

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA E MELHORAMENTO**

SUELANE COSTA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, REPRODUTIVA E
GENÔMICA EM INDIVÍDUOS DE *Psidium cattleyanum* Sabine
(Myrtaceae) COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE DNA**

ALEGRE - ES

2022

SUELANE COSTA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, REPRODUTIVA E
GENÔMICA EM INDIVÍDUOS DE *Psidium cattleianum* Sabine
(Myrtaceae) COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE DNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento, na linha de pesquisa de Genética e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Adésio Ferreira.

Coorientadoras: Prof.^a Dra. Amélia Carlos Tuler e
Prof.^a Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira.

ALEGRE - ES

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

COMISSÃO EXAMINADORA

AGRADECIMENTO

Penso que não seja possível iniciar um texto de agradecimento sem primeiro mencionar o Criador. Por isso, agradeço a Deus que com sua infinita bondade, nos permite sonhar e realizar nossos sonhos, nos dando forças para parar quando necessário for e recomeçar, mas nunca desistir.

Agradeço também a minha família querida, digna de todo amor, a minha mãe Valdirene, meu pai Elias, meu irmão Elandre e minha irmã Suária, pois, são as pessoas que eu sempre posso contar em qualquer situação, sendo minha força e apoio para todos os momentos e decisões. Além de muitos familiares que torcem por mim e pelas minhas conquistas.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e o Conselho Nacional de Pesquisas – CNPq, pela bolsa e apoio financeiro direcionado ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, que também dedico o meu agradecimento pela oportunidade de fazer parte do programa e desenvolver esse estudo.

Ao professor Dr. Adésio Ferreira pela orientação, a professora Dr^a Amélia Carlos Tuler e a professora Dr^a Marcia Flores da Silva Ferreira, pela coorientação, pelo apoio, o conhecimento compartilhado e o direcionamento.

A todos que, em um período de pandemia, apesar de não ter muito contato, mas que ajudou de forma direta ou indireta, em minha formação, desenvolvimento da pesquisa e nas disciplinas, eu agradeço.

Como também, aos meus amigos de Vargem Alta, aos meus amigos que o Centro Universitário São Camilo me proporcionou conhecer e aos amigos que conheci em Alegre, em especial Sara Evaristo que sempre me apoiou e levantou meu astral em momentos difíceis.

Aos membros da banca de defesa do projeto e defesa da dissertação, que se disponibilizaram a participar e compartilhar conhecimento para contribuir em minha formação, assim como ao grupo de pesquisa de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

E todos que de alguma forma participaram da construção deste trabalho.

BIOGRAFIA

Suelane Costa dos Santos, nascida em 16 de abril de 1997 em Cachoeiro de Itapemirim – ES, terceira filha de Valdirene Aparecida Costa dos Santos e Elias Roberto dos Santos. Em fevereiro de 2004, iniciou os estudos na Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio “Presidente Luebke”, localizada no município de Vargem Alta – ES.

Em fevereiro de 2015, ingressou como aluna de graduação no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, no Centro Universitário São Camilo – ES. Concluiu o curso em dezembro de 2017 onde obteve o título de Licenciada em Ciências Biológicas. Durante os três anos de graduação, atuou como bolsista do Programa Institucional de Iniciação à Docência (PIBID) e participou de projetos voltados ao compartilhamento de conhecimento científico em seu município.

Em março de 2018, ingressou como aluna de graduação no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus de Alegre. Concluindo apenas 80% do curso.

Em março de 2020, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus de Alegre, na linha de Genética e Melhoramento, sob orientação do professor Dr. Adésio Ferreira. Atuando em atividades de pesquisa com ênfase em caracterização agrônômica de espécie poliplóide, submetendo a defesa de dissertação em abril de 2022.

RESUMO

O *Psidium cattleianum* Sabine, conhecido popularmente como araçá da praia ou araçá de coroa, é uma espécie nativa presente principalmente no litoral brasileiro e atualmente cultivada em vários países. Os estudos a respeito da espécie são recentes e vem ganhando destaque principalmente no setor farmacêutico e alimentício. A espécie chama atenção por apresentar diferentes números cromossômicos, como $2n = 44, 55, 66, 77, 88, 99, 110$ e 132 , descritos na literatura científica. Essas diferenças na ploidia podem implicar em variações morfológicas, anatômicas e moleculares como já relatado em outras angiospermas. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfológica e micromorfológica das folhas, analisar os dados genômicos e avaliar a viabilidade polínica, em comparação aos diferentes conteúdos de DNA presente nos indivíduos de *P. cattleianum*. Para tanto, foram analisadas a morfologia externa e a micromorfologia de folhas de nove indivíduos que fazem parte da coleção de germoplasma do CCAE/UFES, Campus de Alegre, Espírito Santo, Brasil. O estudo da morfologia externa compreendeu a análise da massa seca, comprimento e da largura da lâmina foliar e do pecíolo de nove folhas por indivíduo. Para análise micromorfológica as folhas foram coletadas e fixadas em FAA 70 % durante 24 h e armazenadas em álcool etílico 70%, em seguida diafanizadas e coradas com safranina. Cinco lâminas da região mediana da face abaxial foram confeccionadas para cada indivíduo, para realização da contagem de densidade estomática e tamanho dos estômatos. Os dados genômicos utilizados na realização da identificação de polimorfismo entre indivíduos foram retirados do banco de dados do Laboratório de Biometria do PPGGM - UFES. E para análise da viabilidade polínica, botões florais foram coletados em fase pré-antese, armazenados no freezer com metanol e ácido acético (3:1). Para confecção das lâminas, foi realizado o corte transversal do botão floral, seguido de coloração com corante Alexander e contagem de mil grãos de pólen por lâmina em um total de três lâminas por indivíduo. Os dados obtidos foram tabulados em planilha eletrônica para a construção das descrições e realização das análises multivariadas. As diferenças observadas nas características analisadas entre os indivíduos com maiores conteúdos de DNA (7.03 e 6.83 pg), menores conteúdos de DNA (3.31 e 3.45 pg) e conteúdo de DNA mediano (3.66, 3.71, 3.77, 4.26 e 4.71 pg), demonstraram que, a relação entre indivíduos com maior conteúdo de DNA apresentar características morfológicas e micromorfológicas das folhas maiores, não foi identificada. Na análise de viabilidade polínica, os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 3.8 e 3.9 picogramas de DNA, apresentaram baixa quantidade de pólenes viáveis. E na análise de dados genômicos, os indivíduos de conteúdo de DNA intermediário apresentaram as maiores variações.

Palavras-chave: Análise multivariadas. Araçá. Genômica. Morfologia. Pólen.

ABSTRACT

Psidium cattleianum Sabine, popularly known as araçá da praia or araçá de crown, is a native species present mainly on the Brazilian coast and currently cultivated in several countries. Studies on the species are recent and have been gaining prominence mainly in the pharmaceutical and food sector. The species draws attention for having different chromosome numbers, such as $2n = 44, 55, 66, 77, 88, 99, 110$ and 132 , described in the scientific literature. These differences in ploidy may imply morphological, anatomical and molecular variations as already reported in other angiosperms. The objective of this work was to carry out the morphological and micromorphological characterization of the leaves, to analyze the genomic data and to evaluate the pollen viability, in comparison to the different DNA contents present in the individuals of *P. cattleianum*. For that, the external morphology and micromorphology of leaves of nine individuals that are part of the germplasm collection of CCAE/UFES, Campus de Alegre, Espírito Santo, Brazil, were analyzed. The study of external morphology comprised the analysis of dry mass, length and width of the leaf blade and petiole of nine leaves per individual. For micromorphological analysis, the leaves were collected and fixed in FAA 70% for 24 h and stored in 70% ethyl alcohol, then diaphanized and stained with safranin. Five slides from the median region of the abaxial face were prepared for each individual to perform the stomatal density count and stomata size. The genomic data used to perform the identification of polymorphism between individuals were taken from the database of the Biometrics Laboratory of PPGGM - UFES. And for pollen viability analysis, flower buds were collected in the pre-anthesis phase, stored in the freezer with methanol and acetic acid (3:1). To make the slides, a cross-section of the floral bud was performed, followed by staining with Alexander dye and counting one thousand pollen grains per slide in a total of three slides per individual. The data obtained were tabulated in an electronic spreadsheet for the construction of descriptions and performance of multivariate analyses. The differences observed in the analyzed characteristics between individuals with higher DNA contents (7.03 and 6.83 pg), lower DNA contents (3.31 and 3.45 pg) and median DNA content (3.66, 3.71, 3.77, 4.26 and 4.71 pg), demonstrated that the relationship between individuals with higher DNA content presenting morphological and micromorphological characteristics of larger leaves was not identified. In the pollen viability analysis, individuals with DNA content ranging between 3.8 and 3.9 picograms of DNA had a low number of viable pollen. And in the analysis of genomic data, individuals with intermediate DNA content showed the greatest variations.

Keywords: Multivariate analysis. Araçá. Genomic. Morphology. Pollen.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização geográfica da cidade de Alegre, Espírito Santo. 31
- Figura 2.** Locais de cultivo dos nove indivíduos da espécie de *P. cattleyanum*.
Legenda A: Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Área experimental do Centro. Legenda B: Campus de Alegre do Instituto Federal do Espírito Santo – IFES, Área do Viveiro de Mudas. 33
- Figura 3.** Gráficos de dispersão da variável área foliar (mm²), massa seca (g), comprimento do pecíolo (mm), diâmetro do pecíolo (mm), nervura principal (cm), obtidos mediante avaliação de folhas dos nove indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais, com conteúdo de DNA variando entre 3.31 e 7.03 picogramas. 38
- Figura 4.** Gráficos de dispersão da variável densidade estomática (mm²), largura célula guarda (µm), comprimento célula guarda (µm), largura do ostíolo (µm), comprimento do ostíolo (µm), obtidos mediante avaliação de folhas dos nove indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais, com conteúdo de DNA variando entre 3.31 e 7.03 picogramas. 40
- Figura 5.** Área de coleta do Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Legenda A: Área experimental do Centro 50
- Figura 6.** Foto ilustrativa de botões florais e flores de um indivíduo de *P. cattleyanum* identificado pelo número 133, cultivado no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.52 picogramas. 53
- Figura 7.** Preparo das lâminas de grão de pólen no Laboratório de Citogenética entre os meses de dezembro (2021) e janeiro (2022). Foto ilustrativa com grãos de pólen de um indivíduo de *P. cattleyanum* identificado pelo número 147, cultivado no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.86 picogramas. Legenda A: Botões, corante e ácido clorídrico solução (5M HCl). Legenda B: Corte do botão floral. Legenda C: Remoção das anteras. Legenda D: Anteras imersas no ácido clorídrico. Legenda E: Grãos de pólen sendo corados. Legenda F: Lâmina pronta para análise. 54
- Figura 8.** Foto ilustrativa com grãos de pólen corados, pouco corados e vazios de um indivíduo de *P. cattleyanum* identificado pelo número 118, cultivado no

Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.84 picogramas, observados com o auxílio da objetiva de 40x pelo microscópio estereoscópico modelo Leica DM 2500. 55

Figura 9. Dispersão de grãos de pólen viáveis, obtidos após avaliação realizada em onze indivíduos de *P. cattleyanum*, identificados pelos números 118, 119, 127, 129, 132, 136, 139, 140, 142, 145 e 147, cultivados no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.84, 3.63, 3.68, 3.39, 3.34, 3.38, 3.64, 3.90, 3.91, 3.54 e 3.86 picogramas, respectivamente. 57

Figura 10. Dispersão de grãos de pólen inviáveis, obtidos após análise realizada em onze indivíduos de *P. cattleyanum*, identificados pelos números 118, 119, 127, 129, 132, 136, 139, 140, 142, 145 e 147, cultivados no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.84, 3.63, 3.68, 3.39, 3.34, 3.38, 3.64, 3.90, 3.91, 3.54 e 3.86 picogramas, respectivamente. 58

Figura 11. Dendrograma de dissimilaridade genética obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas (UPGMA), utilizando a distância Euclidiana. Realizado após filtragem (Call Rate = 1) da genotipagem de 116.926 SNPs oriundos pela metodologia DArTseq, para os dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Os indivíduos foram identificados por numeração e conteúdo de DNA: 77 (4.47pg), 78 (4.71pg), 71 (7.03pg), 72 (6.83pg), 70 (4.36pg), 79 (3.77pg), 73 (3.31pg), 74 (3.45pg), 75 (3.71pg) e 76 (3.66pg) 72

Figura 12. Análise de coordenada principais (PCA) realizada após filtragem (Call Rate = 1) da genotipagem de 116.926 SNPs oriundos pela metodologia DArTseq para os dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Os mesmos foram identificados por numeração e com seus respectivos conteúdos de DNA em picogramas: 77 (4.47pg), 78 (4.71pg), 71 (7.03pg), 72 (6.83pg), 70 (4.36pg), 79 (3.77pg), 73 (3.31pg), 74 (3.45pg), 75 (3.71pg) e 76 (3.66pg). Cada indivíduo foi representado por cores diferentes nos grupos 73

Figura 13. Heatmap da probabilidade de identidade por descendência realizado após filtragem (Call Rate = 1) da genotipagem de 116.926 SNPs oriundos pela

metodologia DArTseq, para os dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Os mesmos foram identificados por numeração e com seus respectivos conteúdos de DNA mensurado pelo valor 2C em picogramas: 77 (4.47pg), 78 (4.71pg), 71 (7.03pg), 72 (6.83pg), 70 (4.36pg), 79 (3.77pg), 73 (3.31pg), 74 (3.45pg), 75 (3.71pg) e 76 (3.66pg). Cada célula colorida representa o grau de parentesco entre os indivíduos representados pelas linhas e colunas. Cada célula é colorida com base no nível de parentesco entre indivíduos, variando do azul (indivíduos pouco aparentados) ao vermelho (indivíduos altamente aparentados).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Caracterização de nove indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Com variações de DNA entre 3.31 e 7.03 picogramas e com seus percentuais de bases AT (%) e CG (%). 31
- Tabela 2.** Apresentação dos trinta indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* cultivados no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Área experimental do Centro, em condições naturais. Com variações de DNA entre 3.3 e 4.26 picogramas 51
- Tabela 3.** Caracterização dos onze indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* cultivados no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, em condições naturais. Com variações de DNA entre 3.3 e 3.91 picogramas e sua ploidia. 52
- Tabela 4.** Valores percentuais de grãos de pólen viáveis obtidos para cada botão floral avaliado e a média por planta para cada um dos onze indivíduos de *P. cattleyanum*, identificados pelos números 118, 119, 127, 129, 132, 136, 139, 140, 142, 145 e 147, cultivados no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.84, 3.63, 3.68, 3.39, 3.38, 3.64, 3.90, 3.91, 3.54 e 3.86 picogramas, respectivamente. 56
- Tabela 5.** Identificação do local de coleta onde os dez indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* são cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Com conteúdo de DNA variando entre 3.31 a 7.03 picogramas. 67
- Tabela 6.** Descrição dos resultados de genotipagem em dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Com variação do valor 2C entre 3.31 e 7.03 picogramas. Resultando um total de 116.926* SNPs amostrados oriundos da metodologia DArTseq. 70
- Tabela 7.** Estimativa de diversidade genética utilizando os resultados após filtragem da genotipagem de 116.926 SNPs oriundos pela metodologia DArTseq, para dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Com variação do valor 2C entre 3.31 e 7.03 picogramas. 71
- Tabela 8.** Número total de SNPs após filtragem (Call Rate = 1) da genotipagem de 116.926 SNPs oriundos pela metodologia DArTseq, para os dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais.

Os mesmos foram identificados por numeração e com seus respectivos conteúdos de DNA mensurado pelo valor 2C em picogramas: 77 (4.47pg), 78 (4.71pg), 71 (7.03pg), 72 (6.83pg), 70 (4.36pg), 79 (3.77pg), 73 (3.31pg), 74 (3.45pg), 75 (3.71pg) e 76 (3.66pg) e o número total de transcritos correspondente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Família Myrtaceae e o Gênero <i>Psidium</i>	14
2.1.2 <i>Psidium cattleyanum</i> Sabine	16
2.2 Caracterização Morfológica e Micromorfológica	17
2.3 Biologia Reprodutiva	18
2.4 Marcador Molecular	20
2.5 Referências	23
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. CAPÍTULO I	28
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MICROMORFOLÓGICA EM INDIVÍDUOS DE <i>Psidium cattleyanum</i> Sabine (Myrtaceae) COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE DNA	28
4.2 Material e Métodos	31
4.2.1 Material Vegetal	34
4.2.2 Análise Morfológica Externa	34
4.2.3 Análise Micromorfológica Interna	34
4.2.4 Análise Estatística	36
4.3 Resultados	37
4.3.1 Morfologia Externa	37
4.3.2 Micromorfologia Interna	39
4.4 Discussão	41
4.5 Conclusão	44
4.6 Referências	45
5. CAPÍTULO II	48
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE POLÍNICA EM INDIVÍDUOS DE <i>Psidium cattleyanum</i> Sabine (Myrtaceae) COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE DNA	48
5.1 Introdução	48
5.2 Material e Métodos	50

5.2.1 Material Vegetal	52
5.2.2 Viabilidade polínica	53
6.2.3 Análise Estatística	55
5.3 Resultados	56
5.4 Discussão	59
5.5 Conclusão	61
5.6 Referências	62
6. CAPÍTULO III	64
COMPARAÇÃO GENÔMICA EM INDIVÍDUOS DE <i>Psidium cattleianum</i> Sabine (Myrtaceae) COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE DNA	64
6.1 Introdução	64
6.2. Material e Métodos	67
6.2.1 Material Vegetal	67
6.2.2 Análise Genômica	68
6.2.3 Identificação e caracterização de marcadores presentes em regiões codificadoras	69
6.3 Resultados	70
6.3.1 Caracterização dos marcadores SNPs	70
6.3.2 Identificação e análise de SNPs presentes em regiões transcritas de <i>P. cattleianum</i>	74
6.4 Discussão	76
6.5 Conclusão	81
6.6 Referências	82
6.7 Apêndices	85

1. INTRODUÇÃO GERAL

A biodiversidade brasileira vem sendo catalogada desde o século XVI com a chegada dos portugueses e escritores europeus à América do Sul. Seguindo, nos séculos XVII e XVIII, naturalistas europeus viajaram pelo Brasil catalogando plantas e demais seres vivos, mas o marco do conhecimento da flora brasileira se deu com a chegada dos naturalistas Johannes Baptist Spix e Carl Friedrich Philipp Martius no século XIX. Os mesmos se dedicaram a descrever as plantas com ciência e arte e explorar o que era visto no Brasil (Flora do Brasil, 2020)

O Brasil como território detentor da biodiversidade mundial, requer um novo olhar por parte dos pesquisadores em como conservar o potencial genético contido nas espécies nativas que foram domesticadas e exploradas, visto que, a perda da biodiversidade ocorre de forma crescente no país por meio do desmatamento, queimadas e monocultivo (CITADIN et al., 2005; SANTOS, 2013; NETO, 2018). A falta de conhecimento em como utilizar espécies nativas de forma sustentável, contribui para a baixa preocupação de como conservá-las. Identificar e mapear o habitat, analisar as características exigidas para crescimento de venda no mercado e descrever a espécie são as ações principais para conservar seu potencial genético (NUNES, 2018).

As espécies nativas que são sucesso na domesticação e geralmente utilizadas para consumo de frutos e produção de derivados com a finalidade de exploração por parte da indústria, ainda são representadas por um número muito baixo. Com as mesmas, grande potencial para fabricação de produtos derivados, os estudos de caracterização multidisciplinar se fazem necessários para o alcance de maior sucesso na domesticação, no manejo e consequente obtenção de valor econômico (BRITO, 2018).

Neste contexto, se insere a família Myrtaceae, que figura entre as dez famílias de maior diversidade no grupo das angiospermas, sendo a Mata Atlântica descrita como centro de diversidade da mesma, contendo mais de 642 espécies descritas (Sobral et al. 2012; OLIVEIRA, 2015). Com um grande número de espécies frutíferas nativas do Brasil, os gêneros *Psidium*, *Eugenia* e *Plinia* se destacam no sucesso da domesticação alcançado e atualmente possuem importância econômica reconhecida (MANICA, 2002; FRANZON, 2004; NUNES, 2018).

O gênero *Psidium*, conhecido por ser o gênero da goiabeira, apresenta cerca de 100 espécies com distribuição neotropical (WCSP, 2020). O Brasil é considerado um dos centros de diversidade do gênero, com aproximadamente 60 espécies distribuídas em todos os biomas brasileiros (Flora do Brasil, 2020).

A grande variedade de habitats naturais que o gênero ocupa se deve em parte a sua capacidade de exploração. Por ser uma planta heliófila, com necessidade de alta exposição solar para seu desenvolvimento, é possível encontrar representantes em ambientes áridos como na caatinga e cerrado. Ao mesmo tempo, a espécie pode ocupar áreas com alta quantidade de umidade no ar e solo como as Florestas Ombrófilas ou até mesmo ambientes alagados, desenvolvendo folhas com hidatódios presentes para realizar o processo de transpiração com maior eficiência (POSSA, 2016).

Psidium cattleianum Sabine é conhecido popularmente como araçazeiro, araçá-doce, araçá-da-praia ou araçá-de-coroa. Caracteriza-se por apresentar porte arbustivo a arbóreo, com variação de tamanho entre 1 a 10 metros, córtex liso com manchas claras, folhas glabras, brilhantes, peciolada, lâmina obovada, flores solitárias, axilares e botões florais piriformes, fruto obovado, adocicado e com altas concentrações de vitamina C, e que se apresenta em dois morfotipo amarelo e vermelho (MACHADO, 2016; TULER et al. 2018).

A espécie apresenta grande potencial para exploração econômica. Seus frutos podem ser consumidos in natura ou utilizados para produção de geleias, sucos, sorvetes e iogurte. No setor farmacêutico a espécie desperta grande interesse, por apresentar alto teor de minerais, fibras e compostos fenólicos com atividade antioxidante, antibacteriana e compostos bioativos, além de produzir alto teor de óleo que é utilizado como essência (HISTER, 2015; POSSA, 2016). Vários compostos: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, epicatequina, quercetina e canferol são descritos na literatura como possíveis agentes antimicrobianos presente no indivíduo (HISTER, 2015).

Diferentes números cromossômicos foram estabelecidos para a espécie como $2n = 44, 55, 66, 77, 88, 99, 110$ e 132 incluindo citótipos não múltiplos do número básico para a família ($x = 11$), como $2n = 46, 48, 55, 58, 77, 82$. Diferenças na ploidia implicam em variações morfológicas anatômicas, moleculares e epigenéticas em uma espécie. Coleções de germoplasma podem

auxiliar nestes estudos e ajudarem no entendimento das características biológicas da espécie (COSTA, 2009).

Os estudos da base molecular auxiliam no entendimento das diferenças intraespecíficas que podem estar relacionadas a aspectos evolutivos e taxonômicos na população. Por meio das modificações em genes estruturais ou alterações em genes regulatórios diferentes respostas podem ser visualizadas na expressão do genes. A análise transcriptômica identificou genes candidatos responsáveis pela atração de polinizadores, genes potenciais envolvidos na biossíntese de terpenóide e responsáveis pela categoria funcional de estrutura dos tecidos e pigmentação dos frutos para os morfotipos relatados na espécies (VETÖ et al., 2020).

Estudos científicos vêm apontando a necessidade de desenvolver estudos biológicos de espécies nativas, como os araçás, buscando principalmente a seleção de genótipos com características definidas e adequadas a programas de melhoramento genético como tolerância às mudanças climáticas, formação de frutos maiores e aumento de produção, assim como o aumento da formação de óleo já utilizado como essência (PIRES e SOUZA, 2011; NUNES, 2018).

Tendo em vista a grande variação na ploidia presente na espécie, é necessário buscar melhor compreensão sobre a evolução de *P. cattleyanum* em vários aspectos; sendo eles, ecológicos, genéticos, químicos, morfológicos, anatômicos, entre outros (HISTER, 2015). O presente estudo teve por objetivo realizar a caracterização morfológica e micromorfológica das folhas, análise de dados genômicos e avaliação da viabilidade polínica, em comparação aos diferentes conteúdos de DNA presente nos indivíduos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Myrtaceae e o Gênero *Psidium*

Myrtaceae inclui cerca de 140 gêneros e 6.000 espécies, com distribuição neotropical, com centro de diversidade na Floresta Atlântica e Cerrado, sendo considerada uma das grandes famílias de Angiospermas (PROENÇA et al., 2020). A diversidade atribuída à família lhe traz grande reconhecimento, assim como sua importância econômica que também promove destaque. Alguns gêneros com frutos comestíveis, como *Psidium* (goiabas e araçás), *Eugenia* (pitangas), *Plinia* (jaboticabas), e *Syzygium* (jambo e jamelão), movimentam muitos setores industriais e promovem maior reconhecimento a família (GIARETTA et al., 2016).

