entre os haplótipos; as mutações correspondem às apresentadas na Tabela 4.3.

De acordo com a teoria da coalescência (KINGMAN, 1982) os haplótipos que se localizam na parte mais interna da rede e são mais frequentes, provavelmente são os mais antigos, assim como os mais recentes se encontram nas extremidades da rede. Pode-se assim observar que os haplótipos H1, H6 e H8 são mais ancestrais, enquanto H2, H5, H9 e H10 são mais recentes (Figura 4.2).

A distribuição dos haplótipos entre as populações analisadas, discriminados por cores no mapa (Figura 4.3) correspondem às cores apresentadas na rede de haplótipos. Pode-se observar que os haplótipos mais antigos H1 e H6 ocorrem mais ao norte da área amostrada, área que também inclui a maior diversidade, pois oito dos 10 haplótipos detectados ocorrem nesta região.

Esta região mais ao norte, com latitudes variando de 25°26'29"S a 29°32'31"S e altitude superior a 500 m (com exceção da população Rio Pardo), é o centro de maior diversidade da espécie quando consideramos marcadores plastidiais neutros. Esta alta diversidade também foi observada em características fenotípicas e genéticas utilizando outros marcadores, como isoenzimáticos (NODARI *et al.*, 1997) e microssatélites (SANTOS, 2009; DONAZZOLO, 2012).

A população de Palmas/PR (PAL) possui um haplótipo exclusivo (H2) aparentemente derivado do haplótipo H8, enquanto que o haplótipo H9 é exclusivo à população de Rio Pardo/RS (RPA), do qual deriva o haplótipo H5 que ocorre em baixa frequência da população de Lages (LG\_2).

Pode-se observar uma diminuição da diversidade nas populações que ocorrem mais ao sul da área amostrada. A partir da latitude 29°65'53"S e abaixo de 400 m de altitude, ocorrem apenas dois haplótipos (H8 e H10). O haplótipo H8 ocorre em todas as populações nesta região, englobando mais de 95% dos indivíduos analisados. Apenas uma população possui outro haplótipo além do H8, o H10, exclusivo de Santana do Livramento (SLI). O haplótipo H8 ocorre também nas populações Capinzal (CAP) e Erechim (ERC). A baixa diversidade genética das populações que ocorrem no Uruguai já tinha sido demonstrada por Santos (2005) utilizando marcadores microssatélites nucleares.

Desde que Keller & Tressens (2007) descreveram a ocorrência da espécie na Argentina, dúvidas existem com relação às populações terem sido introduzidas ou realmente serem de ocorrência natural, isso devido ao fato das populações apresentarem uma densidade alta de plantas em uma região restrita daquele país. As duas populações da Argentina analisadas neste trabalho apresentam um único haplótipo (H3), compartilhado com as populações de Guarapuava/PR, Bituruna/PR e Porto Vitória/PR, o que parece indicar ocorrência natural da espécie, pois estas são as populações analisadas geograficamente mais próximas das populações argentinas. No entanto, não há registros suficientes que demonstrem a ocorrência da espécie em solo argentino. Coletas de possíveis populações na região entre o Paraná, oeste de Santa Catarina e a Argentina são necessárias para confirmar esta hipótese, permitindo verificar se existe uma ponte entre populações argentinas e brasileiras.

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) demonstrou alto grau de estruturação genética entre as populações (Tabela 4.5). Pode-se observar que grande parte da variação encontrada entre as sequências (87,39%) corresponde à variação entre populações, enquanto que apenas 12,61% são relativos à variação intrapopulacional. O Índice de Fixação ( $\Phi_{ST}$ ) foi de 0,87 ( $p < 0,001$ ) após 10.000 permutações.

Tabela 4.4 – Populações, tamanho amostral (N), haplótipos, diversidade de haplótipos (*Hd*) e de nucleotídeos ( $\Pi$ ) e testes de neutralidade em 32 populações de *A. sellowiana*.

<b>População</b>	<b>N</b>	<b>Haplótipos</b>	<b><i>Hd</i></b>	<b><math>\Pi</math></b>	<b>Fs de Fu*</b>	<b>DTajima*</b>
LG_1	15	H1	0,0	0,0	-	-
IPE	19	H1	0,0	0,0	-	-
PAL	15	H2	0,0	0,0	-	-
GUA	14	H1, H3, H4	0,615±0,101	0,00087±0,00022	0,783	1,458
PIN	4	H4	0,0	0,0	-	-
BIT	10	H1, H3	0,356±0,159	0,00070±0,00031	1,523	0,018
POV	24	H3, H4	0,464±0,07	0,00045±0,00007	1,362	1,231
PAM	15	H1, H4	0,533±0,051	0,00122±0,00088	1,317	1,502
LG_2	8	H1, H5	0,250±0,180	0,00133±0,00039	0,761	-1,310
URB	10	H1	0,0	0,0	-	-
PAR	11	H6	0,0	0,0	-	-
CBS	16	H1, H6, H7	0,575±0,112	0,00133±0,00039	1,313	0,778
CAP	10	H7, H8	0,200±0,154	0,00105±0,00077	1,224	-1,562
SOL	12	H6	0,0	0,0	-	-
CAN	15	H6	0,0	0,0	-	-
SJA	19	H6	0,0	0,0	-	-
RPA	5	H9	0,0	0,0	-	-
PEL	20	H8	0,0	0,0	-	-
CPV	10	H8	0,0	0,0	-	-

\*p > 0,01

Tabela 4.4 – Continuação. Populações, tamanho amostral (N), haplótipos, diversidade de haplótipos (*Hd*) e de nucleotídeos ( $\Pi$ ) e testes de neutralidade em 32 populações de *A. sellowiana*.

<b>População</b>	<b>N</b>	<b>Haplótipos</b>	<b><i>Hd</i></b>	<b><math>\Pi</math></b>	<b>Fs de Fu*</b>	<b>DTajima*</b>
BAG	15	H8	0,0	0,0	-	-
SSP	6	H8	0,0	0,0	-	-
ITA	10	H8	0,0	0,0	-	-
SLI	20	H8, H10	0,394±0,100	0,00040±0,00010	0,976	0,722
ROS	15	H8	0,0	0,0	-	-
URCL	10	H8	0,0	0,0	-	-
URO	10	H8	0,0	0,0	-	-
URSR	10	H8	0,0	0,0	-	-
URVE	12	H8	0,0	0,0	-	-
AR_1	10	H3	0,0	0,0	-	-
AR_2	15	H3	0,0	0,0	-	-
ERC	10	H6, H8	0,355±0,159	0,00075±0,00035	3,025	0,022
CAD	13	H1, H6	0,555±0,074	0,00045±0,00045	2,429	1,844

\*p > 0,01

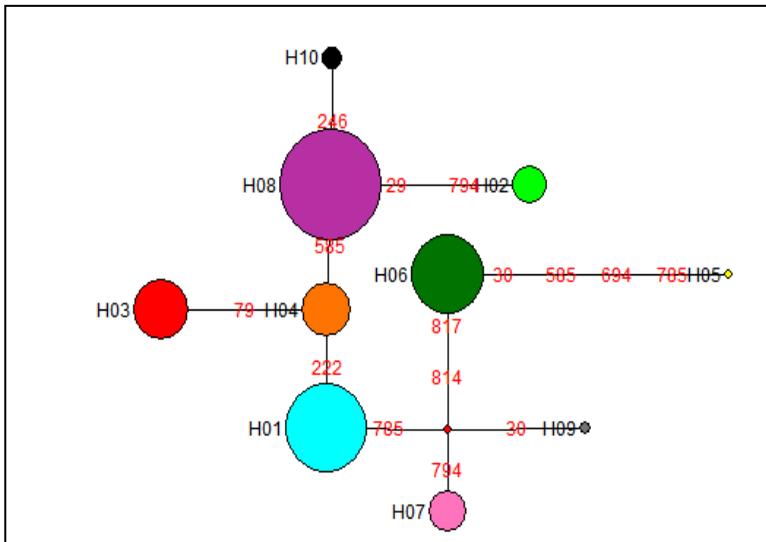


Figura 4.2 - Rede de haplótipos (*Median-joining network*) construída com base na análise das duas regiões de cpDNA (*trnH-psbA* e *trnS-trnG*) em *A. sellowiana*. Os círculos representam os haplótipos e o tamanho dos círculos a frequência dos mesmos. Os números indicam os passos mutacionais.

Uma alta estruturação filogeográfica como esta pode refletir longos períodos de ausência de fluxo gênico (AVISE, 2004) ou fluxo gênico restrito a pequenas distâncias. O mesmo foi observado por Turchetto-Zollet *et al.* (2011) em *E. uniflora* ( $\Phi_{ST} = 0,77$ ), Myrtaceae com ocorrência na Mata Atlântica. Santos (2009) e Donazzolo (2012) encontraram uma maior variação dentro das populações quando analisaram *A. sellowiana* com marcadores microssatélites nucleares, o que é esperado em espécies alógamas. Como o genoma do cloroplasto possui herança materna na maioria das angiospermas, o fluxo gênico é restrito quando comparado com o genoma nuclear, pois é transmitido apenas através de sementes. Conseqüentemente, quando se utiliza o genoma do cloroplasto em estudos genéticos espera-se encontrar uma maior estruturação geográfica da variabilidade genética.

O teste de Mantel apresentou uma correlação baixa, mas significativa entre distância genética e geográfica ( $r = 0,382$ ;  $p < 0,001$ ), ou seja, cerca de 15 % da variação da distância genética pode ser explicada pela distância geográfica.

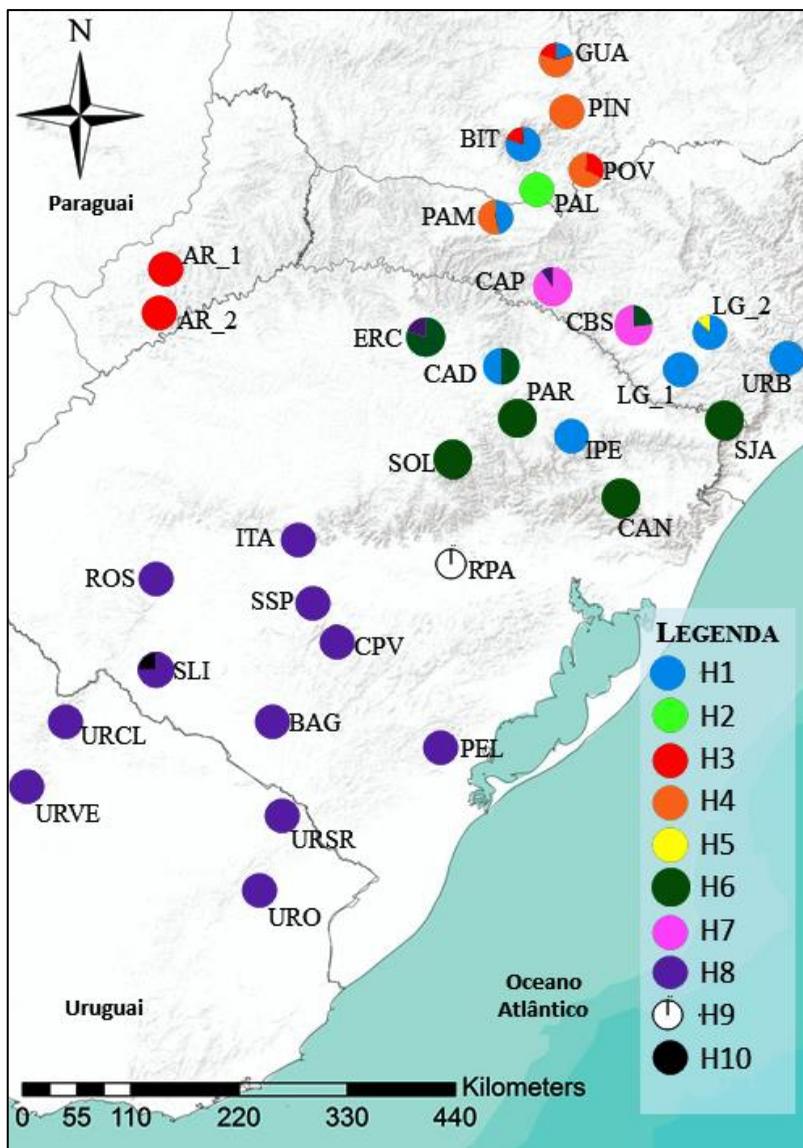


Figura 4.3 – Mapa de distribuição dos 10 haplótipos nas 32 populações analisadas de *A. sellowiana* com os marcadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. As cores correspondem aos haplótipos apresentados na rede de haplótipos (Figura 4.2).

Tabela 4.5 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) entre o total de populações amostradas de *A. sellowiana*.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>Componentes da Variância</b>	<b>Varição</b>
<b>Entre populações</b>	31	364,207	0,910	87,39 %
<b>Dentro das populações</b>	378	49,639	0,131	12,61 %
<b>TOTAL</b>	409	413,846	1,041	$\Phi_{ST} = 0,873^*$

GL – Graus de Liberdade; SQ – Soma dos Quadrados;  $\Phi_{ST}$  – Índice de Fixação.\*  
 $p < 0,001$

A Análise Bayesiana da Estrutura Genética Espacial identificou a formação de nove grupos (Tabela 4.6). A Figura 4.4 representa o gráfico de barras gerado pelo programa BAPS 5.1 onde cada grupo está representado por uma cor e cada população está delimitada por uma barra escura. A distribuição espacial dos grupos formados pode ser observada na Figura 4.5 onde cada célula representa uma população e as cores das células correspondem aos grupos apresentados no gráfico de barras.

As 11 populações localizadas ao sul e que possuem os haplótipos H8 e H10 formaram o maior grupo (Grupo 8), representado pela cor marrom. As populações de Passos Maia (PAM), Rio Pardo (RPA) e Palmas (PAL) formaram grupos isolados, sendo que Rio Pardo e Palmas possuem haplótipos exclusivos H9 e H2, respectivamente.

Os testes de neutralidade  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu foram aplicados para os nove grupos formados pela Análise Bayesiana (Tabela 4.6). O Grupo 3 (LG\_1; LG\_2; IPE; URB; BIT) apresentou  $D$  de Tajima negativo e significativo, indicando uma expansão populacional recente, ao contrário do Grupo 7 (PAR; CBS; CAP; SJA; ERC; SOL) que apresentou valores positivos e significativos ( $p < 0,05$ ) para  $F_s$  de Fu, o que indicaria uma redução no tamanho populacional ou seleção balanceadora. No entanto, para este teste o valor de  $p < 0,02$  deve ser considerado (FU, 1997) devido ao poder do teste (RAMOS-ONSINS & ROZAS, 2002). Todos os outros

grupos não apresentaram valores estatísticos significativos para estes testes. Porém, quando se observa a distribuição geográfica dos haplótipos (Figura 4.5) fica evidente a ocorrência de expansão recente do Grupo 8, onde os valores dos testes de neutralidade são negativos, porém não significativos. Estes testes dependem do número de sítios e de haplótipos, que neste caso são baixos, por isso é comum testes de neutralidade não serem significativos quando os marcadores apresentam tão baixo polimorfismo. A utilização de outros marcadores como microssatélites nucleares, pode acessar mais claramente a ocorrência desta expansão.

Embora não tenham sido avaliadas características fenotípicas nos indivíduos aqui estudados, comparando a localização geográfica das populações amostradas com as áreas de ocorrências dos ‘tipos’ que já foram descritas para a espécie (DUCROQUET *et al.*, 2000; FRANÇA, 1991), parece haver uma sincronia entre o padrão de distribuição de haplótipos e os ‘Tipos Brasil’ e ‘Uruguai’, apoiando, através de evidências moleculares, a existência destes dois ‘Tipos’.

Tabela 4.6 - Nove grupos evidenciados pela Análise Bayesiana (BAPS 5.1), as respectivas populações e testes de neutralidade.

<b>Grupo</b>	<b>Populações</b>	<b>Fs de Fu</b>	<b>D de Tajima</b>
1	CAN; CAD	1,29	1,94
2	AR_1; AR_2	-	-
3	LG_1; LG_2; IPE; URB; BIT	0,49	-1,99*
4	PAM	-	-
5	PAL	-	-
6	PIN; POV; GUA	1,35	1,13
7	PAR; CBS; CAP; SJA; ERC; SOL	4,72**	1,57
8	PEL; CPV; BAG; ITA; SSP; SLI; ROS; URCL; URO; URSR; URVE	-0,55	-0,605
9	RPA	-	-

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $0,02 > p < 0,05$ .

A análise da variância molecular (AMOVA) com 10.000 permutações testando a hipótese de agrupamento apresentado pela Análise Bayesiana (Tabela 4.7) demonstrou que 77,55% da variação encontrada entre as sequencias corresponde a variação entre grupos, 11,45% entre as

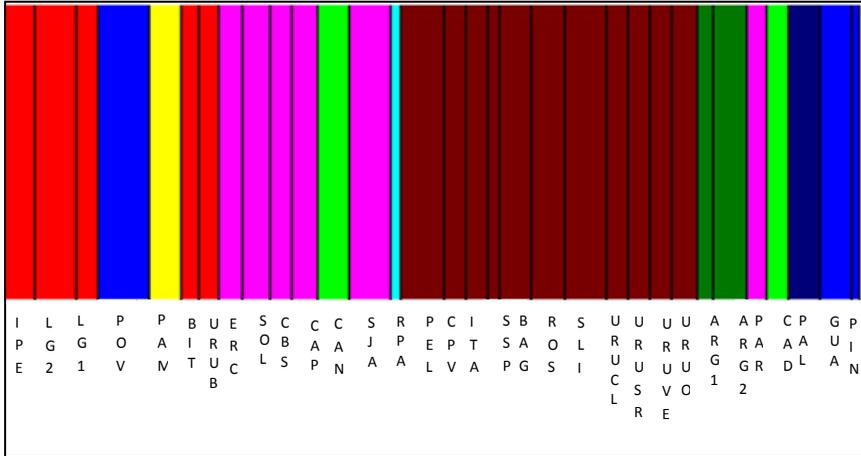


Figura 4.4 - Gráfico de barras gerado pelo programa BAPS (5.1) com as 32 populações analisadas. Cada cor representa um agrupamento e cada população é separada por uma barra escura.

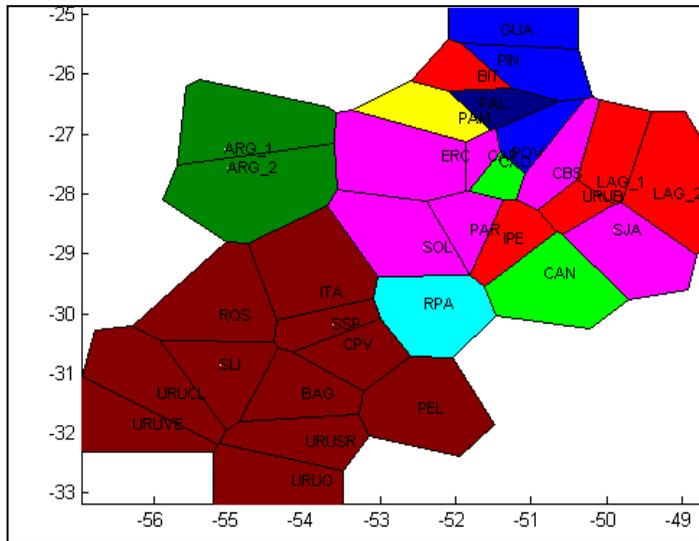


Figura 4.5 – Distribuição espacial das 32 populações de *A. sellowiana* de acordo com os nove grupos formados pela Análise Bayesiana (BAPS 5.1). Cada célula representa uma população e as cores correspondem aos grupos indicados no gráfico de barras (Figura 4.4).

Tabela 4.7 – Análise da Variância Molecular (AMOVA) para hipótese de nove grupos formados pela Análise Bayesiana.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>Componentes da Variância</b>	<b>Varição</b>
<b>Entre grupos</b>	8	322,525	0,925	77,55%
<b>Entre populações dentro de grupos</b>	23	41,683	0,136	11,45%
<b>Dentro das populações</b>	378	49,639	0,131	11%
<b>TOTAL</b>	409	413,846	1,406	
$\Phi_{SC} = 0,43^*$		$\Phi_{ST} = 0,87^*$		$\Phi_{CT} = 0,78^*$

GL – Graus de Liberdade; SQ – Soma dos Quadrados. \* $p < 0,001$ .

populações do mesmo grupo e 11% dentro das populações.

Várias são as características que suportam padrão diferenciado da distribuição da diversidade em dois Super Grupos (Tabela 4.8). O mapa a seguir (Figura 4.6) apresenta a distribuição dos nove grupos formados pela Análise Bayesiana, assim como os dois Super Grupos. O Super Grupo I engloba as populações dos Grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 formados pela Análise Bayesiana, enquanto que o Super Grupo II é formado pelo Grupo 8.

Tabela 4.8 – Bioma, altitude, latitude, diversidade haplotípica ( $Hd$ ), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), testes de neutralidade (D de Tajima e Fs de Fu) e coeficientes de correlação (r) do Teste de Mantel que diferem entre o Super Grupo I e o Super Grupo II.

