

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS
TATIANE LEMOS VARELLA

**Estrutura populacional, diversidade genética e aspectos
reprodutivos da espécie *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng.**

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO – BRASIL
FEVEREIRO - 2015

TATIANE LEMOS VARELLA

Estrutura populacional, diversidade genética e aspectos reprodutivos da espécie *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng.

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

Co-Orientadora: Prof^a. Ph. D. Telma Nair Santana Pereira

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO – BRASIL
FEVEREIRO - 2015

**ESTRUTURA POPULACIONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E
ASPECTOS REPRODUTIVOS DA ESPÉCIE *Theobroma speciosum*
Willd. ex Spreng.**

TATIANE LEMOS VARELLA

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2015.

Comissão Examinadora:

D. Sc. Aisy Botega Baldoni Tardin (D. Sc., Biologia Molecular e Biotecnologia) –
Pesquisadora da Embrapa Agrossilvipastoril

Prof^o. Sérgio Alessandro Machado Souza (D. Sc., Melhoramento vegetal)
Universidade do estado de Mato Grosso

Prof^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho (D. Sc., Genética e Melhoramento) –
Universidade do estado de Mato Grosso
(Co-orientadora)

Prof^a. Ana Aparecida Bandini Rossi (D. Sc., Genética e Melhoramento) –
Universidade do estado de Mato Grosso
(Orientadora)

DEDICO

Aos meus pais Alvaro Varella e Ivonete Aparecida Lemos Varella, e ao meu irmão Albary Lemos Varella, por serem meu referencial de vida e pelo apoio incondicional, dedicando a mim parte de suas vidas.

OFEREÇO

À minha orientadora Ana Aparecida Bandini Rossi e a professora Maurecilne Lemes da Silva Carvalho que sempre acreditaram e confiaram no meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, toda honra e toda glória pela minha vida, por sempre estar comigo me mostrando o caminho, dando-me sempre forças e fé.

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pela concessão da bolsa de estudos.

À Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE) pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, professora Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi por todo seu apoio, incentivo, profissionalismo, ensinamentos, críticas construtivas, por acreditar no meu trabalho e confiança em mim depositada.

À professora Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho que muito acrescentou na minha formação acadêmica, pessoal e profissional.

Aos meus pais, que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando e pelos valores e educação oferecidos.

Ao meu irmão que sempre me apoiou e incentivou, dando suporte para que eu pudesse terminar meus estudos.

Ao meu namorado Carlos Augusto, pela sua paciência, compressão e carinho, apoiando e colaborando no meu trabalho.

À minha cunhada Fernanda, pela amizade e companheirismo de sempre, principalmente na reta final do meu mestrado.

À turma do mestrado (Paulo, Angelita, Alan, Viviane, Natan, Mariana, Deisi, Lais e Greice) por todo o companheirismo, por todas as risadas e pelo carinho ao qual construímos.

Aos meus melhores amigos de campo e laboratório: Greiciele Farias da Silveira e Maicon Arenas de Souza que sempre estiveram ao meu lado durante toda essa caminhada, passando noites em claro, por todo o companheirismo e amizade. Serei eternamente grata.

À Juliana, Bruna, Auana e ao Joameson por todo o auxílio concedido sempre que precisei.

À Luana Della Giustina por todos os ensinamentos, amizade e companheirismo.

Aos colegas de laboratório não apenas pela colaboração durante a execução da pesquisa, mas pelos bons momentos de risadas e confraternização.

À Jakeline Santos Cochev e ao professor Dr. Sérgio Alessandro Machado pelos ensinamentos, sugestões e por todo o auxílio concedido.

Às minhas amigas Mirelly, Crys, Lídia e Laís por me acolherem sempre que precisei.

Aos professores do curso de Pós Graduação que contribuíram para minha formação.

Aos pais da Greice por todo o apoio que me concederam na reta final do meu mestrado.

Aos funcionários do *Campus* que por muitas vezes participaram ativamente da minha pesquisa.

À todos, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que não tenham seus nomes citados aqui, minha gratidão e reconhecimento.

BIOGRAFIA

Tatiane Lemos Varella, filha de Alvaro Varella e Ivonete Aparecida Lemos Varella, nasceu em Santa Ines – MA em 29 de maio de 1988. Em 2005, encerrou o ensino médio na Escola Estadual Nova Canã do Norte e em 2007, iniciou o curso de Licenciatura Plena e Bacharelado em Ciências Biológicas pela UNEMAT *campus* de Tangará da Serra, o qual concluiu em 2012 sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Em 2013, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – UNEMAT – Campus de Alta Floresta, o qual concluiu em 2015 sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Ana Aparecida Bandini Rossi.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Floresta Amazônica	4
2.2 <i>Theobroma speciosum</i>	4
2.3 Fragmentação florestal.....	6
2.4 Estrutura populacional	6
2.5 Diversidade genética.....	7
2.6 Marcadores microssatélites.....	7
2.7 Biologia Reprodutiva	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
4. CAPÍTULOS.....	16
4.1 CAPÍTULO 1	16
Efeito da fragmentação na diversidade genética de populações naturais de <i>Theobroma speciosum</i> Willd. ex Spreng.....	16
RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Área de estudo.....	20
Material vegetal.....	21
Extração e quantificação do DNA	22
Amplificação e genotipagem de locos microssatélites	22
Análise dos dados.....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
4.2 CAPÍTULO 2	36
Estrutura populacional e distribuição espacial de <i>Theobroma speciosum</i> Willd. ex Spreng no norte do Estado de Mato Grosso	36
RESUMO	36
ABSTRACT.....	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
Área de estudo.....	39
Amostragem.....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
4.3 CAPÍTULO 3.....	53
Morfometria floral e estimativa da viabilidade polínica de <i>Theobroma speciosum</i> Willd. ex Spreng.....	53
RESUMO	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUÇÃO	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
Área de estudo.....	56