Com expressiva importância ecológica e socioeconômica, a mesma está entre o grupo mais representativo da Mata Atlântica em número de espécies. As espécies descritas na família, fornecem alimento e habitat para a fauna e são utilizadas na regeneração de áreas degradadas, pois seus frutos atraem animais dispersores que realizam a manutenção do ecossistema. No comércio, folhas e frutos chamam atenção por apresentar características nutricionais importantes para a saúde humana, despertando interesse na indústria alimentícia, cosmética e farmacológica (NETO et al., 2022).

Dentre as espécies que pertence ao gênero *Psidium*, *P. guajava*, a goiaba, *P. cattleyanum* e *P. guineense*, popularmente conhecidas como araçás, são destaque em pesquisas de caracterização anatômica, morfológica e molecular (MEDINA et al., 2011; OLIVEIRA, 2015). O nome *Psidium* provém de *Psidion*, denominação grega do fruto romã, com o qual se parece os frutos desse gênero que apresentam grande número de sementes e cálice persistente em forma de coroa apical (BREMENKAMP, 2015).

Um total aproximado de 150 espécies são descritas dentro do gênero, destas, cerca de 60 ocorrem em território brasileiro, sendo o gênero mais diversificado da família Myrtaceae, sua amplitude ecológica e geográfica possibilita seu desenvolvimento em diferentes tipos de vegetação, tendo alta plasticidade fenotípica (MACHADO, 2016). É característico do gênero o porte subarbustivo a arbóreo, flores solitárias ou agrupadas em trios com numerosos estames (COSTA, 2009).

Os indivíduos representados pelo gênero, apresentam frutos geralmente adocicados e saborosos que atraem a fauna que atuam como dispersores das sementes. Apreciado pela população local, no setor alimentício e no setor farmacêutico por serem ricos em substâncias antioxidantes e óleos essenciais, os indivíduos do gênero estão presentes e adaptados a todos os biomas brasileiros, com isso, estudos que abrangem a caracterização genética das populações para conhecimento das variações fenotípicas e genotípicas favoráveis ao seu amplo desenvolvimento, auxiliam os programas de melhoramento para a conservação dos mesmos e utilização para obtenção de renda (COSTA, 2017).

Como já relatado na espécie *P. cattleyanum*, a poliploidia é um aspecto que confere vantagens e desvantagens no melhoramento genético de plantas. Em decorrência do aumento do conteúdo de DNA, as estruturas vegetativas e produção dos metabólitos secundários tendem a aumentar por meio da alteração na expressão dos genes, gerando melhor atuação dos mecanismos de defesa, metabolismo e desenvolvimento da planta, o que confere vantagens ao desenvolvimento da mesma (SCHISSL et al., 2018).

A variabilidade genética alcançada em poliplóides, leva ao aumento da rede de reguladores dos genes e mudanças no mecanismo de expressão contribuem para melhor capacidade adaptativa. Por meio da duplicação dos genes a divergência adaptativa permite a ocorrência de novidades evolutivas que se tornam um fator fundamental no processo de introdução, naturalização e invasão da espécie em diferentes ambientes. Melhor adaptação a insuficiência de água e nutrientes ou excesso dos mesmos, já foram descritas em espécies poliplóides, como exemplo, o aumento do teor de ácido abscísico que gera a regulação do metabolismo da planta em resposta a insuficiência de água relatados em estudos com *Paulownia fortunei*, *P. australis*, *P. tomentosa* e *Lycium ruthenicum* (PHAM, 2021).

Por mais que a formação de órgãos maiores, melhor desempenho e maior resistência a pragas e doenças sejam relatadas, a ocorrência do fenótipo anão por meio do crescimento reduzido, mal formação dos gametas e menor desempenho na reprodução foram descritas em autotetraplóides de *Betula platyphylla* e *Malus domestica*. Erros durante a meiose por meio do mau emparelhamento, formação de gametas com cromossomos desequilibrados e

dificuldade no reparo do DNA gera a diminuição ou perda da fertilidade dificultando o estabelecimento e manutenção de populações viáveis, o que representa desvantagens da poliploidia no melhoramento genético (IANNICELLI et al., 2020).

2.1.2 *Psidium cattleianum* Sabine

Psidium cattleianum Sabine ocorre no Brasil, Caribe, México, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, África do Sul e Uruguai. Em território brasileiro, é comum em todas as regiões litorâneas do Brasil em ambientes de restinga e áreas de floresta, mas ocorre também em áreas de Cerrado e Caatinga (TULER, 2018).

Definida como espécie silvestre poliplóide, diferentes números cromossômicos como $2n = 44, 55, 66, 77, 88, 99, 110$ e 132 incluindo citótipos não múltiplos do número básico para a família ($x = 11$), como $2n = 46, 48, 55, 58, 77, 82$, foram relatados na literatura científica (Atchison, 1947; Hirano e Nakazone, 1969; Singhal et al. 1984; Raseira e Raseira, 1996; Costa e Forni-Martins, 2006; Costa, 2009; de Souza et al. 2014; Machado, 2016; Souza-Pérez e Speroni, 2017; Machado, 2021).

Dentre as variações do conteúdo de DNA e ploidias correspondentes Machado (2021), descreveu que, o conteúdo de DNA variando entre 2.18-2.49, 2.94-3.02, 3.53-3.61, 3.88-3.96, 4.62-5.04, 5.01-5.71 picogramas, corresponde as ploidias 4, 5, 6, 7, 8, e 10x respectivamente.

Descrita como árvore ou arbusto, com altura entre 1,5 a 6 metros, tronco liso parcialmente tortuoso com casca fina de coloração castanha e descamante, folhas coriáceas variando de 5 a 10 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura e morfotipo dos frutos podendo ser amarelo ou vermelho (XAVIER, 2021)

As flores do araçazeiro são brancas, hermafroditas, com estames numerosos, ovário ínfero contendo de três a quatro lóculos e mais de cem óvulos. Os grãos de pólen, com morfologia variadas e as sementes com tegumento impermeável e enrijecido, tornando a germinação lenta e desuniforme (NUNES, 2018).

Os frutos de película amarela apresentam sabor adocicado apesar de ter baixo teor de açúcar, não sendo muito ácido mesmo com a quantidade de vitamina C considerada alta, além dos compostos fenólicos, vitaminas e sais

minerais. Com peso médio variando entre 9 e 13 g e podendo chegar a 2 cm de diâmetro (FRANZON et al., 2009; NETO, 2018). E sua polpa mucilaginoso já é utilizada para diversos fins alimentícios, além de seu fruto possuir inúmeras sementes ortodoxas e quiescentes (NETO, 2018).

Tendo essas características, a espécie se destaca na indústria farmacêutica, com exploração de seus compostos fenólicos e óleos essenciais. No setor alimentício, com a produção de polpa para suco, fabricação de sorvetes, doces e geleias. Além do indivíduo ser utilizado como ornamentação e na recuperação de área degradada (BERNARDES, 2017).

2.2 Caracterização Morfológica e Micromorfológica

A correta identificação das plantas demanda de estudos que expõe características restritas a espécie, por isso se faz necessário conhecer muito bem os detalhes morfológicos, anatômicos e moleculares da mesma. O primeiro procedimento de um programa de melhoramento que se propõe a estudar plantas com poucos trabalhos desenvolvidos, é conhecer melhor as características da espécie, especialmente quando o gênero apresenta pouca variação morfológica (PROCHNOW, 2018).

Tal identificação pode ser realizada por meio da definição do descritor, sendo este, a característica mensurável que qualifica o recurso genético, tais como características morfológicas, anatômicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares. Por meio da definição do descritor, é possível realizar a caracterização da planta, sendo uma ferramenta de identificação e valoração que auxilia no desenvolvimento de estudos que tem por objetivo manter ou aumentar a diversidade genética na espécie (PAIVA et al., 2019).

Tal levantamento de dados auxilia na descrição, identificação e diferenciação, possibilitando a visualização de características presentes apenas na espécie em estudo. A caracterização morfoanatômica é feita com base em variáveis quantitativas, como número de dias até a floração, número de estômatos na folha, ou variáveis qualitativas, como cor da flor, cor do mesocarpo, formato da semente, sendo caracteres observados a olho nu por meio de medição utilizando objeto milimétrico ou com auxílio de microscopia (BURLE e OLIVEIRA, 2010).

A caracterização morfológica permite a diferenciação relativa entre os fenótipos e fornece estimativas de diversidade encontrada dentro da espécie, fornecendo informações úteis para o manejo, tais como, período de floração, frutificação, hábito de crescimento e os ciclos anuais da planta. Desempenhando papel importante na identificação de acessos desejáveis em programas de melhoramento genético (BREMENKAMP, 2015).

Por meio da caracterização morfológica é possível diferenciar fenotípicamente as espécies, o que auxilia na identificação de variedade superior com características herdáveis. Selecionar descritores que contribuem para o desenvolvimento da pesquisa é essencial para que não ocorra a perda de informação considerada relevante na análise da variação total, reduzindo tempo e mão de obra na coleta de dados (RITSCHER et al., 1998; GUSMÃO e NETO, 2008; SOUZA, 2018).

A padronização dos descritores auxilia na decisão do que é necessário avaliar para comprovação das alterações encontradas, com especificações do período de desenvolvimento da planta que deve ser avaliado, a exata parte da planta que será avaliada, ferramentas de medição, número mínimo de plantas e até número mínimo de características que irá compor a avaliação (PROCHNOW, 2018).

2.3 Biologia Reprodutiva

A caracterização agrônômica permite que as variedades interessantes para o melhoramento de plantas sejam observadas e selecionadas para obtenção de novas cultivares mediante a seleção de atributos economicamente viáveis ao cultivo (MENDES, 2013).

A conservação e manejo adequado da espécie possibilita a preservação de sua variabilidade e sobrevivência no meio ambiente, mesmo havendo mudanças no mesmo, como exemplo as mudanças climáticas. Identificar, mapear e descrever espécies nativas, potencializa a contribuição de características para espécies comerciais, e o entendimento de que o seu desenvolvimento pode promover sua inserção no mercado, por meio da venda de seus frutos, uso ornamental e características utilizadas na indústria farmacêutica, como ocorre na espécie *Psidium cattleianum* (SOUSA, 2019).

O conhecimento do desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, contribui para que seja feito a programação dos tratamentos necessários no cultivo e maior eficiência no manejo, resultando em melhores produtos finais para a colheita e entendimento de quais épocas são essenciais para cruzamentos e obtenção de novas características de interesse (BREMENKAMP, 2015).

A caracterização do sistema reprodutivo auxilia no entendimento do padrão de reprodução, métodos utilizados para o sucesso reprodutivo, relação planta-polinizador, diversidade genética e o comportamento de perpetuação da espécie de forma geral (MACHADO, 2020).

As flores do araçazeiro são descritas como brancas, hermafroditas, estames numerosos, ovário ínfero contendo de três a quatro lóculos e mais de cem óvulos. Os grãos de pólen, com morfologia variadas e as sementes com tegumento impermeável e enrijecido, tornando a germinação lenta e desuniforme (NUNES, 2018).

Segundo Xavier (2021), estudos desenvolvidos para análise da morfologia dos grãos de pólen na espécie *P. cattleyanum*, demonstraram que a morfologia não é um fator que possa interferir nos cruzamentos e levar ao insucesso na reprodução. Com isso, a hipótese é que o insucesso reprodutivo possa ser devido às diferentes ploidias apresentada na espécie (SERRA, 2018).

O padrão morfológico dos grãos de pólen poderia ser usado como indicativo da ploidia do indivíduo e auxiliar no trabalho dos melhoristas, para o desenvolvimento de identificação do conjunto cromossômico par ou ímpar tendo em vista que, erros meióticos são mais propensos a ocorrer em indivíduos com conjunto ímpar (XAVIER, 2021).

Conhecer a morfologia do pólen e sua viabilidade reprodutiva, proporciona o entendimento de como obter o sucesso no cruzamento entre genótipos em diferentes épocas de desenvolvimento dos indivíduos, adquirindo maior segurança na fecundação em cruzamentos específicos e o tempo de conservação do pólen em bancos de germoplasma (ALBUQUERQUE, 2014).

Para que ocorra sucesso nos programas de melhoramento, os mesmos precisam alcançar a eficiência na seleção de genótipos que abrangem as necessidades do mercado. Com isso, a viabilidade polínica, é uma avaliação prévia da garantia da fertilização, sendo uma avaliação da fertilidade do genitor masculino que gera dados a respeito da incompatibilidade e vitalidade do

material em condições adequadas de armazenamento para garantia de sucesso em fecundações posteriores (XAVIER, 2021).

A reprodução é o principal pilar para manter a cultura economicamente viável, estudos voltados para análise da biologia floral, ocorrência da polinização e fenologia, são importantes para entender a dinâmica poliplóide de ocorrência natural e para desenvolvimento de estratégias para possibilitar a produção em larga escala. Tal conhecimento também proporciona novas pesquisas, planejamento de cruzamento dirigidos, plantio, adubação, irrigação e colheita (BREMENKAMP, 2015).

Como exemplo, a apomixia é um método reprodutivo já relatado na espécie de *Psidium cattleyanum*, considerada como apomítica pseudogâmica com a formação do embrião realizada por via mitótica das células do óvulo e a fertilização masculina necessária apenas para a formação do endosperma responsável pela nutrição do embrião (SOUZA-PÉREZ et al., 2021).

Compreender a biologia reprodutiva auxilia no desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo a ser adotado para a espécie em estudo. Para a conservação do germoplasma, conhecer o papel do agente polinizador, comportamento na polinização, tempo de cada estágio fenológico, tempo de floração e frutificação, interferência do ambiente nas características reprodutivas, são fundamentais para se ter a base de seleção de genótipos (NETO, 2018).

A plasticidade ambiental já descrita para *P. cattleyanum*, demonstra que o mesmo se desenvolve diante de diferentes climas e condições ambientais, como áreas de restingas litorâneas, locais úmidos e locais de baixa precipitação (NETO, 2018). Com isso, identificar a relação entre a viabilidade polínica e os diferentes conteúdos de DNA descritos na espécie, auxilia no entendimento do desenvolvimento reprodutivo da espécie e abordagens de manejo que leva ao sucesso de produção.

2.4 Marcador Molecular

Com a descrição da estrutura do DNA, a compreensão da sua função, a publicação do primeiro genoma sequenciado e o desenvolvimento de ferramentas para realização cada vez mais rápida do sequenciamento genômico dos mais diversos organismos existentes, foi possível. A genômica é definida como ciência que estuda e descreve o genoma, sendo um grande marco

científico que revoluciona cada vez mais o conhecimento e entendimento dos processos evolutivos das espécies (FIETTO; MACIEL, 2015).

Dividida entre genômica estrutural e funcional, a genômica estrutural compreende o estudo da organização e estrutura dos genes, e a genômica funcional, busca a descrição da função específica do gene e qual é a característica resultante da sua função. O objetivo da genômica é descrever a informação biológica obtida através dos genes e relacionar a expressão gênica aos mecanismos funcionais do organismo, seu uso contribui em várias áreas de estudo, além da biologia molecular (TULINI, 2020).

Estudos moleculares associados a caracterização agrônômica, contribuem para a obtenção de variedades com características superiores a população natural. Assim como, o entendimento de como o processo evolutivo contribuiu para a sobrevivência da espécie e propagação ao longo dos anos (BERNADES, 2017). Visando obter conhecimento e descrição de melhorias para o desenvolvimento da população, o uso de marcadores moleculares, se tornou uma ferramenta biotecnológica que proporciona estudo voltados para seleção genética, filogenética, diversidade genética, genotipagem e estudo de características genômicas que gera diferentes expressões fenotípicas (SOUSA, 2019).

A principal importância do uso de marcadores moleculares para conhecimento das particularidades da espécie é entender o organismo a nível de DNA, permitindo a exclusão de influências ambientais, assim como, esclarecer a relação de espécies crípticas ou relacionadas. A presença de um marcador pode mostrar regiões genômicas com características funcionais importantes para o desenvolvimento do indivíduo e sobrevivência da sua espécie (FIETTO; MACIEL, 2015).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados em estudos moleculares nos últimos anos, os marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), são oriundos de uma mutação pontual no genoma, que consiste na modificação da sequência de DNA em apenas uma única base, podendo o mesmo ser uma transição, quando a base nitrogenada é trocada por outra de mesma classe, sendo purina por purina (A-G) ou pirimidina por pirimidina (C-T). A transversão, quando a base nitrogenada é trocada por outra de classe distinta,

sendo purina por pirimidina, ou pirimidina por purina. E até mesmo inserção ou deleção de base (TURCHETTO-ZOLET, et al. 2017).

Para que tal alteração no genoma seja considerada modificação de um único nucleotídeo, a frequência mínima do alelo na população precisa ser de pelo menos 1%, assim deixa de ser mutação e é considerada polimorfismo. Se as substituições alterarem a formação do aminoácido, as mesmas serão consideradas mutações não sinônimas. Se não houver alterações, são denominadas mutações sinônimas (JESUS; BUENO, 2020).

Os SNPs apresentam precisão, alto rendimento, ótima resolução e reprodutibilidade. A possibilidade de identificação de forma automatizada em plataformas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), está entre as vantagens da utilização destes marcadores (TULINI, 2020).

Ferramenta auxiliar na compreensão do polimorfismo, o sequenciamento realizado pela tecnologia DArTseq que reduz a complexidade do genoma por meio do uso de enzimas de restrição otimizada de forma específica a espécie, é vantajoso por selecionar regiões genômicas funcionais por atuar próximo a regiões metiladas conhecida por conter genes ativos. Sendo realizada por sequenciamento simultâneo de diferentes amostras, através do estudo de marcadores moleculares (SOUSA, 2019).

2.5 Referências

- ALBUQUERQUE, I. F. de. **Fenologia, atributos florais e fluxo polínico entre citótipos diploides e tetraploides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae)**. 2014. 56 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco / Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Recife, PE. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/29370/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20Isabelle%20Fernandes%20de%20Albuquerque.pdf>>. Acesso em: 25 de jul. 2021
- BERNARDES, C. de O. **DIVERSIDADE GENÉTICA, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Psidium* spp.** 2017. 165 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo / Centro De Ciências Agrárias e Engenharias, Alegre, ES. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/bitstream/10/7863/1/tese_8942_Tese%20Final%20Carolina%20de%20Oliveira%20Bernardes20170605-143247.pdf>. Acesso em: 18 de maio 2021
- BREMENKAMP, C. A. **DISSIMILARIDADE GENÉTICA, FENOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA DE ACESSOS DE ARAÇAZEIROS EM CULTIVO IRRIGADO NO NORTE FLUMINENSE**. 2015. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campus dos Goytacazes, RJ. Disponível em: <<https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/handle/item/2780>>. Acesso em: 07 de junho 2021
- BRITO, E. de J. **PRODUTOS FLORESTAIS NÃO MADEIREIROS VEGETAIS E A SUBSISTÊNCIA DA COMUNIDADE RIBEIRINHA PARICATUBA, MUNICÍPIO DE PONTA DE PEDRAS, PARÁ**. 2018. Monografia (Graduação) - Universidade Federal Rural da Amazônia. Paragominas, PA. Disponível em: <<Http://Bdta.Ufra.Edu.Br/Jspui/Bitstream/123456789/433/6/Produtos%20florestais%20n%C3%83o%20madeireiros%20vegetais%20e%20a%20subsist%C3%8ancia....Pdf>>. Acesso em: 27 de dez. 2021
- BURLE, M. L. OLIVEIRA, M. do S. P. de. **Manual de curadores de germoplasma vegetal: Caracterização Morfológica**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 15 p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2005846/doc312e378.pdf/224f78a4-d9ee-4dad-8824-0f482941c05f#:~:text=Em%20plantas%20perenes%20que%20possuem,em%20programas%20de%20melhoramento%20gen%C3%A9tico.>>. Acesso em: 16 de jun. 2021
- COSTA, I. R. da. **Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em Myrteae, enfatizando *Psidium* e gêneros relacionados**. 2009. 244 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas / Instituto de Biologia. Campinas, SP. Disponível em: <<http://www2.ib.unicamp.br/profs/cjoly/0%20-%20Produ%E7%E3o%20Tematico/3%20-%20Teses/2009/COSTA,%20I.R.%202009%20UNICAMP.pdf>>. Acesso em: 05 de maio 2020
- COSTA, S. R. da. **DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM *PSIDIUM* E ESTUDOS DE HERANÇA E ASSOCIAÇÃO GENÔMICA DA RESISTÊNCIA A *Meloidogyne enterolobii* EM HÍBRIDO DE *Psidium* COM BASE EM POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO**. 2017. 176 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana / Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Feira de Santana, BA. Disponível em: <<Http://Tede2.Uefs.Br:8080/Bitstream/Tede/506/2/Tese%20soniane%20costa.Pdf>>. Acesso em: 28 de dez. 2021
- FIETTO, J. L. R; MACIEL, T. E. F. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações - Sequenciando genomas**. Goiás: Pontifícia Universidade Católica, 2015. Disponível em: <<http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/18497/material/Sequ%C3%A9nciamdo%20genomas.pdf>>. Acesso em 10 out. 2021

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=C067098FF7A6779EC2A54F4DCF59C4D2>>. Acesso em: 13 jan. 2021

FREIRE, C. G. **PROPAGAÇÃO IN VITRO DE ARAÇAZEIRO-VERMELHO (*Psidium cattleianum* SABINE, MYRTACEAE) E SUA INTERAÇÃO COM FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS**. 2016. 121 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Oeste de Santa Catarina. Videira, SC. Disponível em: <https://www.unoesc.edu.br/images/uploads/mestrado/Freire%2C_Cassio_Geremia.._Disserta%C3%A7%C3%A3o_Ci%C3%A4ncia_e_Biotecnologia._2016..pdf>. Acesso em: 09 de junho 2021

GIARETTA, A. TULER, A. C.; SOUZA, M. da C.; VALDEMARIN, K. S.; MAZINE, F. F.; PEIXOTO, A. L. 2016. 11 p. **Diversidade de Myrtaceae na Reserva Natural Vale**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/309187028_Diversidade_de_Myrtaceae_na_Reserva_Natural_Vale>. Acesso em: 25 de nov. 2021

HISTER, C. A. L. **Genotoxicidade, Citotoxicidade, Compostos Fenólicos e Viabilidade Polínica de *Psidium Cattleianum Sabine* (Myrtaceae)**. 2015. 87 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria / Centro de Ciências Naturais e Exatas no Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia. Santa Maria, RS. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/4892/HISTER%2c%20CARMINE%20APARECID A%20LENZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 24 de maio 2020

IANNICELLI, J.; GUARINIELLO, J.; TOSSI, V. E.; REGALADO, J. J.; DI CIACCIO, L.; VAN BAREN, C. M.; ESCANDÓN, A. S. (2020). The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. **Scientia Horticulturae**, 260. Disponível em: <108854. doi:10.1016/j.scienta.2019.108854>. Acesso em 18 de abril 2022

JESUS, A. A. de; BUENO, L. G.; VEJA, W. H. O.; DINIZ, F. M. Molecular tools in genetic breeding of *Megathyrus maximus* for semiarid region: a review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. e7839108675, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i10.8675. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8675>>. Acesso em: 14 jan. 2022

MACHADO, R. M. **DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ANÁLISE CARIOTÍPICA DE CITÓTIPOS DE *Psidium cattleianum* SABINE (MYRTACEAE)**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/321157/1/Machado_RaquelMoura_M.pdf>. Acesso em: 26 de maio 2020

MACHADO, R. M.; OLIVEIRA, F. A. de; ALVES, F. de M.; SOUZA, A. P. de; MARTINS, E. R. F. Population Genetics of Polyploid Complex *Psidium cattleyanum* Sabine (Myrtaceae): Preliminary Analyses Based on New Species-Specific Microsatellite Loci and Extension to Other Species of the Genus. **Biochem Genet** **59**, 219–234 p., 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10528-020-10002-1>>. Acesso em: 25 de mai. 2021

MACHADO, R. M. Poliploidia em *Psidium cattleyanum* Sabine (Myrtaceae): implicações citogenéticas e evolutivas. (2021). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. Disponível em: <<https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/1165943?guid=1651501580907&returnUrl=%2fres ultado%2fflistar%3fguid%3d1651501580907%26quantidadePaginas%3d1%26codigoRegistro%3d1165943%231165943&i=1>>. Acesso em: 15 de set. 2021

MENDES, M. G. **VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA EM POPULAÇÕES DE *HANDEOANTHUS OCHRACEUS* (BIGNONIACEAE) COM SISTEMAS REPRODUTIVOS E PLOIDIAS DISTINTOS**. 2013. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia / Programa de Pós-graduação em Genética e bioquímica. Uberlândia, MG.