	<b>Super Grupo I</b>	<b>Super Grupo II</b>
<b>Bioma</b>	Mata Atlântica	Pampa
<b>Altitude</b>	Acima de 500 m	Até 400 m
<b>Latitude</b>	Até 29°32'S	Abaixo de 29°65'S
<b><math>Hd</math></b>	0,814	0,088
<b><math>\pi</math></b>	0,00209	0,00009
<b>D</b>	0,923	-0,605
<b>Fs</b>	1,779	-0,549
<b>r</b>	0,20 ( $p < 0,001$ )	-0,097 ( $p > 0,05$ )

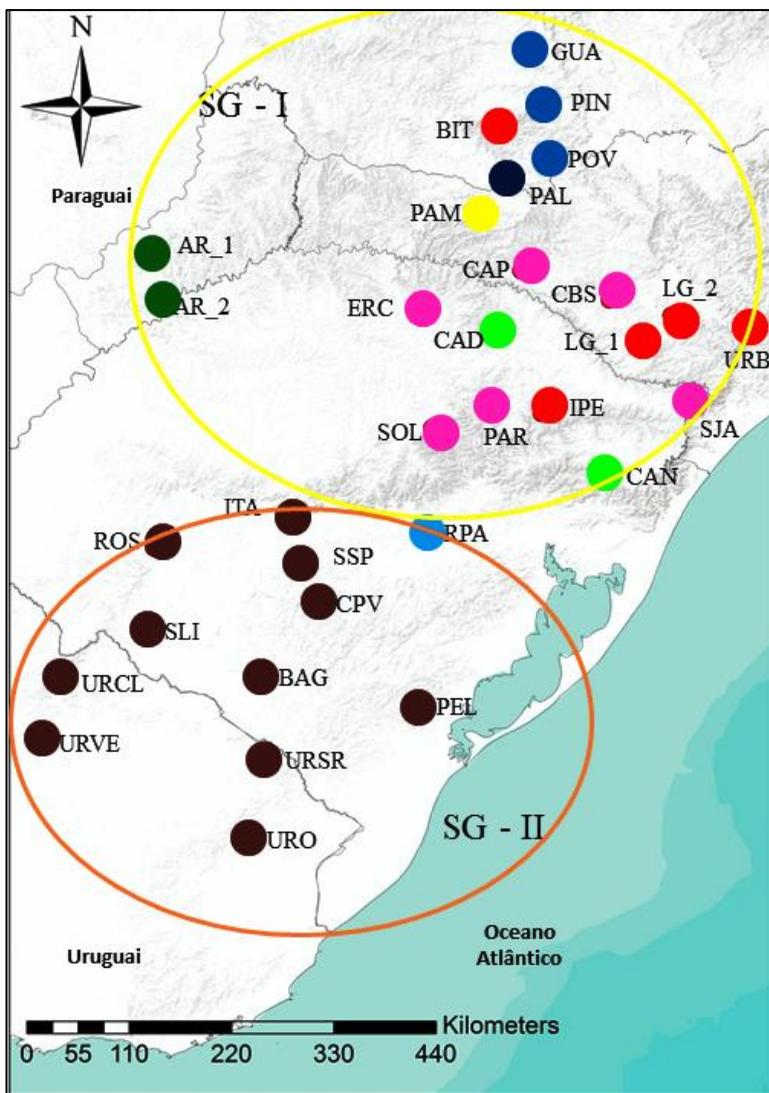


Figura 4.6 – Mapa de distribuição dos nove grupos formados. Populações com a mesma cor pertencem ao mesmo Grupo de acordo com a Análise Bayesiana; elipses maiores delimitam os dois putativos Super Grupos (SG – I Super Grupo I; SG – II Super Grupo II).

O Super Grupo I ocorre na Mata Atlântica, em regiões de maior altitude, associado à Mata de Araucária e Campos de Altitude, possui maior diversidade genética e apenas 4% da variação das distâncias genéticas pode ser explicada pela distância geográfica. Enquanto o Super Grupo II ocorre na região do Bioma Pampa, em menores altitudes, apresenta menor diversidade, expansão recente e outros fatores, que não a distância geográfica, estão contribuindo para a variação das distâncias genéticas (Tabela 4.8)

Mudanças climáticas desempenham papéis importantes na distribuição das espécies de plantas. Algumas dessas mudanças se deram devido aos ciclos glaciais e interglaciais controlados pelos chamados ciclos de Millankovitch (BERGER, 1988). Nos períodos glaciais, clima frio e seco predominava na América do Sul, sendo que na área onde atualmente ocorre a Floresta Ombrófila Mista a vegetação de campo dominava. Já nos períodos interglaciais o clima esquentava e a floresta expandia (similar ao observado nestas regiões atualmente). Nas regiões de menor altitude no Sul do Brasil os campos se mantinham tanto nos períodos glaciais quanto nos interglaciais (BEHLING, 2002; BEHLING & PILLAR, 2007). *A. sellowiana* parece ter sofrido mecanismos distintos de diferenciação nestes dois ambientes.

Na Floresta Ombrófila Mista as mudanças podem ter estimulado a diversidade e influenciado a distribuição geográfica de *A. sellowiana*. Assim como no gênero *Calibrachoa*, onde os ciclos consecutivos de expansão e contração das áreas de campo e florestas em terras altas influenciou a distribuição geográfica das populações e também a diversidade (FREGONEZI *et al.*, 2013).

Lorenz-Lemke *et al.* (2010) sugeriram que a diversidade nos campos de altitude ocorreu como resultado da expansão das espécies ancestrais durante os períodos glaciais, seguido de fragmentação quando as florestas de *Araucária* se espalhavam cercado as áreas de campo, que posteriormente se tornaram ilhas isoladas nas áreas de maior altitude. Esta fragmentação pode ter isolado as populações e reduzindo o fluxo de genes podendo ser a causa da elevada estruturação observada para espécie.

Nas áreas de menor altitude, onde o campo predomina até hoje, as matas de galeria atuais aparecem no registro de pólen apenas há cerca de 5000 anos (BEHLING, *et al.* 2005; BEHLING & PILLAR, 2007). Isso pode justificar a expansão recente de *A. sellowiana* nesta região, além de uma possível influência antrópica.

Klabunde (2012) encontrou três prováveis refúgios para *Araucaria angustifolia*, dois deles estão na área de ocorrência da *A. sellowiana* e coincidem com regiões de alta diversidade aqui identificadas (Serra dos Campos Gerais/PR e Serra Geral SC/RS). Isso mostra que, além destes locais serem prováveis refúgios para *A. angustifolia*, também serviram como refúgios para espécies associadas a ela, como é o caso de *A. sellowiana*.

#### 4.4 Conclusões

As sequências dos espaçadores intergênicos plastidiais apresentaram baixo polimorfismo, mas com potencial para estudos filogeográficos em *A. sellowiana*. Possibilitaram assim, caracterizar a diversidade genética e identificar centros de maior diversidade na distribuição mais ao norte da espécie, englobando os campos de altitude dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Existe uma acentuada estruturação genética, pouco correlacionada com a distribuição geográfica. Foi possível identificar dois padrões de distribuição da diversidade genética, um para região de maior altitude na Floresta Ombrófila Mista onde os fatores climáticos dos períodos glaciais e interglaciais tiveram maior influência. O outro padrão ocorre na região de menor altitude, em grande parte no Bioma Pampa, onde outros fatores parecem ter influenciado a distribuição da diversidade genética e ocasionado uma expansão recente. Para confirmar essa possível expansão recente, a utilização de marcadores microssatélites nucleares é a mais indicada. Porém, é necessário maior número desses marcadores, além daqueles já existentes. Por isso a necessidade de desenvolver novos marcadores para a espécie.

Os resultados indicam que a espécie passou por longos períodos de ausência de fluxo gênico, ou apresenta fluxo gênico restrito, o que fortalece a hipótese da expansão recente na região Sul ter sido influenciada por uma ação antrópica. Mas, para testar essa hipótese são necessárias análises mais aprofundadas dos resultados, assim como a complementação com informações do genoma nuclear.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASIF, H.; KHAN, A.; IQBAL, A.; KHAN, I.A.; HEINZE, B.; AZIM, M.K. The chloroplast genome sequence of *Syzygiumcumini* (L.) and its relationship with other angiosperms. **Tree Genetics & Genomes**. DOI 10.1007/s11295-0130604-1, 2013.

AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**,v.36, p.03-15, 2009.

BANDEL, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.37-48, 1999.

BASILE, A.; VUOTTO, M. L.; VIOLANTE, U.; SORBO, S.; MARTONE, G.; CASTALDO-COBIANCHI, R. Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 8, n.3, p. 199-203, 1997.

BEHEREGARAY, L. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges of the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, v.17, p.3754-3774, 2008.

BERGER, A. Millankovitch theory and climate. **Rev. Gaphys**, v.26, p.624-657, 1988.

BEHLING, H.; PILLAR, V.D. Late Quaternary vegetation, biodiversity and fire dynamics on the Southern Brazilianhighland and their implication for conservation and management of modern *Araucaria* forest and grassland ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B:Biological Sciences**, v.362, p.243-251, 2007.

BEHLING, H.; PILLAR, V.D.; BAUERMANN, S.G. Late Quaternary grassland (Campos), gallery forest, fire and climate dynamics, studied by pollen, charcoal and multivariate analysis of the São Francisco de Assis core in western Rio Grande do Sul (Southern Brazil). **Reviews of Palaeobotany and Palynology**, v.133, p.235-248, 2005.

BEHLING H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v.177, p.19–27, 2002.

BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A.; NEBBIOSO, A.; DE BELLIS, F.; CONTE, M.; MINICHELLO, A.; MANZO, F.; CARAF, V.; BASILE, A.; RIGANO, D.; SORBO, S. COBIANCHI, R.C.; SCHIAVONE, E.M.; FERRARA, F.; DE SIMONE, M.; VIETRI, M.T.; CIOFFI, M.; SICA, V.; BRESCIANI, F.; LERA, A.R.; ALTUCCI, L.; MOLINARI, A.M. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.1902–1914, 2007.

CACIOPPO, O. **La feijoa**. Madri: Mundi-Prensa, 1988. 85p.

CORANDER, J.; WALDMAN, P.; MARTTINEN, P.; SILLANPOA, M.J. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. **Bioinformatics**, n.20, v.15, 2007.

DEMASURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R. J.A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology**, v.4, n.1, p.129-131, 1995.

DONAZZOLO, J. **Conservação e domesticação da feijoa na Serra Gaúcha - RS**. 2012. 312p. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2012.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. **Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*)**. Série frutas nativas 5. Jaboticabal: Funep, 2000, 66p.

DUN, I.S.; BLATTNER, F.R. Sharons 36 to 40: multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucleic Acids Res**, v.15, p.2677-2698.

DUPANLOUP, I.; SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology**, v.11, p.2571-2581, 2002.

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

FREGONEZI, J.N.; TURCHETTO, C.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.171, p.140-153, 2013.

FU, Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v.147, p.915-925, 1997.

GRATAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R.E.; SHEPHERD, M.; THUMMA, B.R.; FOLEY, W.; KULHEIM, C.; POTTS, B.; MYBURG, A.A. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v.8, p.463-508, 2012.

HAMILTON, M.B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. **Molecular Ecology**, v.8, p.521-523, 1999.

HAMILTON, M.B.; BRAVERMAN, J.M.; SORIA-HERNANZ D.F. Patterns and relative rates of nucleotide and insertions/deletions evolution at six chloroplast intergenic regions in new species of the Lecythidaceae. **MolBiolEvol**, v.20, p.1710-1721, 2003.

HEUERTZ, M.; DE PAOLI, E.; KALLMAN, T.; LARSSON, H.; JURMAN, I.; MORGANTE, M.; LASCOUX, M.; GYLLENSTRANDI, N. Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. **Genetics**, v.174, p.2095-2105, 2006.

HEWITT, G.M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature**, v.405, p.907–913, 2000.

IELPO, M.T.L.; BASILE A.; MIRANDA, R.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; SORBO, S.; LAGHI, E.; RICCIARDI, M.M.; RICCIARDI, L.; VUOTTO, M.L. Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v.71, p.101-109. 2000.

KELES, H.; INCE, S.; KÜÇÜKKURT, I.; TATLI, I.I.; AKKOL, E.K.; KAHRAMAN, C.; DEMIREL, H.H. The effects of *Feijoa sellowiana* fruits on the antioxidant defense system, lipid peroxidation, and tissue morphology in rats. **Pharmaceutical Biology**, p.1-8, 2011.

KELLER, H.A.; TRESSSENS, S.G. Presencia en Argentina de dos espécie de uso múltiple: *Acca sellowiana* (Myrtaceae) y *Casearia lasiophylla* (Flacourtiaceae). **Darwiniana**, v.45, n.2, p.204-212, 2007.

KIMURA, M. The number of heterozygous nucleotides sites maintained in a finite population due to the steady flux of mutations. **Genetics**, v.61, p.893-903, 1969.

KINGMAN, J.F.C. The Coalescent. **Stochastic Processes and their Applications**, v.13, p.235-248, 1982.

KLABUNDE, G.H.F. **Análise filogeográfica entre populações de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze em sua área de distribuição natural**. 2012. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2012.

LEGRAND, D. Las mirtaceas del Uruguay. **Anales Del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v.4. n.11, 1936, 65p.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v.25, p.1451–1452, 2009.

LORENZ-LEMKE, A.P.; TOGNI, P.D.; MADER, G. KRIEDT, R.A.; STEHMANN, J.R.; SALZANO, F.M.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B.

Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). **Molecular Ecology**, v.19, p.5240-5251, 2010.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res*, v.27, p. 209-220, 1967.

MATTOS, J.R. **A goiabeira-serrana**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis (publicação IPRNR, 19), 1986. 84p.

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

MILLER, M.P. ALLELES IN SPACE: computer program for the joint analysis of inter individual spatial and genetic information. **Journal of Heredity**, v.96, p.722-724, 2005.

MONFORTE, M.T.; FIMIANI, V.; LANUZZA, F.; NACCARI, C.; RESTUCCIA, S.; GALATI, E.M. *Feijoa sellowiana* Berg Fruit Juice: Anti-Inflammatory Effect and Activity on Superoxide Anion Generation. **Journal of Medicine Food**, v.0, p. 1-7, 2013.

MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. **Systematic Biology**, v. 51, p. 238-254, 2002.

MORTON, J.F. *Feijoa*. In: **Fruits of warm climates**. Miami: Julia F. Morton, p.367-370, 1987.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v.51, p.263-273, 1986.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P.; MELER, K.; DUCROQUET, J.P.H.J. Genetic variability of *Feijoa sellowiana* germoplasm. **Acta Horticulturae**, v.452, p.41-46, 1997.

ODDOU-MURATORIO, S; DEMESURE, M. B.; PÉLISSIER, R.; GOUYON, P.H. The roles of colonization and history in the local genetic

structure of a scattered temperate tree species. **Molecular Ecology**, v.13, p.3689–3702, 2004.

PERRET, M.; CHAUTEMS, A.; SPICHTER, R.; KITE, G.; SAVOLAINEN, V. Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidence from phylogenetic analysis of six plastid DNA regions and nuclear *ncpGS*. **American Journal of Botany**, v.90, p. 445–460, 2003.

PETIT, R.J.; AGUINAGALDE, I.; DE BEAULIEU, J.-L.; BITTKAU, C.; BREWER, S.; CHEDDADI, R.; ENNOS, R.; FINESCHI, S.; GRIVET, D.; LASCOUX, M.; MOHANTY, A.; MÜLLER-STARCK, G.; DEMESURE-MUSCH, B.; PALMÉ, A.; MARTÍN, J.P.; RENDELL, S.; VENDRAMIN, G.G. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. **Science**, n.300, p.1563-1565, 2003.

PETIT, R.J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology**, v.14, p.689-701, 2005.

PLEINES, T.; JAKOB, S.S.; BLATTNER, F.R. Applications of non-coding DNA regions in intraspecific analyses. **Plant Systematic Evolution**, v.282, p. 281-294, 2009.

PIELOU, E.C. Plankton, from the last ice age to the year 3007. **Ices Journal of Marine Science**, v.65, p. 296–301, 2008.

RAMOS-ONSINS, S.E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Molecular Biology and Evolution**, v.19, p.2092–2100, 2002.

RULL, V. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v.26, p.508–513, 2011.

SANTOS, K.L. **Diversidade cultural, genética e fenotípica da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*): implicações para a domesticação da espécie**. 163f. Tese (Doutorado em Ciências área de concentração: Recursos

Genéticos Vegetais), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.

SANTOS, K.L.; PERONI, N.; GURIES, R.P.; NODARI, R.O. Traditional knowledge and management of feijoa (*Acca sellowiana*) in Southern Brazil. **Economic Botany**, v.63, p. 204-214, 2009.

SAZIMA, I.; SAZIMA M. Petiscos florais: pétalas de *Acca sellowiana* como fonte alimentar para aves em área urbana no Sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v.7, n.2, p.307-312, 2007.

SHARPE, R.H.; SHERMAN, W.B.; MILLER, E.P. *Feijoa* history and improvement. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v.106, p.134-139. 1993.

SHAW, J.; LICKEY, E.B.; SCHILLING, E.E.; SMALL, R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, v.94, n.3, p. 275-288, 2007.

SCHÖNENBERGER, J.; CONTI, E. Molecular phylogeny and floral evolution of Penaeaceae, Oliniaceae, Rhynchocalycaceae, and Alzateaceae (Myrtales). **American Journal of Botany**, v.90, p. 293–309, 2003.

TAJIMA, F. **Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA**, 1989.

TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, v.105, p.437-460, 1983.

THORP, G.; BELESKI, R. **Feijoas: origins, cultivation and uses**. Auckland, N.Z.: HortResearch. Ed. David Bateman, 2003, 87p.

THORP, G. DSRI's feijoa breeding program goes to South America. **The Orchardist of New Zealand**, v.61, n.7, p.213-215, 1988.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-

SILVA, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, p.01-21, 2012.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; SALGUEIRO, F.; CRUZ, F.; VETO, N.; MARGIS, R. Chloroplast DNA variation and phylogeography of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) in the Brazilian Atlantic forest. **BMC Proceedings**, v.5 (Suppl 7), p.19, 2011.

TURCHETTO-ZOLET A.C.; SEGATTO, A.L.A.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; FREITAS, L.B. **Guia prático para estudos filogeográficos**, Sociedade Brasileira de Genética, 2013.

VUOTTO, M. L.; BASILE A.; MOSCATIELLO, V.; DE SOLE, P.; CASTALDO-COBIANCHI, R.; LAGHI, E.; IELPO, M.T.L. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.13, p.197-201, 2000.

WATTERSON, G. A. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. **Theoretical Population Biology**, v.7, p.256-276, 1975.

WESTON, R.J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v.121, p. 923-926, 2010.

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

XU, D.H.; SAKAI, A.J.; KANAZAWA, M.; SHIMAMOTO, A.; SHIMAMOTO, Y. Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications of the evolution of different chloroplast haplotypes. **TheorApplGenet**, v.101, p.724-732, 2000.

## 5. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE 10 NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES NUCLEARES (SSR) PARA *Acca sellowiana* (MYRTACEAE)<sup>1</sup>

### 5.1 Introdução

*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret, popularmente conhecida como feijoa, ocorre naturalmente no sul do Brasil, Uruguai (THORP & BIELESKI, 2002) e Argentina (KELLER & TRESSENS, 2007). SANTOS *et al.* (2009) sugerem que existe um potencial para desenvolver esse recurso como um produto alimentar explorando os frutos e também como planta medicinal. Além do sabor único dos frutos, a espécie tem várias propriedades bioativas que a tornam interessante para fins farmacológicos (WESTON, 2010). A espécie é pouco conhecida e explorada no seu centro de origem, no entanto, cultivares comerciais das espécies são exploradas em outras partes do mundo (por exemplo, Colômbia e Nova Zelândia).

O desenvolvimento de marcadores microsatélites pode ser muito útil para diversos estudos, como caracterização de cultivares, avaliação da diversidade genética, conservação e filogeografia.

Treze marcadores moleculares microsatélites (SSRs) específicos já foram desenvolvidos para a espécie (SANTOS *et al.*, 2008), mas apenas nove são utilizados rotineiramente e com sucesso (dados não publicados). Portanto, o desenvolvimento de novos marcadores SSR auxiliará na caracterização mais profunda dos níveis de distribuição da diversidade genética, além de ser essencial para a domesticação, mapeamento genético e estudos filogeográficos. Dessa forma foram desenvolvidos e analisados dez novos marcadores microsatélites para a espécie.

### 5.2 Material e Métodos

O DNA total foi isolado a partir de uma planta *A. sellowiana* de acordo com Doyle & Doyle (1990). A biblioteca enriquecida de SSR foi construída com base no protocolo proposto por Billote *et al.* (1999).

O desenvolvimento da biblioteca foi realizado no Laboratório de Análise Genética e Molecular da UNICAMP no ano de 2009. O sequenciamento, desenvolvimento e caracterização dos novos marcadores foram realizados no LFDGV\UFSC durante os anos de 2011 e 2012.

---

<sup>1</sup> Artigo publicado na revista científica *Applications in Plant Science*.

O DNA total foi digerido utilizando *AfaI* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), ligado a adaptadores *AfaI*, amplificados por PCR e enriquecido para regiões repetitivas de microssatélites ( $CT_n$ ,  $GT_n$  e  $TTC_n$ ). Para seleção dos fragmentos foram empregadas esferas magnéticas ligadas a estreptavidina (Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, EUA) e oligos de microssatélites associados a biotina. Os oligos se ligam aos fragmentos purificados que sejam complementares a sua sequência, e dada a alta afinidade entre biotina e estreptavidina, as esferas magnéticas são ligadas ao complexo biotina-oligo-fragmento. A seleção dos fragmentos foi realizada por um ímã que magnetiza as esferas contendo os fragmentos enriquecidos com microssatélites associados a biotina e esferas magnéticas ligadas a estreptavidina.

O DNA enriquecido foi amplificado por PCR, ligado em plasmídeos, e clonado usando pGEM-t *Vector Systems* (Promega Corporation). O produto dessa reação foi utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* (cepa XL1-Blue) (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA).

Após a transformação o material foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido e ampicilina para crescimento. Após esta etapa foram selecionadas colônias brancas que indicavam a presença de fragmentos de DNA clonado de *A. sellowiana*. Estas colônias foram então repicadas para crescimento e posterior extração do DNA plasmidial que foi amplificado via PCR utilizando-se iniciador complementar à sequência do vetor.

Um total de 192 clones positivos foram sequenciados através do Método Sanger em sequenciador automático MegaBACE1000 (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Para desenho dos iniciadores foi utilizado o programa Primer3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000) disponível em [http://www.genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).

A validação dos novos marcadores foi realizada em quatro populações de *A. sellowiana*: Ipê, Urubici, Bituruna e Guarapuava (Figura 5.1). Amostras dessas quatro populações foram depositadas no Herbário Flor da Universidade Federal de Santa Catarina (Tabela 5.1) Para cada população foram avaliados 15 indivíduos, totalizando 60 plantas.

Para amplificação dos fragmentos foi utilizado 20 ng de amostra de DNA, 0,2 mM de cada dNTP (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1U de Taq DNA Polymerase (Fermentas), 1x Taq buffer, 2 mM  $MgCl_2$  e 5 pmol de cada primer em um volume total de 12  $\mu$ L. Termociclador Veriti (Life

Technologies, Carlsbad, CA) foi utilizado para amplificação dos fragmentos seguindo o protocolo: 95 °C por 5 min, com 32 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura de anelamento por 1 min, 72 °C por 30 s, e uma extensão final de 7 min a 72 °C. Para determinar a temperatura de anelamento de cada primer foi testada inicialmente gradiente de 45 °C a 67 °C. A amplificação dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1% corado com GelRed (*Biotium*®). Os iniciadores que apresentaram amplificação foram testados em gel de poliacrilamida 4% em cinco indivíduos de *A. sellowiana* para identificação de polimorfismo.

A leitura dos alelos em sistema de detecção por fluorescência foi realizada em sequenciador MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare) mediante uma eletroforese capilar com matriz de poliacrilamida linear utilizando padrões de tamanho conhecido (ET-Rox 400 GE Healthcare). Foi utilizado sistema biplex, considerando o tamanho do fragmento esperado e a fluorescência utilizada em cada marcador (FAM ou NED), utilizando 1 µl do produto de cada PCR diluído 8 x em água ultrapura autoclavada. Em 2µl de produto diluído foram adicionados 7,75 µl de Tween 20 0,1% (*GE-Healthcare*) e 0,25 µL de MegaBACE ET400-R Size Standard (*GE-Healthcare*). Mediante leitura dos 20 fragmentos do padrão que variam de 60 pb até 400 pb foi realizada comparação pelo software Fragment Profiler (*GE Healthcare*) quando é calculado o tamanho em pares de base (pb) dos alelos.