Disponível em:

<<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/29563/1/MosaicosReprodutivosMorfometria.pdf>>. Acesso em: 19 de out. 2021

NETO, C. K. **BIOLOGIA FLORAL E REPRODUTIVA DE ARAÇAZEIROS (*Psidium* sp.)**. 2018. 187p. Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná / Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR. Disponível em:<https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/40111/1/PB_PPGAG_D_Kosera%20Neto%2C%20Carlos_2018.pdf>. Acesso em: 10 de jun. 2021

NETO, J. D. de S.; SANTOS, E. K. dos; LUCAS, E.; VETÖ, N. M.; BARRIENTOS-DIAZ, O.; STAGGEMEIER, V. G.; VASCONCELOS, T.; TURCHETTO-ZOLET, A. C. Advances and perspectives on the evolutionary history and diversification of Neotropical Myrteae (Myrtaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society: Bot J Linn Soc**, 2022, v. 199, ed. 1, p. 173-195. Disponível: < <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boab095>>. Acesso em: 08 de abril 2022

NUNES, I. B. **CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE DE FRUTOS DE ARAÇAZEIRO VERMELHO (*Psidium cattleianum* SABINE) EM VERÊ E DOIS VIZINHOS – PARANÁ**. 2018. 94 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná / Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. Dois vizinhos, PR. Disponível em:<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4359/1/DV_PPGSIS_M_Nunes%2c%20Isadora%20Bischoff_2018.pdf>. Acesso em: 13 de junho 2021

OLIVEIRA, E. F. de. **MORFOANATOMIA E MICROMORFOLOGIA COMPARADA DAS FOLHAS DE ESPÉCIES DE *Psidium* L. (MYRTACEAE) DO CERRADO GOIANO**. 2015. 123 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Goiás. Anápolis, GO. Disponível em:<https://www.bdt.d.ueg.br/bitstream/tede/296/2/Elaine_.pdf>. Acesso em: 10 de jun. 2021

PAIVA, S. R.; TEIXEIRA, F. F.; RAMOS, S. R. R.; MACHADO, C. de F.; MAZZOCATO, A. C.; LAMEIRA, O. A.; LEITE, O. L.; CASTRO, A. C. R. de.; MELO, S. C. M de.; SILVA, J. B. T. da.; AZEVEDO, V. C. R. **Caracterização de Recursos Genéticos**. 2019. 23 p. Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. Disponível em:<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1113670>>. Acesso em: 16 de jun. 2021

PHAM, V. H. (2021). The Unique Existence of Chromosomal Abnormalities in Polyploidy Plants. In Down Syndrome and Other Chromosome Abnormalities. **Intech Open**. Disponível: < DOI: 10.5772/intechopen.99821>. Acesso em: 10 de abril 2022

POSSA, J. **Compostos bioativos e capacidade antioxidante de araçás (*Psidium Cattleianum* Sabine) morfotipo amarelo e vermelho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2016. 45 p. Trabalho Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Faculdade de Medicina. Porto Alegre, RS. Disponível em:<<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/144320/000998766.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 26 de maio 2020

PROCHNOW, D. **Caracterização morfo-anatômica e metabólica de espécies do gênero *Cymbopogon*: uma contribuição para o melhoramento das espécies**. 2018. 104 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pelotas / Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pelotas, RS. Disponível em:<<http://guaiaca.ufpel.edu.br/bitstream/prefix/4195/1/Tese-%20Daiane%20Prochnow%20%28Caracteriza%2c%20a7%2c%20a3o%20morfoanat%2c%20b4mica%20e%20metab%2c%20b3lica%20de%20%2c%20a9species%20do%20g%2c%20aanero%20Cymbopogon-%20uma%20contribui%2c%20a7%2c%20a3o%20para%20o%20melhoramento%20das%20esp%2c%20a9cies.pdf>>. Acesso em: 15 de jun. 2021

PROENÇA, C.E.B.; AMORIM, B.S.; ANTONICELLI, M.C. ; BÜNGER, M.; BURTON, G.P.; CALDAS, D.K.D.; COSTA, I.R.; FARIA, J.E.Q.; FERNANDES, T.; GAEM, P.H.; GIARETTA, A.; LIMA, D.F.; LOURENÇO, A.R.L.; LUCAS, E.J.; MAZINE, F.F.; MEIRELES, L.D.; OLIVEIRA, M.I.U.; PIZZARDO, R.C.; ROSA, P.O.; SANTANA, K.C.; SANTOS, L.L.D.; SANTOS, M.F.;

SOUZA, M.C.; SOUZA, M.A.D.; STADNIK, A.; STAGGEMEIER, V.G.; TULER, A.C.; VALDEMARIN, K.S.; VASCONCELOS, T.N.C.; VIEIRA, F.C.S.; WALTER, B.M.T.; SOBRAL, M. 2020. *Myrtaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 13 jun. 2021

SCHIESSL, S. V.; KATCHE, E.; IHLEN, E.; CHAWLA, H. S.; MASON, A. S. (2018). The role of genomic structural variation in the genetic improvement of polyploid crops. **The Crop Journal**. Disponível em: <[doi:10.1016/j.cj.2018.07.006](https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.07.006)>. Acesso em 20 de abril 2022.

SERRA, A. da C. **Mosaicos reprodutivos e morfometria de estômatos em *Eriotheca gracilipes* (Bombacoideae-Malvaceae)**. 2018. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia / Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Uberlândia, MG. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/29563/1/MosaicosReprodutivosMorfometria.pdf>>. Acesso em: 21 de ago. 2021

SOUZA, L. L. **MARCADORES MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E GENÔMICA EM ESPÉCIES DE *Psidium***. 2019. 115 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo / Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Alegre, ES. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/bitstream/10/11299/1/tese_12845_Disserta%20a7%20a3o%20Final%20Luara%20Lopes%20Souza.pdf>. Acesso em: 12 de set. 2020

SOUZA, E. M. de C. **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, SELEÇÃO DE DESCRITORES E DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE MANGUEIRA DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO**. 2018. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos e Vegetais. Cruz das Almas, BA. Disponível em: <<http://repositorio.ufrb.edu.br/bitstream/prefix/1048/1/Caracteriza%20a7%20a3o%20morfologia%20e%20sele%20a7%20a3o%20de%20descritores%20e%20diversidade%20gen%20etica%20entre%20acessos...%20.pdf>>. Acesso em: 18 de junho 2021

Souza-Pérez, M.; Mourelle, D.; Trujillo, C.; Borges, A.; Speroni, G. (2021). Pollen grain performance in *Psidium cattleianum* (Myrtaceae): a pseudogamous polyploid species, **Flora**, Volume 281, Disponível em: <[2021.https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151863](https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151863)>. Acesso em: 18 de abril 2022

TULER, A. C.; PROENÇA, C. E. B.; CARRIJO, T. T.; PEIXOTO, A. L. Typification and nomenclatural notes on *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). (2018). **Taxon**, 67: 1194-1198. Disponível em: <<https://doi.org/10.12705/676.17>>. Acesso em: 11 de junho 2021.

TULINI, F. L. **IDENTIFICAÇÃO DE SNPs CANDIDATOS RELACIONADOS À TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO EM CANA-DE-AÇÚCAR**. 2020. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista / Unesp Campus de Jaboticabal, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/193084/tulini_fl_me_jabo.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 10 de abr. 2021

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/206113/001056154.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 18 de ago. 2021

VETÖ, N. M. et al. Transcriptomics analysis of *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) unveils potential genes involved in fruit pigmentation. **Genetics and Molecular Biology [online]**, 2020, v. 43, n. 2, 11 p. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0255>>. Acesso em: 10 de abril 2022.

XAVIER, K. B. **CARACTERIZAÇÃO PALINOLÓGICA DE ACESSOS DE ARAÇAZEIROS (*Psidium* spp.)**. 2021. 67 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte

Fluminense Darcy Ribeiro / Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ. Disponível em: <<https://uenf.br/posgraduacao/gmp/wp-content/uploads/sites/6/2021/06/Tese-MS-Kevelin-Barbosa-Xavier-assinada.pdf>>. Acesso em: 13 de nov. 2021

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Compreender se os conteúdos de DNA, em indivíduos de *Psidium cattleianum*, influenciam nos caracteres morfológicos, micromorfológicos, genômicos e na viabilidade do pólen.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a morfologia e micromorfologia de folhas dos indivíduos da espécie *Psidium cattleianum* com diferentes conteúdos de DNA.

Estudar as alterações presentes nos citótipos mediante a relação conteúdo de DNA, morfologia e micromorfologia de folhas.

Comparar indivíduos com diferentes conteúdos de DNA sob o aspecto genômico.

Realizar alinhamento no transcriptoma para identificação de regiões codificadoras e estudar as variações genômicas mediante os diferentes conteúdos de DNA.

Analisar a viabilidade polínica em indivíduos com diferentes conteúdos de DNA, estudando a relação do conteúdo de DNA na viabilidade polínica.

4. CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MICROMORFOLÓGICA EM INDIVÍDUOS DE *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE DNA

Psidium cattleianum Sabine, conhecido popularmente como araçazeiro, araçá-doce, araçá-de-praia ou araçá-de-coroa, é nativa do Brasil, sendo comum em todas as regiões litorâneas, em ambientes de restinga e áreas de floresta, ocorrendo também em áreas de Cerrado e Caatinga (TULER, 2018).

O consumo in natura do fruto, a produção de geleias, doces e sucos, bem como a extração de seu óleo comercializado como essência, já são atividades comerciais bem estabelecidas. No setor farmacêutico seus compostos fenólicos são empregados devido a atividade antioxidante e antibacteriana, assim como compostos bioativos (HISTER, 2015).

A espécie é também utilizada como árvore secundária em reflorestamento para recuperação de grandes áreas degradadas e apresenta grande importância ecológica, pois, seus frutos são atrativos para insetos polinizadores e alimentam a fauna silvestre (FREIRE, 2016). Além das características citadas, diferentes números cromossômicos foram estabelecidos para a espécie como $2n = 44, 55, 66, 77, 88, 99, 110$ e 132 incluindo citótipos não múltiplos do número básico para a família ($x = 11$), como $2n = 46, 48, 55, 58, 77, 82$ (COSTA, 2009).

Os estudos em poliplóides naturais ainda é recente, porém a identificação das diferentes ploidias auxiliam no entendimento das variações ocasionadas pela mesma. Os reflexos de tais variações podem ser alterados por fatores ambientais, como exposição à luz solar, temperatura, disponibilidade de água, disponibilidade de nutrientes, o que leva às diferenciações de estruturas morfológicas, em células especializadas e desenvolvimento dos órgãos (ROSSI, 2014).

Obter germoplasma com características favoráveis à sobrevivência do indivíduo mediante as variações no ambiente inserido e mudanças climáticas, se faz necessário, já que, identificar problemas ocasionados pelas instabilidades do tempo como excesso de chuva ou calor, é essencial para direcionar alterações nos métodos de manejo. Características de tolerância em espécies poliplóides

já foram observadas, em que, as mesmas foram consideradas de melhor desempenho fisiológico mediante estresse abiótico (ANWAR et al., 2022).

Dentre as variadas formas de verificação dos efeitos da poliploidia na alteração do desenvolvimento do indivíduo, a análise morfológica das folhas, tem se mostrado eficaz na prospecção desses efeitos. O aumento dos órgãos, efeito tampão genômico, e plasticidade fenotípica já relatados em indivíduos poliplóides, podem favorecer ou atrasar o desenvolvimento dos mesmos (CORNEILLIE et al., 2019), visto que, aumento do conteúdo de DNA que é característicos dos diferentes níveis de ploidias observados em algumas espécies, resulta em diferentes mecanismos de desenvolvimento e reprodução (SALEEM et al., 2021).

Aprimorar novas características desejadas no melhoramento de plantas, são viáveis para espécies diplóides, assim como, para espécies poliplóides. A obtenção de novas cultivares com características atrativas ao comércio, como exemplo, o tamanho da planta, aumento das folhas, botões florais e frutos maiores, proporcionam melhorias no valor econômico, ornamental e no desenvolvimento da planta. Alterações nas características fenotípicas podem ser resultados do aumento do tamanho da célula, da diversificação de alelos, aumento do efeito ou silenciamento de genes, e alterações fisiológicas (MORI, et al., 2021)

Como descrito na literatura científica, plantas poliplóides geralmente superam diplóides quando características fenotípicas, metabólica e resistência a condições ambientais adversas, são avaliadas. Aplicada ao melhoramento, a indução da poliploidia visa obter novas cultivares e multiplicação de indivíduos superiores, com alto rendimento, maiores características vegetativas, florais, crescimento padrão e melhor desempenho. Folhas maiores e espessas, maior tamanho e diâmetro do pecíolo que induz a maior força e segurança da folha, células guarda mais longas e aumento dos estômatos, são descritos em resultados dos estudos em poliplóides (HU, et al., 2021).

Variações inconsistentes em plantas poliplóides também são comuns, as mesmas são explicadas pela necessidade do aumento no consumo de água e nutrientes para a manutenção do DNA e desenvolvimento, que podem levar a diminuição de alguns parâmetros, visto que, plantas poliplóides também necessitam de maior tempo para adaptação mediante ao aumento do conteúdo

de DNA. Influência no crescimento, metabolismo, fertilidade, dosagem dos alelos, aumento dos genes, e expressão do mesmo geram a variabilidade relatada em poliplóides (MORI, et al., 2021).

Assim, considerando que são descritos treze citótipos na espécie *P. cattleyanum*, o objetivo foi avaliar se há ocorrência de alterações morfológicas e micromorfológicas em folhas de indivíduos da espécie relacionando à variação descrita nos diferentes conteúdos de DNA.

4.2 Material e Métodos

A presente pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Genética e Melhoramento e de Botânica da Universidade Federal do Espírito Santo, localizada no município de Alegre (Figura 1).

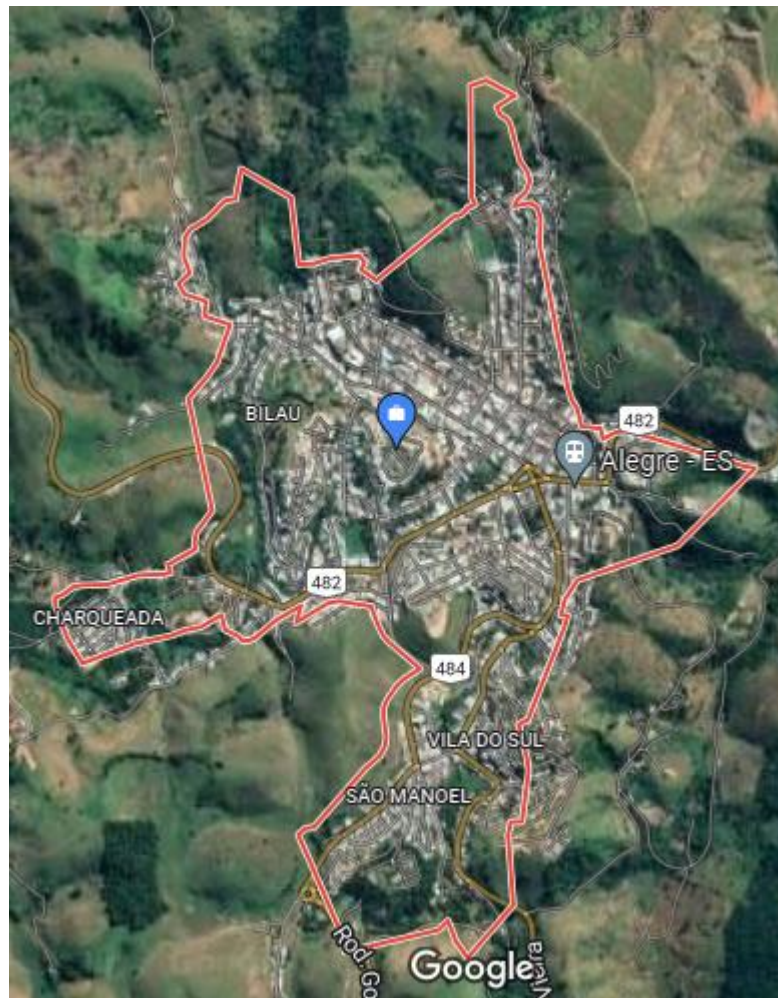


Figura 1. Localização geográfica da cidade de Alegre, Espírito Santo. Fonte: Google Maps (com modificações) (2022).

Foi realizado o estudo morfológico e micromorfológico das folhas de nove indivíduos com variação do conteúdo de DNA entre 3.31 a 7.03 picogramas da espécie de *P. cattleyanum* (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização de nove indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Com variações de DNA entre 3.31 e 7.03 picogramas e com seus percentuais de bases AT (%) e CG (%)

Identificação do Espécime	Local de coleta	Conteúdo DNA em picogramas	Percentual de bases AT (%)	Percentual de bases CG (%)
---------------------------	-----------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------

1	Área Experimental - UFES	4.26	59,02	40,98
2	Área Experimental - UFES	7.03	58,22	41,78
3	Área Experimental - UFES	6.83	57,55	42,45
4	Área do Viveiro de Mudas - IFES	3.31	61,50	38,50
5	Área do Viveiro de Mudas - IFES	3.45	60,95	39,05
6	Biblioteca - UFES	3.71	59,53	40,47
7	Departamento de Biologia - UFES	3.66	59,69	40,31
8	Área Experimental - UFES	4.71	61,30	38,70
9	Área Experimental - UFES	3.77	59,43	40,57

Os indivíduos estão plantados no campus da Universidade Federal do Espírito Santo no município de Alegre e na Área do Viveiro de Mudas do Instituto Federal do Espírito Santo – IFES Campus de Alegre (Figura 2).

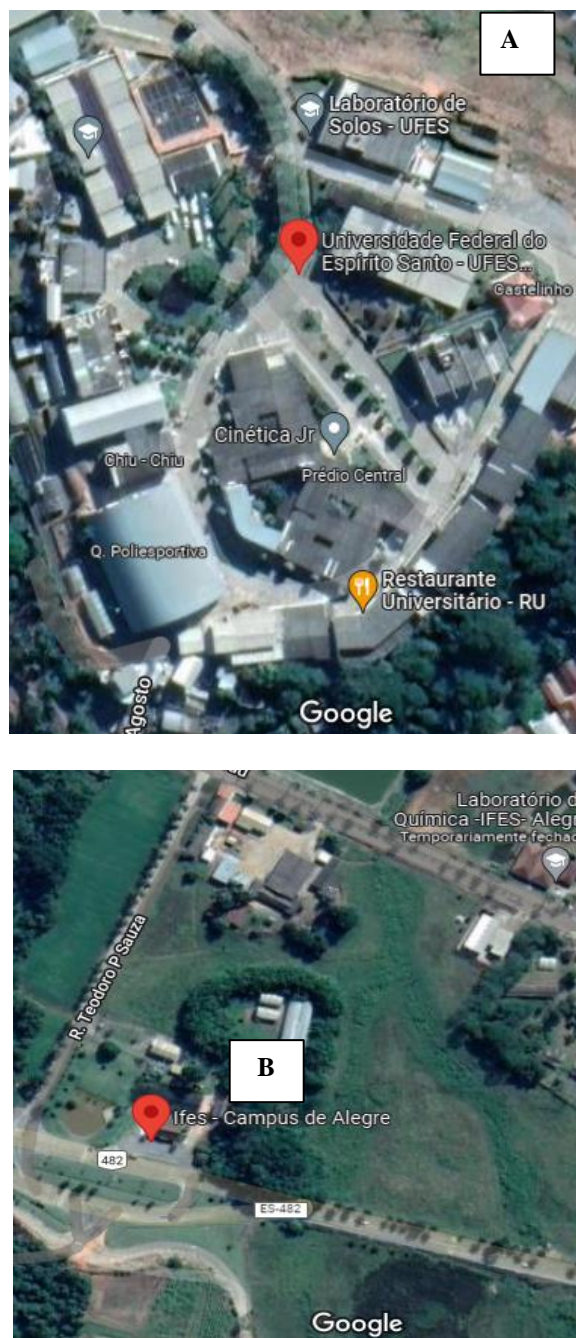


Figura 2. Locais de cultivo dos nove indivíduos da espécie de *P. cattleyanum*. Legenda A: Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Área experimental do Centro. Legenda B: Campus de Alegre do Instituto Federal do Espírito Santo – IFES, Área do Viveiro de Mudas. Fonte: Google Maps (com adaptações) (2022).

O material botânico utilizado foi coletado a partir de indivíduos selecionados, crescendo em condições naturais, sendo no município de Alegre na Área experimental da UFES ($20^{\circ}45'40.7''S$ e $41^{\circ}32'08.3''W$), próximo ao departamento de biologia UFES ($20^{\circ}45'44.4''S$ e $41^{\circ}32'07.8''W$), em frente à biblioteca da UFES ($20^{\circ}45'42''S$ e $41^{\circ}32''W$) e na Área do Viveiro de Mudas – IFES ($20^{\circ}45'39.2''S$ e $41^{\circ}27'23.6''W$).

4.2.1 Material Vegetal

O estudo foi desenvolvido com um total de nove indivíduos de *P. cattleyanum*, as coletas foram realizadas no período de verão, período de frutificação da espécie. E, exsiccatas do material botânico coletado foram construídas logo após a coleta e incorporadas à coleção de germoplasma de *P. cattleyanum* Sabine no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias-CCAIE na Universidade Federal do Espírito Santo campus de Alegre.

Folhas jovens de cada genótipo, livres de qualquer dano por doenças, pragas ou deformidades, foram utilizadas para determinação do valor 2C e do %CG. As análises foram conduzidas no Laboratório de Citogenética e Citometria, pertencente à Universidade Federal de Viçosa, localizada no município de Viçosa – Minas Gerais. O padrão interno utilizado para as análises foi *Solanum lycopersicum* Linnaeus, 1753, 'Stupické' (2C = 2,00 pg) (PRAÇA-FONTES et al., 2011; SILVA, 2020).

4.2.2 Análise Morfológica Externa

Para análise da morfologia externa, as folhas completamente expandidas foram coletadas, sendo nove amostras por indivíduo e um total de nove indivíduos analisados ($n=9 \times 9=81$). Esta análise foi realizada com o objetivo de se adquirir os dados de tamanho da área foliar, peso da massa seca, comprimento do pecíolo, diâmetro do pecíolo, e comprimento da nervura principal. Em que, as medidas foram realizadas somente com material seco e as medidas obtidas com o uso do paquímetro digital e para pesagem da massa seca a balança de precisão foi utilizada.

4.2.3 Análise Micromorfológica Interna

Após a análise da morfologia externa, as folhas coletadas foram fixadas em FAA 70 % sendo uma mistura composta por formalina, ácido acético e álcool etílico ficando submersas nesta mistura em um período de 24 horas e em seguida submersas em álcool etílico 70 % e armazenadas na coleção de germoplasma de *P. cattleyanum* no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias-CCAIE na Universidade Federal do Espírito Santo campus de Alegre para posterior uso das mesmas.

Para análise das folhas fixadas foi necessário fazer a reidratação do material, utilizando o protocolo de reidratação SMITH AND SMITH (1942). Primeiramente foi cortado um fragmento da folha herborizada de aproximadamente 3 cm com auxílio de uma tesoura e em seguida o fragmento foi fervido em água destilada em tempo necessário para que o mesmo afundasse, variando entre 5 e 15 minutos na espécie de *P. cattleyanum*, sendo necessário aguardar um momento a cada 5 minutos para saber se a partir do momento em que o material está esfriando o mesmo está se dirigindo ao fundo do béquer, pois se não estiver é necessário repetir o processo em mais cinco minutos.

O fragmento após chegar ao fundo do béquer e esfriar foi transferido para a solução de hidróxido de potássio a temperatura ambiente por duas horas. Após aguardar duas horas o material foi submerso em água destilada para lavagem do mesmo, ficando submerso em um período de 50 minutos e a troca da água destilada ocorreu três vezes. E assim foi reidratado permanecendo em uma série de álcool etílico de concentração 10, 30 e 70 %, por 10 minutos em cada solução.

Em seguida a reidratação foi necessário realizar o processo de diafanização em que os fragmentos foram passados em soluções com álcool 30 e 10% para retirar resquícios de álcool etílico 70 %, permanecendo 5 minutos em cada solução, assim o material foi submerso em uma solução de hidróxido de sódio 10% por duas horas e mantido na estufa a 60° neste período. Após as duas horas foi lavado em água destilada permanecendo submerso por cinco minutos feito isso três vezes e logo submerso em hipoclorito de sódio 20 % até clarear, após esse processo foram lavados em água destilada novamente submerso três vezes por 10 minutos.

E para a coloração das estruturas presente no fragmento da folha, os mesmos foram submersos em solução de Safranina 1:1 até que a coloração estivesse completa em todo fragmento do material e submersa em seguida em água destilada para posterior confecção da lâmina, sendo a mesma confeccionada utilizando a lâmina de vidro, um pedaço do fragmento da folha que foi corada, seguido de uma gota de gelatina incolor, coberto com a lamínula e selada com esmalte, para que a lamínula não se desgrudasse da gelatina.

Foram confeccionadas um total de 90 lâminas sendo para cada indivíduo uma lâmina da parte adaxial e uma lâmina da parte abaxial do fragmento da

folha, em um total de nove folhas de cada indivíduo, sendo 10 lâminas para cada espécime.

Para análise estomática a partir das lâminas confeccionadas foi utilizado o microscópio estereoscópico modelo Leica DM 2500 com câmera acoplada, e foram feitas fotomicrografias de cada lâmina na parte abaxial da folha, sendo cinco fotos com a objetiva de 20x e cinco fotos com a objetiva de 40x para posterior análise com auxílio do programa IPWin4.

Sendo feito a análise da densidade estomática por área das cinco lâminas abaxiais de cada indivíduo utilizando as fotos tiradas com a objetiva de 20x e medido o tamanho de cinco estômatos presentes em cinco diferentes áreas na lâmina utilizando as fotos tiradas com a objetiva de 40x, analisando a largura e comprimento do ostíolo e largura e comprimento da célula guarda.

4.2.4 Análise Estatística

Os valores obtidos após a análise micromorfológica dos estômatos e análise morfológica para determinação de área foliar, massa seca, comprimento do pecíolo, diâmetro do pecíolo e nervura principal, foram tabulados em planilha eletrônica para a construção das descrições e realização das análises multivariadas.

Utilizou-se análises estatísticas das variáveis para verificar diferenças significativas ($p < 0,05$) e gráficos foram realizados utilizando o software R Core Team (2021), para demonstração dos resultados obtidos.

4.3 Resultados

4.3.1 Morfologia Externa

A análise da morfologia externa demonstrou que os diferentes conteúdos de DNA apresentaram variabilidade entre os indivíduos estudados (Figura 3).

A área foliar, massa seca e comprimento do pecíolo, dos indivíduos de conteúdo de DNA de 3.31, 3.45, 3.66, 3.71, 3.77 e 4.2 picogramas, definidos por Machado (2021), como indivíduos de ploidia 6x e 8x, não apresentaram variações quando comparados aos indivíduos com maior conteúdo de DNA, sendo 4.7, 6.83 e 7.03 picogramas, com ploidias 10x e 13x.

Na análise do diâmetro do pecíolo não houve grandes variações no tamanho, porém, os indivíduos com menor conteúdo de DNA e com conteúdo de DNA representando como médio, apresentaram maior diâmetro (mm) do pecíolo.

Quanto a nervura principal, os indivíduos de menor conteúdo de DNA, 3.31 a 3.77 picogramas, definidos por Machado (2021) como indivíduos de ploidia 6x, apresentaram pouca variação quando comparados aos indivíduos com maior conteúdo de DNA (4.2 a 7.03 picogramas).

Houve uma clara distinção do indivíduo de 4.71 picogramas de DNA em relação aos demais, pela maior homogeneidade de dados e em geral com maiores valores que os demais. Os indivíduos com maior conteúdo de DNA, apresentaram em geral grande amplitude de variação em relação aos demais. E o pecíolo foi um carácter de menor variação e possibilitou discriminar as classes de indivíduos.

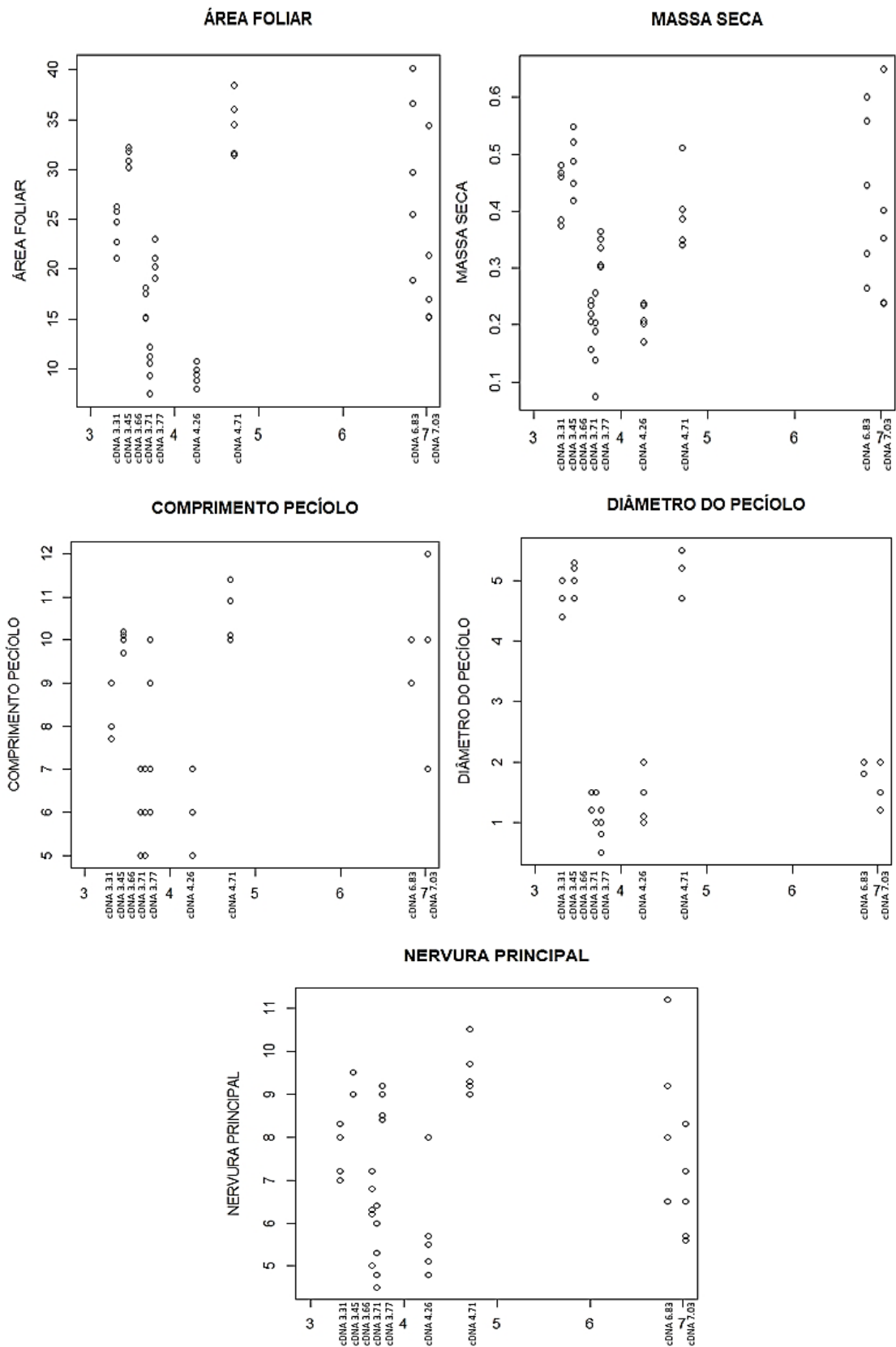


Figura 3. Gráficos de dispersão da variável área foliar (mm²), massa seca (g), comprimento do pecíolo (mm), diâmetro do pecíolo (mm), nervura principal (cm), obtidos mediante avaliação de folhas dos nove indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais, com conteúdo de DNA variando entre 3.31 e 7.03 picogramas.

4.3.2 Micromorfologia Interna

Na análise micromorfológica a variação dos caracteres foi constatada, de forma que, os diferentes conteúdos de DNA apresentaram variabilidade, para a densidade estomática, assim como o tamanho dos estômatos.

A densidade estomática dos indivíduos com conteúdo de DNA em picogramas considerado na presente amostragem como menor (3.31, 3.45, 3.66, 3.71 e 3.77 picogramas), apresentaram maior variação comparados aos indivíduos com maior conteúdo de DNA (4.2 a 7.03 picogramas).

Na análise da largura e comprimento da célula guarda os indivíduos com conteúdo de DNA em picogramas pequeno e médio, definidos por Machado (2021) como indivíduos de ploidia 6x e 8x, apresentaram maior variação comparados aos indivíduos com maior e menor conteúdo de DNA.

A largura e comprimento do ostíolo foram de menor tamanho e menor variação comparados para os indivíduos com menor conteúdo de DNA em picogramas (3.31, 3.45 e 3.66) assim como para os indivíduos de maior conteúdo de DNA (6.83 e 7.03 picogramas). Os indivíduos com conteúdo de DNA de 3.71, 3.77, 4.26 e 4.71 apresentaram maior variação comparados aos demais.

A densidade estomática e o tamanho da célula guarda e ostíolo, em geral, reduziram com o aumento do genoma. Comportamentos similares foram observados para os dois indivíduos de menor conteúdo de DNA para largura e comprimento de células guarda e ostíolo. Essas diferenças nas variações da análise dependendo do conteúdo de DNA, apresentaram grande estabilidade, com exceção dos indivíduos de conteúdo de DNA considerado médio na presente amostragem.

Os gráficos de dispersão das variáveis densidade estomática (mm^2), largura célula guarda (μm), comprimento célula guarda (μm), largura do ostíolo (μm) e comprimento do ostíolo (μm), foram elaborados para demonstração das variações que ocorreram entre os indivíduos estudados e apresentados na Figura 4.

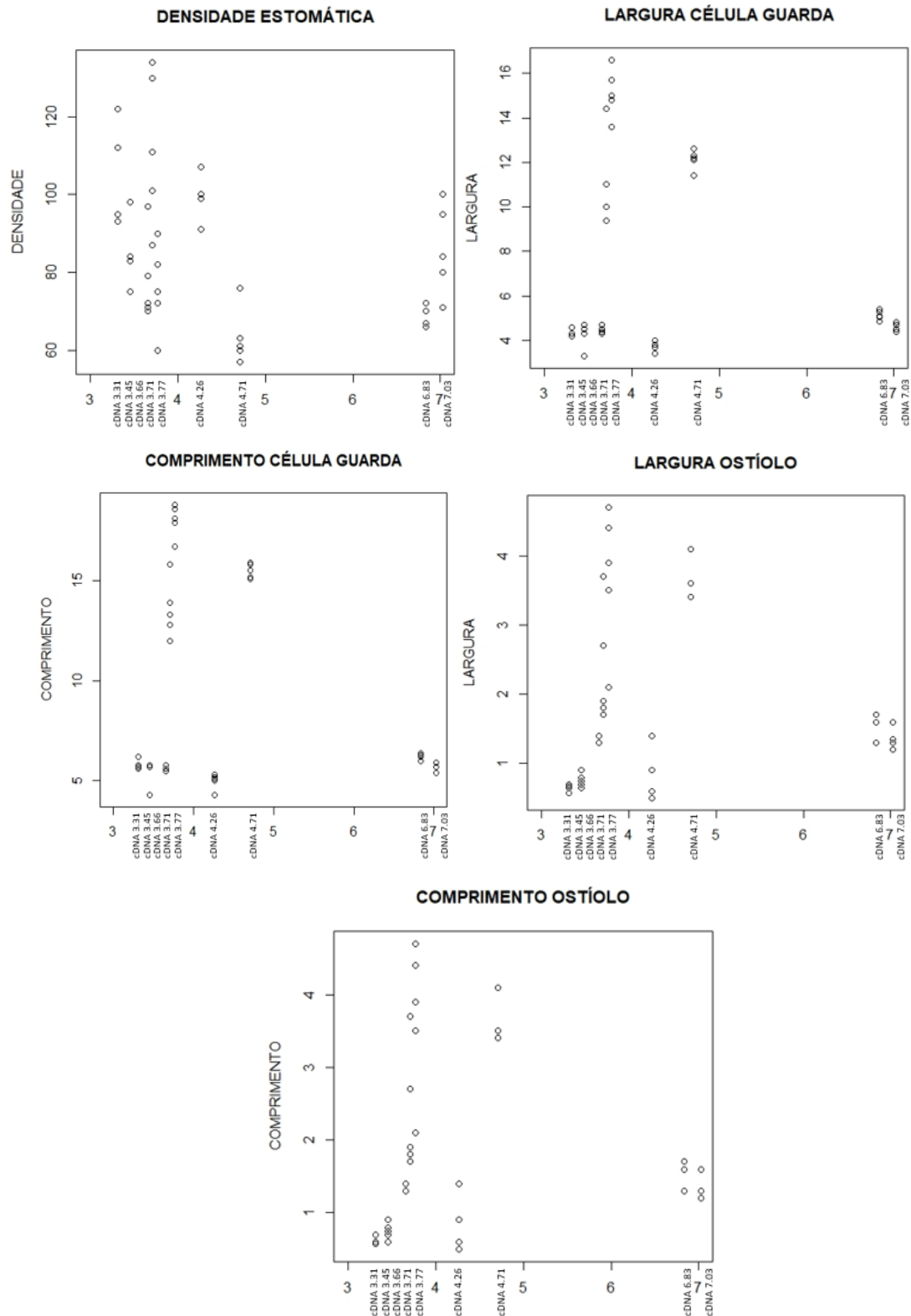


Figura 4. Gráficos de dispersão da variável densidade estomática (mm²), largura célula guarda (µm), comprimento célula guarda (µm), largura do ostíolo (µm), comprimento do ostíolo (µm), obtidos mediante avaliação de folhas dos nove indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais, com conteúdo de DNA variando entre 3.31 e 7.03 picogramas.

4.4 Discussão

Como apresentado no presente estudo, a área foliar variou entre 8 a 40 mm², em que, os diferentes conteúdos de DNA acarretam variações entre os indivíduos e as maiores variações foram visualizadas em indivíduos com o conteúdo de DNA variando de 4.26 a 7.03 picogramas. Diretamente relacionada à produção, a área foliar determina a taxa de fotossíntese realizada pela planta, já que, é a partir da mesma que a absorção de energia luminosa é realizada, o que influencia diretamente no desenvolvimento do indivíduo (MATOS, 2015).

No gênero *Psidium*, as variações de tamanho da folha são descritas entre 4 e 16 cm de comprimento e 3 a 8 cm de largura (BEZERRA et al., 2016). Segundo Silva (2019), analisando características morfoanatômicas das folhas de *P. cattleyanum* Sabine, os indivíduos estudados apresentam diferenças de área variando de 29,35 mm² a 44,14 mm², caracterizando-as segundo a classificação de Cain et al. (1956 in Silva, 2019) podendo ser micrófila com 2,25-20,25 mm² e notófila com variação entre 20,25 a 45,0 mm².

O limbo que é a estrutura foliar responsável por manter concentrações de moléculas de clorofila que participam nos processos metabólicos da planta, assim como, pelo armazenamento de nutrientes utilizado em tais processos e em outros processos de desenvolvimento dos indivíduos, com isso, quanto maior tamanho do limbo, maior será o acúmulo de elementos provenientes da produção fotossintética, resultando em quantidade maior de massa seca (MARIANO et al., 2019).

Segundo Silva (2019), a variação da massa seca obtida em seu trabalho foi de 0.01 a 0.61 (g). Os dados obtidos no presente estudo demonstraram a variação de 0.07 a 0.63 (g) para a massa seca das folhas, em que, os indivíduos com maiores conteúdos de DNA apresentaram maior variação de massa seca de 0.2 a 0.63 (g), sendo eles com 4.71, 6.83 e 7.03 picogramas.

Como estrutura de sustentação o pecíolo e a nervura principal são responsáveis por assegurar a estabilidade das folhas junto ao caule e assim garantir a permanência das mesmas na planta, com isso, características de tamanho do pecíolo e nervura principal citadas na literatura científica para a família Myrtaceae, variam entre 0.5 a 2.5 cm e 8 a 15 cm de comprimento, respectivamente (LIMA, 2018).

As variações de 0,5 a 1,5 cm para o diâmetro e comprimento do pecíolo e de 4 a 11 cm para o comprimento da nervura principal, foram descritas neste estudo, para o comprimento do pecíolo os indivíduos com maiores conteúdos de DNA apresentaram maior comprimento, sendo eles com 4.71, 6.83 e 7.03 picogramas. Para o diâmetro do pecíolo, os indivíduos com 3.31, 3.45 e 4.71 apresentaram o maior diâmetro e em relação à nervura principal os indivíduos com 4.71, 6.83 e 7.03 picogramas de DNA, apresentaram maior variação.

Como a poliploidização é um evento que resulta no aumento do conteúdo de DNA, a mesma pode induzir ao aumento das variações fenotípicas, quando comparadas a espécies diplóides. Por meio da avaliação morfológica realizada no presente estudo, essas variações intraespecíficas foram observadas (Mendes, 2013).

Os estudos de características morfológicas e micromorfológicas são métodos indiretos na identificação de poliploidia baseados no entendimento de que, a mesma influência no aumento das células e órgãos do indivíduo, porém, a confirmação é obtida a partir da contagem do número cromossômico por células em diferentes indivíduos da espécie (MENDES, 2013).

As principais alterações nas características morfológicas descritas na literatura são visualizadas nas flores, frutos, área foliar e densidade dos estômatos (Sol et al. 2009; Van Laere et al. 2011; Trojak-Goluch, Skomra 2013; Tan et al. 2015; Niek et al., 2017). Como atividade principal da folha, a fotossíntese, que é um processo físico-químico e permite transformar a energia luminosa, o dióxido de carbono e a água, em energia química armazenada em forma de glicose, é a característica de estudo utilizado na avaliação da produtividade do indivíduo (MATOS, 2015). Associado ao controle das trocas gasosas e transpiração, densidade e tamanho dos estômatos também fazem parte dessa avaliação (ALMEIDA, 2018).

Em relação a análise estomática realizada no presente estudo, a densidade estomática variou de 57 a 134 estômatos por mm^2 e de 4 a 19 μm para o tamanho dos estômatos. Assim, os indivíduos com menor conteúdo de DNA em picogramas apresentaram maior variação na densidade dos estômatos. E os indivíduos com 3.71, 3.77 e 4.71 picogramas de DNA apresentaram maior variação em relação ao tamanho dos estômatos. Segundo Wisniewsk (2003), a densidade e tamanho dos estômatos são características de grande variação

dentro da espécie *P. cattleyanum*, podendo a densidade por mm² chegar à média de 140 estômatos e seu tamanho variar de 3 a 27.5 µm.

Atuando em conjunto com outros fatores, como fisiológicos e ambientais, a poliploidia é uma fonte de variabilidade que pode resultar em polimorfismos genotípicos e fenotípicos muito desejado no melhoramento vegetal. Assim, espera-se que, com o aumento do conteúdo de DNA, que resulta no aumento do núcleo e conseqüentemente aumento do tamanho das células, órgãos maiores sejam formados e o desenvolvimento de características que favoreçam a sobrevivência da espécie sejam vantajosas (MANCINI et al., 2021).

Mancini et al. (2021), desenvolvendo estudos com indivíduos poliplóides de *Solanum elaeagnifolium*, que possuem frutos com alto teor de solasodina utilizados na fabricação comercial de hormônios esteroides, visualizou que as características morfológicas estudadas não tiveram correlação positiva com efeitos da poliploidização. Porém, relatou que, as conseqüências da poliploidização podem gerar diferenciação ecológica entre os diferentes níveis de ploidia favorecendo a estabilidade de ploidias específicas.

O estudo da relação entre características fenotípicas e diferentes conteúdos de DNA é necessário para entendimento de como a ploidia interfere no desenvolvimento da característica e expressão de diferentes caracteres. No presente estudo foi perceptível a ocorrência de variações e semelhanças entre os indivíduos com diferentes conteúdos de DNA em picogramas, porém não ocorreu a correlação positiva entre as características e o conteúdo de DNA.

O objetivo de conservar ou melhorar a expressão de caracteres para melhor desempenho da espécie, é relevante para programas de melhoramento. Entender a correlação biológica, além dos números resultantes da avaliação e as variações identificadas, sugerem que os diferentes conteúdos de DNA afetam os atributos dos indivíduos da espécie de maneiras diferentes (ALVES, 2019).

4.5 Conclusão

A avaliação da morfologia e micromorfologia das folhas em indivíduos com diferentes conteúdos de DNA possibilitou o entendimento de que, os diferentes conteúdos de DNA dos indivíduos geram diferentes respostas estando os mesmos crescendo no mesmo ambiente e sob as mesmas condições naturais para realizar seus processos fisiológicos.

Mediante a avaliação realizada, o aprimoramento dos métodos de melhoramento para a espécie que pode vir a se tornar uma potência em produção de frutos e utilização de indivíduos para o reflorestamento pode ser alcançado, visto que, os indivíduos com conteúdo de DNA médios, foram os que apresentaram menor variação nos tamanhos da área foliar, comprimento e diâmetro do pecíolo, assim como a massa seca e tamanho da nervura principal, além de, maiores características mediante avaliação dos estômatos.

Entendendo que a variabilidade é um atributo almejado nos programas de melhoramento, selecionar as características que são naturalmente maiores, pode resultar em uma descendência com as características agronômicas mais desejadas.

4.6 Referências

- ALMEIDA, M. de.; ALMEIDA, C. V. de. **MORFOLOGIA DA FOLHA DE PLANTAS COM SEMENTES**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2018. 11 p. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/biblioteca/pdf/morfologia_folha.pdf>. Acesso em: 11 de ago. 2021
- ALVES, B. L. **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES DE TANGERINEIRA**. 2019. 37 p. Dissertação (Mestrado) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA / Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Cruz das Almas, BA. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufrb.edu.br/bitstream/prefix/1073/1/Disserta%20Bernardo%20Lovatti.pdf>>. Acesso em: 06 de jan. 2022
- ANWAR, M.; SALEEM, M. A.; DAN, M.; MALIK, W.; UL-ALLAH, S.; AHMAD, M. Q.; QAYYUM, A.; AMJID, M. W.; ZIA, Z. U.; AFZAL, H.; ASIF, M.; RAHMAN, M. A. U.; HU, Z. (2022). Morphological, physiological and molecular assessment of cotton for drought tolerance under field conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 29, n. 1, p. 444-452. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X21008032>>. Acesso em 23 de fev. 2022
- BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA-JUNIOR, J. F. da.; FRANZON, R. C.; SOUSA-SILVA, J. C.; CAMPOS, L. Z. de O.; PROENÇA, C. E. B. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Centro Oeste**. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, DF. 2016. 1.160 p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1073409>>. Acesso em: 22 de out. 2021
- CORNEILLIE, S.; STORME, N.; ACKER, R. V.; FANGEL, J. U.; BRUYNE, M.; RYCKE, R.; GEELEN, D.; WILLATS, W. G. T.; VANHOLME, B.; BOERJAN, W. (2019). Polyploidy Affects Plant Growth and Alters Cell Wall Composition. *Plant Physiology*, v. 179, n. 1, p. 74–87. Disponível em: <<https://doi.org/10.1104/pp.18.00967>>. Acesso em: 25 de março, 2022.
- COSTA, I. R. da. **Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em Myrteae, enfatizando Psidium e gêneros relacionados**. 2009. 244 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas / Instituto de Biologia. Campinas, SP. Disponível em: <<http://www2.ib.unicamp.br/profs/cjoly/0%20%20Produ%20E7%E3%20Tematico/3%20%20Teses/2009/COSTA,%20I.R.%202009%20UNICAMP.pdf>>. Acesso em: 05 de maio 2020
- FREIRE, C. G. **PROPAGAÇÃO IN VITRO DE ARAÇAZEIRO-VERMELHO (Psidium cattleianum SABINE, MYRTACEAE) E SUA INTERAÇÃO COM FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS**. 2016. 121 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Oeste de Santa Catarina. Videira, SC. Disponível em: <https://www.unoesc.edu.br/images/uploads/mestrado/Freire%20Cassio_Geremia.._Disserta%20C3%A7%C3%A3o_Ci%C3%A4ncia_e_Biotecnologia._2016..pdf>. Acesso em: 09 de jun. 2021
- HISTER, C. A. L. **Genotoxicidade, Citotoxicidade, Compostos Fenólicos e Viabilidade Polínica de Psidium Cattleianum Sabine (Myrtaceae)**. 2015. 87 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria / Centro de Ciências Naturais e Exatas no Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia. Santa Maria, RS. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/4892/HISTER%20CARMINE%20APARECID A%20LENZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 24 de mai. 2020
- HU, Y., SUN, D., HU, H., ZUO, X., XIA, T., & XIE, J. (2021). A comparative study on morphological and fruit quality traits of diploid and polyploid carambola (*Averrhoa carambola* L.) genotypes. *Scientia Horticulturae*, v. 277, n. 109843. Disponível em: <[doi:10.1016/j.scienta.2020.109843](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109843)>. Acesso em: 26 de março, 2022
- LIMA, D. O. **Agrupamento colorimétrico, anatômico e quimiotaxonômico da madeira de 10 espécies de Eucalyptus spp**. 2018. 57 p. Dissertação (Mestrado) - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO / Programa de Pós-Graduação em Ciências

Ambientais e Florestais. Seropédica, RJ. Disponível em:
<<https://tede.ufrj.br/jspui/bitstream/jspui/4737/2/2018%20-%20Dayane%20Oliveira%20Lima.pdf>>. Acesso em: 08 de jan. 2022

MACHADO, R. M. **POLIPLOIDIA EM *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae): IMPLICAÇÕES CITOGENÉTICAS E EVOLUTIVAS**. 2021. 124 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas / Instituto de Biologia. Campinas, SP. Disponível em: <http://143.106.227.105/bitstream/REPOSIP/364416/1/Machado_RaquelMoura_D.pdf>. Acesso em: 23 de set. 2021

MANCINI, M.; CHIARINI, F.; CLAVIÑO, A.; STIEFKENS, L.; ESTUDIOS CITOGENÉTICOS Y MORFO-ANATÓMICOS COMPARATIVOS ENTRE DIPLOIDES Y POLIPLOIDES DE *Solanum elaeagnifolium* (SOLANACEAE). **Bol. Soc. Argent. Bot.** 56: 151-169 p., 2021. Disponível em: <<http://www.scielo.org.ar/pdf/bsab/v56n2/1851-2372-bsab-56-02-31.pdf>>. Acesso em: 12 de dez. 2021

MARIANO, G. V. P.; SILVA, V. P. G. da.; ALMEIDA, M. B. Á.; SANTIAGO, V. de O.; CARMO, M. de C. A. do.; VALE, V. S. do. ÁREA FOLIAR ESPECÍFICA E TEOR DE ÁGUA PARA DIFERENTES COMPONENTES FOLIARES EM ESPÉCIES DE CERRADO. **ACSA**, Patos-PB, v.15, n.3, p. 179-183, Edição Especial IV CONEFLO, 2019. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v15i3.1173>>. Acesso em: 16 de ago. 2021

MATOS, R. M. de.; SILVA, P. F. da.; LIMA, S. C. de.; SANTOS, C. S. dos.; NETO, J. D. CARACTERÍSTICAS FOLIARES E ÍNDICE DE COLHEITA DO RABANETE IRRIGADO COM ÁGUA RESIDUÁRIA EM AMBIENTE PROTEGIDO. Goiânia, **Enciclopédia Biosfera**, v.11 n.21; p. 372, 2015. Disponível em:<<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2015b/agrarias/Caracteristicas%20foliares.pdf>>. Acesso em: 25 de nov. 2021

MENDES, M. G. **VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA EM POPULAÇÕES DE HANDROANTHUS OCHRACEUS (BIGNONIACEAE) COM SISTEMAS REPRODUTIVOS E PLOIDIAS DISTINTOS**. 2013. 111 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia / Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15867>>. Acesso em: 18 de nov. 2021

MORI, S.; YAHATA, M.; KUWAHARA, A.; SHIRONO, Y.; UENO, Y.; HATANAKA, M.; HONDA, Y.; SUGIYAMA, K.; MURATA, N.; OKAMOTO, Y.; WAGATSUMA, T. (2021) Morphological Characterization of Tetraploids of *Limonium sinuatum* (L.) Mill. Produced by Oryzalin Treatment of Seeds. *Horticulturae*, v. 7, n. 248. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/horticulturae7080248>>. Acesso em: 26 de março, 2022.