O programa MICRO-CHECKER 2.2.4 (VON OOSTERHOUT *et al.*, 2004) foi utilizado para identificar a presença de alelos nulos e erros de genotipagem. Os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram calculados utilizando GenAEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). O número de alelos, a heterozigosidade observada e esperada e o Conteúdo Informativo Polimórfico (PIC) foram obtidos através do programa CERVUS 3.0.3 (KALINOWSKI *et al.*, 2007).

Tabela 5.1 – Localização, coordenadas geográficas e *voucher* das populações depositadas no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, (FLOR).

<b>Espécie</b>	<b>Voucher</b>	<b>Localização e Coordenadas Geográficas</b>
<i>Acca sellowiana</i>	FLOR 49843	Ipê (28°75'14"S-51°35'39"W)
<i>Acca sellowiana</i>	FLOR 49841	Urubici (28°04'18"S-50°29'70"W)
<i>Acca sellowiana</i>	FLOR 49842	Bituruna (26°02'52"S-51°70'20"W)
<i>Acca sellowiana</i>	FLOR 49839	Guarapuava (25°26'29"S-51°39'17"W)

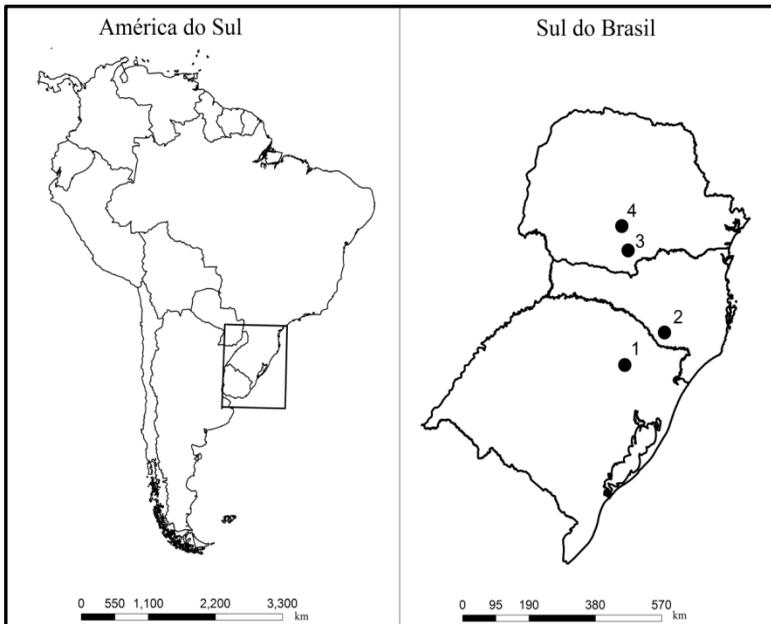


Figura 5.1 – Mapa da América do Sul com destaque para o sul do Brasil e a localização de quatro populações de *A. sellowiana*: Ipê (1), Urubici (2), Bituruna (3) e Guarapuava (4).

### 5.3 Resultados e Discussão

A partir dos clones sequenciados, 36 apresentaram regiões SSR únicas e 26 foram adequados para desenho dos iniciadores. Os 26 iniciadores desenhados tiveram temperatura de anelamento testadas com gradiente entre 47 e 67 °C. Dez dos 26 iniciadores foram amplificados com sucesso e apresentaram polimorfismo. As sequências originais contendo as regiões microssatélites foram depositadas no Genbank (NCBI – National Center for Biotechnology Information) (Tabela 5.2).

Os dez novos marcadores microssatélites foram caracterizados em 60 plantas de quatro populações. Todos os produtos amplificados estiveram dentro do tamanho esperado de acordo com a informação obtida no sequenciamento da biblioteca.

O número de alelos por loco variou de 4 a 27, com uma média de 14,10, considerando todas as populações. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e a esperada ( $H_e$ ) para cada marcador variou de 0,269 a 1 (média de 0,735) e 0,569 a 0,038 (média de 0,805), respectivamente. O Conteúdo Informativo Polimórfico (PIC) variou de 0,495 a 0,923, com média de 0,773. Desses novos marcadores, quatro apresentaram valor de PIC superior aqueles desenvolvidos por Santos *et al.* (2008), ampliando assim o número de iniciadores polimórficos para a espécie.

Os índices de diversidade para as quatro populações analisadas estão apresentados na Tabela 5.3. A presença de alelos nulos foi significativa em quatro marcadores (Fse06, Fse08, Fse10, Fse12). O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) testado para cada uma das quatro populações indicou que todos os locos estão em desequilíbrio ao menos para uma população, exceto o loco Fse16 ( $p>0,05$ ), provavelmente devido a deficiência de heterozigotos. Entretanto, esses resultados devem ser observados com cautela, dado o pequeno tamanho amostral das populações ( $n=15$ ) (Hedrick, 2000).

Adicionalmente a caracterização destes novos marcadores foi testada a transferibilidade deles para outras quatro espécies de Myrtaceae: *Plinia jacobitcaba* (Vell.) Berg, *Plinia cauliflora* (DC.) Berg, *Plinia trunciflora* (Berg) Mattos e *Eugenia uniflora* L. Seis entre os 10 marcadores testados apresentaram sucesso na transferibilidade para *P. jacobitcaba*, *P. cauliflora* e *P. trunciflora* (Fse04, Fse09, Fse11, Fse17, Fse16 e Fse21). Esta foi a primeira vez que marcadores específicos para *A. sellowiana* foram testados para outras espécies da família.

Tabela 5.2 – Características dos 10 locos microsatélites desenvolvidos para *A. sellowiana*. Tam. (pb) = Tamanho do fragmento em pares de base;  $T_a$  = Temperatura de Anelamento; \* Número do acesso no GenBank.

<b>Loco</b>	<b>Sequencia do iniciador (5'-3')</b>	<b>MotivoMicrosatélite</b>	<b>Tam. (bp)</b>	<b><math>T_a</math> (°C)</b>	<b>GenBank*</b>
<b><i>Fse04</i></b>	F:TTCGTTTGGCGTTTACCTTC R:CGGTGCTCGTTTGTGTATG	(CT) <sub>12</sub>	204	59	JX978696
<b><i>Fse06</i></b>	F:CGAATAGGGCACTCCAACCTC R:GCCGTCCTTAGGTTCAACAC	(CT) <sub>9</sub>	232	54	KJ14661
<b><i>Fse08</i></b>	F:TCAGGTGTGGAATCTGCTTCT R:CCCTCTCATTAGGTGGTTGG	(CT) <sub>10</sub>	195	53	KF011978
<b><i>Fse09</i></b>	F:ACCTTGCAAAAGGATGTCGT R:GCTGTTGGAGGAAAAAGCAG	(TTC) <sub>7</sub>	166	55	JX978698
<b><i>Fse10</i></b>	F:TTTCGTCTCATACAAGCCTACAG R:CGAGGAATCCCCAAAACAAC	(CT) <sub>6</sub>	249	55	KJ146612
<b><i>Fse11</i></b>	F:AAAAGGAAAGTACGCATCCA R:CCCAGCAACAGGTGTATGA	(AG) <sub>13</sub>	236	55	JX978699
<b><i>Fse12</i></b>	F:GCGATTGAACCATGAAGTCC R:CGGTGGATTCAATGGAGAAG	(CT) <sub>8</sub>	193	55	KF011979
<b><i>Fse16</i></b>	F:CCATTGTTTTGGAAGGAACA R:TTGCGATTTTGAGAGTGGAG	(CT) <sub>20</sub>	167	55	JX978702
<b><i>Fse17</i></b>	F:CCATGAAATTGCTAAGCTGGA R:CGTGCTCGATGAAGAGGAA	(CT) <sub>30</sub>	204	55	JX978703

Tabela 5.2 – Continuação. Características dos 10 locos microssatélites desenvolvidos para *A. sellowiana*. Tam. (pb) = Tamanho do fragmento em pares de base;  $T_a$  = Temperatura de Anelamento; \* Número do acesso no GenBank.

<b>Loco</b>	<b>Sequencia do iniciador (5'-3')</b>	<b>MotivoMicrossatélite</b>	<b>Tam. (bp)</b>	<b><math>T_a</math> (°C)</b>	<b>GenBank*</b>
<i>Fse21</i>	F:ATCAGAAAATGCTGCCGAGT R:GCAACATTGCTCAGCAGGTA	(CT) <sub>12</sub>	168	57	JX978700

Tabela 5.3 – Caracterização de 10 SSRs específicos para *A. sellowiana* em quatro populações.

Loco	Ipê (n=15)				Urubici (n=15)				Bituruna (n=15)				Guarapuava (n=15)			
	A	$H_e$	$H_o$	PIC	A	$H_e$	$H_o$	PIC	A	$H_e$	$H_o$	PIC	A	$H_e$	$H_o$	PIC
Fse04 <sup>ns</sup>	6	0,671	0,667	0,596	9	0,809**	0,733	0,761	7	0,744**	0,813	0,676	9	0,874**	0,667	0,826
Fse06 <sup>*</sup>	10	0,877	0,750	0,822	11	0,932	0,800	0,874	5	0,788	0,667	0,680	8	0,894**	0,714	0,846
Fse08 <sup>*</sup>	5	0,458	0,400	0,421	5	0,743	0,733	0,672	4	0,599	0,500	0,493	5	0,637**	0,400	0,541
Fse09 <sup>ns</sup>	4	0,690**	0,667	0,610	5	0,533	0,467	0,479	4	0,651	0,688	0,578	5	0,729**	0,467	0,650
Fse10 <sup>*</sup>	3	0,530	0,333	0,424	2	0,467**	0,200	0,332	3	0,654	0,273	0,553	2	0,536	0,250	0,359
Fse11 <sup>ns</sup>	7	0,724	0,800	0,654	8	0,832**	0,867	0,781	7	0,778	0,813	0,720	6	0,699	0,933	0,635
Fse12 <sup>*</sup>	14	0,940	1,000	0,902	13	0,906	0,800	0,866	7	0,740	0,563	0,686	12	0,887**	0,867	0,844
Fse16 <sup>ns</sup>	12	0,913	1,000	0,872	15	0,949	1,000	0,912	12	0,911	1,000	0,871	8	0,855	1,000	0,806
Fse17 <sup>ns</sup>	12	0,931	0,933	0,891	15	0,915	0,800	0,875	14	0,883	0,875	0,845	11	0,864**	0,733	0,821
Fse21 <sup>ns</sup>	7	0,825**	0,867	0,769	6	0,848**	0,867	0,794	7	0,851**	0,875	0,800	5	0,789**	0,533	0,724

$n$  = número de indivíduos amostrados;  $A$  = número de alelos por loco;  $H_e$  = heterozigosidade esperada;  $H_o$  = heterozigosidade observada; PIC = conteúdo polimórfico informativo;  $ns$  = valores não significativos para a análise de alelos nulos ( $p > 0,05$ ); \* = valores não significativos para a análise de alelos nulos ( $p < 0,05$ ); \*\* = Desvios significativos do HWE ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Conclusões

Este é o segundo estudo realizado para desenvolver marcadores SSRs para *A. sellowiana*, sendo importante para expandir a fonte de marcadores polimórficos, duplicar a capacidade de amostragem no genoma, bem como o genoma de outras espécies de Myrtaceae (devido à capacidade de transferência com êxito de seis marcadores), ressaltando que marcadores microssatélites nucleares não estão disponíveis para nenhuma espécie do gênero *Plinia* até o momento.

Estudos do processo de domesticação e filogeográficos, que requerem um mínimo de 10 marcadores, agora podem ser realizados. Estes novos marcadores, juntamente com os já existentes, serão futuramente empregados nas populações analisadas no capítulo anterior para elucidar a ocorrência de uma expansão recente que não pôde ser comprovada com a utilização de sequências de cloroplasto.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v.54, p.277–288, 1999.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1106, 2007.

KELLER, H.A.; TRESSSENS, S.G. Presencia en Argentina de dos espécie de uso múltiple: *Acca sellowiana* (Myrtaceae) y *Casearia lasiophylla* (Flacourtiaceae). **Darwiniana**, v.45, n.2, p.204-212, 2007.

PEAKALL, R.; MOUSE P.E.S. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—An update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537 – 2539, 2012 .

ROZEN, S.; H.J. SKALETSKY. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In S. Krawetz and S. Misener [eds.], **Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology**, 365 – 386. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2000.

SANTOS, K.L.; SANTOS, M.O.; LABORDA, P.R.; SOUZA, A. P.; PERONI, N.; NODARI, R. O. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers in *Acca sellowiana* (Berg) Burret. **Molecular Ecology Notes**, v. 8, p. 998-1000, 2008.

SANTOS, K.L.; PERONI, N.; GURIES, R.P.; NODARI, R.O. Traditional knowledge and management of feijoa (*Acca sellowiana*) in Southern Brazil. **Economic Botany**, v.63, p. 204-214, 2009.

THORP, G.; BIELESKI, R. **Feijoas: origins, cultivation and uses**. Auckland, N.Z.: HortResearch. Ed. David Bateman, 2002, 87p.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535-553, 2004.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v.121, p. 923-926, 2010.

## **6. CAPÍTULO III - HERANÇA MENDELIANA, LIGAÇÃO GENÉTICA E DESEQUILÍBRIO GENOTÍPICO EM OITO LOCOS MICROSSATÉLITES DE *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret**

### **6.1 Introdução**

A conservação genética de uma espécie requer o conhecimento do seu sistema de reprodução, diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico. Os marcadores microssatélites (SSRs) são considerados os mais adequados para tais estudos devido ao seu elevado polimorfismo em termos de número de alelos (ASHLEY, 2010). No entanto, para esses marcadores serem utilizados com essas finalidades, é necessário saber se a sua herança segue as regras Mendelianas (BRONDANI *et al.*, 1998; SELKOEL & TOONEN, 2006; TARAZI *et al.*, 2010) e se os locos estão ligados entre si. Estas informações são necessárias porque são utilizadas estimativas multiloco e modelos populacionais genéticos que são baseadas em suposições de herança mendeliana, ausência de ligação genética e equilíbrio de ligação (TAMBARUSSI *et al.*, 2013).

*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret é uma espécie pertencente a família Myrtaceae, natural da região neotropical da América do Sul (LEGRAND, 1936; MATTOS, 1986; MARCHIORI & SOBRAL, 1997; THORP & BIELESKI, 2003; KELLER & TRESSENS, 2007). Os frutos são o principal atrativo econômico dessa espécie (SANTOS *et al.*, 2009), que necessita de estudos genéticos que contribuam para sua conservação e melhoramento, embora a importância nutracêutica também tenha sido evidenciada (WESTON, 2010).

O objetivo deste trabalho foi investigar herança mendeliana, ligação genética e equilíbrio de ligação em oito marcadores microssatélites previamente desenvolvidos para *A. sellowiana* (SANTOS *et al.*, 2008; KLABUNDE *et al.*, 2014), e assim validar esses marcadores para estudos evolutivos ou que visem a conservação genética da espécie.

### **6.2 Material e Métodos**

Sementes de polinização aberta foram coletadas de oito árvores matrizes localizadas no Parque Nacional de São Joaquim (PNSJ), Urubici, Santa Catarina (28°07'46.4"S, 49°35'54.2"O; 1468 m). De cada árvore matriz foram coletados de 3 a 5 frutos e foram selecionadas de 5 a 10

sementes por fruto, totalizado 325 sementes. Apenas as progênies das matrizes heterozigotas foram utilizadas nas análises do presente estudo.

As sementes foram germinadas e as folhas utilizadas para extração de DNA. Tecidos foliares também foram coletados das oito árvores matrizes para extração de DNA. A extração de DNA de todas as amostras foi realizada com o kit de extração *NucleoSpin® Plant II* (Macherey-Nagel) conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

Na análise do DNA os indivíduos foram genotipados com oito SSRs (Ase08 Ase59, Ase21, Ase 31, Fse04, Fse17, Fse11 e Fse16) desenvolvidos para a espécie (SANTOS *et al.*, 2008; KLABUNDE *et al.*, 2014). Para amplificação dos fragmentos foram utilizados 20 ng de amostra de DNA, 0,2 mM de cada dNTP (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,25 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas), 1x Taq buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 2,5 pmol de cada iniciador em um volume total de 12 µL. Termociclador Veriti (Life Technologies, Carlsbad, CA) foi utilizado para amplificação dos fragmentos com a seguinte ciclagem: 95 °C por 5 min, com 32 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura de anelamento por 1 min, 72 °C por 30 s, e uma extensão final de 7 min a 72 °C.

A identificação dos alelos em sistema de detecção por fluorescência foi realizada em sequenciador MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare) mediante uma eletroforese capilar com matriz de poliacrilamida linear utilizando padrões de tamanho conhecido (ET-Rox 400 GE Healthcare). Foi utilizado sistema biplex, considerando o tamanho esperado e a fluorescência (FAM ou NED) de cada marcador, com 1 µl do produto de cada PCR diluído 8 x em água ultrapura autoclavada. Em 2 µl de produto diluído foram adicionados 7,75 µl de Tween 20 0,1% (*GE-Healthcare*) e 0,25 µL de MegaBACE ET400-R Size Standard (*GE-Healthcare*). Mediante leitura de 20 fragmentos do padrão que variam de 60 pb até 400 pb foi realizada comparação pelo software Fragment Profiler (*GE Healthcare*) quando é calculado o tamanho em pares de base (pb) dos alelos. Em cada eletroforese foi utilizada um número de quatro a oito amostras testemunhas para evitar variação na leitura do tamanho dos fragmentos.

Para investigar a herança mendeliana dos locos SSRs foi utilizado o método de Gillet & Hattemer (1989). Este método investiga a segregação dos alelos de uma árvore materna heterozigota na sua progênie de polinização aberta. Este método assume que os locos têm segregação independente e seus alelos seguem padrões clássicos de herança mendeliana 1:1, que é baseado em três requisitos principais: segregação meiótica

regular; fertilização aleatória de óvulos por cada tipo de pólen; ausência de seleção entre o momento da fecundação e genotipagem das progênies. O modelo também assume que há uma relação de codominância entre todos os alelos. O método ainda exige que sejam atendidas as seguintes condições: toda a descendência de uma árvore deve possuir um alelo materno, nos casos de mães heterozigotas ( $A_iA_j, i \neq j$ ) cada indivíduo da progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna; o número de descendentes heterozigotos ( $A_iA_j$ ) deve ser igual à soma de progênie homozigota ( $A_iA_i$ ) e ( $A_jA_j$ ); o número de descendentes heterozigotos ( $A_iA_k$ ) deve ser igual ao número de descendentes heterozigotos ( $A_jA_k$ ), sendo  $k \neq i, j$ .

Os genótipos observados em cada progênie de árvores heterozigotas, para um dado loco, foram testados para hipótese de segregação esperada 1:1 através de teste  $G$  (SOKAL & ROHLF, 1981) e baseado na metodologia apresentada por Tambarussi *et al.* (2013). Este teste determina se o desvio entre a segregação observada e esperada é estatisticamente significativo ou se os desvios podem ser explicados pelo acaso. Aplicou-se ainda correção de Bonferroni para comparações múltiplas (95% de confiança), afim de evitar falsos positivos.

Para investigar se os locos não estavam ligados, foi realizado um teste de ligação entre pares de locos. Neste caso, a hipótese nula ( $H_0$ ) é a segregação mendeliana normal de 1: 1: 1: 1. A hipótese de segregação regular entre os pares de locos foi aceita ou rejeitada com base no teste  $G$  (SOKAL & ROHLF, 1981), também se aplicando uma correção de Bonferroni para comparações múltiplas (95% de confiança,  $\alpha = 0,05$ ).

O teste de desequilíbrio genotípico foi realizado apenas para árvores adultas, uma vez que o desequilíbrio é esperado em progênies já que todos os descendentes sempre recebem um dos alelos maternos. Este teste foi realizado utilizando o programa Fstat (GOUDET, 2002), associado a correção de Bonferroni a 95% de probabilidade.

### 6.3 Resultados e discussão

A herança mendeliana dos alelos é um requisito para quase todas as análises genéticas de populações e, sempre que possível, deve ser avaliada e relatada (SELKOEL & TOONEN, 2006). Os resultados detectaram desvio significativo da segregação mendeliana esperada 1:1 em apenas quatro (3,6%) dos 110 testes realizados (Tabela 6.1), sendo os desvios observados em uma matriz para o loco *Ase59*, outra para o loco *Fse11*, e duas matrizes

para o loco *Fse17*. Para os demais locos não se constatou nenhum desvio da segregação mendeliana.

Proporções não mendelianas em locos SSRs podem ser causadas pela presença de alelos nulos ou pequenos tamanhos amostrais. Em ambos os casos, o desvio do padrão de herança é simplesmente um artefato técnico (SELKOEL & TOONEN, 2006). Os poucos desvios observados possivelmente foram causados pelo baixo número de plantas por progênie, o que também foi observado por Tambarussi *et al.* (2013) para *Cariniana legalis* Mart. Kuntze. Ainda, outras possíveis causas reais de desvios da segregação mendeliana são associação física com genes sob seleção forte, centros (*spots*) de recombinação, elementos transponíveis, não disjunção durante a meiose ou distorção de segregação, processos que podem ter graves efeitos, como apenas um alelo parental sendo passado a toda prole (SELKOEL & TOONEN, 2006).

Após a correção de Bonferroni, apenas 7% dos testes de ligação dos 223 realizados foram significativos (Tabela 6.2). Porém, praticamente todos os casos em que foi observada ligação significativa, isso ocorreu nas mesmas progênies (M3, M5 e M6), com exceção da M1 entre os locos *Ase59* e *Fse17*.

Mais uma vez, esses poucos desvios observados podem ser justificados pelo baixo número de plantas por progênie, que já foi relatado em outros estudos de segregação de locos SSR. Tarazi *et al.* (2010), utilizando 20 sementes por progênies de 28 árvores matrizes, encontraram 20% de ligação genética em *Copaifera langsdorffii*. Resultados similares foram obtidos por Carneiro *et al.* (2012) em *Hymenaea courbaril*. No entanto, para *Cariniana legalis* Tambarussi *et al.* (2013) constataram 2,8% de ligação, porém numa amostragem bem mais significativa (22 matrizes e de 40 a 100 sementes por matriz).

Após a correção de Bonferroni os resultados para desequilíbrio genotípico não mostraram nenhuma evidência significativa entre os pares de locos (Tabela 7.3) ( $p > 0,000179$ ). Não havendo, portanto, associação entre desequilíbrio e ligação física entre os locos.

Tabela 6.1 – Teste de herança mendeliana em oito locos microssatélites de *A. sellowiana*.