POSSA, J. **Compostos bioativos e capacidade antioxidante de araçás (*Psidium Cattleianum* Sabine) morfotipo amarelo e vermelho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2016. 45 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Departamento de Nutrição. Porto Alegre, RS. Disponível em:<<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/144320/000998766.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 26 de mai. 2020

ROSSI, D. A. **ESTABILIDADE FENOTÍPICA E AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS DE CULTIVARES DE MORANGUEIRO *Fragaria x ananassa* Duch. EM DIFERENTES AMBIENTES DE CULTIVO**. 2014. 81 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro / Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento De Plantas. Campos Dos Goytacazes, RJ. Disponível em: <<https://uenf.br/posgraduacao/gmp/wp-content/uploads/sites/6/2014/06/Tese-DS-Drieli-Aparecida-Rossi1.pdf>>. Acesso em: 13 de nov. 2021

SALEEM, M. A.; MALIK, W.; QAYYUM, A.; et al. (2021). Impact of heat stress responsive factors on growth and physiology of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Mol Biol Rep**, n. 48, p. 1069–1079. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06217-z>>. Acesso em: 25 de março, 2022.

SILVA, A. M. da. **INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES LUMINOSAS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE *Psidium cattleianum* Sabine (MYRTACEAE)**. 2019 61 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras / Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada. Lavras, MG. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/33215/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Influ%C3%A4ncia%20de%20diferentes%20condi%C3%A7%C3%B5es%20luminosas%20sobre%20as%20caracter%C3%ADsticas%20morfoanat%C3%B4micas%20e%20fisiol%C3%B3gicas%20de%20Psidium%20cattleianum%20Sabine%20%28Myrtaceae%29.pdf>. Acesso em 15 de fev. de 2020

WISNIEWSKI, C.; BOEGER, M. R. T. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. **Revista Brasil Bot.**, São Paulo, V.26, n.1, p.61-72, mar 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v26n1/v26n1a07.pdf>>. Acesso em: 12 de fev. de 2020.

5. CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE POLÍNICA EM INDIVÍDUOS DE *Psidium cattleyanum* Sabine (Myrtaceae) COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE DNA

5.1 Introdução

Psidium cattleyanum Sabine, é uma espécie que apresenta diferentes números cromossômicos descritos $2n = 44, 55, 66, 77, 88, 99, 110$ e 132 incluindo citótipos não múltiplos do número básico para a família ($x = 11$), como $2n = 46, 48, 55, 58, 77, 82$, descrita como poliplóide natural (Atchison, 1947; Hirano e Nakazone, 1969; Singhal et al. 1984; Raseira e Raseira, 1996; Costa e Forni-Martins, 2006; Costa, 2009; de Souza et al. 2014; Machado, 2016; Souza-Pérez e Speroni, 2017; Machado, 2021)

A poliploidia estudada em populações naturais, resulta na compreensão das variações ocasionadas pela mesma o que gera a identificação de como as características do indivíduo podem ser alteradas mediante aos diferentes conteúdos de DNA (ROSSI, 2014).

A caracterização do sistema reprodutivo auxilia na compreensão do padrão de reprodução, relação planta-polinizador, diversidade genética e o comportamento de perpetuação da espécie de forma geral (MACHADO, 2021). O entendimento da atuação de tais características, proporciona o desenvolvimento de métodos que auxiliam na preservação de coleções de germoplasma e manutenção da mesma (COSTA, 2009).

Para entender a dinâmica reprodutiva, o estudo da qualidade do pólen é necessário, visto que, o mesmo influencia diretamente no tamanho do fruto, formação de maior número de sementes e qualidade no desenvolvimento do mesmo. Assim, testes de germinação do grão de pólen *in vitro*, *in vivo* e testes colorimétricos, são formas de avaliar a viabilidade do grão de pólen por meio da identificação da qualidade e integridade celular do mesmo (SANTOS, 2020).

Dentro da família Myrtaceae o gênero *Psidium* está entre os mais difíceis de delimitar as espécies, com isso, utilizar o estudo das características do grão de pólen tem grande importância para entendimento de características exclusivas de uma espécie específica. Dentro do gênero, o grão de pólen é classificado como isopolar, de abertura angulaperturate, e tamanho variando de pequeno a médio. O tipo de abertura, tamanho da mesma, ornamentação da

sexina que é a camada mais externa do grão de pólen e a morfologia de forma geral são evidências de diferenciação entre grupos de espécies dentro do gênero (TULER et al., 2017).

Dentre os diferentes métodos de avaliação da viabilidade polínica, os métodos colorimétricos possuem vantagens, pois utilizam corantes químicos que reagem com componentes celulares específicos presente no grão de pólen, e são eficazes, rápidos e de baixo custo para preparação das lâminas. Desde a coleta do botão floral, armazenamento e posterior utilização, é possível definir o tempo para cada etapa de acordo com o desenvolvimento do botão floral entre os diferentes indivíduos que vão ser avaliados e os processos necessários para a avaliação (SILVA; AMARAL, 2021).

Compreender a biologia reprodutiva auxilia no desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo a ser adotado para a espécie em estudo. Além disso, conhecer o papel do agente polinizador, comportamento na polinização, tempo de cada estágio fenológico, tempo de floração e frutificação, interferência do ambiente nas características reprodutivas, são fundamentais para a seleção de genótipos (NETO, 2018).

Sabendo que, no melhoramento genético os cruzamentos controlados tem por objetivo gerar híbridos e obter as melhores características de interesse agrônomo e ornamental, o conhecimento sobre a viabilidade e desenvolvimento dos grãos de pólen são essenciais para garantir os primeiros indicativos de que o sucesso na reprodução será alcançado, pois, o bom índice de fertilização depende diretamente da viabilidade polínica (VIDA, et al., 2014).

Assim, considerando que são descritos treze citótipos na espécie *P. cattleyanum*, o objetivo foi avaliar a viabilidade polínica, relacionando à variações dos diferentes conteúdos de DNA descritas na espécie.

5.2 Material e Métodos

A presente pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizada no município de Alegre, utilizando botões florais de indivíduos que fazem parte da coleção de germoplasma da área experimental da Universidade (Figura 1), que conta com mais de 30 indivíduos. Os dados da citometria de fluxo usado no presente estudo foram obtidos a partir de folhas jovens de cada genótipo, livres de qualquer dano por doenças, pragas ou deformidades, para determinação do valor $2C$ e do obtenção da %CG. As análises foram conduzidas no Laboratório de Citogenética e Citometria, pertencente à Universidade Federal de Viçosa, localizada no município de Viçosa – Minas Gerais. O padrão interno utilizado para as análises foi *Solanum lycopersicum* Linnaeus, 1753, 'Stupické' ($2C = 2,00$ pg) (PRAÇA-FONTES et al., 2011; SILVA, 2020).

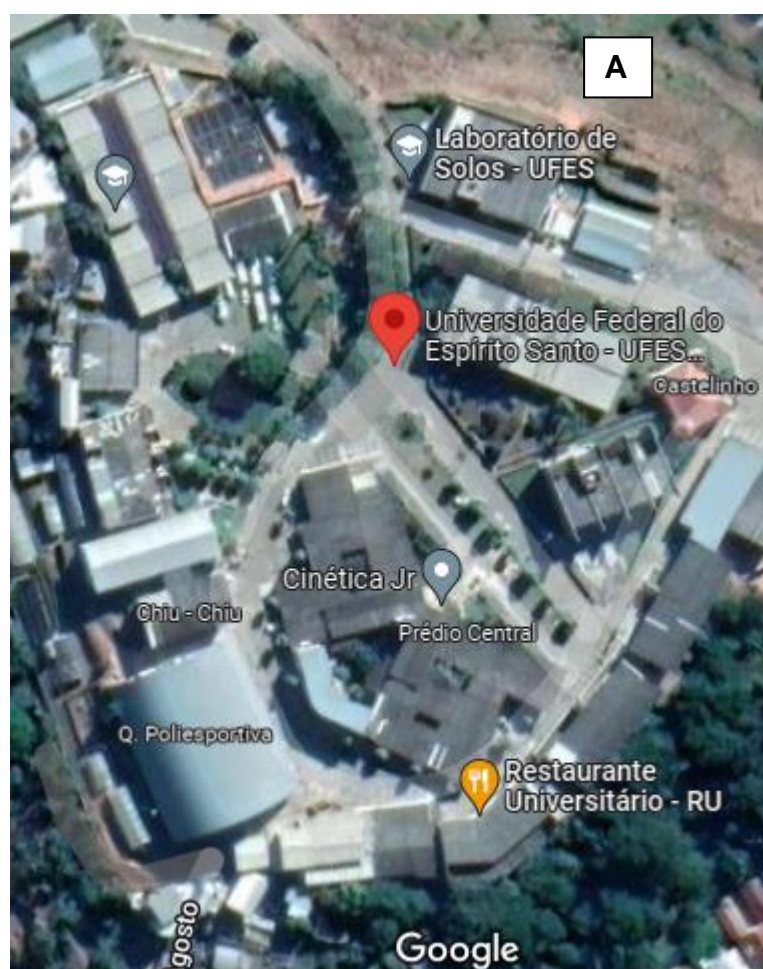


Figura 5. Área de coleta do Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Legenda A: Área experimental do Centro. Fonte: Google Maps (com adaptações) (2022).

O material botânico utilizado foi coletado a partir de indivíduos crescendo em condições naturais na Área experimental da UFES (20° 45 '40.7 ``S e 41° 32' 08.3"W) – campus de Alegre, no período de outubro a novembro do ano de 2021. Todos os trinta indivíduos estão representados na tabela abaixo.

Tabela 2. Apresentação dos trinta indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* cultivados no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Área experimental do Centro, em condições naturais. Com variações de DNA entre 3.3 e 4.26 picogramas

Identificação do Espécime	Conteúdo de DNA nuclear (pg)
CAT 118	3.84
CAT 119	3.63
CAT 120	3.86
CAT 121	3.95
CAT 122	3.655
CAT 123	3.675
CAT 124	3.67
CAT 125	3.40
CAT 126	3.679
CAT 127	3.68
CAT 128	3.652
CAT 129	3.39
CAT 130	3.64
CAT 131	3.60
CAT 132	3.34
CAT 133	3.52
CAT 134	3.44
CAT 135	3.66
CAT 136	3.38
CAT 137	3.68
CAT 138	3.69
CAT 139	3.64
CAT 140	3.90
CAT 141	3.65

CAT 142	3.91
CAT 143	3.59
CAT 144	4.26
CAT 145	3.54
CAT 146	3.74
CAT 147	3.86

5.2.1 Material Vegetal

Um total de onze indivíduos de *P. cattleyanum* foram utilizados neste estudo, representados na tabela abaixo.

Tabela 3. Caracterização dos onze indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* cultivados no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, em condições naturais. Com variações de DNA entre 3.3 e 3.91 picogramas e sua ploidia

Identificação do Espécime	Local de coleta	Conteúdo DNA em picogramas	Ploidia*
118	Área Experimental - UFES	3.84	7x
119	Área Experimental - UFES	3.63	6x
127	Área Experimental - UFES	3.68	6x
129	Área Experimental - UFES	3.39	6x
132	Área Experimental - UFES	3.34	6x
136	Área Experimental - UFES	3.38	6x
139	Área Experimental - UFES	3.64	6x
140	Área Experimental - UFES	3.90	7x
142	Área Experimental - UFES	3.91	7x
145	Área Experimental - UFES	3.54	6x
147	Área Experimental - UFES	3.86	7x

*Ploidia descrita segundo Machado (2021).

Os botões florais foram retirados de um único ramo (Figura 6), entendendo que na mesma planta ocorra a mesma viabilidade do pólen. Os mesmos foram destinados à preparação de lâminas para avaliação da viabilidade polínica pelo método de coloração.

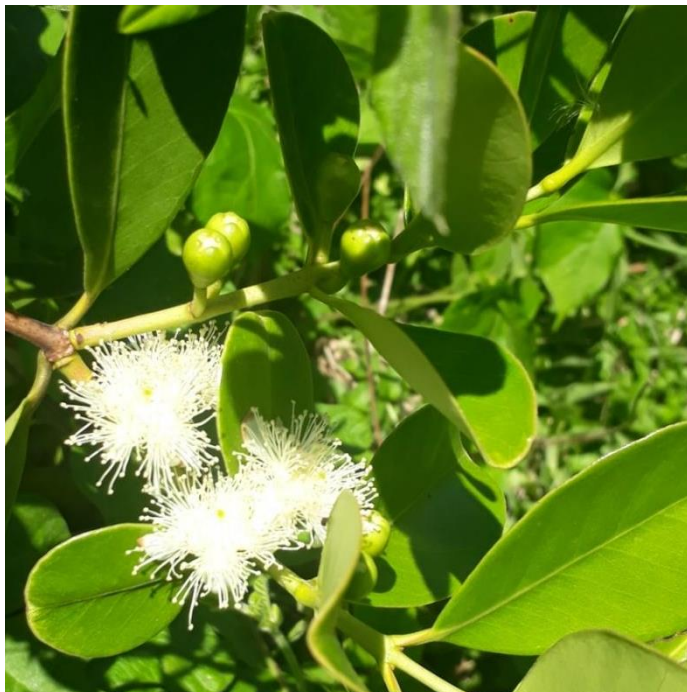


Figura 6. Foto ilustrativa de botões florais e flores de um indivíduo de *P. cattleyanum* identificado pelo número 133, cultivado no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.52 picogramas. Fonte: O Autor, 2021.

5.2.2 Viabilidade polínica

Para análise da viabilidade polínica, os botões florais foram coletados em fase de pré-antese, após o período chuvoso que ocorreu entre os dias 05 e 20 de outubro de 2021. Os botões florais coletados foram fixados em metanol e ácido acético (3:1) e armazenados no freezer -20° no Laboratório de Citogenética da UFES, para análise posterior.

Lâminas foram confeccionadas, a partir do corte transversal do botão floral com auxílio de um bisturi. Foram selecionadas aleatoriamente cinco anteras, que foram reidratadas, ficando submersas por três minutos em solução de ácido clorídrico (5 M HCl).

Com o auxílio do papel toalha o ácido clorídrico foi removido, e o corante Alexander contendo fucsina ácida e verde malaquita que reage com o protoplasma e a celulose da parede do pólen, respectivamente, foi aplicado (ALEXANDER, 1969). Durante 5 minutos as anteras submersas no corante

foram trituradas e por mais 15 minutos os grãos de pólen permaneceram submersos no corante. Após o tempo dos 20 minutos, a lamínula foi colocada sobre os grãos de pólen corados, como mostrado na Figura 7 (Adaptado de SILVA et al., 2017).

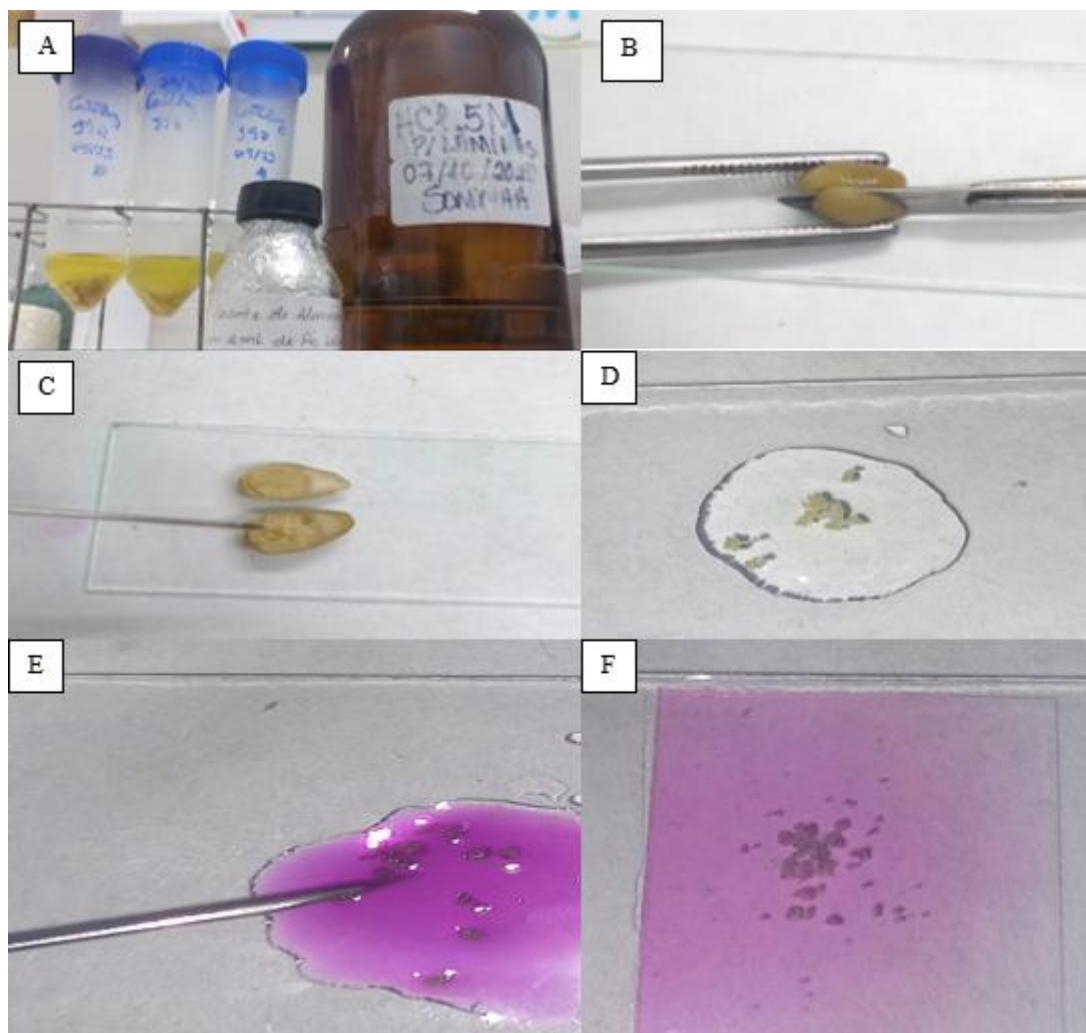


Figura 7. Preparo das lâminas de grão de pólen no Laboratório de Citogenética entre os meses de dezembro (2021) e janeiro (2022). Foto ilustrativa com grãos de pólen de um indivíduo de *P. cattleyanum* identificado pelo número 147, cultivado no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.86 picogramas. Legenda A: Botões, corante e ácido clorídrico solução (5M HCl). Legenda B: Corte do botão floral. Legenda C: Remoção das anteras. Legenda D: Anteras imersas no ácido clorídrico. Legenda E: Grãos de pólen sendo corados. Legenda F: Lâmina pronta para análise. Fonte: O Autor, 2022.

Os grãos de pólen foram classificados de acordo com o tamanho, morfologia e capacidade de coloração, e um total de mil grãos de pólen por lâmina foram identificados, sendo confeccionado três lâminas por indivíduo. Os grãos de pólen de tamanho maior, formato regular e protoplasma corado foram classificados como viáveis e os grãos de pólen de tamanhos menores, formato

irregular e coloração fraca ou não corados, foram identificados como inviáveis (Figura 8). A partir das lâminas confeccionadas foi utilizado o microscópio estereoscópico modelo Leica DM 2500 para visualização e contagem dos grãos de pólen.

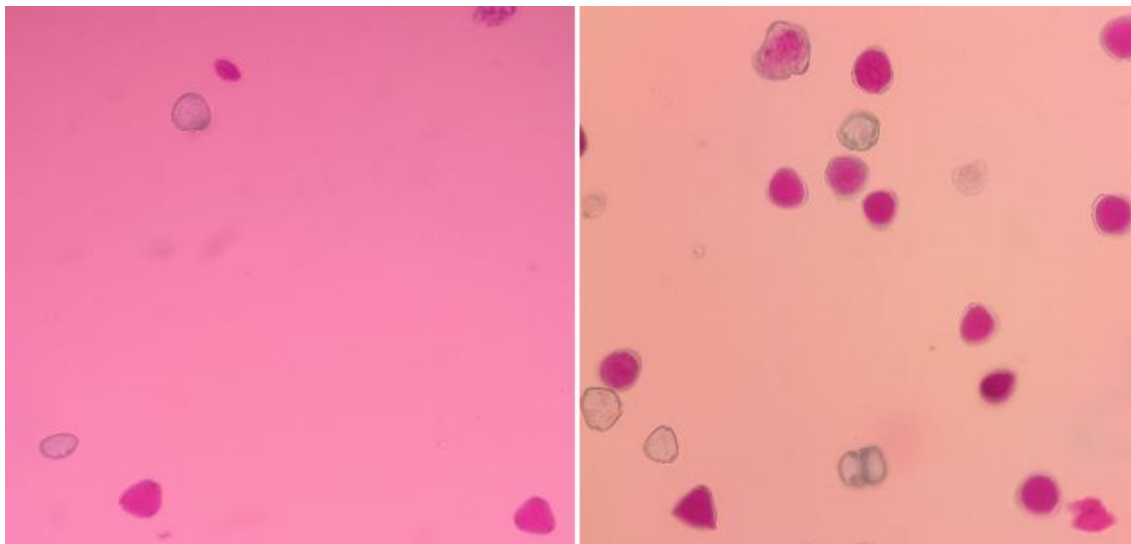


Figura 8. Foto ilustrativa com grãos de pólen corados, pouco corados e vazios de um indivíduo de *P. cattleyanum* identificado pelo número 118, cultivado no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.84 picogramas, observados com o auxílio da objetiva de 40x pelo microscópio estereoscópico modelo Leica DM 2500.

Para o cálculo da porcentagem de pólenes viáveis e inviáveis utilizou-se a fórmula:

$$\text{Viabilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de pólenes viáveis}}{\text{n}^\circ \text{ total de pólenes contados}} * 100$$

6.2.3 Análise Estatística

Os valores obtidos após a contagem dos grãos de pólen viáveis e inviáveis foram tabulados em planilhas para a construção das descrições e realização das análises.

Utilizou-se análises estatísticas das variáveis para verificar diferenças significativas ($p < 0,05$) e gráficos foram realizados utilizando o software R Core Team (2021), para demonstração dos resultados obtidos.

5.3 Resultados

Foi constatada variação na viabilidade polínica entre os indivíduos estudados. O cálculo da porcentagem de pólen viáveis, resultou na tabela abaixo.

Tabela 4. Valores percentuais de grãos de pólen viáveis obtidos para cada botão floral avaliado e a média por planta para cada um dos onze indivíduos de *P. cattleyanum*, identificados pelos números 118, 119, 127, 129, 132, 136, 139, 140, 142, 145 e 147, cultivados no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.84, 3.63, 3.68, 3.39, 3.38, 3.64, 3.90, 3.91, 3.54 e 3.86 picogramas, respectivamente

Identificação do Espécime	Botão floral 1	Botão floral 2	Botão floral 3	Média por planta	Conteúdo de DNA (pg)	Ploidia*
132	80.8	75.5	78.9	78.4	3.34	6x
136	57.8	50.2	53.6	53.8	3.38	6x
129	51.1	59.3	51.9	54.1	3.39	6x
145	58.1	73.6	57.4	63.03	3.54	6x
119	46	44.8	41.7	44.1	3.63	6x
139	63	75.9	82.5	73.8	3.64	6x
127	50.5	53.1	54.6	54.8	3.68	6x
118	47.2	37.5	46.3	43.6	3.85	7x
147	30.3	34.3	21.4	28.6	3.86	7x
142	36.8	43.3	39.7	39.93	3.90	7x
140	19.8	24.2	24.7	22.9	3.91	7x

*Ploidia definida por Machado (2021). Em destaque, os indivíduos com conteúdo de DNA que equivale a ploidia ímpar.

Os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 3.34 a 3.68 picogramas, apresentaram médias de 44 a 78% de pólen viáveis, sendo os indivíduos definidos com ploidia 6x. Já os indivíduos, com o conteúdo de DNA variando entre 3.85 e 3.91 tiveram as menores médias de pólen viáveis, variando de 22 a 43%. Definidos como indivíduos de ploidia ímpar (7x), esperava-se que a baixa

porcentagem de pólen inviáveis fosse identificada, pois erros na meiose podem ocorrer devido a ploidia ser ímpar.

O gráfico de dispersão do número de pólen viáveis e inviáveis, apresentados na Figura 9 e 10, foram elaborados para mostrar nitidamente as variações que ocorreram entre os indivíduos estudados.

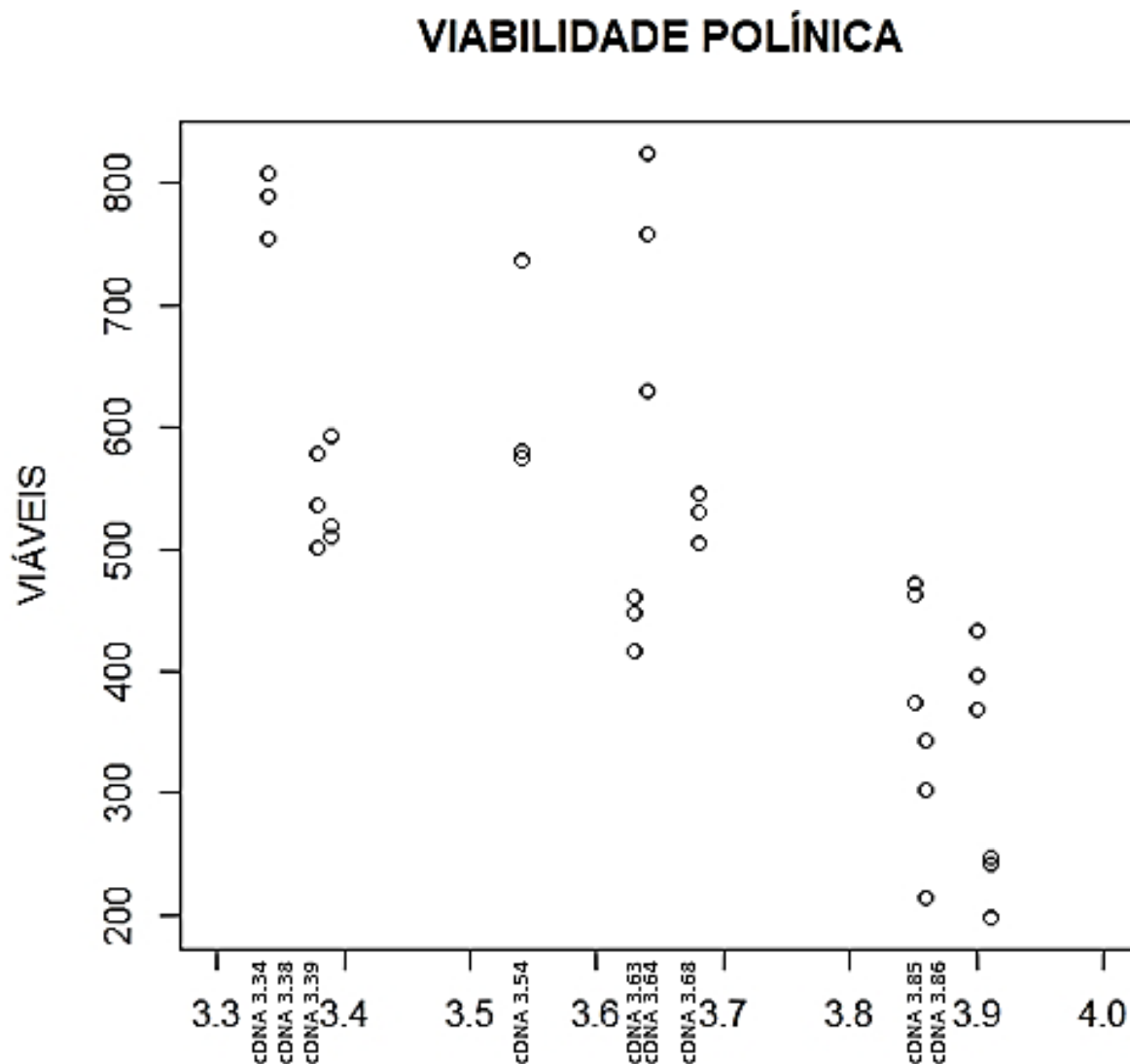


Figura 9. Dispersão de grãos de pólen viáveis, obtidos após avaliação realizada em onze indivíduos de *P. cattleyanum*, identificados pelos números 118, 119, 127, 129, 132, 136, 139, 140, 142, 145 e 147, cultivados no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.84, 3.63, 3.68, 3.39, 3.34, 3.38, 3.64, 3.90, 3.91, 3.54 e 3.86 picogramas, respectivamente.

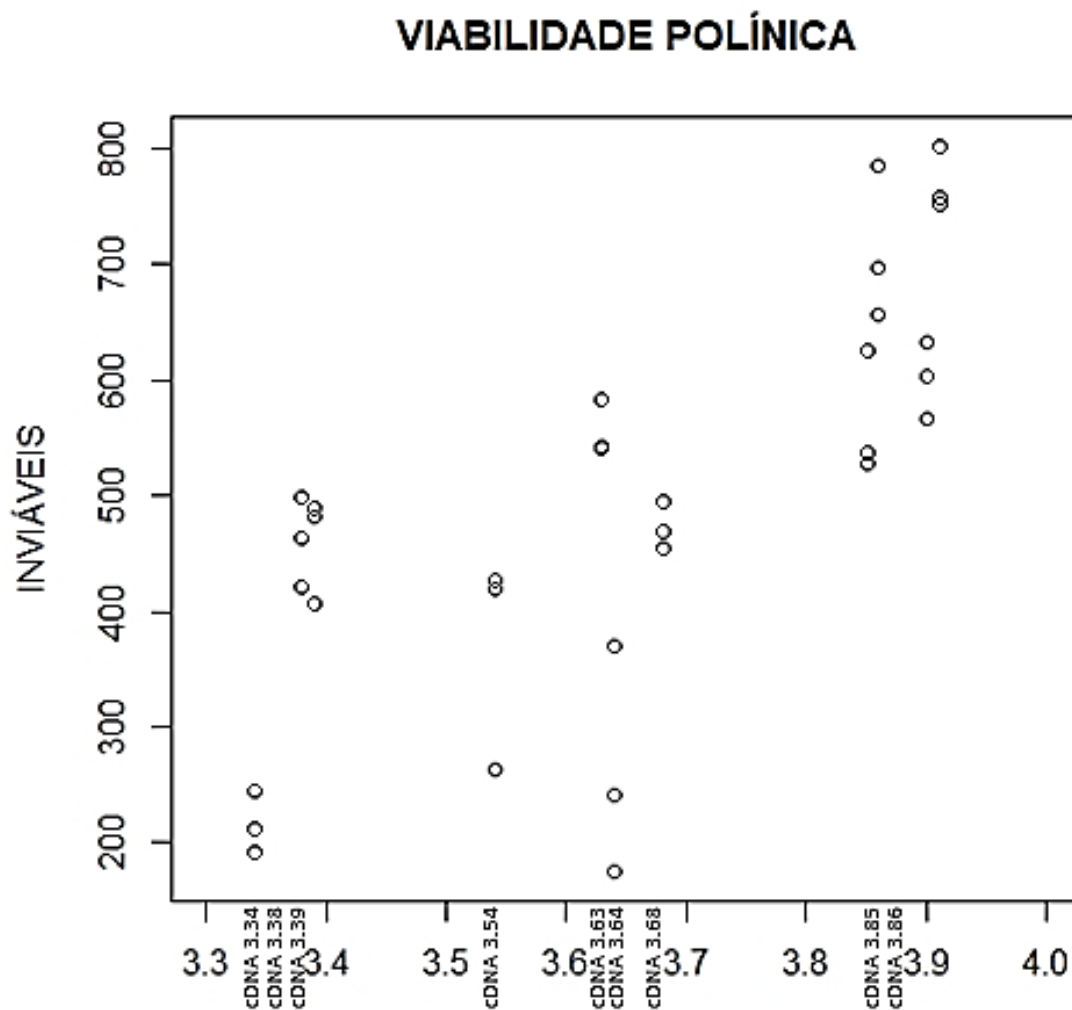


Figura 10. Dispersão de grãos de pólen inviáveis, obtidos após análise realizada em onze indivíduos de *P. cattleyanum*, identificados pelos números 118, 119, 127, 129, 132, 136, 139, 140, 142, 145 e 147, cultivados no Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo, em condições naturais. Com conteúdo de DNA nuclear de 3.84, 3.63, 3.68, 3.39, 3.34, 3.38, 3.64, 3.90, 3.91, 3.54 e 3.86 picogramas, respectivamente.

Com a variação de pólen viáveis na figura 9 foi possível identificar que, os indivíduos com 3.90 e 3.91 picogramas de DNA, apresentaram o menor número de grãos de pólen viáveis. Assim como, os indivíduos com conteúdo de DNA em picogramas, variando de 3.34 a 3.54 apresentaram maior quantidade de grãos de pólen viáveis e os indivíduos variando de 3.63 a 3.68 apresentaram maiores variações, tendo maiores e menores porcentagem de grãos de pólen viáveis e inviáveis.

5.4 Discussão

Descrita como poliplóide natural, a espécie de *Psidium cattleianum* apresenta diferentes conjuntos cromossômicos por célula, e o mesmo pode não ser do número básico para a família ($x = 11$). Observando o resultado obtido por meio do cálculo da porcentagem, foi possível visualizar que os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 3.34 a 3.68 picogramas, apresentou uma média de 44 a 78% de pólenes viáveis, sendo os indivíduos definidos por Machado (2021), com ploidia 6x. Já os indivíduos, com o conteúdo de DNA variando entre 3.85 e 3.91 tiveram as menores médias de pólenes viáveis, variando de 22 a 43%. Definido por Machado (2021), como ploidia ímpar (7x).

O conhecimento da viabilidade do pólen entre os indivíduos estudados é necessário, pois, permite a seleção de genótipos com melhor desempenho na multiplicação e no desenvolvimento de novas cultivares. Como os fatores ambientais, características genéticas, morfologia do pólen, desenvolvimento do tubo polínico e capacidade germinativa podem influenciar na qualidade do grão de pólen, o teste de viabilidade é o auxílio para entender se há fatores inviabilizando os mesmos (POZZOBON et al., 2018).

A prática otimizada de seleção genética para novos cultivos, requer a obtenção de informações que possibilitem melhorias na produção. Sabe-se que, no processo de formação do grão de pólen na microsporogênese, o microsporócito passa por meiose e após a citocinese, quatro micrósporos ou grão de pólen são formados e anormalidades em alguma das etapas de formação dos mesmos, podem ocorrer, formando pólenes inviáveis que impossibilita o alcance de sucesso na reprodução (SANTOS, 2020).

Mediante avaliação, a viabilidade polínica é considerada baixa quando a média atinge até 30% de pólenes viáveis, e considera alta quando se atinge médias acima de 70%. Assim, quanto maior a média da viabilidade polínica, maior é a possibilidade de fertilização e sucesso reprodutivo (NACHBAR; SOUZA, 2018).

Considerando o estudo realizado, indivíduos com ploidia ímpar atingiram a porcentagem considerada baixa para pólenes viáveis. O pólen inviável que apresenta tamanho menor, formato irregular e coloração fraca ou não corados, pode apresentar o crescimento anormal do tubo polínico, estrutura mal formada

ou não armazena o gameta. Com tais irregularidades, o indivíduo é considerado estéril, não tendo vantagem nos programas de melhoramento (POZZOBON et al., 2018).

Com a estimativa da viabilidade dos grãos de pólen, a análise do fluxo gênico pode ser realizada, pois, o potencial masculino de reprodução pode ser avaliado. Estudos genéticos, ecológicos e palinológicos podem ser desenvolvidos mediante a obtenção dessa informação. A forma variada, descrita como triangular, arredondado, oval ou disforme, o tamanho médio e formato triangular são mais observados na espécie de *P. cattleyanum* (HISTER; TEDESCO, 2016).

Obter o resultado de viabilidade polínica considerada alta, tem-se o indicativo de alta fertilidade, pois, estando correlacionada à formação de gametas masculinos normais e balanceados, o sucesso reprodutivo da espécie é mais garantido (SILVA, 2018). Assim, em relação aos indivíduos de ploidia ímpar, os indivíduos de ploidia par, apresentaram maior porcentagem de grãos de pólen viáveis, sendo indicativo que em ploidias pares a ocorrência de erros na meiose durante a formação do gameta é mais improvável.

A viabilidade polínica é um fator de grande importância para o melhoramento de plantas, levando-se em consideração que a expressão do genótipo de um indivíduo resulta da combinação dos gametas masculino e feminino, tem-se que quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos, promovendo maior variabilidade genética (SANTOS et al., 2017). As diferentes estratégias reprodutivas são descritas para a espécie de *P. cattleyanum*, como alogamia, autogamia e apomixia, a poliploidia e essas diferentes estratégias pode ser a principal influência no sucesso para sobrevivência em diferentes ambientes (MACHADO, 2021).

Dessa forma, os diferentes conteúdos de DNA afetam os atributos dos indivíduos da espécie em diferentes maneiras, a avaliação da viabilidade permite prever se o alcance do sucesso reprodutivo será obtido pelo indivíduo (ALVES, 2019).

5.5 Conclusão

Com objetivo de avaliar a viabilidade polínica em indivíduos com diferentes conteúdos de DNA e estudar essa relação, foi possível perceber que os indivíduos com conteúdo de DNA que demonstra ploidia par, tem mais chances de proporcionar a propagação da espécie por apresentar maior quantidade de pólen viável em comparação com indivíduos que apresentam ploidia considerada ímpar. Pois, foi possível identificar a menor quantidade de pólenes viáveis em indivíduos de ploidia ímpar.

Para conservar a espécie e obter melhores características de interesse agrônomo e industrial, a prática de seleção genética de novos cultivares requer conhecimentos que resultam em melhorias na produção. Com isso, identificar e selecionar indivíduos superiores, com características que favorecem sua sobrevivência e propagação da espécie quando inseridos em diferentes ambientes e expostos a mudanças climáticas está entre os primeiros passos do melhoramento genético.

O alcance do sucesso reprodutivo da espécie é uma característica indispensável para a perpetuação da mesma. A identificação da viabilidade pólen possibilita o entendimento do comportamento reprodutivo em espécie poliplóide. Entender o resultado da viabilidade em indivíduos de ploidia ímpar que tendem a apresentar erros durante a meiose e conseqüentemente formar grãos de pólen inviáveis, possibilita a ampliação de estudos para alcançar melhorias nas atividades de manejo, melhor desempenho na multiplicação dos indivíduos que resulta na formulação de melhores estratégias para a obtenção de novas cultivares.

5.6 Referências

- ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and no aborted pollen. **Stain Technology**, n.1, v. 44, p. 117-122, 1969. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10520296909063335>>. DOI:10.3109/10520296909063335.
- ALVES, B. L. **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES DE TANGERINEIRA**. 2019. 37 p. Dissertação (Mestrado) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA / Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Cruz das Almas, BA. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufrb.edu.br/bitstream/prefix/1073/1/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20Bernardo%20Lovatti.pdf>>. Acesso em: 06 de jan. 2022
- COSTA, I. R. da. **Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em Myrteae, enfatizando Psidium e gêneros relacionados**. 2009. 244 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas / Instituto de Biologia. Campinas, SP. Disponível em: <<http://www2.ib.unicamp.br/profs/cjoly/0%20-%20Produ%E7%E3o%20Tematico/3%20-%20Teses/2009/COSTA,%20I.R.%202009%20UNICAMP.pdf>>. Acesso em: 05 de mai. 2020
- HISTER, C.A.L.1; TEDESCO, S.B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p.135-141, 2016. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/z8MfZJf5zKFGTjbnCgJ7KD/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 28 de dez. 2021
- MACHADO, R. M. **POLIPLOIDIA EM *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae): IMPLICAÇÕES CITOGENÉTICAS E EVOLUTIVAS**. 2021. 124 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas / Instituto de Biologia. Campinas, SP. Disponível em: <http://143.106.227.105/bitstream/REPOSIP/364416/1/Machado_RaquelMoura_D.pdf>. Acesso em: 23 de set. 2021
- NACHBAR, L. de A. SOUZA, S. A. M. ESTIMATIVA DA VIABILIDADE POLÍNICA E POLINIZAÇÃO CONTROLADA DE VARIEDADES TRADICIONAIS DE *Cucurbita moschata* Duchesne. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.15 n.27; p. 2018 220 Disponível em: <<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2018a/agrar/estimativa%20da%20viabilidade.pdf>>. Acesso em: 09 de jan. 2022
- NETO, C. K. **BIOLOGIA FLORAL E REPRODUTIVA DE ARAÇAZEIROS (*Psidium* sp.)**. 2018. 187p. Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná / Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4011/1/PB_PPGAG_D_Kosera%20Neto%2C%20Carlos_2018.pdf>. Acesso em: 10 de jun. 2021
- POZZOBON, M. T.; SANTOS, S. dos.; MELO, L. A. M. P. de.; CARVALHO, S. I. C. de.; RIBEIRO, C. S. da C. **Análise da viabilidade polínica na avaliação e seleção de genótipos de *Capsicum* spp. Para o melhoramento genético**. Distrito Federal: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, 2018. 18 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/187848/1/Boletim-341capsicum.pdf>>. Acesso em: 12 de nov. 2021
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso: 2021
- ROSSI, D. A. **ESTABILIDADE FENOTÍPICA E AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS DE CULTIVARES DE MORANGUEIRO *Fragaria x ananassa* Duch. EM DIFERENTES AMBIENTES DE CULTIVO**. 2014. 81 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Do Norte

Fluminense Darcy Ribeiro / Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento De Plantas. Campos Dos Goytacazes, RJ. Disponível em: <<https://uenf.br/posgraduacao/gmp/wp-content/uploads/sites/6/2014/06/Tese-DS-Drieli-Aparecida-Rossi1.pdf>>. Acesso em: 13 de nov. 2021

SANTOS, K. S.; PASSOS, A. R. SEREJO, J. A. S. LINO, L. S. M. CHAVES, M. C. SANTOS, R. M. F. Microsporogenesis and pollen viability in *Physalis ixocarpa*. **Cytologia** 82(4):363-367, sep. 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/321841929_Microsporogenesis_and_Pollen_Viability_in_Physalis_ixocarpa>. Acesso: 16 de jan. 2022

SANTOS, I. R. B. dos. Morfologia, viabilidade polínica e índice meiótico de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth. **Braz. J. of Develop.** Curitiba, v. 6, n. 6, p.37514-37536 jun. 2020. Disponível em: <<https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/11657/9824>>. Acesso em: 28 de nov. 2021

SILVA, C. M. de J. **INDUÇÃO DE CALOS EM ANTERAS E POLIPLOIDIA EM GENÓTIPOS DE MELANCIA**. 2018. 96 p. - Universidade Estadual de Feira de Santana / Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Feira de Santana, BA. Disponível em: <http://tede2.uefs.br:8080/bitstream/tede/631/2/TESE%202018%20-%20Doutorado%20RGV_UEFS%20-%20Carla%20Maria%20de%20Jesus%20Silva.pdf>. Acesso em: 15 de jan. 2022

SILVA, N. B. da.; AMARAL, L. F. Aplicação de testes colorimétricos para determinação da viabilidade polínica em *Catharanthus roseus* [L.] G. Don (Gentianales). **Rev. Ciênc. Agroamb.** v.19, n.2, 5 p. 2021. Disponível em: <<https://periodicos2.unemat.br/index.php/rcaa/article/view/5590/4466>>. Acesso em: 18 de jan. 2022

SILVA, S. N. da; SILVA, M. A.; SOUZA, T. M. de; FERREIRA, A.; FONTES, M. M. P.; FERREIRA, M. F. da S. (2017). Genetic parameters of pollen viability in guava ('*Psidium guajava*' L.). *Australian Journal of Crop Science*, 11(1), 1–8. Disponível em: <<https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.821228018993842>>. Acesso em 13 de set. 2021

TULER, A. C.; SILVA, T. da; CARRIJO, M. L.; MENDONÇA, C. B. F.; PEIXOTO, A. L.; ESTEVES, V. G. Taxonomic significance of pollen morphology for species delimitation in *Psidium* (Myrtaceae). **Plant Syst Evol** (2017) 303:317–327. DOI 10.1007/s00606-016-1373-8

VIDA, Á. M.; SOARES, T. L.; OLIVEIRA, E.; JESUS, O. N. de.; SOUZA, F. V. D.; CERQUEIRA, T. T. de.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos. **Germinação *in vitro* e Viabilidade Polínica em Passifloras Silvestres**. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 6, 2011, Búzios. Anais... Búzios: CBMP, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/266170143_Germinacao_In_vitro_e_Viabilidade_Polinica_em_Passifloras_Silvestres>. Acesso em: 15 de jan. 2022

6. CAPÍTULO III

COMPARAÇÃO GENÔMICA EM INDIVÍDUOS DE *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE DNA

6.1 Introdução

A genômica, definida como ciência que estuda e descreve o genoma, é um grande marco científico que revoluciona cada vez mais o conhecimento e entendimento do processo evolutivo das espécies (FIETTO; MACIEL, 2015). Parte desse estudo pode ser realizado com o desenvolvimento e uso de marcadores moleculares, definidos como, sequências de DNA que revelam polimorfismos em regiões codificantes ou não codificantes, possibilitando a detecção de variabilidade entre indivíduos o que auxilia na exploração do polimorfismo do DNA gerando avanços na construção do conhecimento em genética molecular (HENRY, 2012; TULINI, 2020).

Divididos em três categorias principais, os marcadores podem ser baseados em hibridização, Reação em Cadeia da Polimerase – *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e em sequenciamento. Classificados em dominantes, quando só é possível identificar a presença ou ausência do alelo e codominantes, quando é possível diferenciar genótipos homocigotos e heterocigotos. Conhecer a característica do marcador é importante antes de definir o objetivo do estudo a ser realizado para obter a certeza que o uso, o custo, e a reprodutibilidade será eficiente para o alcance dos resultados esperados (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

A presença de múltiplos conjuntos cromossômicos por célula no indivíduo poliploide, pode dificultar a geração de dados precisos em estudos de genotipagem, com isso, o uso dos marcadores SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo Único - Single Nucleotide Polymorphism), demonstra eficácia na obtenção de dados genotípicos de qualidade (WERKISSA, 2020). Abundância no genoma, amplamente distribuído, alta precisão e rendimento, reprodutibilidade acessível e favorecimento da detecção de alelos ligados a genes funcionais, são características que definem os SNPs como marcador preciso (SOUSA et al., 2018).