Loco	Matriz	Genótipo	n1	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	$G_1$	n2	$n_{ik} : n_{jk}$	$G_2$
Ase08	M1	239/241	9	4:5	0,11	41	24:17	1,20
	M2	233/247	15	9:6	0,60	31	17:14	0,29
	M3	249/253	11	8:3	2,35	36	18:18	0,00
	M4	235/237	2	0:2	–	24	16:8	2,72
	M5	233/253	20	10:10	0,00	25	12:13	0,04
	M6	235/237	23	5:18	7,79	24	11:13	0,16
	M7	237/261	18	5:13	3,68	24	12:12	0,00
	M8	237/249	7	2:5	1,33	14	6:8	0,29
Ase21	M1	159/167	20	8:12	0,80	28	15:13	0,14
	M2	165/185	7	4:3	0,14	36	26:10	7,37
	M3	167/169	26	8:18	3,95	21	14:7	2,38
	M4	159/167	6	0:6	–	20	10:10	0,00
	M6	153/161	14	6:8	0,28	31	19:12	1,59
	M7	163/183	12	5:7	0,33	31	15:16	0,03
	M8	161/163	5	3:2	0,20	14	8:3	0,29
	Ase59	M1	183/187	18	9:9	0,00	32	14:18
M3		185/187	38	17:21	0,42	9	3:6	1,01
M4		185/187	19	11:8	0,47	7	4:3	0,14
M5		185/187	43	24:19	0,58	2	2:0	–
Ase59	M6	187/189	32	3:29	24,45*	15	12:3	5,78
	M7	187/189	23	8:25	2,16	19	13:6	2,64
	M8	187/189	11	7:4	0,83	10	6:4	0,40
Ase31	M1	307/313	20	7:13	1,83	30	12:18	1,21
	M2	311/313	8	4:4	0,00	38	23:15	1,70

n1 e n2 = tamanho amostral;  $G_1$  e  $G_2$  = testes  $G$  para hipótese de  $n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$  e  $n_{ik} : n_{jk}$  respectivamente, com um grau de liberdade;  $n_{ij}$  e  $n_{ii} + n_{jj}$  são os números observados de heterozigotos e homozigotos, respectivamente;  $n_{ik}$  e  $n_{jk}$  são os números observados de genótipos heterozigotos  $ik$  e  $jk$ , respectivamente. \*Significância após a correção de Bonferroni ( $\chi^2 = 11,46$ ).

Tabela 6.1 – Continuação. Teste de herança mendeliana em oito locos microssatélites de *A. sellowiana*.

Loco	Matriz	Genótipo	n1	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	$G_1$	n2	$n_{ik} : n_{jk}$	$G_2$
Ase31	M5	295/309	20	8:12	0,81	25	12:13	0,04
	M6	291/303	8	3:5	0,51	39	16:23	1,26
	M8	293/311	7	4:3	0,29	14	8:7	0,29
Fse04	M2	207/209	23	11:12	0,04	23	10:13	0,39
	M3	203/213	17	6:11	1,49	25	12:13	0,04
	M4	201/203	7	5:2	1,33	19	10:9	0,05
	M5	203/213	29	13:16	0,31	16	11:5	2,31
	M6	211/217	14	9:5	1,16	33	18:15	0,27
	M7	207/211	27	12:15	0,33	16	9:7	0,25
	M8	207/213	6	2:4	0,68	14	7:7	0,00
	Fse17	M1	169/173	26	13:13	0,00	24	5:19
M2		171/175	31	12:19	1,59	15	3:12	5,78
M3		171/175	22	15:7	2,98	25	15:10	1,01
M5		169/175	15	5:10	1,70	29	5:24	13,5*
M6		171/175	37	33:4	25,9*	10	3:7	1,64
M7		171/175	31	15:16	0,03	12	8:4	1,35
M8		171/175	10	6:4	0,40	11	5:6	0,09
Fse11		M1	228/234	25	13:12	0,04	25	15:10
	M2	224/226	24	13:11	0,16	22	8:14	1,65
	M3	228/234	15	8:7	0,06	32	12:20	2,02
	M5	224/234	24	13:11	0,16	21	14:7	2,37
	M6	236/238	12	3:9	3,13	35	19:16	0,25
	M7	236/242	24	7:17	19*	19	12:7	1,33
	M8	218/228	11	4:7	0,82	10	5:5	0,00

n1 e n2 = tamanho amostral;  $G_1$  e  $G_2$  = testes  $G$  para hipótese de  $n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$  e  $n_{ik} : n_{jk}$  respectivamente, com um grau de liberdade;  $n_{ij}$  e  $n_{ii} + n_{jj}$  são os números observados de heterozigotos e homozigotos, respectivamente;  $n_{ik}$  e  $n_{jk}$  são os números observados de genótipos heterozigotos *ike jk*, respectivamente. \*Significância após a correção de Bonferroni ( $\chi^2 = 11,46$ ).

Tabela 6.1 – Continuação. Teste de herança mendeliana em oito locos microsatélites de *A. sellowiana*.

<b>Loco</b>	<b>Matriz</b>	<b>Genótipo</b>	<b>n1</b>	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	$G_1$	<b>n2</b>	$n_{ik} : n_{jk}$	$G_2$
Fse16	M2	156/168	7	4:3	0,14	37	18:19	0,02
	M3	154/162	12	6:6	0,00	32	16:16	0,00
	M4	156/168	10	3:7	1,64	15	8:7	0,06
	M5	156/162	21	14:7	2,37	24	14:10	0,66
	M6	162/178	12	4:8	1,35	34	17:17	0,00
	M8	156/164	6	3:3	0,00	15	7:8	0,06

n1 e n2 = tamanho amostral;  $G_1$  e  $G_2$  = testes  $G$  para hipótese de  $n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$  e  $n_{ik} : n_{jk}$  respectivamente, com um grau de liberdade;  $n_{ij}$  e  $n_{ii} + n_{jj}$  são os números observados de heterozigotos e homozigotos, respectivamente;  $n_{ik}$  e  $n_{jk}$  são os números observados de genótipos heterozigotos *ike jk*, respectivamente. \*Significância após a correção de Bonferroni ( $\chi^2 = 11,46$ ).

Tabela 6.2 – Testes *G* para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1: 1: 1: 1) em *A. sellowiana*.

<b>Loco</b>	<b>Matriz</b>	<b>G</b>	<b>Loco</b>	<b>Matriz</b>	<b>G</b>	
Ase8 x Ase21	M1	3,44	Ase8 x Fse17	M5	8,17	
	M2	9,47		M6	2,58	
	M3	17,83		M7	2,77	
	M4	0,3		M8	0,98	
	Ase8 x Ase59	M5	0,04	Ase8 x Fse11	M1	3,48
		M6	3,66		M2	1,73
		M7	1,74		M3	9,42
		M8	3,39		M4	2,42
M1		2,42	M5		1,49	
M2		0,33	M6		20,84*	
M3		26,23*	M7		7,7	
M4		16,84	M8		5,81	
Ase8 x Ase31	M5	2,22	Ase8 x Fse16	M1	0,57	
	M6	16,16		M2	0,49	
	M7	3,11		M3	15,81	
	M8	1,77		M4	5,75	
	M1	0,69		M5	0,73	
	M2	2,79		M6	1,95	
	M3	9,91		M7	2,68	
	M4	2,99		M8	2,36	
Ase8 x Fse04	M5	0,52	Ase21xAse59	M1	2,46	
	M6	8,78		M2	13,84	
	M7	0,67		M3	23,25*	
	M8	2,18		M4	0,23	
	M1	0,04		M5	2,71	
	M2	1,43		M6	22,45*	
	M3	8,38		M7	2,37	
	M4	9,87		M8	7,06	
Ase8 x Fse17	M5	3,4	Ase21xAse31	M1	6,6	
	M6	4,01		M2	10,91	
	M7	2,53		M3	25,6*	
	M8	2,73		M4	0,07	
	M1	7,89		M5	0,91	
	M2	4,77		M6	9,45	

*G* = teste *G* para três graus de liberdade; \* Significância após a correção de Bonferroni ( $\chi^2 = 20,2$ ).

Tabela 6.2 – Continuação. Testes *G* para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1: 1: 1: 1) em *A. sellowiana*.

<b>Loco</b>	<b>Matriz</b>	<b>G</b>	<b>Loco</b>	<b>Matriz</b>	<b>G</b>	
Ase21 x Fse04	M1	1,29	Ase21 x Fse 16	M7	0,17	
	M2	8,72		M8	0,38	
	M3	20,03		Ase59 x Ase31	M1	10,39
	M4	5,21			M2	0,12
	M5	0,03	M3		50,03*	
	M6	1,65	M4		0,00	
	Ase21 x Fse17	M7	2,05	M5	22,25*	
		M8	1,73	M6	27,22*	
Ase21 x Fse17		M1	5,76	Ase59 x Fse04	M7	0,59
		M2	17,79		M8	2,86
		M3	10,43		M1	0,00
		M4	0,07		M2	0,03
		M5	5,18		M3	–
		M6	2,17		M4	1,07
	M7	1,95	M5		1,75	
	M8	1,41	M6		21,54*	
Ase21 x Fse 11	M1	3,46	Ase59 x Fse17	M7	0,91	
	M2	6,13		M8	2,54	
	M3	7,54		M1	22,26*	
	M4	0,58		M2	9,29	
	M5	0,13		M3	14,58	
	M6	0,15		M4	0,21	
	M7	5,98		M5	5,96	
	M8	1,98		M6	45,25*	
Ase21 x Fse 16	M1	2,29	Ase59 x Fse11	M7	0,45	
	M2	5,1		M8	0,15	
	M3	1,28		M1	0,51	
	M4	2,89		M2	0,03	
	M5	0,28		M3	28,25*	

*G* = teste *G* para três graus de liberdade; \* Significância após a correção de Bonferroni( $\chi^2 = 20,2$ ).

Tabela 6.2 – Continuação. Testes G para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1:1:1:1) em *A. sellowiana*.

<b>Loco</b>	<b>Matriz</b>	<b>G</b>	<b>Loco</b>	<b>Matriz</b>	<b>G</b>
Ase59 x Fse11	M5	1,09	Ase31xFse11	M4	0,00
	M6	27,09*		M5	1,58
	M7	13,94		M6	1,06
	M8	0,7		M7	9,63
Ase59 x Fse16	M1	0,03	Ase31xFse16	M8	0,34
	M2	0,98		M1	0,55
	M3	28,03*		M2	1,05
	M4	2,81		M3	1,04
	M5	2,03		M4	1,15
	M6	17,2		M5	1,86
	M7	0,98		M6	1,21
	M8	1,79		M7	0,00
Ase31 x Fse04	M1	0,13	Fse4 x Fse17	M8	1,11
	M2	4,55		M1	14,76
	M3	15,03		M2	5,16
	M4	0,49		M3	14,5
	M5	2,32		M4	0,06
	M6	7,86		M5	7,8
	M7	0,91		M6	2,21
	M8	0,72		M7	3,89
Ase31 x Fse17	M1	6,10	Fse4 x Fse11	M8	1,92
	M2	6,03		M1	0,5
	M3	12,87		M2	4,52
	M4	0,00		M3	–
	M5	8,07		M4	0,89
	M6	4,44		M5	0,29
	M7	1,2		M6	6,36
Ase31 x Fse11	M1	1,85		M7	10,98
	M2	2,2		M8	1,74

G = teste G para três graus de liberdade; \* Significância após a correção de Bonferroni ( $\chi^2 = 20,2$ ).

Tabela 6.2 – Continuação. Testes *G* para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1:1:1:1) em *A. sellowiana*.

<b>Loco</b>	<b>Matriz</b>	<b>G</b>	<b>Loco</b>	<b>Matriz</b>	<b>G</b>
Fse4 x Fse16	M2	1,64	Fse17 x Fse16	M1	11,27
	M3	25,2*		M2	1,8
	M4	2,26		M3	9,35
	M5	0,3		M4	1,15
	M6	1,26		M5	5,51
	M7	0,91		M6	1,42
	M8	2,94		M7	1,24
	Fse17 x Fse11	M1		9,61	Fse11 x Fse16
M2		3,18	M1	1,51	
M3		6,25	M2	0,14	
M4		0,00	M3	8,14	
M5		8,91	M4	2,42	
M6		0,72	M5	0,72	
M7		17,41	M6	0,56	
M8		3,56	M7	7,63	
			M8	2,53	

*G* = teste *G* para três graus de liberdade; \* Significância após a correção de Bonferroni ( $\chi^2 = 20,2$ ).

Tabela 6.3 – Teste de equilíbrio genotípico entre oito locos nSSRs em *A. sellowiana* (10.000 permutações; após correção de Bonferroni o teste foi considerado significativo se  $p < 0,000179$ )

<b>Loco</b>	<b>Matrizes</b>
Ase08 x Ase21	1,000
Ase08 x Ase59	1,000
Ase08 x Ase31	1,000
Ase08 x Fse04	1,000
Ase08 x Fse17	1,000
Ase08 x Fse11	1,000
Ase08 x Fse16	1,000
Ase21 x Ase59	1,000
Ase21 x Ase31	1,000
Ase21 x Fse04	1,000
Ase21 x Fse17	1,000
Ase21 x Fse11	1,000
Ase21 x Fse16	1,000
Ase59 x Ase31	1,000
Ase59 x Fse04	0,213
Ase59 x Fse17	0,357
Ase59 x Fse11	1,000
Ase59 x Fse16	1,000
Ase31 x Fse04	1,000
Ase31 x Fse17	1,000
Ase31 x Fse11	1,000
Ase31 x Fse16	1,000
Fse04 x Fse17	1,000
Fse04 x Fse11	1,000
Fse04 x Fse16	1,000
Fse17 x Fse11	1,000
Fse17 x Fse16	1,000
Fse11 x Fse16	1,000

## 6.4 Conclusões

Os oito locos microssatélites desenvolvidos para *A. sellowiana* e aqui analisados segregam de acordo com as leis mendelianas 1:1, não estão ligados e apresentam equilíbrio genotípico. Portanto, este conjunto de locos pode ser utilizado em estudos filogeográficos, de diversidade, estrutura genética, sistema de cruzamento e análise de parentesco, entre outros.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHLEY , M. V. Plant parentage, pollination, and dispersal: How DNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews inPlant Sciences**, v.29, p.148 – 161, 2010.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 5, p. 816-827, 1998.

GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate F-statistics. **Heredity**, v.86, p.485-486, 2002.

GILLET, E.; HATTEMER, H.H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**,v. 63, n.1, p.135-141, 1989.

KELLER, H.A.; TRESSENS, S.G. Presencia en Argentina de dos espécie de uso múltiple:*Acca sellowiana* (Myrtaceae) y *Casearia lasiophylla* (Flacourtiaceae). **Darwiniana**, v.45, n.2, p.204-212, 2007.

KLABUNDE, G.H.F; OLKOSKI, D.; VILPERTE, V.; ZUCCHI, M.I.; NODARI, R.O. Characterization of 10 new nuclear microsatellite markers in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Applications in Plant Science**, v.2, n. 6, 2014.

LEGRAND, D. Las mirtaceas del Uruguay. **Anales Del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v.4. n.11, 1936, 65p.

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

MATTOS, J.R. **A goiabeira-serrana**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis (publicação IPRNR, 19), 1986. 84p.

SANTOS, K.L.; SANTOS, M.O.; LABORDA, P.R.; SOUZA, A. P.; PERONI, N.; NODARI, R. O. Isolation and Characterization of

Microsatellite Markers in *Acca sellowiana* (Berg) Burret. **Molecular Ecology Notes**, v. 8, p. 998-1000, 2008.

SANTOS, K.L.; GURIES, R.P.; NODARI, R.O.; PERONI, N. Traditional knowledge and management of feijoa (*Accasellowiana*) in southern Brazil. **Economic Botany**, v.63, p.204-214, 2009.

SELKOEL, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, Chichester, v. 9, p. 615–629, 2006.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. New York: W. H. Freeman, 1981, 937p.

TAMBARUSSI, E.V; VENCOVSKY, R.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Mendelian inheritance, genetic linkage and genotypic disequilibrium at nine microsatelittelocos of *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze. **Genetics and Molecular Research**, v.12, n. 4, p. 5442-5457, 2013.

TARAZI, R.; SEBBENN, A.M.; MOLLINARI, M.; VENCOVSKY, R. Mendelian inheritance, linkage and linkage disequilibrium in microsatellite locos of *Copaiferalangsdorffii* Desf. **Conservation Genetic Resource**, New York, v. 2, n. 1, p. 201–204, 2010.

THORP, G.; BIELESKI, R. **Feijoas: origins, cultivation and uses**. Auckland, N.Z.: HortResearch. Ed. David Bateman, 2002, 87p.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v.121, p. 923-926, 2010.

## 7. CAPÍTULO IV – PERCEPÇÕES MOLECULARES SOBRE A ORIGEM E DIVERSIDADE DE FEIJOA (*Acca sellowiana* (O. BERG) BURRET) EM REGIÕES INTRODUZIDAS

### 7.1 Introdução

*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae) é natural da região neotropical da América do sul, incluindo Brasil (MARCHIORI & SOBRAL, 1997), Uruguai (LEGRAND, 1936; MATTOS, 1986; THORP & BIELESKI, 2002) e possivelmente Argentina (KELLER & TRESSSENS, 2007). Na área de ocorrência natural a espécie é conhecida como goiabeira-serrana (Brasil) e *guayabo del pais* (Uruguai), e internacionalmente é conhecida como feijoa ou *pineapple guava* (POPENOE, 1912; MORTON, 1987).

A espécie não é muito explorada comercialmente na região de ocorrência natural, embora seja conhecida pelos habitantes da região. Entretanto, muitas vezes é considerada uma fruta exótica no Brasil por ser tão pouco conhecida (SANTOS *et al.*, 2009) pelo restante da população. Suas propriedades bioativas fazem com que a espécie receba atenção especial na área farmacológica (BASILE *et al.*, 1997; VUOTTO *et al.*, 2000; IELPO *et al.*, 2000; RUBERTO & TRIGALI, 2004; BONTEMPO *et al.*, 2007; WESTON 2010; KELES *et al.*, 2011; MONFORTE *et al.*, 2013), enquanto seus frutos possuem alto potencial para consumo tanto *in natura* como na fabricação de diversos produtos (SHARPE *et al.*, 1993; SANTOS *et al.*, 2009), características que estimularam a produção em diversos países principalmente pela facilidade de adaptação da espécie em regiões subtropicais.

Resumidamente, a espécie saiu da área de ocorrência natural em 1890, com poucas plantas de origem uruguaia sendo levadas pelo botânico André para a França (ANDRE, 1898; SHARPE *et al.*, 1993) de onde foi levada para a Califórnia em 1901. De acordo com Moretto (2014) a introdução nos Estados Unidos aconteceu em 1901, quando foi obtido um grande número de mudas advindas de plantas aclimatadas na França por André, trazidas do Uruguai e estabelecidas em diferentes locais deste país. Em 1903 foi levada para a Flórida (MORTON, 1987). Dos Estados Unidos foi levada para a Nova Zelândia, onde teria chegado em 1908. Dessa forma, a espécie acabou por se espalhar pela Itália, Rússia, Estados Unidos, Nova Zelândia, Israel e Colômbia (THORP & BIELESKI, 2003).

Atualmente a feijoa é extensivamente cultivada na Califórnia (EUA), Nova Zelândia, no norte da África, Espanha, Portugal, França e Itália, bem como na região Caucasiana do sul da Rússia, Colômbia e Israel (DUCROQUET *et al.*, 2000; RUBERTO & TRIGALI, 2004). Atualmente, a Colômbia é o principal país produtor da fruta. Cresce também em toda a área do Mediterrâneo, onde foi introduzida no final do século XIX, inicialmente como planta ornamental (MORTON, 1987). A Colômbia (FISCHER *et al.*, 2003; QUINTERO, 2003; RODRÍGUEZ *et al.*, 2006a; RODRÍGUEZ *et al.*, 2006b) e o Uruguai (RIVAS *et al.*, 2007; VIGNALE *et al.*, 2009) vêm estudando, melhorando e cultivando a feijoa. Estados Unidos e Chile igualmente dedicaram esforços para o melhoramento da espécie, mas foi na Nova Zelândia onde ocorreu o maior trabalho de melhoramento recente, e provavelmente onde tenham sido obtidos os avanços mais significativos (THORPE, 2006). No Brasil, pesquisas experimentais iniciadas em 1986 foram estimuladas pelo potencial organoléptico e pelo fato da espécie ser adaptada às condições edafoclimáticas das regiões de altitude (superior a 800 m) presentes no Sul do Brasil (DUCROQUET *et al.*, 2000).

Técnicas de genética molecular têm o potencial de evidenciar as relações entre acessos de coleções, e de vincular essas com populações silvestres e áreas geográficas. Microsatélites nucleares (SSR), por exemplo, são marcadores de elevado caráter informativo, pois em geral são multialélicos, polimórficos, codominantes, e evoluem de forma relativamente rápida (ASHLEY, 2010). Santos *et al.*, (2007) e Santos *et al.* (2011) utilizaram marcadores SSRs heterólogos para caracterizar cinco populações do Estado de Santa Catarina (Brasil). Paralelamente, os primeiros SSRs foram descritos para *A. sellowiana* por Santos *et al.* (2008), e utilizados por Santos (2009) e Donazzolo (2012) para caracterizar poucas populações no sul do Brasil e também materiais conservados *on farm* e em banco de germoplasma. Existe apenas um estudo que analisa a diversidade genética de feijoa introduzida em regiões fora de sua ocorrência natural: Dettori & Palombi (2000) avaliaram acessos cultivados na Itália por meio de marcadores RAPD, demonstrando diversidade genética restrita.

Análises com marcadores SSR têm sido utilizadas para fazer inferências sobre a relação existente entre espécies cultivadas e seus parentes silvestres, associados a outros marcadores moleculares (GARCIALOR *et al.*, 2013; MORETZSOH *et al.*, 2013; SEGATTO *et al.*, 2014) e mesmo isoladamente (KATO *et al.*, 2014; NISHIO *et al.*, 2014; TANIGUCHI *et al.*, 2014; ZHENQING, *et al.*, 2014).

Dessa forma, com uma abordagem do genoma nuclear pretende-se contribuir para uma melhor elucidação sobre a diversidade genética das populações cultivadas em diferentes regiões do mundo, assim como fazer inferências sobre a origem das mesmas e contribuir para o conhecimento histórico sobre a distribuição e domesticação da *A. sellowiana*.