Como a montagem do genoma é o primeiro passo da análise genômica, associado ao sequenciamento de nova geração a metodologia DArTseq

(Diversity Arrays Technology) foi desenvolvida para realização da genotipagem em larga escala e de ampla amostragem do genoma que possibilita a identificação e descrição do polimorfismo (Jaccoud et al., 2001; Mwadzingen et al., 2017; Kulcheski, 2017; Santos, 2020). Segundo Sansaloni (2012), a primeira técnica DArT era baseada em hibridização de microarranjos para obtenção de polimorfismo presente ao longo do genoma. Atualmente, a técnica passou a ser baseada em sequenciamento (DArTseq), sendo de interesse para desenvolvimento de pesquisas principalmente relacionados a plantas (SOUSA et al., 2018).

A obtenção de marcadores SNPs gerados a partir do método DArTseq, permite que o estudo seja aplicado a qualquer organismo. Como a técnica é baseada no princípio de digestão do DNA total utilizando enzimas de restrição, permite a redução do genoma gerando milhares de marcadores em um único ensaio, e possibilita a visualização dos resultados no arquivo de dados gerados na própria plataforma, que descreve a genotipagem (SPINOSO-CASTILLO et al., 2020). Com isso, o uso da metodologia DArTseq para obtenção de SNPs vem sendo utilizado em vegetais com o enfoque voltado para a agricultura, no melhoramento genético, possibilitando maior cobertura do genoma e exploração de dados que permite na detecção de polimorfismo mediante marcadores conservados na espécie (DAVEY, 2011; PEREIRA, 2015).

As tecnologias de sequenciamento de DNA de alto rendimento, viabiliza os estudo que permitem entender a dinâmica dos indivíduos poliplóides naturais, com a obtenção de informações relacionadas às características que diferenciam os genomas, como identificação de deleção, inserção, e recombinação nas sequências, influências das origens maternas e paternas, os mecanismos envolvidos no processo evolutivo e influência dos fatores ambientais (LEITCH, 2008). Essas características junto às características agronômicas, auxiliam no estreitamento do entendimento da relação planta ambiente, por meio da identificação dos perfis genéticos da espécie (JESUS et al., 2020).

A busca por variações em sequências gênicas minimiza o tempo de obtenção de novas cultivares, principalmente em espécies perenes, com o período de juvenilidade muito amplo e de difícil propagação. Conhecer tais características é importante para estudo de diversidade genética, análises filogenéticas, mapeamento genético, mapeamento de *locus* de características

quantitativas (QTL), caracterização de indivíduos, e para o melhoramento genético visando resistência a estresses bióticos e abióticos (Cominelli et al., 2005; Rodrigues et al., 2011; Shan et al., 2012; Chen et al., 2015; TULINI, 2020).

Psidium L. é um gênero monofilético com quatro clados principais, de origem nativa do Brasil, que abrange as mais diversificadas espécies, ampla distribuição geográfica difundido através dos Neotrópicos, possui características agrônômicas exploráveis e proporciona os mais variados estudos em suas espécies (PROENÇA et. al, 2022).

A poliploidia é uma condição que pode influenciar na reorganização e instabilidade dos cromossomos por meio de inserções, deleções e recombinações que podem ser feitas durante o processo de meiose. A troca de blocos de DNA ao longo dos segmentos cromossômicos, é uma característica que resulta na diferenciação cromossômica dentro da espécie, tendo influência direta nas alterações do genoma e conseqüentemente no desenvolvimento do indivíduo (NASCIMENTO, 2021).

E abrangendo todo o genoma, não necessitando conhecimento prévio do mesmo, marcadores SNPs são recomendáveis para estudos nas espécies descritas para o gênero *Psidium* L., pois, dentre as espécies frutíferas apenas a goiabeira é amplamente cultivada e estudada, sendo o potencial das demais espécies sem ampla evidência (COSTA, 2017). Assim, o presente trabalho teve como objetivo, comparar indivíduos de *Psidium cattleyanum* Sabine com diferentes valores do conteúdo de DNA, sob aspecto genômico.

6.2. Material e Métodos

6.2.1 Material Vegetal

Dez indivíduos de *P. cattleyanum* foram utilizados no presente estudo (Tabela 10), as coletas de folhas retiradas de um único extrato da copa de cada indivíduo crescendo em condições naturais no município de Alegre – ES, foram realizadas no período de verão e após o uso as folhas restantes foram incorporadas à coleção de germoplasma de *P. cattleyanum* no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias-CCAIE na Universidade Federal do Espírito Santo campus de Alegre.

Os dados da citometria de fluxo usado no presente estudo foram obtidos a partir de folhas jovens de cada genótipo, livres de qualquer dano por doenças, pragas ou deformidades, para determinação do valor 2C e do obtenção da %CG. As análises foram conduzidas no Laboratório de Citogenética e Citometria, pertencente à Universidade Federal de Viçosa, localizada no município de Viçosa – Minas Gerais. O padrão interno utilizado para as análises foi *Solanum lycopersicum* Linnaeus, 1753, 'Stupické' (2C = 2,00 pg) (PRAÇA-FONTES et al., 2011; SILVA, 2020).

Tabela 5. Identificação do local de coleta onde os dez indivíduos da espécie de *P. cattleyanum* são cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Com conteúdo de DNA variando entre 3.31 a 7.03 picogramas

Identificação do Espécime	Local de coleta	Conteúdo DNA em picogramas	Ploidia (conteúdo de DNA dividido por 0.55)
70	Área Experimental - UFES	4.26	7x
71	Área Experimental - UFES	7.03	13x
72	Área Experimental - UFES	6.83	12x
73	Viveiro de Mudas - IFES	3.31	6x
74	Viveiro de Mudas - IFES	3.45	6x
75	Biblioteca - UFES	3.71	6x
76	Departamento de Biologia - UFES	3.66	6x

77	Área Experimental - UFES	4.47	8x
78	Área Experimental - UFES	4.71	8x
79	Área Experimental - UFES	3.77	7x

6.2.2 Análise Genômica

Os dados genômicos utilizados na realização da identificação de polimorfismo entre dez indivíduos de *P. cattleyanum*, de valores de conteúdo de DNA variando de 3.31 a 7.03 picogramas, foram obtidos de acordo com Grossi et al. (2021), em que, o DNA de cada amostra foi extraído a partir de folhas maceradas com nitrogênio líquido. Para extração de DNA do tecido foliar macerado, foi utilizado o método CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com modificações do IAC. A caracterização inicial da quantidade e qualidade das amostras de DNA foram verificadas em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e visualizadas em gel de agarose a 0,8%.

Para que a metodologia de genotipagem DArTseq fosse aplicada, uma padronização foi realizada e 2 µL de cada amostra do DNA genômico purificado foi submetido a uma incubação, com tampão da enzima HINFI e corante loading buffer 10x, totalizando um volume final de 12 µL, por 2 horas a 37°C. As amostras foram submetidas à eletroforese, em gel de agarose a 0,8% com tampão TAE 1X. Apenas as amostras que permaneceram íntegras foram aceitas para o sequenciamento. Um volume de 60 µL de cada amostra contendo entre 60 a 100 ng de DNA foi pipetado em placas de PCR e enviados para a empresa Diversity Arrays Technology Pty. Ltd, de acordo com as recomendações da empresa (<https://www.diversityarrays.com/faq/>) em Canberra – Austrália, para produção da biblioteca e da genotipagem por sequenciamento.

A representação do genoma foi obtida a partir de uma biblioteca genômica adquirida a partir de digestão com as com enzimas de restrição PstI (corte raro) e MseI (corte comum). Às extremidades dos fragmentos clivados foram ligados a um adaptador com barcode e um adaptador comum. Os fragmentos misturados foram amplificados utilizando dois iniciadores com sequências complementares aos adaptadores ligados e aos oligonucleotídeos da plataforma de sequenciamento Illumina HiSeq 2000. Todas as amplificações que tiveram

sucesso foram agrupadas e levadas a uma célula de fluxo para amplificação, onde foram gerados vários moldes de moléculas de DNA. Posteriormente os clusters foram sequenciados em plataforma NGS (KILIAN et al., 2012)

Os dados DArTseq foram processados para análise e controle de qualidade. Primeiramente, foi estimado por indivíduo, o número de loci totais, a heterozigosidade observada (H_o), esperada (H_e) e índice de fixação (F). A filtragem Call Rate foi realizada, a análise do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e Frequência do Alelo Mínimo (MAF) foi obtida. Assim como, o agrupamento através da ligação média entre indivíduos (UPGMA), análise de coordenadas principais (PCoA), e heatmap da probabilidade de identidade por descendência, sendo analisados utilizando o software R versão 4.1.0 (R CORE TEAM, 2021).

6.2.3 Identificação e caracterização de marcadores presentes em regiões codificadoras

Para o estudo de polimorfismos e identificação de marcadores em regiões codificadoras, as sequências consenso trimadas de aproximadamente 69 bases (tags), oriundas da genotipagem NGS, as quais contém os SNPs, foram utilizadas para realização de buscas no transcriptoma da espécie fornecido pelo grupo de pesquisa do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Por meio do software BLASTP “ncbi-blast-2.12” com valor de corte de E-value de $1e-5$ e um mínimo de identidade de 80%. As sequências provenientes dos alinhamentos em cada indivíduo com diferentes valores do conteúdo de DNA, foram comparadas e selecionadas para posterior anotação funcional das sequências tags com a presença SNPs por meio da descrição do domínio biológico dos genes para prever as funções moleculares e posteriormente realizar estudos filogenéticos.

6.3 Resultados

6.3.1 Caracterização dos marcadores SNPs

A genotipagem realizada em dez indivíduos de *P. cattleyanum* resultou em 116.926 SNPs. Primeiramente, foi realizada a análise descritiva para obtenção da distribuição do resultado da amostragem de SNPs, a quantidade de marcadores homozigoto referência (HR), homozigotos SNPs (H-SNPs), marcadores heterozigotos (He) e marcadores ausentes por indivíduos (Tabela 6). Por meio da mesma, a evidência da maior quantidade de marcadores ausentes (-) que demonstra o menor compartilhamento de regiões genômicas com os demais indivíduos foi maior para os indivíduos 77 e 78 (4.47 e 4.74 pg) com conteúdo de DNA intermediário, seguido dos indivíduos 72 e 71 (6.83 e 7.03 pg), que possuem maior conteúdo de DNA em picogramas entre as amostras.

Tabela 6. Descrição dos resultados de genotipagem em dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Com variação do valor 2C entre 3.31 e 7.03 picogramas. Resultando um total de 116.926* SNPs amostrados oriundos pela metodologia DArTseq

Indivíduo	Conteúdo de DNA	Número de <i>locus</i> nulo	Número de <i>locus</i> total	Número de <i>locus</i> referência	Número de <i>locus</i> H-SNP	Número de <i>locus</i> Heterozigotos
73	3.31 pg	19.989	96.937	67.055	25.717	4.165
74	3.45 pg	20.214	96.712	66.964	25.579	4.169
76	3.66 pg	20.972	95.954	66.936	25.047	3.944
75	3.71 pg	20.825	96.101	66.977	25.162	3.962
79	3.77 pg	32.891	84.035	58.127	21.343	4.565
70	4.26 pg	24.732	92.194	59.934	24.166	8.634
77	4.47 pg	40.090	76.836	34.642	29.084	13.110
78	4.71 pg	40.538	76.388	34.639	29.120	12.629
72	6.83 pg	29.521	87.405	41.719	30.373	15.313
71	7.03 pg	30.419	86.507	41.654	30.254	14.599

*Total de 116.926 *locus* por indivíduo. *Locus* HR: homozigoto referência. *Locus* H-SNP: *Locus* homozigoto SNP. *Locus* He: *locus* heterozigotos. Em destaque, os indivíduos com conteúdo de DNA intermediário e maior entre as amostras.

A análise de parâmetros de diversidade genética (Tabela 7), heterozigosidade observada, esperada e o coeficiente de fixação foram calculados. Os resultados evidenciaram que, a maior variabilidade foi detectada nos indivíduos com conteúdo de DNA, 4.47 e 4.74 picogramas, sendo os indivíduos 77 e 78, seguido dos indivíduos 71 e 72, com 6.83 e 7.03 picogramas de DNA.

Tabela 7. Estimativa de diversidade genética utilizando os resultados após filtragem da genotipagem de 116.926 SNPs oriundos pela metodologia DArTseq, para dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Com variação do valor 2C entre 3.31 e 7.03 picogramas

Indivíduo	Conteúdo de DNA	Ho	He	F
73	3.31 pg	0.07902	0.32275	0.75516
74	3.45 pg	0.07939	0.32279	0.75405
76	3.66 pg	0.07705	0.32027	0.75942
75	3.71 pg	0.07744	0.32044	0.75833
79	3.77 pg	0.08537	0.32820	0.73988
70	4.26 pg	0.16439	0.34392	0.52201
77	4.47 pg	0.30665	0.49216	0.37438
78	4.71 pg	0.29742	0.49091	0.39414
72	6.83 pg	0.28164	0.41442	0.32039
71	7.03 pg	0.27013	0.41451	0.34831

*Ho: heterozigosidade observada. He: heterozigosidade esperada. F: índice de fixação. Em destaque, os indivíduos com conteúdo de DNA intermediário e maior entre as amostras.

A filtragem para cobertura alta dos dados (Call Rate = 1) foi realizada, e a análise do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e Frequência do Alelo Mínimo (MAF) aplicado aos dados de genotipagem (Apêndice). Posteriormente a filtragem, um total de 35.949 sequências distintas, foram utilizados para as análises.

O agrupamento pelo Método de Grupo-Par não Ponderado com Média Aritmética - Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) foi realizado, sendo o mesmo um método hierárquico simples, em que, o algoritmo seleciona o par de indivíduos com a maior distância (ou dissimilaridade), seguindo de médias em pares a pares de indivíduos (Figura 11), resultando três ramos de agrupamento, por meio das características comum entre os indivíduos, que os diferem entre grupos. Os indivíduos 77 (4.47pg) e 78 (4.71pg) formaram o primeiro grupo, seguido dos indivíduos 71 (7.03pg) e 72 (6.83pg) no segundo grupo, e o terceiro agrupamento formado pelos indivíduos 70 (4.36pg), 79 (3.77pg), 73 (3.31pg), 74 (3.45pg), 75 (3.71pg) e 76 (3.66pg).

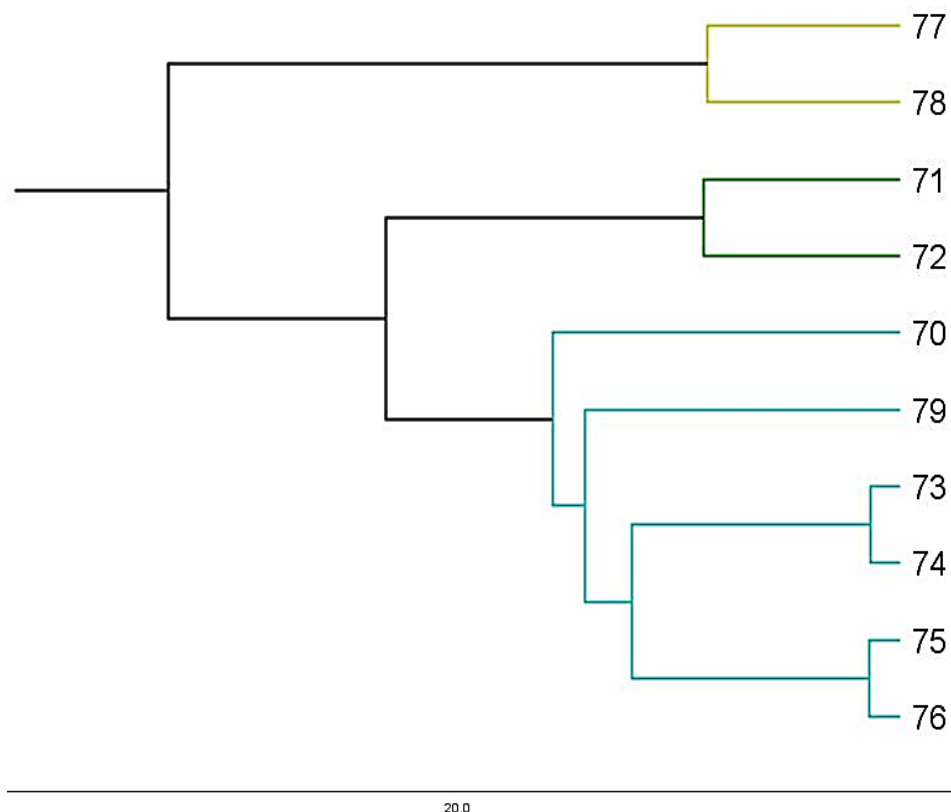


Figura 11. Dendrograma de dissimilaridade genética obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas (UPGMA), utilizando a distância Euclidiana. Realizado após filtragem (Call Rate = 1) da genotipagem de 116.926 SNPs oriundos pela metodologia DArTseq, para os dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Os indivíduos foram identificados por numeração e conteúdo de DNA: 77 (4.47pg), 78 (4.71pg), 71 (7.03pg), 72 (6.83pg), 70 (4.36pg), 79 (3.77pg), 73 (3.31pg), 74 (3.45pg), 75 (3.71pg) e 76 (3.66pg) (O Autor, 2022).

A análise de componentes principais (PCA) (Figura 12), resultou na demonstração da relação genética entre os indivíduos, evidenciando três grupos distintos, sendo que, para os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 3 e 4 picogramas formou um grupo, para os indivíduos com o conteúdo de DNA entre 4 e 5 picogramas um outro grupo e para os indivíduos com o conteúdo de DNA entre 6 e 7 picogramas um outro grupo. Tais resultados forneceram a representação espacial das distâncias genéticas entre os mesmos.

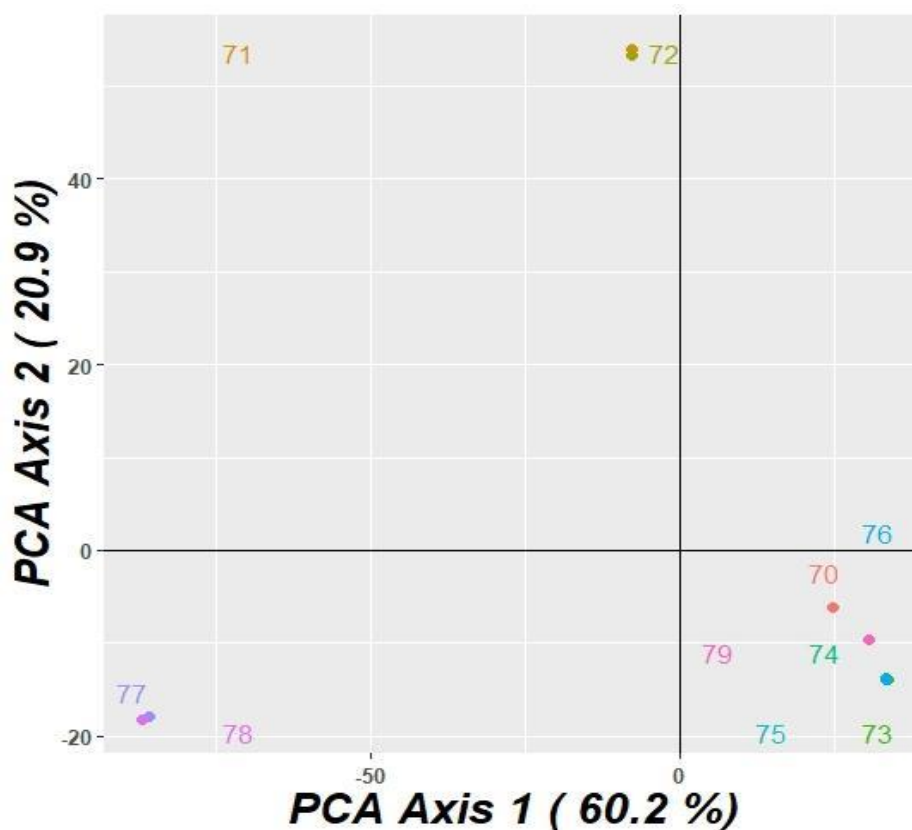


Figura 12. Análise de coordenada principais (PCA) realizada após filtragem (Call Rate = 1) da genotipagem de 116.926 SNPs oriundos pela metodologia DArTseq para os dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Os mesmos foram identificados por numeração e com seus respectivos conteúdos de DNA em picogramas: 77 (4.47pg), 78 (4.71pg), 71 (7.03pg), 72 (6.83pg), 70 (4.36pg), 79 (3.77pg), 73 (3.31pg), 74 (3.45pg), 75 (3.71pg) e 76 (3.66pg). Cada indivíduo foi representado por cores diferentes nos grupos (O Autor, 2022).

E, foi realizado um heatmap da probabilidade de identidade por descendência (Figura 13), evidenciando a probabilidade de um indivíduo ser semelhante a outro. Desse resultado, os indivíduos identificados com numeração 74 (3.45pg), 73 (3.31pg), 75 (3.71pg), 76 (3.66pg), 79 (3.77pg), 70 (4.26pg), foram identificados como mais semelhantes. Seguido pelo grupo dos indivíduos 71 (7.03pg), 72 (6.83pg), e grupo dos indivíduos 77 (4.47pg) e 78 (4.71pg). Assim, três grupos idênticos por descendência foram formados.

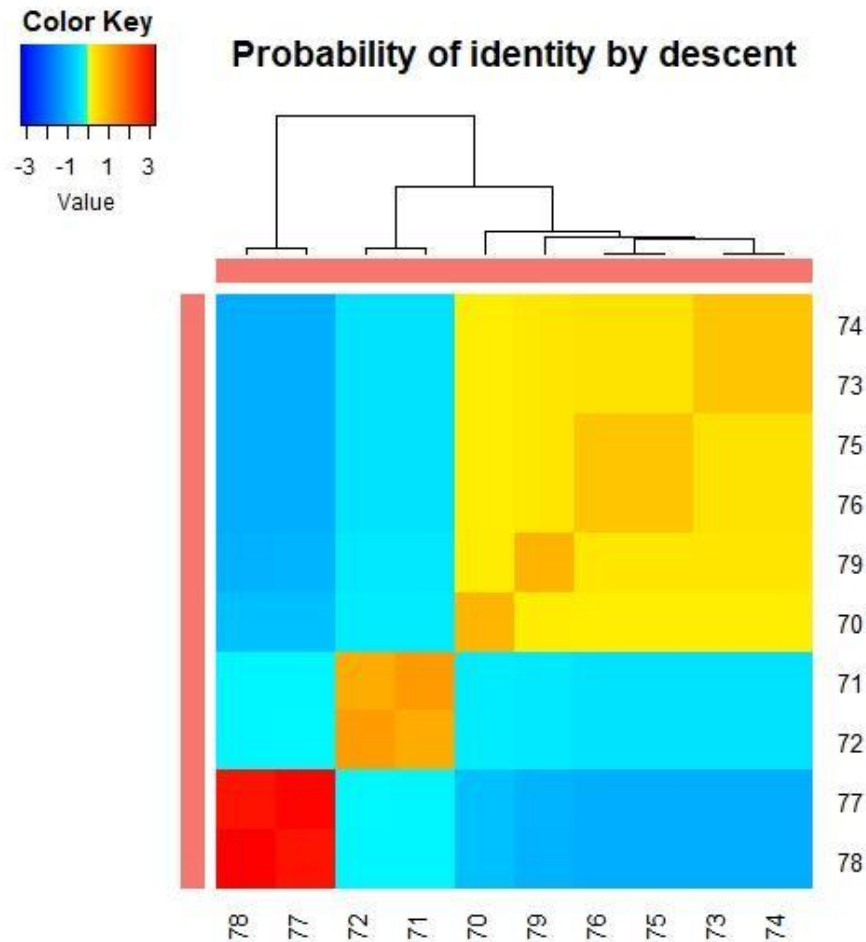


Figura 13. Heatmap da probabilidade de identidade por descendência realizado após filtragem (Call Rate = 1) da genotipagem de 116.926 SNPs oriundos pela metodologia DArTseq, para os dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Os mesmos foram identificados por numeração e com seus respectivos conteúdos de DNA mensurado pelo valor 2C em picogramas: 77 (4.47pg), 78 (4.71pg), 71 (7.03pg), 72 (6.83pg), 70 (4.36pg), 79 (3.77pg), 73 (3.31pg), 74 (3.45pg), 75 (3.71pg) e 76 (3.66pg). Cada célula colorida representa o grau de parentesco entre os indivíduos representados pelas linhas e colunas. Cada célula é colorida com base no nível de parentesco entre indivíduos, variando do azul (indivíduos pouco aparentados) ao vermelho (indivíduos altamente aparentados).