## 7.2 Material e Métodos

Para este estudo foram obtidas amostras foliares de plantas de diferentes regiões onde a espécie foi introduzida. Foram obtidas amostras de três cultivares comerciais desenvolvidas na Nova Zelândia (Opalstar, Apollo e Triunfo) e que possuem representantes no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) mantido pela EPAGRI (Santa Catarina, Brasil); nove amostras de um pomar comercial de plantas introduzidas, sem procedência conhecida, e localizado na área de ocorrência natural da espécie no município de Ipê no Rio Grande do Sul, Brasil; 12 amostras de indivíduos provenientes do Banco de Germoplasma do Centro Nacional da Feijoa (CENAF), localizado no Departamento de Cundinamarca (Colômbia) formado na década de 1980 a partir de coletas em todo território colombiano e de acessos oriundo da Nova Zelândia e dos Estados Unidos (CASTILLO, 2003); 10 amostras de indivíduos cultivados na Califórnia (Estados Unidos) e 10 em Bordeaux (França), totalizando assim 44 amostras de regiões onde espécimes foram introduzidos no passado. Também foram incluídas na análise nove populações distribuídas ao longo da área de ocorrência natural da espécie (Tabela 7.1), somando 110 amostras. As amostras do germoplasma uruguaio foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa da Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai. Além disso, fez parte da amostragem uma população argentina, sendo que a ocorrência natural da espécie nesta região ainda é questionada.

As amostras de tecido foliar coletadas foram mantidas em sílica gel e foi utilizado Kit de extração de DNA *NucleoSpin® Plant II* (Macherey-Nagel) conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

Para análise do DNA nuclear os indivíduos foram genotipados com dez SSRs desenvolvidos para a espécie (SANTOS *et al.*, 2008; KLABUNDE *et al.*, 2014) (Tabela 7.2). Para amplificação dos fragmentos foram utilizados 20 ng de amostra de DNA, 0,1 mM de cada dNTP (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,25 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas), 1x Taq buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,2 µM de cada primer, em um volume total de 12 µL. Termociclador Veriti (Life Technologies, Carlsbad,

CA) foi utilizado para amplificação dos fragmentos com a seguinte ciclagem: 95 °C por 5 min, 32 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura de anelamento por 1 min, 72 °C por 30 s, e uma extensão final de 7 min a 72 °C.

Tabela 7.1 - Código de identificação, local e tamanho amostral (N) das populações de *A. sellowiana*.

<b>Código</b>	<b>Local</b>	<b>N</b>
CL	Colômbia	12
USA	Califórnia, Estados Unidos	10
FR	França	10
NZ	Nova Zelândia (BAG, EPAGRI)	3
BR_CB	Campo Belo do Sul, Santa Catarina, Brasil	8
BR_GP	Guarapuava, Paraná, Brasil	8
BR_SJ	São Joaquim, Santa Catarina, Brasil	15
BR_IT	Itaara, Rio Grande do Sul, Brasil	15
BR_BG	Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil	15
BR_EX	Ipê, Rio Grande do Sul, Brasil	9
BR_CN	Canela, Rio Grande do Sul, Brasil	7
BR_PL	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	12
ARG	Oberá, Argentina	10
UR_CL	Cuchilla de Laurales, Uruguai	10
UR_SC	Quebrada de los Cuervos, Uruguai	10
<b>Total</b>		<b>154</b>

A obtenção dos genótipos em sistema de detecção por fluorescência foi realizada em sequenciador MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare), por eletroforese capilar com matriz de poliacrilamida linear utilizando padrões de tamanho (ET-Rox 400 GE Healthcare). Foi utilizado sistema bplex, de acordo com o tamanho esperado do amplicon e a fluorescência do marcador (FAM ou NED), com 1 µl do produto de cada PCR diluído 8 x em água ultrapura. Em 2 µl de produto foram adicionados 7,75 µl de Tween 20 0,1% (*GE-Healthcare*) e 0,25 µL de ET400-R Size Standard. Mediante leitura de 20 fragmentos foi realizada comparação pelo software Fragment Profiler (*GE Healthcare*). Em cada eletroforese foi utilizada um número de quatro a oito amostras testemunhas para evitar variação na leitura do tamanho dos fragmentos.

Tabela 7.2 – Sequência e temperatura de anelamento dos dez marcadores SSRs de *A. sellowiana* utilizados no presente estudo

<b>Loco</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Temperatura de Anelamento</b>	<b>Referência</b>
<i>Ase08</i>	F-GACGAAACAGGGGAAGAAG R-CGACACGTGGCTATCATCTA	52 ° C	Santos <i>et al.</i> , 2008
<i>Ase21</i>	F: ACCTTGCAAAGGATGTCGT R: GCTGTTGGAGGAAAAAGCAG	55 ° C	Santos <i>et al.</i> , 2008
<i>Ase31</i>	F-TCTTCAAACAAATCCACTCTC R-TCTTCATCAGGCGACCATA	52 ° C	Santos <i>et al.</i> , 2008
<i>Ase59</i>	F-ACTATTGCATGCTTGTCTC R-AGGTATCTTCAGTTCTTGTTG	47 ° C	Santos <i>et al.</i> , 2008
<i>Fse06</i>	F: CGAATAGGGCACTCCAATC R: GCCGTCCCTTAGGTTCAACAC	54 ° C	Klabunde <i>et al.</i> , 2014
<i>Fse08</i>	F: TCAGGTGTGGAATCTGCTTCT R: CCCTCTCATTAGGTGGTTGG	53 ° C	Klabunde <i>et al.</i> , 2014
<i>Fse11</i>	F: AAAAGGAAAGTACGCATCCA R: CCCAGCAACAGGTGTATGA	55 ° C	Klabunde <i>et al.</i> , 2014
<i>Fse12</i>	F: GCGATTGAACCATGAAGTCC R: CGGTGGATTCAATGGAGAAG	55 ° C	Klabunde <i>et al.</i> , 2014
<i>Fse16</i>	F:CCATTGTTTTGGAAGGAACA R: TTGCGATTTTGAGAGTGGAG	55 ° C	Klabunde <i>et al.</i> , 2014
<i>Fse17</i>	F:CCATGAAATTGCTAAGCTGGA R: CGTGCTCGATGAAGAGGAA	55 ° C	Klabunde <i>et al.</i> , 2014

### 7.3 Resultados e Discussão

Os marcadores microssatélites utilizados se mostraram altamente polimórficos, com o número de alelos por loco variando de 10 a 30, com uma média de 20,9 alelos por loco. Além de um Índice de Informação Polimórfico elevado, com média de 0,846, variando de 0,704 no loco Ase59 a 0,904 no loco Ase08. A heterozigiosidade observada média (0,602) foi menor que a heterozigiosidade esperada (0,863) (Tabela 7.3).

Tabela 7.3 – Caracterização dos dez marcadores microssatélites utilizados em *A. sellowiana*.

Loco	Tam. Obs. (pb)	N	<i>k</i>	$H_o$	$H_e$	PIC
<i>Fse06</i>	219-289	143	27	0,566	0,824	0,810
<i>Fse08</i>	189-215	154	14	0,474	0,840	0,817
<i>Fse11</i>	214-300	143	23	0,559	0,861	0,849
<i>Fse12</i>	153-197	154	22	0,636	0,912	0,904
<i>Fse16</i>	144-218	154	30	0,747	0,916	0,907
<i>Fse17</i>	163-213	149	22	0,597	0,876	0,861
<i>Ase08</i>	211-329	141	10	0,651	0,931	0,924
<i>Ase21</i>	147-187	154	15	0,571	0,856	0,838
<i>Ase31</i>	293-331	154	19	0,630	0,860	0,844
<i>Ase59</i>	153-189	149	27	0,596	0,749	0,704
Média	-	-	20,9	0,602	0,863	0,846

Tam. Obs. = tamanho observado em pares de base (pb); N = número de amostras; *k* = número de alelos;  $H_o$  = Heterozigiosidade observada;  $H_e$  = heterozigiosidade esperada; PIC = Índice de Conteúdo Polimórfico.

Todas as amostras oriundas de populações introduzidas apresentaram número inferior de alelos por loco, sendo que a média dessas populações variou de 2,2 (EUA e FR) a 4,6 (BR\_EX), enquanto que as médias de alelos por loco nas populações consideradas naturais variou de 5,6 (BR\_CB) a 9,6 (BR\_SJ). A população Argentina, cuja ocorrência natural ainda é questionada, apresentou uma média de 6,1 alelos por loco (Tabela 6.4). A diferença do número médio de alelos por loco foi significativa ( $p = 0,0001$ ) quando comparamos o material introduzido com o não introduzido.

O número de alelos exclusivos foi alto e, entre as amostras de populações introduzidas, foram observados apenas em BR\_EX e em amostras colombianas. Em contrapartida, todas as outras amostras de populações (incluindo a Argentina) apresentaram ao menos dois alelos

exclusivos (Tabela 7.4). Portanto, as populações introduzidas apresentaram significativamente menos alelos exclusivos ( $p < 0,05$ ).

A heterozigosidade esperada foi maior que a observada em todas as amostras de populações analisadas, indicando um excesso de homozigotos nas populações e déficit de heterozigotos (Tabela 7.4). Este resultado é corroborado pelo coeficiente de endogamia ( $F$ ), que apresentou valores positivos para todas as amostras, e significativos para amostras da Nova Zelândia (apenas três amostras), Colômbia e para as amostras do Uruguai e sul do Rio Grande do Sul (BR\_BG e BR\_PL). Tanto a heterozigosidade observada quanto a esperada foram significativamente diferentes entre populações introduzidas e não introduzidas ( $p < 0,05$ ).

Quando as amostras foram distribuídas em dois grupos (introduzidas e não introduzidas) os coeficientes de endogamia foram significativamente positivos e não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ).

Podemos observar que as amostras da França e dos Estados Unidos apresentam os menores índices de diversidade genética. Isso confirma o que foi descrito por Andre (1901), sobre poucas plantas ou frutos da região de ocorrência natural da espécie terem sido levadas para a França e, posteriormente, para os Estados Unidos. No caso da Nova Zelândia, depois que teve início o programa de melhoramento dessa espécie, houveram novas coletas na região de ocorrência natural para escolher novos acessos (THORP & BIELESKI, 2003), o que pode justificar a presença de maior diversidade nas cultivares lá desenvolvidas. Segundo Castillo (2003) para montar o banco de germoplasma mantido na Colômbia foram realizadas coletas de espécimes em todo país, além de acessos cultivados nos Estados Unidos e Nova Zelândia, o que levou, provavelmente, essas plantas a apresentarem maior diversidade comparativamente a outras regiões que introduziram a mesma espécie.

A árvore *neighbor-joining* (NJ) que foi gerada a partir da matriz de alelos compartilhados entre as 15 amostras de populações estudadas (Figura 7.1), mostra um único ramo englobando as populações da França (FR), Estados Unidos (USA), Colômbia (CL) e Nova Zelândia (NZ), indicando uma origem similar para todos os materiais. Estas amostras se encontram mais estreitamente relacionadas com aquelas que ocorrem no Uruguai (UR\_CL e UR\_SC) e no sul do Brasil (BR\_BG) (Figura 7.1), corroborando com as informações históricas de Sharpe *et al.* (1993), que afirmaram que as primeiras plantas de feijoa que foram para o exterior foram levadas desta região e, então, disseminadas para outras partes do mundo.

Tabela 7.4 - Diversidade genética nas 15 amostras de populações de *A. sellowiana* com base em dez marcadores SSRs.

Amostras	n	A	$A_e$	$H_o$	$H_e$	F
EUA	10	2,2	0	0,430	0,444	0,033
FR	10	2,2	0	0,400	0,406	0,019
NZ	3	3,4	0	0,500	0,673	0,320*
COL	12	4,1	3	0,441	0,591	0,262*
ARG	10	6,1	3	0,633	0,747	0,152
UR_CL	10	7,4	5	0,610	0,829	0,264*
UR_SC	10	6,8	2	0,580	0,823	0,296*
BR_BG	15	7,6	4	0,573	0,740	0,184*
BR_PL	12	7,8	2	0,608	0,829	0,266*
BR_IT	15	8,2	3	0,721	0,804	0,115
BR_CN	7	7,8	8	0,777	0,860	0,101
BR_CB	8	6,5	2	0,719	0,798	0,108
BR_GP	8	5,6	3	0,760	0,797	0,046
BR_SJ	15	9,6	12	0,793	0,879	0,098
BR_EX	9	4,6	5	0,489	0,735	0,335*
Introduzidas	44	8,5	11	0,448	0,680	0,340*
Não introduzidas	110	19,9	41	0,669	0,881	0,238*

n = tamanho amostral; A = número médio de alelos por loco;  $A_e$  = alelos exclusivos;  $H_e$  = heterozigiosidade esperada;  $H_o$  = heterozigiosidade observada; F = coeficiente de endogamia. \*p<0,05

A árvore *neighbor-joining* (NJ) gerada a partir da matriz de alelos compartilhados entre os indivíduos (Figura 7.2) também demonstra um agrupamento único para todas as plantas consideradas introduzidas, incluindo no mesmo agrupamento a população BR\_EX (cultivada em vários municípios da Serra Gaúcha), indicando que realmente se trata de uma população introduzida, também apresentando relação com as populações uruguayas (Figura 7.1; Figura 7.2). As informações obtidas na região (Cesar Volpato, comunicação pessoal) são de que as plantas foram obtidas de um viveirista que dizia se tratarem de plantas oriundas do Chile. Informações históricas (MORETTO, 2014) descrevem a presença da espécie nesse país latino-americano, sendo que lá foi introduzida na década de 1980.

As amostras da Argentina ficaram agrupadas com amostras das populações brasileiras geograficamente próximas, assim como ocorreu entre outras populações ditas naturais, um indicativo que se trata de uma população de ocorrência natural, conforme descrito por Keller & Tressens

(2007). No entanto, são necessárias análises de populações com maior tamanho amostral para ter conclusões mais robustas e realmente afirmar que a espécie ocorre naturalmente nessa região. Uma das hipóteses levantadas por Moretto (2014) atribui a presença de árvores na Argentina à introdução da mesma por indígenas no século XVIII. Essa região era habitada por Guaranis e Kaimgang que já conheciam a planta por serem seminômades, que eles circulavam pela área de ocorrência de espécie. Sabe-se que a feijoa esteve presente na alimentação desses grupos indígenas (MATTOS, 1978).

A caracterização genética demonstrou uma diversidade restrita para as amostras introduzidas, assim como foi observado por Dettori & Palombi (2000) em plantas cultivadas na Itália. Isso, devido ao gargalo genético que a espécie sofreu após ter se distribuído ao redor do mundo a partir de poucos genótipos.

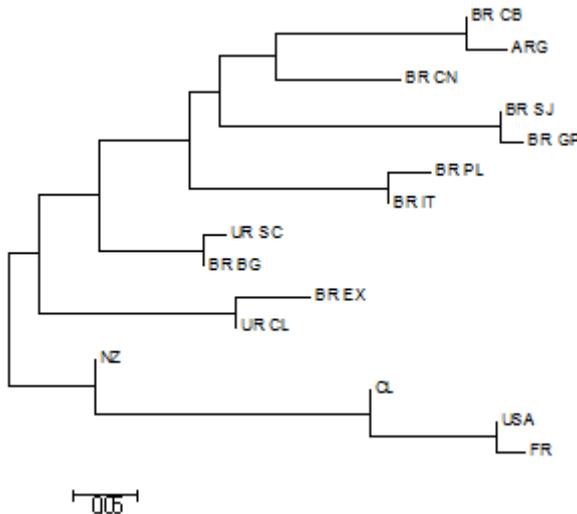


Figura 7.1 - Árvore *Neighbor-joining* (NJ) construída a partir de alelos compartilhados entre as 15 amostras de populações de *A. sellowiana* analisadas. As amostras correspondem àquelas apresentadas na Tabela 7.1.

A seleção de genitores silvestres durante processos de melhoramento muitas vezes resulta em uma redução da diversidade genética dentro das cultivares (TANKSLEY & MCCOUCH, 1997). A força de um gargalo genético durante a domesticação depende da duração do evento de

domesticação, do sistema reprodutivo do organismo e de práticas adotadas no processo de melhoramento (IORIZZO *et al.*, 2013). Este processo é muito recente para a feijoa, porém o fato de poucos materiais terem saído da área de ocorrência natural, o que não permitiu fluxo gênico com plantas silvestre, acentuou o gargalo genético. Donazzolo (2012) estudou amostras cultivadas e não cultivadas na Serra Gaúcha e observou mudanças em termos genéticos, embora em pequenas magnitudes, especialmente pela alta heterozigiosidade da espécie e pelo fato das plantas selecionadas serem originadas de reprodução sexuada, mantendo assim a diversidade. O fluxo de genes com plantas não selecionadas também contribui para que as mudanças genéticas sejam mais lentas na área de ocorrência natural.

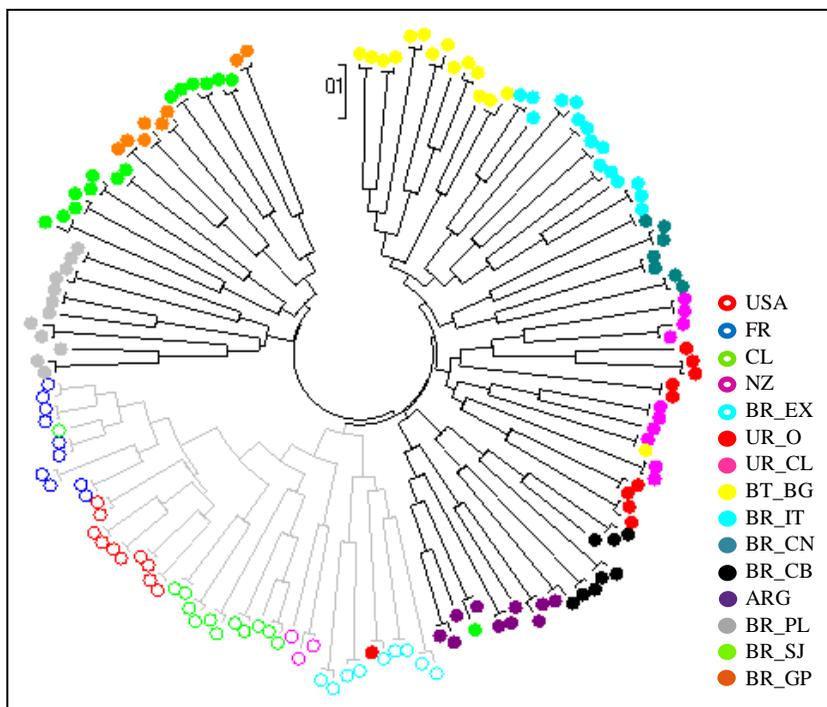


Figura 7.2 - Árvore *Neighbor-joining* (NJ) construída a partir de alelos compartilhados entre as 154 amostras de *A. sellowiana* analisadas. Ramos em cinza representam agrupamento formado pelas populações introduzidas.

Smith (2001) e Olsen & Gross (2008) sugeriram que, para compreender a dinâmica de uma cultura, devem-se combinar dados

genéticos e históricos. Os resultados aqui apresentados concordam com os dados históricos existentes sobre distribuição dessa espécie redor do mundo.

#### **7.4 Conclusões**

Com base nos resultados obtidos é possível confirmar a reduzida base genética das amostras de *A. sellowiana* que foram levadas da região de origem e introduzidas em diferentes países. Esses acessos são a base para praticamente todos os programas de melhoramento dessa espécie que são desenvolvidos naqueles países. Isso demonstra a importância da diversidade genética disponível no centro de origem e diversidade da espécie, tanto para conservação, quanto para servir como fonte para o desenvolvimento de novas cultivares.

Estes resultados são de grande importância para esclarecer dúvidas a respeito das relações evolutivas e históricas entre populações naturais e introduzidas que podem ser úteis em programas de melhoramento e direcionar ações de conservação para espécie.

Por fim, em razão da constatação da grande diversidade genética ainda existente no centro de origem e diversidade da espécie, cabe ressaltar a importância da adoção de esforços adicionais na conservação da espécie, notadamente no Brasil.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRE, E. Um nouvel arbre frutrier: *Feijoa sellowiana*. **Revue Horticole**, v.70, p.264-265,1898.
- ASHLEY , M. V. Plant parentage, pollination, and dispersal: How DNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews inPlant Sciences**, v.29, p.148 – 161, 2010.
- BASILE, A.; VUOTTO, M. L.; VIOLANTE, U.; SORBO, S.; MARTONE, G.; CASTALDO-COBIANCHI, R. Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 8, n.3, p. 199–203, 1997.
- BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A.; NEBBIOSO, A.; DE BELLIS, F.; CONTE, M.; MINICHELLO, A.; MANZO, F.; CARAF, V.; BASILE, A.; RIGANO, D.; SORBO, S. COBIANCHI, R.C.; SCHIAVONE, E.M.; FERRARA, F.; DE SIMONE, M.; VIETRI, M.T.; CIOFFI, M.; SICA, V.; BRESCIANI, F.; LERA, A.R.; ALTUCCI, L.; MOLINARI, A.M. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.1902–1914, 2007.
- CACIOPPO, O. **La feijoa**. Madri: Mundi-Prensa, 1988. 85p.
- CASTILLO, O.Q. Selección de Cultivares, Manejo del Cultivo y Regulación de las Cosechas de Feijoa. In Fischer, G., D Miranda, G, Cayón, e M, Mazorra (eds). **Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa (Acca sellowiana Berg)**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Produmedios, 2003.
- DETTORI, M.T; PALOMBI, M.A. Identification of *Feijoa sellowiana* Bergaccessionsby RAPD markers. **Scientia Horticulturae**,v.86, p.279-790, 2000.
- DONAZZOLO, J. **Conservação e domesticação da feijoa na Serra Gaúcha - RS**. 2012. 312p. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2012.

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. **Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*)**. Série frutas nativas 5. Jaboticabal: Funep, 2000, 66p.

DUCROQUET, J.P.H.J.; RIBEIRO, P. Goiabeira-serrana: velha conhecida, nova alternativa. **Agropecuária Catarinense**, v.4, n.3, p 27-29, 1991.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p. 564–567, 2010.

FISCHER, G., D.; MIRANDA, D.; CAYÓN, G.; MAZORRA, M.(Ed.). **Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa (*Accasellowiana Berg*)**. Bogotá: Produmedios, 2003.

GARCIA-LOR, A., F.; CURK, H.; SNOUSSI-TRIFA, R.; MORILLON, G.; ANCILLO, F.; LURO, L.; NAVARRO, P.; OLLITRAUL T. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. **Annals of Botany**, v. 111, p. 1–19, 2013.

GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate F-statistics. **Heredity**, v.86, p.485-486, 2002.

IELPO, M.T.L.; BASILE, A.; MIRANDA, R.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; SORBO, S.; LAGHI, E.; RICCIARDI, M.M.; RICCIARDI, L.; VUOTTO, M.L. Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v.71, p.101-109, 2000.

IORIZZO, M.; SENALIK, D.A.; ELLISON, S.L.; GRZEBELUS, D.; CAVAGNARO, P.F.; ALLENDER, C.; BRUNET, J.; SPOONER, D.M.; DEYNZE, A.V.; SIMON, P.W. Genetic structure and domestication of carrot (*Daucus carota* subsp. *Sativus*) (Apiaceae). **American Journal of Botany**, v. 100, n. 5, p.930-938, 2013.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases

success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1106, 2007.

KATO, S.; MATSUMOTO, A.; YOSHIMURA, K.; KATSURI, T.; IWAMOTO, K.; KAWAHARA, T.; MUKAI, Y.; TSUDA, Y.; ISHIO, S.; NAKAMURA, K.; MORIWAKI, K.; SHIROISHI, T.; GOJOBOR, T.; YOSHIMARU, H. Origins of japanese flowering cherry (*Prunus* subgenus *Cerasus*) cultivars revealed using nuclear SSR markers. **Tree Genetics & Genomes**, v. 10, n. 3, p. 477-487, 2014.

KELES, H.; INCE, S.; KÜÇÜKKURT, I.; TATLI, I.I.; AKKOL, E.K.; KAHRAMAN, C.; DEMIREL, H.H. The effects of *Feijoa sellowiana* fruits on the antioxidant defense system, lipid peroxidation, and tissue morphology in rats. **Pharmaceutical Biology**, p.1-8, 2011.

KELLER, H.A.; TRESSSENS, S.G. Presencia en Argentina de dos especie de uso múltiple: *Acca sellowiana* (Myrtaceae) y *Casearia lasiophylla* (Flacourtiaceae). **Darwiniana**, v.45, n.2, p.204-212, 2007.

KLABUNDE, G.H.F; OLKOSKI, D.; VILPERTE, V.; ZUCCHI, M.I.; NODARI, R.O. Characterization of 10 new nuclear microsatellite markers in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Applications in Plant Science**, v.2, n. 6, 2014.

LEGRAND, D. Las mirtaceas del Uruguay. **Anales Del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v.4. n.11, 1936, 65p.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUK, L.; PEMBERTON, J.M.. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7, p.639-655, 1998.

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

MATTOS, J.R. **A goiabeira-serrana**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis (publicação IPRNR, 19), 1986. 84p.

MATTOS, J. R. *Frutos Indígenas Comestíveis do Rio Grande do Sul*. 2ª ed. Publicação IPRNR, N.1, Porto Alegre, 1978.

MONFORTE, M.T.; FIMIANI, V.; LANUZZA, F.; NACCARI, C.; RESTUCCIA, S.; GALATI, E.M. *Feijoa sellowiana* Berg Fruit Juice: Anti-Inflammatory Effect and Activity on Superoxide Anion Generation. **Journal of Medicine Food**, v.0, p. 1-7, 2013.

MORETTO, S. P. **A domesticação e a disseminação da feijoa (*Acca sellowiana*) do século XIX ao século XX**. 2014. 432 p. Tese (Doutorado em História), Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2014, 432 p.

MORETZSOHN, M.C.; GOUVEA, E. G. P.; INGLIS, W.; LEAL-BERTOLI, S.C.M.; VALLS, J.F.M.; BERTIOLI, D.J. A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. **Annals of Botany**, v.111, p. 113–126, 2013.

MORTON, J.F. *Feijoa*. In: **Fruits of warm climates**. Miami: Julia F. Morton, p.367-370, 1987.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P.; MELER, K.; DUCROQUET, J.P.H.J. Genetic variability of *Feijoa sellowiana* germoplasm. **Acta Horticulturae**, v.452, p.41-46, 1997.

OLSEN, K.M.; GROSS, B.L. Detecting multiple origins of domesticated crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 13701 – 13702, 2008.

POPENOE, F.W. *Feijoa sellowiana* I, its history. Culture and varieties. **Pomona College Journal of Economic Botany and Subtropical Horticulture**, v.2, n.1, p. 217-242, 1912.

QUINTERO, O. Selección de cultivares, manejo del cultivo y regulación de las cosechas de feijoa. In.: FISCHER, G.; MIRANDA, D.; CAYÓN, G.; MAZORRA, M. (Eds) **Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa (*Acca sellowiana* Berg)**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Produmedios, 2003.

RODRÍGUEZ, M.; ARJONA, H.E.; GALVIS, J.A. Maduración del fruto de feijoa (*Acca sellowiana* Berg) em los clones 41 (Quimba) y 8-4 a

temperatura ambiente en condiciones de La Sabana de Bogotá. **Agronomía Colombiana**, v.24, n.1, p.68-76, 2006..

RIVAS, M.; VIGNALE, B.; CAMUSSI, G.; PUPPO, M.; PRITSCH, C. Los recursos genéticos de *Acca sellowiana* (Berg) Burret em Uruguay. In.: CLAUSEN, A.; CONDÓN, F.; BERETTA, A. (Eds) **Avances de investigación en recursos genéticos en el Cono SurII**, Montevideo, Uruguay: PROCISUR II, IICA, 2007. p.103-112.

RUBERTO, G.; TRINGALI, C. Secondary metabolites from the laves of *Feijoa sellowiana* Berg. **Phytochemistry**, v.65, p.2947-2951, 2004.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method—A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406–425, 1987.

SANTOS, K.L. **Diversidade cultural, genética e fenotípica da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*): implicações para a domesticação da espécie**. 163f. Tese (Doutorado em Ciências área de concentração: Recursos Genéticos Vegetais), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.

SANTOS, K.L.; SANTOS, M.O.; LABORDA, P.R.; SOUZA, A. P.; PERONI, N.; NODARI, R.O. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 73–79, 2007.

SANTOS, K.L.; SANTOS, M.O.; LABORDA, P.R.; SOUZA, A. P.; PERONI, N.; NODARI, R. O. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers in *Acca sellowiana* (Berg) Burret. **Molecular Ecology Notes**, v. 8, p. 998-1000, 2008.

SANTOS, K.L.; GURIES, R.P.; NODARI, R.O.; PERONI, N. Traditional knowledge and management of feijoa (*Acca sellowiana*) in southern Brazil. **Economic Botany**, v.63, p.204-214, 2009.

- SANTOS, K.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; Caracterização genética de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) com marcadores microssatélites heterólogos. **Biotemas**, v. 24, n.4, p.75-83, 2011.
- SEGATTO, A.L.A.; RAMOS-FREGONEZI, A.M.C.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L.B. Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petúnias. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 1, 2014.
- SHARPE, R.H.; SHERMAN, W.B.; MILLER, E.P. *Feijoa* history and improvement. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v.106, p.134-139. 1993.
- SMITH , B.D. Documenting plant domestication: The consilience of biological and archaeological approaches. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 1324 – 1326, 2001.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p. 2731–2739, 2011.
- TANIGUCHI, F.; KIMURA, K.; SABA, T.; OGINO, A.; YAMAGUCHI, S.; TANARA, J. Worldwide core collections of tea (*Cameliasinensis*) based on SSR markers. **Tree Genetics & Genome**, 2014.
- TANKSLEY, S.D.; McCOUCH , S.R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science**, v.277, p.1063-1066, 1997.
- THORP, G. DSRI's feijoa breeding programme goes to South America. **The Orchardist of New Zealand**, v.61, n.7, p.213-215, 1988.
- THORP, G.; BELESKI, R. **Feijoas: origins, cultivation and uses**. Auckland, N.Z.: HortResearch. Ed. David Bateman, 2003, 87p.
- THORP, G. Feijoa. In.: JANICK, J., PAULL, R.E. (Eds) **The encyclopedia of fruit & nuts**. London: CABI Publisher, p.526-534, 2006.

VIGNALE, B.; CABRERA, D.; NEBEL, J.P.; LOMBARDO P. Avances em La caracterización y mejoramiento genético Del guayabo del país – *Acca sellowiana* (Berg) Burret em Uruguay. In.: Workshop Sulamericano sobre *Acca sellowiana*, I, São Joaquim (SC), 2009. **Anais...** Florianópolis (SC), 2009.

VUOTTO, M. L.; BASILE A.; MOSCATIELLO, V.; DE SOLE, P.; CASTALDO-COBIANCHI, R.; LAGHI, E.; IELPO, M. T. L. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.13, p.197-201, 2000.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v.121, p. 923-926, 2010.



## 8. CAPÍTULO V- SISTEMA REPRODUTIVO, ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E FLUXO GÊNICO EM *Acca sellowiana* (O. BERG) BURRET

### 8.1 Introdução

A Mata Atlântica é considerada um dos principais *hotspots* de diversidade do planeta, e estima-se que quase 3% das espécies de plantas de todo mundo estão restritas à esse bioma, sendo que cerca de 8.000 são endêmicas (MYERS *et al.*, 2000) e/ou apresentam distribuição restrita. Entre as diferentes formações vegetais que ocorrem na Mata Atlântica, a Floresta Ombrófila Mista ocorre nas partes mais altas do Planalto Sul, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (KLEIN, 1960). Marchiori & Sobral (1997) descrevem Floresta Ombrófila Mista como área de ocorrência de *Acca sellowiana*, onde a espécie habita a borda da mata e savanas nos campos de altitude.

*A. sellowiana* é uma espécie da família Myrtaceae que possui importância ornamental (SAZIMA & SAZIMA, 2007) e farmacológica (BASILE *et al.*, 1997; VUOTTO *et al.*, 2000; IELPO *et al.*, 2000; BONTEMPO *et al.*, 2007; KELES *et al.*, 2011; WESTON 2010; MONFORTE *et al.*, 2013). Porém, seu maior potencial está nos frutos, que podem ser consumidos *in natura* ou processados (SHARPE *et al.*, 1993; SANTOS *et al.*, 2009). A espécie é hermafrodita, predominantemente de alógama, com tendências a dicogamia (DUCROQUET & RIBEIRO, 1991), e possui autoincompatibilidade tardia (FINATTO *et al.*, 2011). As pétalas se apresentam como recurso alimentício para os pássaros, considerados os principais polinizadores (STEWART, 1987). Os frutos aparentemente são fonte de alimentação para animais, porém não há estudos sobre a dispersão zocórica de sementes. Apesar do potencial econômico a espécie não possui estudos sobre sistema de cruzamento, fluxo gênico, parentesco, endogamia e estrutura genética intrapopulacional, fatores que têm forte influência sobre a composição genética de populações naturais, conhecimento este fundamental para a conservação e o melhoramento genético.

A diversidade genética permite que as populações naturais mantenham processos evolutivos e, por consequência, a capacidade de adaptação a mudanças ambientais (FRANKHAM *et al.*, 2010). O fluxo gênico e a deriva genética interagem com a seleção natural determinando o potencial de adaptação das populações (KLEIN *et al.*, 2011). Já os sistemas

de reprodução e mecanismos de dispersão de pólen e semente desempenham papel essencial na composição genética das populações, afetando a distribuição da diversidade entre e dentro das populações (GOODWILLIE *et al.*, 2005). Recentemente tem aumentado o número de estudos científicos sobre fluxo gênico, estudos esses que vêm comprovando que o fluxo de genes em plantas varia, mas é frequentemente alto o suficiente para ser evolutivamente significativo (ELLSTRAND, 2014). De modo geral, estudos sobre sistema reprodutivo, fluxo gênico, estrutura genética espacial e análise de parentesco têm sido realizados utilizando locos microssatélites, devido ao seu alto polimorfismo (ASHLEY, 2010).

Assim, este trabalho teve por objetivos investigar a ocorrência de estruturação genética espacial, endogamia, migração e padrões de dispersão de pólen e seus efeitos na diversidade genética de *A. sellowiana* e, dessa forma, unir informações que possam contribuir para tomada de decisões que incluam o melhoramento e a conservação da espécie.

## 8.2 Material e Métodos

Uma população foi escolhida com base no tamanho e na representatividade. Foi então realizado levantamento demográfico de uma parcela permanente de 2,9 ha, dividida em subparcelas de 100 m<sup>2</sup>. A parcela se localiza no Parque Nacional de São Joaquim, Urubici/SC (28°07'46.4"S, 49°35'54.2"O), a 1468 m de altitude, na Floresta Ombrófila Mista, em uma área que foi desapropriada há cerca de 10 anos. Porém, proprietários de áreas vizinhas soltam o gado na área para se alimentar, sendo que durante o desenvolvimento dos trabalhos foi observada presença dos animais. A parcela é composta por uma área aberta (campo) e uma mata ciliar que cerca um pequeno corpo d'água (Figuras 8.1; 8.2). A área não se encontra isolada.

A demarcação da parcela em subparcelas foi realizada com o intuito de facilitar a localização e caracterização dos indivíduos e assim verificar a densidade e frequência dos mesmos. Todas as plantas de *A. sellowiana* do interior da parcela foram identificadas com placas de alumínio e mapeadas com coordenadas  $x$  e  $y$  para as análises de distribuição e de estrutura genética espacial. As plantas tiveram material vegetal coletado e armazenado em sacos hermeticamente fechados contendo sílica gel para posterior extração de DNA.

O censo realizado na área de 2.9 hectares resultou na coleta de amostras de 355 plantas, com uma densidade de 122 indivíduos por hectare.

Como ainda não existe na literatura uma definição de plântula, juvenil e adulto para a espécie, de modo que os fenótipos possam ser inequivocadamente distinguidos, todos os indivíduos foram considerados adultos. Além disso, foram encontradas evidências de que algumas das plantas da parcela apresentavam rebrote após terem sido cortadas no colo, o que dificulta ainda mais a caracterização destes indivíduos.

Oito plantas matrizes foram selecionadas e delas foram coletados de três a cinco frutos (Figura 8.3). As sementes destes frutos foram germinadas e de cinco a dez plântulas por fruto foram genotipadas, totalizando 325 plântulas (Tabela 8.1).

A extração de DNA foi realizada com o uso do kit de extração *NucleoSpin® Plant II* (Macherey-Nagel) conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Foram selecionados oito marcadores microssatélites atualmente disponíveis, quatro desenvolvidos por Santos *et al.* (2008) (Ase) e quatro outros quatro desenvolvidos por Klabunde *et al.* (2014) (Fse) (Tabela 8.2).

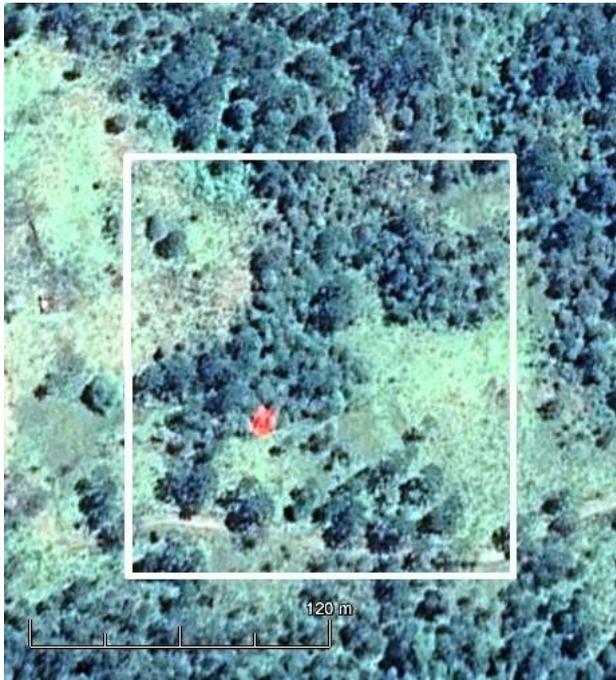


Figura 8.1 – Imagem de satélite indicando a área de estudo no Parque Nacional de São Joaquim, Urubici, Santa Catarina. Fonte: *GoogleEarth*.



Figura 8.2 – Detalhe da parcela estudada no Parque Nacional de São Joaquim, Urubici, Santa Catarina.

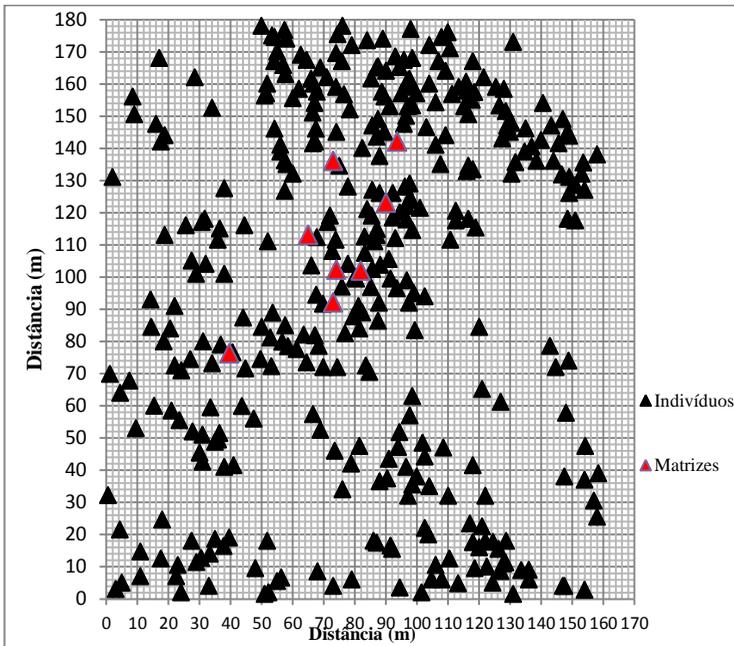


Figura 8.3 - Distribuição espacial das plantas de *A. sellowiana*, com destaque para as plantas matrizes avaliadas na parcela no PNSJ, Urubici.

Tabela 8.1 - Relação das oito matrizes com seus respectivos frutos e número de progênies analisadas.

<b>Matriz</b>	<b>Fruto</b>	<b>Progênies</b>	<b>Matriz</b>	<b>Fruto</b>	<b>Progênies</b>
01	01_01	10	05	05_01	8
01	01_02	10	05	05_02	10
01	01_03	10	05	05_03	8
01	01_04	10	05	05_04	10
01	01_05	10	05	05_05	9
02	02_01	10	06	06_01	9
02	02_02	10	06	06_02	10
02	02_03	10	06	06_03	9
02	02_04	9	06	06_04	9
02	02_05	7	06	06_05	10
03	03_01	10	07	07_01	8
03	03_02	10	07	07_02	10
03	03_03	9	07	07_03	8
03	03_04	8	07	07_04	9
03	03_05	10	07	07_05	8
04	04_01	9	08	08_01	8
04	04_02	8	08	08_02	8
04	04_03	9	08	08_03	5
<b>Total</b>		<b>8</b>	<b>36</b>	<b>325</b>	

Para análise do DNA nuclear os indivíduos foram genotipados com oito SSRs desenvolvidos para a espécie (SANTOS *et al.*, 2008; KLABUNDE *et al.*, 2014) (Tabela 7.2). Estes marcadores foram testados anteriormente (Capítulo 3) e apresentam características que permitem a sua utilização em estudos que englobem diversidade e estrutura genética espacial.

Para amplificação dos fragmentos foram utilizados 20 ng de amostra de DNA, 0,1 mM de cada dNTP (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,25 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas), 1x Taq buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,2 µM de cada primer em um volume total de 12 µL. Termociclador Veriti (Life Technologies, Carlsbad, CA) foi utilizado para amplificação dos fragmentos com ciclos de: 95 °C por 5 min, 32 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura de anelamento por 1 min, 72 °C por 30 s, e uma extensão final de 7 min a 72 °C.

A identificação dos alelos em sistema de detecção por fluorescência foi realizada em sequenciador MegaBACE 1000 DNA Analysis System

(GE Healthcare) de 96 capilares com dois lasers (um azul e um verde) lendo quatro comprimentos de onda (FAM, HEX, NED E ROX), sendo ROX (vermelho) o padrão, mediante uma eletroforese capilar com matriz de poliacrilamida linear. Os padrões de tamanho (ET-Rox 400 GE Healthcare) correm em cada uma das 96 amostras e possuem o fluoróforo ROX - vermelho. Para a eletroforese capilar foi utilizado sistema biplex, considerando o tamanho esperado do amplicon e a fluorescência do marcador (FAM ou NED), utilizando 1  $\mu$ l do produto de cada PCR diluído 8 x em água ultrapura autoclavada. Em 2  $\mu$ l de produto diluído foram adicionados 7,75  $\mu$ l de Tween 20 0,1% (*GE-Healthcare*) e 0,25  $\mu$ L de MegaBACE ET400-R Size Standard (*GE-Healthcare*). As amostras foram eletro-injetadas a 3 KV e a corrida ocorreu a 9 KV durante 80 min. Mediante a leitura de 20 fragmentos do padrão que variam de 60 pb até 400 pb foi realizada comparação pelo software Fragment Profiler (*GE Healthcare*) sendo calculado o tamanho em pares de base (pb) dos dois alelos de cada planta por um algoritmo do programa em comparação aos picos dos 20 fragmentos padrões. Em cada eletroforese foi utilizada um número de quatro a oito amostras testemunhas para evitar variação na leitura do tamanho dos fragmentos.

Para identificação de erros de genotipagem e presença de alelos nulos foi usado o programa Micro-Checker Versão 2.2.3 (Van OOSTERHOUT *et al.*, 2004). As probabilidades de significância do teste foram obtidas por permutação (1.000) e aplicando uma correção sequencial de Bonferroni para comparações múltiplas (95 % de confiança,  $\alpha = 0,05$ ).

Testou-se desequilíbrio genotípico entre pares de locos, com o intuito de verificar a existência de alguma associação entre alelos nos locos através do programa FSTAT, versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). A significância do teste foi obtida por permutação (10.000) e aplicando uma correção sequencial de Bonferroni para comparações múltiplas (95 % de confiança,  $\alpha = 0,05$ ).

A diversidade genética do censo da parcela e também das progênies foi caracterizada de acordo com número total de alelos por locos ( $k$ ), número médio de alelos ( $A$ ), riqueza alélica ( $R$ ), número de alelos privados ( $A_p$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ) (NEI, 1987), utilizando o programa FSTAT, versão 2.9.3.2. (GOUDET, 2002). Os níveis de endogamia foram quantificados pelo índice de fixação ( $F$ ) no mesmo programa. Para testar se estes valores foram significativamente diferentes de zero, foram utilizadas 1.000 permutações

de alelos entre indivíduos. Teste-t não emparelhado foi utilizado para comparar adultos e progênies ( $\alpha = 0,05$ ).

Tabela 8.2 - Sequência e temperatura de anelamento dos oito locos nSSRs para *A. sellowiana*.

Locos	Sequência 5'- 3'	Temperatura de Anelamento
Fse04	F:TTCGTTTGGCGTTTACCTTC R: CGGTGCTCGTTTGTGTATG	59 ° C
Fse11	F: AAAAGGAAAGTACGCATCCA R: CCCAGCAACAGGTGTATGA	55 ° C
Fse16	F: CCATTGTTTTGGAAGGAACA R: TTGCGATTTTGAGAGTGGAG	55 ° C
Fse17	F: CCATGAAATTGCTAAGCTGGA R: CGTGCTCGATGAAGAGGAA	55 ° C
Ase08	F-GACGAAACAGGGGAAGAAG R-CGACACGTGGCTATCATCTA	52 ° C
Ase21	F-TAGTTGAAAGTTTTAGCACCAC R-GTAAGTAGGGCAAATCAGAGTT	47 ° C
Ase31	F-TCTTCAAAACAAATCCACTCTC R-TCTTCATCAGGCGACCATA	52 ° C
Ase59	F-ACTATTGCATGCTTGTCTC R-AGGTATCTTCAGTTCTTGTG	47 ° C

Para as análises sobre o sistema reprodutivo foi considerado o modelo misto de reprodução (RITLAND & JAIN, 1981) e modelo de cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989), utilizando o programa Multilocos MLTR (RITLAND, 2004) com base nas progênies das mães conhecidas.