6.3.2 Identificação e análise de SNPs presentes em regiões transcritas de *P. cattleyanum*

Um total de 116.926 SNPs presente no arquivo de dados fornecido pela empresa de genotipagem, foram utilizados para buscas no transcriptoma exclusivo da espécie de *P. cattleyanum*. Após o alinhamento realizado utilizando os dados de SNPs e o transcriptoma, um total de 19.591 sequências únicas, que não estão presente em mais de um indivíduo, alinharam no transcriptoma e foram identificados como sequencias que fazem parte de regiões codificadoras

que contém informações necessárias em relação a dinâmica do desenvolvimento dos indivíduos (Tabela 8).

Tabela 8. Número total de SNPs após filtragem (Call Rate = 1) da genotipagem de 116.926 SNPs oriundos pela metodologia DArTseq, para os dez indivíduos de *P. cattleyanum* cultivados no município de Alegre-ES, em condições naturais. Os mesmos foram identificados por numeração e com seus respectivos conteúdos de DNA mensurado pelo valor 2C em picogramas: 77 (4.47pg), 78 (4.71pg), 71 (7.03pg), 72 (6.83pg), 70 (4.36pg), 79 (3.77pg), 73 (3.31pg), 74 (3.45pg), 75 (3.71pg) e 76 (3.66pg) e o número total de transcritos correspondente

Indivíduo	Conteúdo de DNA em picogramas	Nome arquivo de SNPs	Número de SNPs	Transcritos de <i>Psidium</i> que alinharam nos SNPs
73	3.31	out_cat73.blas tn.tsv	29.324	9.632
74	3.45	out_cat74.blas tn.tsv	29.332	9.629
76	3.66	out_cat76.blas tn.tsv	28.617	9.539
75	3.71	out_cat75.blas tn.tsv	28.638	9.538
79	3.77	out_cat79.blas tn.tsv	22.034	7.848
70	4.26	out_cat70.blas tn.tsv	26.019	9.002
77	4.47	out_cat77.blas tn.tsv	34.692	10.667
78	4.71	out_cat78.blas tn.tsv	34.626	10.689
72	6.83	out_cat72.blas tn.tsv	30.804	9.681
71	7.03	out_cat71.blas tn.tsv	30.738	9.586
Total	-	.csv	116.926	19.591

6.4 Discussão

A genotipagem dos dez indivíduos de *P. cattleyanum*, resultou em uma quantidade significativa de sequências contendo SNPs. Segundo Pavan et al. (2020), revisando os métodos de genotipagem baseados em sequenciamento de nova geração do ano de 2017, empresas líderes como Affymetrix e Illumina desenvolveram 46 plataformas de matrizes SNPs e demonstraram que, com o sequenciamento as tags obtidas podem variar de 3 a 820 mil sequências que contém os marcadores, sendo mais comum a obtenção de 50 e 90 mil sequências.

A identificação de SNPs permite relacionar o polimorfismo nas sequências de DNA a variação do conteúdo de DNA referente aos indivíduos amostrados. Como nem sempre a caracterização agrônômica é o suficiente para identificar a variabilidade na espécie, estudos genômicos são ideais para complementar os demais dados ou resolver questões relacionadas a seleção de variedades, melhoramento das cultivares e conservação da mesma (PAIVA et al., 2019).

No presente estudo, o uso da metodologia DArTseq, permitiu a identificação de variabilidade genética nas amostras, sendo um método de alta confiabilidade por apresentar ampla cobertura genômica. Evidenciado nas tabelas 1 e 2, os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 3.31 e 4.26 picogramas, apresentaram menor quantidade de locos nulos e locos heterozigotos demonstrando a ocorrência de maior quantidade de sequências em comum, assim como, evidências de menor heterozigosidade por meio do resultado do índice de fixação.

Os indivíduos com maiores conteúdos de DNA 6.83 e 7.03, apresentaram maior quantidade de locos nulos e heterozigotos quando comparado aos indivíduos de menor conteúdo de DNA desta amostragem, assim como menores índices de fixação, que demonstra maior heterozigosidade.

Em contrapartida, os indivíduos com conteúdo de DNA de 4.47 e 4.71, apresentaram a maior quantidade de locos nulos e heterozigotos de toda a amostragem, evidenciando o menor compartilhamento de regiões genômicas com os demais indivíduos, sendo que, após a análise da medida de diversidade apresentado pelo índice de fixação, os mesmos demonstraram os menores índices o que resulta na maior diversidade em relação aos demais indivíduos.

A análise descritiva para compreensão da base genética que proporciona a variação do germoplasma da espécie, é fundamental para o entendimento da distribuição dos alelos dentro da população e consequente descrição dos alelos obtidos por meio da metodologia de sequenciamento utilizada. Os locos homocigotos, heterocigotos e nulos, auxiliam na compreensão das características dos indivíduos que podem gerar informações para os caracteres de interesse agrônomo, distribuição da diversidade relacionada e extensão da mesma, quando se relaciona ao conteúdo de DNA, permitindo a identificação de variações no genótipo que podem gerar alterações no fenótipo e favorecer o desenvolvimento da espécie (PANTALIÃO, 2016).

Com isso, as informações de semelhanças entre os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 3 e 4.2 picogramas de DNA, o alto valor de locos nulos entre os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 4.4 e 7.3 picogramas de DNA, revela que, os indivíduos com maior conteúdo de DNA possuem regiões genômicas com menor semelhanças quando comparados aos indivíduos com menor conteúdo de DNA.

Devido a evolução do genoma através de atividades de elementos móveis, deleções e alterações no fluxo de informações genéticas entre os cromossomos, ou seja, a ocorrência de recombinação entre partes iguais ou muito semelhantes no genoma, alterações intraespecíficas podem ser relatadas. A ocorrência da recombinação homóloga resulta em maior diversidade o que favorece a domesticação da espécie poliploide que, por maior que seja a complexidade particular de seu genoma, as diferentes características resultantes da poliploidia, favorece a formação de variabilidade na espécie, melhor desempenho de sobrevivência e desenvolvimento (BERTIOLI et al., 2019).

A análise de diversidade genética permite o entendimento da variação genética entre indivíduos, em que, quando descrita com domínio de genótipos homocigotos, espera-se predominância de autofecundação característico de plantas autógamas. E, quando o domínio é de genótipos heterocigotos espera-se predominância de fecundação cruzada, característico de plantas alógamas. Os valores de H_e , H_o e F , revelam essas características que auxiliam os programas de melhoramento no entendimento de quais são as possibilidades de gerar variabilidade na população (PEAKALL and SMOUSE, 2012; ALVARENGA, 2019).

Dentro desta expectativa, com base na (Tabela 2), é possível identificar aumento da variabilidade em indivíduos com maior conteúdo de DNA nuclear, demonstrando que, quanto maior o conteúdo de DNA, mais próximo de zero está o índice de fixação (F) que indica maior número de alelos heterozigotos no indivíduo.

O agrupamento pelo Método de Grupo-Par não Ponderado com Média Aritmética - Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA), demonstrou que, os indivíduos com menor conteúdo de DNA, conteúdo de DNA mediano e com maior conteúdo de DNA formaram três diferentes grupos no dendrograma identificando a maior similaridade entre os mesmos. Segundo Oliveira (2020), as informações de distâncias genéticas podem ser aplicadas para examinar as relações genéticas entre os indivíduos por meio da ordem formada de acordo com as similaridades ou dissimilaridades genéticas. A ferramenta de agrupamento UPGMA fundamenta-se na identificação de dois indivíduos similares sendo agrupados no dendrograma e é usado a média das distâncias do grupo formado, demonstrando a distância entre os indivíduos geneticamente mais próximos.

A análise de coordenadas principais – *Principal Component Analysis* (PCA) mostrou o agrupamento dos indivíduos sendo uma aproximação focada nas semelhanças genéticas, resultando em um gráfico que por meio da representação espacial demonstra a dispersão, em que, três grupos bem definidos foram representados para a amostragem estudada. O agrupamento se dá mediante as semelhanças entre os indivíduos, a estrutura da população é avaliada por meio da proximidade entre os genótipos (NIEDERHEITMANN, 2021).

O mapa de calor – heatmap, permite uma visualização rápida da relação entre cada indivíduo obtido por meio dos dados de SNPs estudados que define a probabilidade de identidade por descendência. Cada locus sequenciado contribui para distinguir as relações de parentesco mediante a probabilidade de um indivíduo ter a maior quantidade de sequências iguais por meio das sequências obtidas com a metodologia de sequenciamento realizado. Através do heatmap é possível distinguir os indivíduos mais aparentados dentro da população por meio do dendrograma formado (KIDD et al., 2014).

Por meio do heatmap, foi possível visualizar os três grupos formados, em que, os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 3 e 4.2 picogramas de DNA formaram um agrupamento, se separando dos indivíduos com 4.47 e 4.71 picogramas de DNA, sendo os mesmos mais aparentados aparecendo em vermelho no mapa e o outro grupo foi formado separando os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 6 e 7.03 picogramas de DNA. Demonstrando que a probabilidade das mesmas sequências estarem disponíveis nos indivíduos é maior, quando os mesmos possuem conteúdo de DNA semelhante.

A caracterização genética e genômica em espécies do gênero *Psidium* resultam em informações que podem ser utilizadas no melhoramento genético por meio da obtenção de conhecimento a respeito das prováveis respostas que a espécie pode desenvolver ao longo de sua evolução, mediante as mais variadas mudanças ambientais. O estudo de Souza (2019) utilizando SNPs para avaliar o polimorfismo entre indivíduos de *Psidium*, resultou no entendimento das relações genéticas entre diferentes espécies do gênero, regiões conservadas e polimórficas entre e dentro das espécies, presença de marcadores em regiões gênicas, e seleção de SNPs para compor painel de genotipagem.

O desenvolvimento de estudos e obtenção de resultados que auxiliam na seleção de indivíduos superiores na espécie, facilitam o desenvolvimento de métodos aplicáveis à produção que proporcionam melhor qualidade do produto esperado. Como relatado por Costa (2017), a clareza na separação das espécies, entendimento da funcionalidade presente nas regiões gênicas e o acesso à informação genômica que reflete nas características fenotípicas do indivíduo, são proporcionados pelos estudos utilizando marcadores SNPs. Como resultado do presente estudo, a identificação de marcadores presentes em regiões codificadoras proporcionam os estudos iniciais para compreensão das funcionalidades desenvolvidas pelo indivíduo que favorecem seu desempenho.

A realização do alinhamento dos marcadores SNPs no transcriptoma da espécie, resulta na identificação de regiões codificadoras que possibilita a identificação de genes funcionais associados a características agrônomicas. Demonstrando que, no presente estudo, os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 3 e 4.2 picogramas apresentaram menor quantidade de sequências transcritas alinhadas as sequências que contêm marcadores SNPs, e os indivíduos com 4.47 e 4.71 picogramas de DNA, com as maiores sequências

alinhas, assim como os indivíduos com conteúdo de DNA variando entre 6 e 7.03 picogramas de DNA.

O processo biológico estudado indica o produto resultante de cada informação gênica, as atividades do produto a nível molecular e o ambiente extracelular em que o produto gênico desempenha sua função, sendo características importantes na seleção de genótipos e agrega conhecimento que posteriormente pode ser utilizado em diferentes gêneros e espécies (TULINI, 2018). Demonstrando ser fundamental a importância da associação de estudos com marcadores SNPs e transcriptoma.

6.5 Conclusão

Por meio da presente pesquisa, foi possível visualizar a ampla possibilidade de adquirir conhecimento a nível genômico para espécies que ainda são pouco estudadas. Não necessitando de conhecimento prévio do genoma para a utilização e estando presente em toda sua região, os marcadores SNPs estão se mostrando essenciais no desenvolvimento de estudos genômicos em espécies pouco estudadas resultando na compreensão de como o desenvolvimento de diferentes indivíduos reflete o resultado de processos evolutivos.

Como demonstrado, as diferenças entre os indivíduos de *P. cattleyanum* que é uma espécie poliplóide, foram descritas e sua variabilidade intraespecífica foi relatada. Entendendo que, a variabilidade é uma característica que permite a conservação da espécie e resulta em diferentes respostas mediante exposição a fatores diversificados, o estudo genômico permite a identificação da variação entre indivíduos da espécie, seleção de genótipos e aperfeiçoamento das técnicas de manejo que são essenciais em programas de melhoramento.

Com isso, espera-se que este estudo possa fornecer dados para a construção de novos questionamentos a respeito da poliploidia na espécie e entendimento das características genômicas que explicam a variabilidade mediante aos diferentes valores do conteúdo de DNA dos indivíduos.

6.6 Referências

- ALVARENGA, P. M. **MARCADORES MOLECULARES TIPO SNPs CANDIDATOS LIGADOS A RESISTÊNCIA A NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA RAÇA 14 EM CULTIVARES DE SOJA BRASILEIRAS**. 2019. 59. Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal Goiano / Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas. URUTAÍ, GO. Disponível em: <https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos_1/2019-12-03-02-49-21P%C3%A2mela%20Martins%20Alvarenga.pdf>. Acesso em 16 de jan. 2022
- BERTIOLI, D. J.; JENKINS, J.; CLEVINGER, J. *et al.* A sequência do genoma do amendoim alotetraplóide segmentar *Arachis hypogaea*. **Nat Genet** **51**, 877-884 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0405-z>
- COSTA, S. R. da. **DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM PSIDIUM E ESTUDOS DE HERANÇA E ASSOCIAÇÃO GENÔMICA DA RESISTÊNCIA A *Meloidogyne enterolobii* EM HÍBRIDO DE *Psidium* COM BASE EM POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO**. 2017. 176 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana / Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Feira de Santana, BA. Disponível em: <<Http://Tede2.Uefs.Br:8080/Bitstream/Tede/506/2/Tese%20soniane%20costa.Pdf>>. Acesso em: 28 de dez. 2021
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 1213-1215.
- Erdtman, G. 1952. Pollen Morphology and Plant Taxonomy – Angiosperms. Stockolm, Almqvist & Wiksel.
- FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. **Sequenciando genomas**. In: CIÊNCIAS GENÔMICAS FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES, 2015. 27-62 p. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, SP. Disponível em: <<http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/18497/material/Sequ%C3%A2Anciamdo%20genomas.pdf>>. Acesso em 10 out. 2021
- JESUS, A. A. de.; BUENO, L. G.; VEJA, W. H. O.; DINIZ, F. M. Molecular tools in genetic breeding of *Megathyrus maximus* for semiarid region: a review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. e7839108675, 2020. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8675>>. Acesso em: 14 jan. 2022
- KIDD, K.; SPEED, W.; PAKSTIS, A.; FURTADO, M.; FANG, R.; MADBOULY, A.; MAIERS, M.; MIDDHA, M.; FRIEDLAENDER, F.; KIDD, J. Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference. **Forensic science international – Genetics**, v. 10C. 23-32 p., 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/260129812_Progress_toward_an_efficient_panel_of_SNPs_for_ancestry_inference>. Acesso em: 18 de jan. 2022
- KILIAN A.; WENZL P.; HUTTNER, E. *et al.* (2012). Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology on open platforms. In: Pompanon F., Bonin A. (eds) Data Production and Analysis in Population Genomics. **Methods in Molecular Biology** (Methods and Protocols), v. 888, 67–89 p. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-870-2_5
- Leitch, A. R. 2008. Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants. **Science**, v.320, p. 481- 483. DOI: 10.1126/science.1153585
- PEREIRA, V. M. **DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Elaeis oleifera* POR MEIO DE DA_rTSeq**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2015. Disponível em:< 10.13140/RG.2.1.2846.4887>. Acesso em: 14 de jan. 2022
- NASCIMENTO, E. F. de M. B. do. Organização **genômica de genótipos diplóides e alotetraplóides espontâneos e induzidos de *Arachis L.* revelada por citogenética**. 2021. 126 p., Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de Brasília. Brasília, DF. Disponível em: < <https://repositorio.unb.br/handle/10482/41622>>. Acesso em: 28 de jan. 2022

NIEDERHEITMANN, M. **Fenotipagem e associação genômica ampla para resistência à mancha bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. 2021. 99 p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, SP. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-08042021-164758/publico/Mariana_Niederheitmann_versao_revisada.pdf>. Acesso em: 18 de jan. 2022

OLIVEIRA, L. S. de. **AGRUPAMENTO HETERÓTICO DE MILHO USANDO MARCADORES SNPS**. 2020. 41 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras / Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas. Lavras, MG. Disponível em:<http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/43079/2/DISSERTA%c3%87%c3%83O_Agrupamento%20heter%c3%b3tico%20de%20milho%20usando%20marcadores%20SNPS.pdf>. Acesso em: 16 de jan. 2022

PAIVA, S. R.; TEIXEIRA, F. F.; RAMOS, S. R. R.; MACHADO, C. de F.; MAZZOCATO, A. C.; LAMEIRA, O. A.; LEITE, O. L.; CASTRO, A. C. R. de.; MELO, S. C. M de.; SILVA, J. B. T. da.; AZEVEDO, V. C. R. **Caracterização de Recursos Genéticos**. 2019. 23 p. Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. Disponível em:<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1113670>>. Acesso em: 16 de jun. 2021

PANTALIÃO, G. F. **Estudo de associação genômica ampla para produtividade em arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2016. 152 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás / Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Goiás, GO. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/6135/5/Tese%20-%20Gabriel%20Feresin%20Pantali%c3%a3o%20-%202016.pdf>>. Acesso em: 16 de jan. 2022

PAVAN, S.; DELVENTO, C.; RICCIARDI, L.; LOTTI, C.; CIANI, E.; D'AGOSTINO, N. Recommendations for Choosing the Genotyping Method and Best Practices for Quality Control in Crop Genome-Wide Association Studies. **Frontiers In Genetics**. v.11, 2020. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2020.00447>>.

PROENÇA, C.E.B.; Costa, I.R.; Tuler, A.C, 2020. **Psidium in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10853>>. Acesso em: 10 dez. 2021

PROENÇA, C. E. B.; TULER, A. C.; LUCAS, E. J.; VASCONCELOS, T. N. DA C.; FARIA, J. E. Q. DE; STAGGEMEIER, V. G.; CARVALHO, P. S. DE; FORNI-MARTINS, E. R.; INGLIS, P. W.; MATA, L. R. DE; COSTA, I. R. DA. 2022. Diversity, phylogeny and evolution of the rapidly evolving genus *Psidium* L. (Myrtaceae, Myrteae). *Annals of Botany* XX. Disponível em:< <https://academic.oup.com/aob/advance-article/doi/10.1093/aob/mcac005/6509026> >. Acesso em: 19 de fev. 2022

R Core Team (2021). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso: 2021

SANSALONI, C. P. **Desenvolvimento e aplicações de DArT (Diversity Arrays Technology) e genotipagem por sequenciamento (Genotyping-bySequencing) para análise genética em *Eucalyptus***. 2012. 145 p. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília / Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia. Brasília, DF. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13400/1/2012_CarolinaPaolaSansaloni.pdf>. Acesso em 22 de jan. 2022

SANTOS, J. F. F. dos. **MAPEAMENTO DE QTL PARA CARACTERES DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA EM ARROZ NO CRUZAMENTO *Araguaia* x *Maninjavu***. 2020. 124 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás / Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Goiânia, GO. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/10914/3/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20-%20J.F.F.Santos%20-%202020.pdf>>. Acesso em: 16 de jan. 2022

%20J%20c3%a9ssica%20Fernanda%20Ferreira%20dos%20Santos%20-%202020.pdf>. Acesso em: 25 de jan. 2022

SOUSA, L., FERREIRA, M. F. da S., MARCIEL, T. E. F. Marcadores Moleculares Baseados em Sequenciamento de Nova Geração. In: **MIRANDA, F. D. de (Org.)**. *Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento II*. Alegre - ES: CAUFES 2018. p. 144-173.

SOUSA, L. L. **MARCADORES MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E GENÔMICA EM ESPÉCIES DE *Psidium***. 2019. 115 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo / Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Alegre, ES. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/bitstream/10/11299/1/tese_12845_Disserta%20c3%a7%20c3%a3o%20Final%20Luara%20Lopes%20Souza.pdf>. Acesso em: 12 de set. 2020

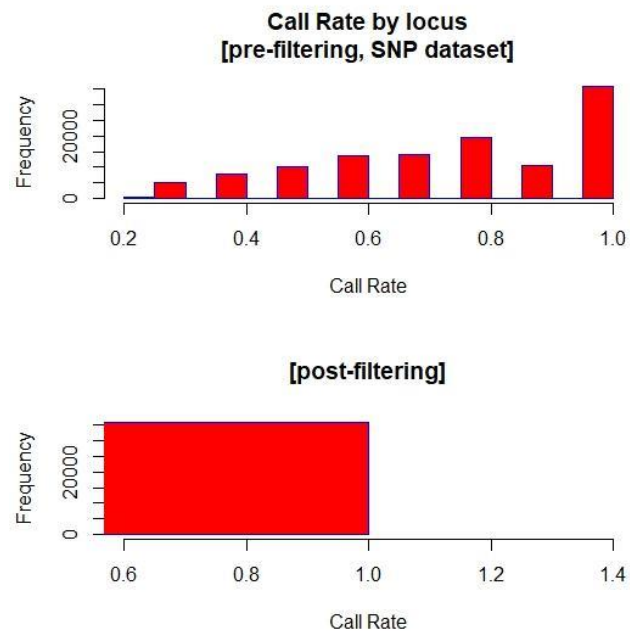
Spinosa-Castillo JL, Escamilla-Prado E, Aguilar-Rincón VH, et al. Genetic diversity of coffee (*Coffea* spp.) in Mexico assessed using DArTseq and SNP markers. **Genet Resour Crop Evol.** 2020; 67:1795–1806. <https://doi.org/10.1007/s10722-020-00940-5>.

TULINI, F. L. **IDENTIFICAÇÃO DE SNPs CANDIDATOS RELACIONADOS À TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO EM CANA-DE-AÇÚCAR**. 2020. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista / Unesp Campus de Jaboticabal, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/193084/tulini_fl_me_jabo.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 10 de abr. 2021

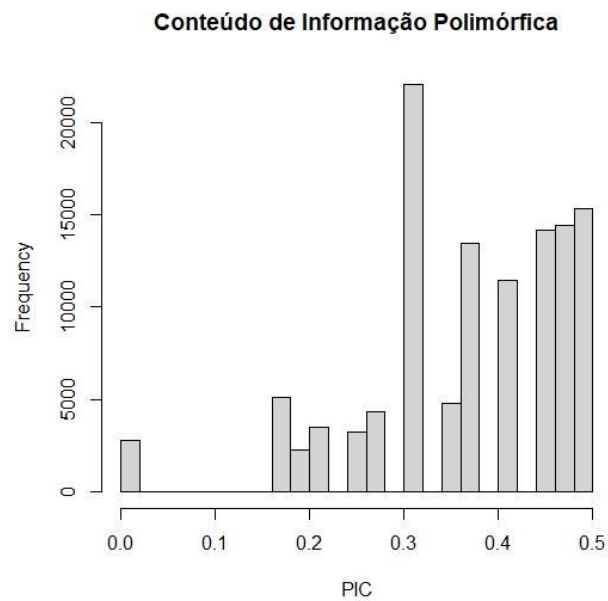
TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/206113/001056154.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 18 de ago. 2021

WERKISSA, Y. 2020. Genomic Mapping in Polyploid Plants. **International Journal of Research in Agriculture and Forestry**, v. 7, n. 5, p. 10-22. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/355903403_Genomic_Mapping_in_Polyploid_Plants>. Acesso em 02 fev. 2022

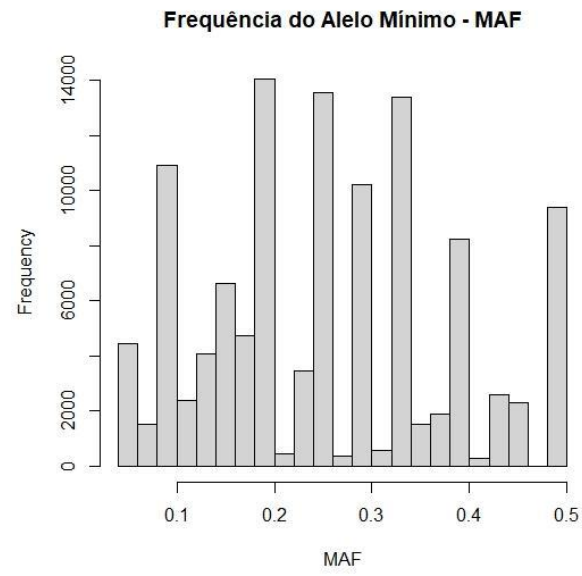
6.7 Apêndices



Apêndice 1. Aplicação do filtro para todas as amostras, Call Rate = 1,00.



Apêndice 2. Aplicação do filtro para todas as amostras, PIC calculado no programa R.



Apêndice 3. Aplicação do filtro para todas as amostras, $MAF > 0,01$.