As análises foram estimadas em nível de população e para cada árvore matriz. Foram estimados os parâmetros de taxa populacional de cruzamento multiloco, taxa populacional de cruzamento uniloco, taxa de cruzamento entre aparentados e correlação multiloco de paternidade. Através da amostra hierárquica dentro e entre frutos, foi possível estimar a correlação de paternidade multilocos também entre e dentro de frutos. Os parâmetros acima mencionados foram utilizados para estimar o número efetivo de plantas polinizadoras ou tamanho da vizinhança reprodutiva. As estimativas do intervalo de confiança de 95% de probabilidade foram obtidas por 1000 *bootstraps*. Estes parâmetros foram utilizados para estimar outros parâmetros genéticos e demográficos, como número efetivo de doadores de pólen e o coeficiente médio de coancestria dentro de progênies (RITLAND, 1989).

A coancestria média de grupo (LINDGREN *et al.*, 1997) para as árvores adultas foi estimada como a coancestria média entre todos os pares de árvores da população ( $\Theta$ ), utilizando-se o estimador de J. Nason, descrito por Loiselle *et al.* (1995), no programa SPAGEDI versão 1.3 (HARDY & VEKEMANS, 2002),

$$\Theta = \frac{0,5n(1 + F_p) + \sum_{i=1}^n \sum_{i \neq j}^n \theta_{xy}}{N^2} \quad (\text{LINDGREN } et al., 1997),$$

onde  $N$  é o tamanho censo da população,  $F_p$  é a endogamia nas árvores adultas e  $\theta_{xy}$  é a estimativa do coeficiente de coancestria entre pares de indivíduos  $x$  e  $y$ . O coeficiente  $\theta_{xy}$  mede a extensão da similaridade entre os indivíduos  $x$  e  $y$ , relativo à similaridade genética média entre dois indivíduos aleatórios da amostra (HARDY & VEKEMANS, 2002). Para testar se os valores médios foram significativamente diferentes de zero, um intervalo de confiança de 95% de probabilidade foi calculado para cada valor em cada classe de distância usando 1.000 permutações por indivíduo entre as diferentes classes de distância. As análises foram realizadas usando o programa SPAGEDI 1.3 (HARDY & VEKEMANS, 2002).

O tamanho efetivo foi estimado pela expressão  $N_e = 0,5/\Theta$  (COCKERHAM, 1969). Estimou-se a relação entre o tamanho efetivo ( $N_e$ ) e o número censo ( $N$ ):  $N_e/N$ . Para testar se os valores médios foram significativamente diferentes de zero, um intervalo de confiança de 95% de probabilidade foi calculado para cada valor em cada classe de distância usando 1.000 permutações. Estas análises também foram conduzidas utilizando o programa SPAGEDI versão 1.3.

As estimativas de dispersão de pólen foram realizadas utilizando análise de parentesco através do programa CERVUS 3.0 (MARSHALL *et al.*, 1998; KALINOWSKI *et al.*, 2007). A análise de parentesco foi realizada com base no genótipo dos adultos e progênie utilizando um método de simples exclusão, aceitando a maternidade ou paternidade apenas em casos onde não houve nenhuma incoerência entre o trio filho-mãe-pai. Os mais prováveis parentes foram determinados utilizando-se como referência as frequências alélicas estimadas apenas na geração parental, como sugerido por Meagher & Thompson (1987). A paternidade de cada semente foi determinada com base na estatística  $\Delta$  (MARSHALL *et al.*, 1998), definida como a diferença entre o "LOD score" do primeiro

candidato mais provável pai e a "pontuação LOD" do segundo candidato mais provável. O valor de  $\Delta$  foi determinado com base em um nível de confiança de 80%, como sugerido por Marshall *et al.* (1998), usando 10.000 repetições, 0,01 como a razão de erros de genotipagem e como 70% a proporção de doadores de pólen, dentro de cada população. O número mínimo de locos necessário para determinar a paternidade de uma semente foi fixado em cinco. Se a semente não tinha doador de pólen potencial dentro da população, esta semente foi considerada como tendo recebido o pólen de fora da população (imigração de pólen). A análise também considerou a possibilidade de autopolinização.

A taxa de imigração de pólen no fragmento ( $m$ ) foi calculada como a proporção de indivíduos que não tiveram um candidato a pai ou mãe determinado dentro da população ( $n_{imigrante}$ ) em relação ao número total de indivíduos amostrados ( $n_{total}$ ):  $m = n_{imigrante} / n_{total}$  (BURCZYK *et al.*, 2004).

Como todas as árvores amostradas foram genotipadas e tiveram sua posição espacial conhecida (coordenadas  $x$  e  $y$ ), as sementes atribuídas a um doador de pólen foram utilizadas para determinar a distância mínima, máxima, média e mediana de dispersão de pólen.

Para investigar se o sucesso reprodutivo está relacionado com a distância entre árvores, comparou-se a distribuição de frequência de dispersão de pólen com a distribuição de distância entre todas as árvores, usando o teste de Kolmogorov-Smirnov (SOKAL & ROHLF, 1995). A área de vizinhança efetiva de polinização ( $A_{ep}$ ) foi calculada de acordo com Levin (1998), onde o parâmetro  $A_{ep}$  corresponde à área circular, em que 63% dos doadores de pólen de determinada matriz devem estar localizados. O raio efetivo de polinização foi estimado como descrito por Austerlitz & Smouse (2001), onde  $\hat{r}_{ep} = \sqrt{\hat{A}_{ep} / 3,1415}$ .

### 8.3 Resultados e Discussão

Não foi indicada a presença de erros de genotipagem ( $p > 0,05$ ) de acordo com as análises realizadas no programa Micro-Checker Versão 2.2.3 (Van OOSTERHOUT *et al.*, 2004). Foram observadas frequências significativas de alelos nulos para os locos Ase 21, Fse 11 e Fse 17. A presença significativa de alelos nulos pode ser justificada pelo excesso de homocigotos que também foram observados nesses mesmos locos. A presença de alelos nulos pode causar uma detecção errônea da quantidade

de genótipos homozigotos em uma população avaliada por locos microssatélites (WHITE *et al.*, 1999). Alelos nulos podem ser encontrados em mais de 25% dos locos de microssatélites, chegando a atingir frequências superiores a 15% em alguns casos (JARNE & LAGODA, 1996).

O desequilíbrio de ligação foi testado entre todos os locos na geração parental, totalizando 28 combinações. Nenhuma das combinações apresentou desequilíbrio de ligação ( $p = 0,000179$ , correção de Bonferroni). Isso, juntamente com resultados apresentados anteriormente neste trabalho, demonstra que os locos utilizados neste estudo encontram-se em equilíbrio genético e segregam independentemente, sendo assim eficientes para as análises aqui realizadas.

A população de *A. sellowiana* apresentou alto nível de diversidade genética para os oito locos SSR, tanto nos adultos quanto nas progênies. A alta diversidade genética parece ser comum para a espécie, sendo observada em outros trabalhos (SANTOS, 2009; SANTOS *et al.*, 2011; DONAZZOLO, 2012). Esta alta diversidade deve estar associada ao sistema de reprodução com predominância de cruzamentos.

O número total de alelos observados foi de 151, onde os adultos apresentaram 145 alelos, sendo 31 privados. As progênies apresentaram 120 alelos e apenas seis privados (Tabela 8.3). O número de alelos privados diferiu significativamente entre adultos e progênies ( $p < 0,05$ ), sugerindo baixas taxas de imigração de alelos por fluxo de pólen, assim como o fato dos adultos apresentarem número total de alelos superior ao das progênies. Estas características tem como causa mais provável a deriva genética.

A heterozigosidade observada foi menor que a esperada em adultos ( $H_o = 0,789$ ;  $H_e = 0,871$ ) e nas progênies ( $H_o = 0,751$ ;  $H_e = 0,824$ ) indicando excesso de homozigotos, o que foi confirmado pelos índices de fixação positivos e significativos de 0,094 para os adultos e 0,089 para as progênies (Tabela 8.3), indicando endogamia. Esses parâmetros não diferiram significativamente entre adultos e progênies.

A divergência genética entre as gerações foi analisada pela estatística  $G_{ST}$  de Hedrick e variou de 0,082 a 0,259 entre os locos. A divergência genética entre os adultos e as progênies foi de 0,109, considerada alta, denotando forte estruturação decorrente de deriva genética. Essa estimativa leva em consideração não apenas a frequência dos alelos, como também o tipo de alelo presente nas populações na estimação da medida de diferenciação genética entre populações (HEDRICK, 2005).

A taxa de cruzamento multilocos ( $t_m$ ) foi alta (0,895), mas significativamente diferente de 1,0, indicando que ocorre alguma autopolinização. A taxa de cruzamento unilocos ( $t_s$ ) de 0,824 foi significativa, com valor próximo e não significativamente diferente da taxa de cruzamento multilocos, resultando numa diferença pequena (0,071), porém significativa, na taxa de cruzamento entre parentes ( $t_m - t_s$ ), utilizada para quantificar a ocorrência de cruzamentos endogâmicos (Tabela 8.4). Cruzamentos correlacionados podem ocorrer quando o número de pais em potencial é baixo ou quando o acasalamento ocorre entre os vizinhos mais próximos (SURLES *et al.*, 1990).

A correlação de autofecundação ( $r_s$ ) foi significativamente diferente de zero (0,041), demonstrando alguma variação individual na taxa de cruzamento (Tabela 8.4). Isso demonstra que algumas plantas maternas deixam mais descendentes por autofecundação ou cruzamentos do que outras, o que já era esperado uma vez que algumas plantas podem apresentar autoincompatibilidade tardia (FINATTO *et al.*, 2011).

As correlações de paternidade multilocos dentro e entre frutos ( $r_{p(m)}$  = 0,067), dentro de fruto ( $r_{p(m)w}$  = 0,196), e entre os frutos ( $r_{p(m)a}$  = 0,034) foram significativamente maiores que zero, indicando cruzamentos correlacionados. Consequentemente, o número efetivo de doadores de pólen foi significativamente menor dentro de fruto ( $N_{ep(w)}$  = 5,1) do que entre os frutos ( $N_{ep(a)}$  = 29,4), sendo que cada fruto pode ter entre três e sete árvores polinizadoras, resultando numa correlação de paternidade multilocos dentro de fruto de (0,196) (Tabela 8.4).

O índice de fixação entre as plantas matrizes ( $F_m$ ) variou de -0,15 a 0,18 e dentro das progênies ( $F_o$ ) de -0,14 a -0,02. O número total de alelos ( $k$ ) entre as progênies variou de 44 a 78 e a riqueza alélica de 5,4 a 7. A heterozigiosidade observada variou de 0,650 a 0,820 (Tabela 8.5).

A taxa de cruzamento multilocos variou de 0,810 a 1,00 entre as progênies, não sendo significativa para duas delas. A taxa de cruzamento entre parentes não foi significativamente diferente de zero em quatro progênies, variando de -0,02 a 0,09, onde, em alguns casos, a taxa de cruzamento unilocos foi maior que a taxa de cruzamento multilocos, resultando em taxa de cruzamento entre parentes negativa. A correlação de

paternidade multilocos entre e dentro de frutos variou de 0,02 a 0,16 e foi significativa para todas as progênies, assim como a correlação de paternidade dentro de fruto que variou de 0,09 a 0,18. A correlação de paternidade multilocos entre frutos variou de 0,01 a 0,11, sendo significativamente diferente de zero em cinco progênies (Tabela 8.5).

O coeficiente de coancestria médio entre as progênies variou de 0,128 a 0,209, enquanto o tamanho efetivo da variância foi de 2,32 a 3,68 (Tabela 8.5). O coeficiente médio e coancestria dentro de progênies ( $\Theta = 0,160$ ) foi maior que aquele esperado em casos de sementes de polinização aberta colhidas de uma população panmítica (0,125), enquanto o tamanho efetivo ( $N_e = 4$ ) foi menor ( $N_e = 2,9$ ) (Tabela 8.4). Isso significa que coletas de semente para fins de conservação devem ser oriundas de um número grande de plantas matrizes. O número de árvores matrizes necessárias para coleta de sementes com objetivo de reter um tamanho efetivo de 150 foi estimado em no mínimo 52 árvores (Tabela 8.4).

A estrutura genética espacial é formada principalmente pela dispersão de sementes próximas à planta mãe. A figura 6.4 é o demonstrativo dos coeficientes de coancestria por classes de distância para indivíduos adultos de *A. sellowiana*. Observa-se que o coeficiente de coancestria diminuiu com o aumento da distância entre as árvores. A estrutura genética espacial foi significativa até uma distância de 54 m, ou seja, a dispersão de sementes ocorre a curtas distâncias.

Tabela 8.3 – Índices de diversidade genética e de fixação ( $F$ ) em oito locos microssatélites de adultos e progênies de uma população de *A. sellowiana*.

Loco	Adultos (N= 355)						Progênies (n=325)					
	$k$	$R$	$A_p$	$H_o$	$H_e$	$F$	$k$	$R$	$A_p$	$H_o$	$H_e$	$F$
<i>Ase08</i>	23	22,98	7	0,881	0,917	0,040	17	16,97	1	0,808	0,897	0,099*
<i>Ase21</i>	22	21,98	2	0,710	0,911	0,221*	21	21	1	0,787	0,868	0,093*
<i>Ase59</i>	9	8,99	1	0,774	0,794	0,025	8	7,97	0	0,657	0,721	0,088
<i>Ase31</i>	17	17	2	0,893	0,892	-0,001	15	14,93	0	0,732	0,852	0,141*
<i>Fse04</i>	18	17,98	6	0,799	0,839	0,047	14	13,97	2	0,708	0,829	0,146*
<i>Fse17</i>	15	15	4	0,726	0,801	0,094*	13	12,86	2	0,759	0,720	-0,054
<i>Fse11</i>	20	19,94	5	0,708	0,905	0,218*	15	14,93	0	0,757	0,869	0,130*
<i>Fse16</i>	21	20,94	4	0,828	0,915	0,096*	17	16,99	0	0,801	0,839	0,045
Total	145	-	31	-	-	-	120	-	6	-	-	-
Média	18,13	18,10	3,87	0,789	0,871	0,094*	15,13	14,95	0,75	0,751	0,824	0,089*
SD	4,5	4,5	2,10	0,073	0,068	0,085	3,7	3,7	0,88	0,051	0,068	0,066

N = número de indivíduos (censo); n = tamanho amostral;  $k$  = número de alelos;  $R$  = riqueza alélica;  $A_p$  = alelos privados;  $H_o$  = heterozigiosidade observada; e  $H_e$  = heterozigiosidade esperada. \* $p < 0,00313$ , após correção de Bonferroni.

Tabela 8.4 – Parâmetros do sistema reprodutivo de *A. sellowiana*. Valores entre parênteses indicam desvio padrão após 1.000 reamostragem *bootstrap*.

Parâmetros	Média (95% CI)
Taxa de cruzamento multiloco: $t_m$	0,895 (0,859 a 0,923)
Taxa de cruzamento uniloco: $t_s$	0,824 (0,785 a 0,860)
Acasalamento entre parentes: $t_m - t_s$	0,071 (0,063 a 0,074)
Correlação de autofecundação: $r_s$	0,041 (0,009 a 0,208)
Correlação de paternidade multiloco (entre e dentro de frutos): $r_{p(m)}$	0,067 (0,045 a 0,085)
Correlação de paternidade multiloco (dentro de fruto): $r_{p(m)w}$	0,196 (0,140 a 0,262)
Correlação de paternidade multiloco (entre frutos): $r_{p(m)a}$	0,034 (0,016 a 0,050)
Diferença multiloco entre $r_{p(m)w} - r_{p(m)a}$	0,162 (0,124 a 0,212)
Número efetivo de doadores de pólen (entre e dentro de frutos): $N_{ep}$	14,9 (11,8 a 22,2)
Número efetivo de doadores de pólen (dentro de frutos): $N_{ep(w)}$	5,1 (3,8 a 7,1)
Número efetivo de doadores de pólen (entre frutos): $N_{ep(a)}$	29,4 (20 a 62,5)
Coancestria (entre e dentro de frutos): $\Theta$	0,160 (0,150 a 0,174)
Tamanho efetivo de variância (entre e dentro de frutos): $N_e$	2,90 (2,67 a 3,09)

Tabela 8.4 – Continuação. Parâmetros do sistema reprodutivo de *A. sellowiana*. Valores entre parênteses indicam desvio padrão após 1000 reamostragem *bootstraps*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média (95% CI)</b>
Número de árvores matrizes (entre e dentro de frutos): $m$	52 (49 a 56)
Número médio de árvores polinizadoras: $1/r_{p(m)}$	14,92

Tabela 8.5 - Diversidade genética e endogamia de oito matrizes de polinização aberta de *A. sellowiana*.

<b>N</b>	<i>n</i>	$F_m$	<i>k</i>	<i>R</i>	$H_o$	$F_o$
1	50	0,12	71	6,6	0,74	-0,12
2	46	-0,04	69	6,8	0,82	-0,14
3	47	-0,20	67	6,5	0,74	-0,06
4	26	0,18	62	6,9	0,78	-0,14
5	45	-0,04	70	6,3	0,73	-0,10
6	47	-0,09	67	6,8	0,77	-0,09
7	43	0,16	78	7,0	0,65	-0,02
8	21	-0,15	44	5,4	0,80	-0,11

N = matriz; *n* = número de progênies;  $F_m$  e  $F_o$  são os índices de fixação das matrizes e das progênies, respectivamente;  $k$  = número total de alelos; *R* = riqueza alélica;  $H_o$  = heterozigosidade observada.

Tabela 8.6 - Parâmetros do sistema reprodutivo de oito matrizes de polinização aberta de *A. sellowiana*.

<b>N</b>	<b>n</b>	<b><math>t_m \pm \text{SD}</math></b>	<b><math>t_m - t_s</math> <math>\pm \text{SD}</math></b>	<b><math>r_{p(m)}</math> <math>\pm \text{SD}</math></b>	<b><math>r_{p(m)w}</math> <math>\pm \text{SD}</math></b>	<b><math>r_{p(m)a}</math> <math>\pm \text{SD}</math></b>	<b><math>N_{ep}</math></b>	<b><math>N_{ep(w)}</math></b>	<b><math>N_{ep(a)}</math></b>	<b><math>\Theta</math></b>	<b><math>N_e</math></b>
1	50	0,90±0,04	0,08±0,02	0,02±0,01	0,09±0,03	0,01±0,00	40	11	71	0,171	2,82
2	46	1,00±0,00	0,09±0,02	0,03±0,01	0,15±0,04	0,01±0,00	32	7	200	0,128	3,68
3	47	0,91±0,04	0,00±0,02	0,04±0,01	0,15±0,05	0,01±0,01	26	7	77	0,150	3,18
4	26	0,92±0,05	-0,04±0,00	0,06±0,02	0,13±0,03	0,04±0,01	16	8	27	0,178	2,62
5	45	0,87±0,05	0,07±0,03	0,09±0,03	0,13±0,04	0,07±0,03	11	8	14	0,167	2,86
6	47	0,83±0,05	-0,02±0,00	0,10±0,03	0,18±0,04	0,07±0,03	10	6	15	0,178	2,70
7	43	0,81±0,08	0,16±0,06	0,06±0,02	0,10±0,02	0,05±0,02	17	10	19	0,209	2,32
8	21	0,95±0,05	0,07±0,04	0,16±0,04	0,17±0,03	0,11±0,04	6	6	9	0,155	2,92

N = matriz; n = número de progênies;  $t_m$  = taxa de cruzamento multilocos;  $t_m - t_s$  = taxa de cruzamento entre parentes;  $r_{p(m)}$ ,  $r_{p(m)w}$  e  $r_{p(m)a}$  são as correlações de paternidade multilocos entre e dentro de frutos, dentro de frutos, e entre frutos, respectivamente;  $N_{ep}$ ,  $N_{ep(w)}$  e  $N_{ep(a)}$  são o número efetivo de doadores de pólen entre e dentro de frutos, dentro de frutos e entre frutos, respectivamente;  $\Theta$  = coeficientes de coancestria dentro de progênies;  $N_e$  = tamanho efetivo de variância dentro de progênie. ( $\pm$  SD = desvio padrão).

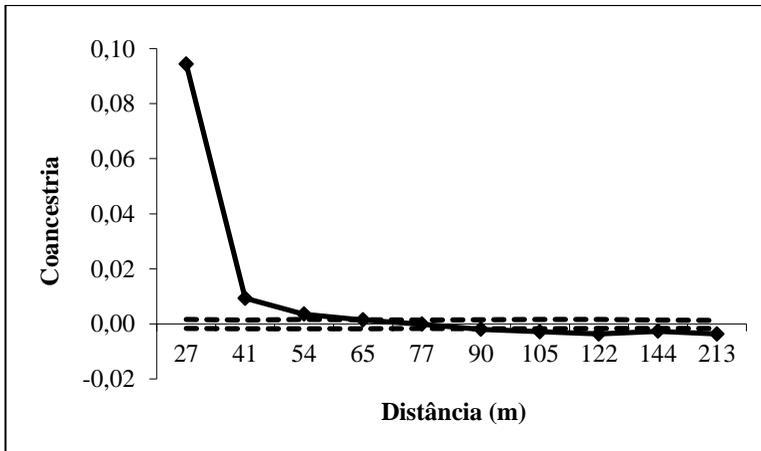


Figura 8.4 – Estrutura genética espacial nos adultos de *A. sellowiana* na área amostrada no PNSJ, Urubici. A linha contínua refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se ao intervalo de confiança a 95% do erro padrão da média das estimativas para hipótese de ausência de estrutura genética espacial ( $H_0: \theta_{xy} = 0$ ).

A estrutura genética espacial em populações naturais de plantas é definida como a distribuição não aleatória da variação genética entre os indivíduos e pode acarretar efeitos drásticos, já que agrupamentos familiares intrapopulacionais favorecem acasalamentos entre parentes, gerando endogamia (SATO *et al.*, 2006). A presença de estrutura genética demonstra que existem indivíduos aparentados na população e eles se encontram agrupados. Segundo Vekemans & Hardy (2004), em uma escala local, a causa mais prevalente para o arranjo espacial dos genótipos em estruturação de famílias seria a dispersão limitada de genes.

Anteriormente, Zucchi *et al.*, (2003) também verificaram comportamento similar na Myrtaceae *Eugenia dysenterica*, uma forte estruturação a partir de processos de diferenciação estocástica, que inclui fluxo de genes a pequenas distâncias, associado a deriva.

A endogamia observada nos índices de fixação reflete um excesso de homozigotos causado pela subdivisão populacional resultante da estrutura genética espacial (BITTENCOURT & SEBBENN, 2007). Isso fica evidenciado na divergência genética entre as gerações que foi observada pela estatística  $G_{ST}$  de Hedrick.

O coeficiente de coancestria tem papel central em programas de melhoramento e conservação genética, bem como a estimativa do

coeficiente de correlação de parentesco entre plantas dentro de progênies. Também influencia o tamanho efetivo de variância, que mede a representatividade genética de uma população em função de alterações nas frequências alélicas entre gerações, em razão de efeitos da deriva genética (CABALLERO, 1994).

O parentesco entre adultos foi inferido pela estimativa do coeficiente de coancestria de grupo ( $\Theta$ ), o qual foi utilizado para o cálculo do tamanho efetivo de variância ( $N_e$ ), estimado pela metodologia proposta por Cockerham (1969). O coeficiente de coancestria de grupo foi de 0,0056 ( $\Theta$ ) (Tabela 8.7), valores próximos daqueles esperados entre indivíduos primos de segundo grau. O tamanho efetivo da população é um parâmetro crítico em genética de populações, pois mede a taxa de deriva genética e endogamia (VENCOVSKY & CROSSA, 2003). As 355 árvores da parcela correspondem ao tamanho efetivo de apenas 90 indivíduos não parentes e não endogâmicos ( $N_e/N = 0,25$ ). O tamanho efetivo de variância permite a estimativa do número de árvores-matriz necessárias para a coleta de sementes para os mais diversos fins, como tamanhos amostrais para conservação *ex situ*, melhoramento genético e recuperação de áreas degradadas (GUSSON *et al.*, 2006). Frankel & Soule (1981) sugerem um tamanho efetivo de 50 para conservação genética no curto prazo. Logo, a interligação genética por fluxo gênico é importante para aumentar o tamanho efetivo das gerações descendentes. A estimativa do coeficiente de coancestria entre árvores adultas indica que, se os cruzamentos fossem aleatórios entre os indivíduos adultos da população, baixa endogamia seria esperada pelo cruzamento entre parentes. Devido a endogamia nos adultos ( $F = 0,094$ ) e parentesco entre parte dos indivíduos adultos, o tamanho efetivo da população adulta foi menor que o número censo ( $N_e/N = 0,25$ ) (Tabela 8.7).

A coancestria observada foi menor do que valores relatados em outros trabalhos para espécies com dispersão de sementes limitada por animais (0,0088) (VEKEMANS & HARDY, 2004). Entretanto, este valor foi próximo ao encontrado para a espécie *Sextonia rubra* (Lauraceae) (0,006), que é uma espécie hermafrodita, com polinização por insetos e dispersão de sementes por pássaros (HARDY *et al.*, 2006). Stewart (1987) descreve os pássaros como principais polinizadores da feijoa, que utilizam as pétalas para alimentação (SAZIMA & SAZIMA, 2007).

Baseando-se na análise de paternidade, foi possível identificar dentro da área amostrada o putativo doador de pólen de 230 (71%) das 325

progênes analisadas, sendo que 64 das progênes foram excluídas por apresentarem mais de um possível pai. Trinta e uma progênes não tiveram o putativo doador de pólen encontrado na área amostrada, indicando uma taxa de imigração de pólen de 10%. A área estudada não se encontra isolada, sendo comum a presença de outros indivíduos da espécie próximos a ela; dessa forma a taxa de imigração de pólen é considerada baixa.

Tabela 8.7 - Tamanho total da amostra de adultos, estimativa de coancestria de grupo ( $\Theta$ ), tamanho efetivo da população ( $N_e$ ) e da relação entre o tamanho efetivo e o número censo ( $N_e/N$ ).

Parâmetros	Estimativas
Número censo: $N$	355
Coancestria de grupo: $\Theta$	0,0056
Tamanho efetivo: $N_e$	90
$N_e/N$	0,25

Dentro da área estudada a distância média da dispersão do pólen foi de 54 m ( $\pm 30$ ) e a mediana de 57 m, sendo que as distâncias variaram de 4 a 152 m (Figura 8.5). Cerca de 60% dos cruzamentos ocorreram até uma distância de 60 m, e 90% deles até a distância de 100 m. Trata-se de um padrão típico de isolamento por distância e que tem sido evidenciado em outros estudos (ROBLEDO-ARNUNCIO & AUSTERLITZ, 2006; BITTENCOURT & SEBBENN, 2007).

Para investigar se o sucesso reprodutivo está relacionado com a distância entre árvores foi realizada comparação da curva de frequência efetiva de dispersão de pólen e a curva de frequência de distância entre todas as plantas da área estudada, e elas foram significativamente diferentes (Kolmogorov-Smirnov,  $D = 0,282$ ,  $p < 0,01$ ) (Figura 8.5), o que indica que a distância entre as árvores não explica o padrão de dispersão de pólen apresentado. Desta forma, o padrão de reprodução desta população não é aleatório.

A área de vizinhança efetiva de polinização ( $\hat{A}_{ep}$ ), ou seja, a área de atuação dos polinizadores foi de 0,6 hectares, isso produziu um raio efetivo de polinização ( $\hat{r}_{ep}$ ) de 109,24 m. A taxa de imigração de pólen (10%), que pode ser considerada baixa, e essa pequena distância na dispersão dos mesmos são fatores que influenciaram na estrutura genética espacial que foi observada.

Moraes & Sebbenn (2008) afirmaram que a densidade populacional afeta a distância de dispersão de pólen. Uma população com baixa densidade populacional de plantas reprodutivas deverá ter maior distância na dispersão do pólen do que populações com alta densidade. Assim, a alta densidade de plantas na área aqui amostrada podem ser a causa da baixa distância no fluxo de pólen.

As classes de distâncias representadas na Figura 8.4, além constituírem informação importante para o manejo, são uma indicação da distância mínima entre indivíduos amostrados para programas de melhoramento genético e para a coleta de sementes para programas de recuperação de áreas degradadas, de forma a obter maior variabilidade genética (KELLY *et al.*, 2004; CLOUTIER *et al.*, 2007). Juntamente com os resultados sobre dispersão do pólen e observando que 90% dos cruzamentos ocorrem até uma distância de 100 m, a melhor distância para capturar maior variabilidade genética e evitar a coleta de sementes que possuam estrutura de famílias, é superior a 100 m, não podendo ser inferior a 54 m.

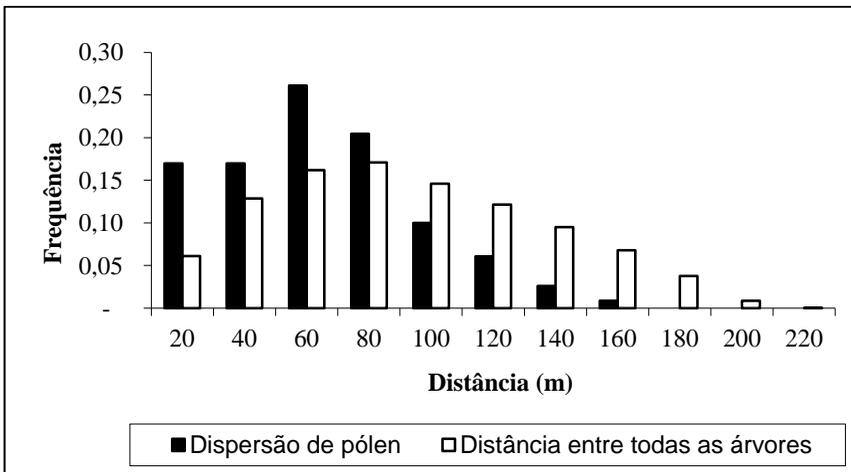


Figura 8.5 – Frequências de distâncias de dispersão efetiva de pólen (barras escuras) e frequências de distâncias entre as plantas de *A. sellowiana* (barras claras) amostradas na área estudada no PNSJ.

Através da análise de paternidade foi possível observar que nenhuma progênie teve a árvore materna determinada como parental paterno. Isto era esperado já que a autoincompatibilidade tardia é descrita para a espécie,

embora nem todas as plantas apresentem esta característica (FINATTO *et al.*, 2011). Isso se reflete também na análise do sistema de cruzamento, onde a taxa de cruzamento foi alta, porém significativa, demonstrando que a espécie é predominantemente alógama.

Muitos dos resultados aqui obtidos demonstram a ocorrência de deriva genética na população, porém esta pode ter sido evidenciada pelo método de amostragem realizado. Há que ser considerado que todos os indivíduos amostrados foram considerados adultos (potenciais doadores de pólen) devido a dificuldade de diferenciar jovens e adultos através de características fenotípicas e, portanto, muitos desses ditos adultos possivelmente são plantas que ainda não estão em estágio reprodutivo.

#### 8.4 Conclusões

A diversidade genética na população estudada foi alta, porém foi constada a presença de endogamia nos adultos e progênies, provavelmente causada pela ocorrência de cruzamento entre parentes, já que a espécie se apresentou preferencialmente alógama. Além disso, nenhuma das progênies analisadas apresentou plantas oriundas de autofecundação.

O fluxo de pólen foi restrito a curtas distâncias (4 a 152 m), com taxa de imigração de pólen de 10%, considerada baixa, já que a área estudada não se encontra isolada.

A presença de cruzamentos entre parentes e ocorrência de distribuição não aleatória dos genótipos, devido ao ilimitado fluxo alélico, resultaram no agrupamento de indivíduos aparentados. E, conseqüentemente, em uma estrutura genética espacial significativa. Os níveis atuais de fluxo gênico não são suficientes para evitar efeitos de deriva genética na população.

A deriva genética observada na população está também relacionada a amostragem. Para resolver o impasse dos indivíduos da população não terem sido diferenciados em coortes é necessário fazer uma correlação entre os doadores de pólen detectados e suas características fenotípicas (altura, diâmetro na altura do solo e ou diâmetro na altura do colo), para então diferenciá-los daqueles que ainda não entraram em estágio reprodutivo. Dessa forma, seria possível considerar apenas os adultos como potenciais doadores de pólen.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUSTERLITZ, F.; SMOUSE, P.E. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between  $\Phi_{FT}$ , pollen dispersal and interfemale distance. **Genetics**, v. 157, p. 851-857, 2001.

BASILE, A.; VUOTTO, M. L.; VIOLANTE, U.; SORBO, S.; MARTONE, G.; CASTALDO-COBIANCHI, R. Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 8, n.3, p. 199–203, 1997.

BITTENCOURT, J.M.V.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v.99, p.580-591, 2007.

BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A.; NEBBIOSO, A.; DE BELLIS, F.; CONTE, M.; MINICHELLO, A.; MANZO, F.; CARAF, V.; BASILE, A.; RIGANO, D.; SORBO, S. COBIANCHI, R.C.; SCHIAVONE, E.M.; FERRARA, F.; DE SIMONE, M.; VIETRI, M.T.; CIOFFI, M.; SICA, V.; BRESCIANI, F.; LERA, A.R.; ALTUCCI, L.; MOLINARI, A.M. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.1902–1914, 2007.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S.P.; ADAMS, W.T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel. **Forest Genetic**, v.11, p.1-14, 2004.

DONAZZOLO, J. **Conservação e domesticação da feijoa na Serra Gaúcha - RS**. 2012. 312p. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2012.

DUCROQUET, J.P.H.J.; RIBEIRO, P. Goiabeira-serrana: velha conhecida, nova alternativa. **Agropecuária Catarinense**, v.4, n.3, p 27-29, 1991.

CABALLERO, A. Developments in the prediction of the effective population size. **Heredity**, v.73, p.657-679, 1994.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v. 23, p. 72-84, 1969.

CLOUTIER, D.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapaguianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, v.16, p.797-809, 2007.

ELLSTRAND, N.C. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? **American Journal of Botany**, v.101, n.5, p.737-753, 2014.

FINATTO, T.; DOS SANTOS, K.L.; STEINER, N.; BIZZOCCHI, L.; HOLDERBAUM, D. F.; DUCROQUET, J.P.H.J.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Late-acting self-incompatibility in (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany** (Print), v. 59, p. 53-60, 2011.

FRANKEL, O. H. & SOULÉ, M. E. **Conservation and evolution**. Cambridge, University Press, 1981. 327p.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C.G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations and empirical evidence. **Annual Review in Ecology, Evolution and Systematics**, v.36, p.47-79, 2005.

GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate F-statistics. **Heredity**, v.86, p.485-486, 2002.

GUSSON, E.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema de reprodução em populações de *Eschweileraovate*(Cambess.) Miers. **Revista Árvores**, v.30, n.4, p.491-502, 2006.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Mol. Ecol. Notes**, v.2, p.618-620, 2002.

HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDO, E.; BREYNE, P.; CARON, J.; CHEVALLIER, M.H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C.; TROISPOUX V.; VERON, V.; DEGEN, B.

Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. **Molecular Ecology**, v.15, p.559-571, 2006.

HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, v.59, n.8, p. 1633-1638, 2005.

IELPO, M.T.L.; BASILE, A.; MIRANDA, R.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; SORBO, S.; LAGHI, E.; RICCIARDI, M.M.; RICCIARDI, L.; VUOTTO, M.L. Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v.71, p.101-109. 2000.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to population and back. **Trends in Ecology & Evolution**, v.11, n.10, p.424-429, 1996.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1106, 2007.

KELES, H.; INCE, S.; KÜÇÜKKURT, I.; TATLI, I.I.; AKKOL, E.K.; KAHRAMAN, C.; DEMIREL, H.H. The effects of *Feijoa sellowiana* fruits on the antioxidant defense system, lipid peroxidation, and tissue morphology in rats. **Pharmaceutical Biology**, p.1-8, 2011.

KLABUNDE, G.H.F; OLKOSKI, D.; VILPERTE, V.; ZUCCHI, M.I.; NODARI, R.O. Characterization of 10 new nuclear microsatellite markers in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Applications in Plant Science**, v.2, n. 6, 2014.

KLEIN, R.M. Aspectos dinâmicos do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, v.12, p.17-44, 1960.

LEVIN, D.A. The paternity pool plants. **American Naturalist**, v. 132, p. 309-317, 1988.

LINDGREN, D.; LUIGI, D.G.; JEFFERSON, P.A. Status number for measuring genetic diversity. **Forest Genetics**, v. 4, p. 69-76, 1997.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.D.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v.11, p.1420-1425, 1995.

MARCHIORI, J.N.C. **Fitogeografia do Rio Grande do Sul: enfoque histórico e sistemas de classificação**. Porto Alegre, RS: Est, 2002. 119p.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUEK, L.; PEMBERTON, J.M.. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7, p.639-655, 1998.

MEAGHER, T.R.; THOMPSON, E. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). **Ecology**, v. 68, p.803-812, 1987.

MATTOS, J.R. **A goiabeira-serrana**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis (publicação IPRNR, 19), 1986. 84p.

MONFORTE, M.T.; FIMIANI, V.; LANUZZA, F.; NACCARI, C.; RESTUCCIA, S.; GALATI, E.M. *Feijoa sellowiana* Berg Fruit Juice: Anti-Inflammatory Effect and Activity on Superoxide Anion Generation. **Journal of Medicine Food**, v.0, p. 1-7, 2013.

MORAES, M.L.T.; SEBBENN, A.M. Pollen dispersal between isolated trees in the Brazilian Savannah: a case study of the Neotropical tree *Hymenaeastigonocarpa*. **Biotropica**, Washington, v. 43, p. 192-199, 2011.

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

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**, ed. Columbia University, 1987.

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

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent locos. **Heredity**, v.47, p.35-52, 1981.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lancaster, v.43, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K. **Multiloco mating system program MLTR Version 3.1**. Vancouver: University of British Columbia, 2004. Disponível em: <kritland@interchange.ubc.ca>.

ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal in spatially aggregated populations. **The American Naturalist**, v.168, n.4, p.500-511, 2006.

SANTOS, K.L.; SANTOS, M.O.; LABORDA, P.R.; SOUZA, A. P.; PERONI, N.; NODARI, R. O. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers in *Acca sellowiana* (Berg) Burret. **Molecular Ecology Notes**, v. 8, p. 998-1000, 2008.

SANTOS, K.L.; GURIES, R.P.; NODARI, R.O.; PERONI, N. Traditional knowledge and management of feijoa (*Acca sellowiana*) in southern Brazil. **Economic Botany**, v.63, p.204-214, 2009.

SANTOS, K.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; Caracterização genética de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) com marcadores microssatélites heterólogos. **Biotemas**, v. 24, n.4, p.75-83, 2011.

SAZIMA, I.; SAZIMA M. Petiscos florais: pétalas de *Acca sellowiana* como fonte alimentar para aves em área urbana no Sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v.7, n.2, p.307-312, 2007.

SHARPE, R.H.; SHERMAN, W.B.; MILLER, E.P. *Feijoa* history and improvement. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v.106, p.134-139. 1993.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. 2<sup>nd</sup> ed. New York: W.H. Freeman, 1981. 859 p.

STEWART, A.M.; CRAIG, J.L. Factors affecting pollinator effectiveness in *Feijoa sellowiana*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.17, p.145–154, 1987.

SURLES, S.E.; ARNOLD, J.; SCHNABEL, A.; HAMRICK, J.L.; BONGARTEN, B.C. Genetic relatedness in open pollinated families of two leguminous tree species, *Robinia pseudoacacia* L. and *Gleditsia triacanthos* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, p. 49-56, 1990.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535-553, 2004.

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop Science**, v. 43, p. 1912–1921, 2003.

VEKEMANS, X.; HARDY, O.J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analysis in plant populations. **Molecular Ecology**, v.13, p.921–935, 2004.

VUOTTO, M. L.; BASILE A.; MOSCATIELLO, V.; DE SOLE, P.; CASTALDO-COBIANCHI, R.; LAGHI, E.; IELPO, M. T. L. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.13, p.197-201, 2000.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v.121, p. 923-926, 2010.

WHITE, G.M.; BOSHER, D.H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 4, p. 2038–2042, 2002.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.V.; PINHEIRO, J.B.; COELHO, A.S.G.; CHAVES, L.J.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow

in *Eugenia dysenterica* DC. in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.449-458, 2003.



## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização desta tese de doutorado possibilitou caracterizar a diversidade genética de *Acca sellowiana* no seu centro de origem, em nível intra e interpopulacional, além de materiais cultivados fora deste centro.

Espaçadores intergênicos plastidiais foram utilizados pela primeira vez para esta espécie e apresentaram potencial para estudos filogeográficos em *A. sellowiana*. Foi possível identificar dois padrões de distribuição da diversidade genética, um para região de maior altitude na Floresta Ombrófila Mista onde os fatores climáticos dos períodos glaciais e interglaciais tiveram maior influência. O outro padrão ocorre na região de menor altitude, no Pampa, onde se hipotese é de que fatores mais recentes tenham influenciado mais fortemente na dinâmica populacional da espécie.

É importante ressaltar que, baseada em dados moleculares e geográficos, a identificação de dois "Super Grupos" filogeográficos de *A. sellowiana*, parece corroborar com a distinção da espécie, feita com base em características fenotípicas e geográficas, em dois "Tipos", o "Tipo Brasil" e o "Tipo Uruguaí". Neste sentido, recomenda-se que novos estudos se utilizem de dados moleculares, geográficos e fenotípicos para melhor caracterizar uma possível associação entre os dois padrões filogeográficos aqui identificados e os dois "Tipos" de *A. sellowiana*.

A utilização de marcadores SSRs nucleares em estudos filogeográficos demanda um número mínimo de 10 locos. Deste modo, visando contribuir para esse e outros estudos, foram desenvolvidos dez novos marcadores SSRs. Os novos marcadores apresentaram elevado polimorfismo, além de terem sido transferidos para outras Myrtaceae com sucesso. Futuramente, esses marcadores nucleares, juntamente com marcadores previamente desenvolvidos por outros autores, poderão ser utilizados para testar a hipótese de expansão recente da espécie na região do bioma Pampa, hipótese essa que foi levantada, mas não pôde ser comprovada com marcadores de cpDNA utilizados neste trabalho.

Embora estudos de genética de populações exijam a utilização de marcadores moleculares com herança mendeliana, que não estejam ligados e que apresentem equilíbrio genotípico, este foi o primeiro estudo onde foram testadas estas características em SSRs desenvolvidos para *A. sellowiana*. Os oito locos microssatélites testados segregam de acordo com as leis mendelianas 1:1, não estão ligados e apresentam equilíbrio genotípico. Portanto, este conjunto de locos pode ser utilizado em estudos

sobre a diversidade e estrutura genética, sistema de cruzamento e análise de parentesco dessa espécie.

Pela primeira vez, marcadores SSRs foram utilizados para caracterizar amostras de *A. sellowiana* cultivadas fora da área de ocorrência da espécie, e foi possível confirmar uma reduzida base genética das amostras. Esses acessos são a base para grande parte dos programas de melhoramento desenvolvidos nos países onde são cultivados. Isso demonstra a importância da diversidade genética disponível no centro de origem, tanto para conservação, quanto para servir como fonte de germoplasma para o desenvolvimento de novas cultivares.

Em razão da grande diversidade genética ainda existente no centro de origem, cabe ressaltar a importância da adoção de esforços adicionais na conservação *in situ* e *on farm* da espécie no Brasil.

No nível intrapopulacional, foi confirmada a predominância de sistema de reprodução por cruzamento para a população analisada. Porém, foi observada endogamia, aparentemente causada por cruzamento entre parentes. A estrutura genética espacial foi significativa, causada pelo baixo fluxo de pólen e pela ocorrência de cruzamento entre parentes. O baixo fluxo gênico atual está causando efeitos de deriva genética na população estudada. Tanto os resultados intrapopulacionais obtidos através de SSRs nucleares, quanto aqueles oriundos das análises das sequências de cpDNA entre diferentes populações, demonstraram fluxo gênico restrito para a espécie.

Estes resultados são úteis para tomadas de decisão com relação a iniciativas de conservação e à coleta de material para conservação *ex situ*, ou mesmo para manutenção da diversidade genética nas populações, sendo recomendada a utilização de no mínimo 52 plantas matrizes para a coleta de sementes, com objetivo de reter um tamanho efetivo de 150 indivíduos. Adicionalmente, foi estimada a distância entre plantas matrizes que maximiza a captura da variabilidade genética como superior a 100 m, não podendo ser inferior a 54 m.

Em suma, os resultados apresentados neste trabalho dão uma importante contribuição para o conhecimento científico sobre *A. sellowiana*, e demonstram potencial para ser de grande valia em futuros estudos e iniciativas que visem o melhoramento e a conservação desta espécie nativa do sul do Brasil.