Morfologia e Morfometria Floral	57
Testes de Viabilidade Polínica	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
Morfologia e Morfometria floral.....	59
Viabilidade Polínica.....	61
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	66
4.4 CAPÍTULO 4	70
Viabilidade polínica e receptividade do estigma de cacauí (<i>Theobroma speciosum</i> Willd. ex Spreng.).....	70
RESUMO	70
ABSTRACT	71
INTRODUÇÃO	72
MATERIAL E MÉTODOS.....	73
Área de estudo.....	73
Material Vegetal	74
Viabilidade Polínica.....	75
Receptividade estigmática	76
RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
Biologia Floral	76
Viabilidade Polínica.....	78
Receptividade estigmática	80
CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	86

RESUMO

Varella, Tatiane Lemos; M. Sc.; Universidade do Estado de Mato Grosso; Fevereiro de 2015. Estrutura populacional, diversidade genética e aspectos reprodutivos da espécie *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. Orientadora: Ana Aparecida Bandini Rossi. Conselheiras: Maurecilne Lemes da Silva Carvalho e Telma Nair Santana Pereira.

Theobroma speciosum é uma espécie nativa da região Amazônica e apresenta potencial para ser implantada em um programa de melhoramento genético devido à presença de um banco de genes que pode ser de resistência a patologias das espécies cultivadas. No entanto, a fragmentação florestal causada pela ação antrópica ocasiona isolamento das populações naturais, alterando os padrões de migração e dispersão das sementes, o que pode gerar a erosão genética da espécie. Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar a estrutura populacional e os aspectos reprodutivos da espécie *T. speciosum* em fragmentos florestais urbanos na cidade de Alta Floresta, MT, bem como avaliar, por meio de marcadores microssatélites, a diversidade genética da espécie. Foram selecionados três fragmentos florestais urbanos no município de Alta Floresta-MT, denominados: parque C/E, parque J e parque Zoobotânico. Para o estudo da estrutura populacional foram implantadas grades nesses fragmentos e amostrados todos os indivíduos com CAP > 1 cm. Os dados foram comparados com um estudo realizado no Parque Nacional do Juruena em 2013. Para o estudo dos aspectos reprodutivos, foram avaliados a viabilidade polínica com base em testes colorimétricos, a receptividade estigmática com peróxido de hidrogênio em 7 horários de coleta. Para o estudo da diversidade genética foi amostrado um total de 75 indivíduos, sendo 25 em cada fragmento, dos quais foram coletadas folhas para a extração de DNA genômico. As amplificações foram realizadas via PCR com o emprego de 9 *primers* SSR. Com relação às classes diamétricas e de altura, o único parque urbano que manteve um maior número de indivíduos nas menores classes (0-5 cm e 0-5 m), assim como o PNJu, foi o parque Zoobotânico, demonstrando capacidade regenerativa populacional, apresentando o modelo característico das florestas tropicais (“J-invertido”), enquanto que nos parques C/E e J, a espécie não seguiu esse padrão. Quanto ao padrão de distribuição dos indivíduos, todas as populações apresentaram comportamento agregado. O Cacauí possui inflorescência caulinar, com flores hermafroditas, diclamídeas com cálice e corola pentâmeras. As flores possuem 5 estames, 5 estaminódios e 6 anteras. O ginceu é pluricarpelar com soldadura gamocarpelar, formando um só pistilo. O estigma é ramificado e o ovário é súpero com placentação axial. As flores medem em média de 14,89mm de comprimento e 19,77mm de largura. A viabilidade polínica permaneceu alta, independente do horário de coleta e do corante utilizado, com média superior a 94%. Os estigmas de *T. speciosum*, encontraram-se receptivos em todos os horários de avaliação, com percentual médio acima de 75%. Todos os nove locos microssatélites utilizados na genotipagem foram polimórficos e amplificaram 84 alelos. A heterozigozidade esperada foi maior que a observada em todos os marcadores. A maior parte da variabilidade genética encontra-se intrapopulacional. O dendrograma gerado pelo método UPGMA possibilitou a formação de 3 grupos distintos, assim como no agrupamento do “Structure”, demonstrando que os

indivíduos ficaram alocados nas suas devidas populações. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o presente estudo serve de base para o estabelecimento de estratégias que visem a conservação e o manejo da espécie nesses fragmentos urbanos.

Palavras-Chave: Cacauí, Marcador Molecular, Fragmentação Florestal.

ABSTRACT

Varella, Tatiane Lemos; M. Sc.; Universidade do Estado de Mato Grosso; Fevereiro de 2015. Population structure, genetic diversity and reproductive aspects of species *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. Orientadora: Ana Aparecida Bandini Rossi. Conselheiras: Maurecilne Lemes da Silva Carvalho e Telma Nair Santana Pereira.

Theobroma speciosum is a native species of the Amazon region and has the potential to be deployed in a genetic breeding program due to the presence of a gene bank that may be resistance to diseases of cultivated species. However, forest fragmentation caused by anthropic action causes isolation of natural populations, migration changing patterns and seeds dispersal, which can lead to the genetic erosion of the species. Thus, this study aimed to analyze the populational structure and the reproductive aspects of *T. speciosum* in urban forest fragments in the city of Alta Floresta, MT, as well as assess the genetic diversity of the species by microsatellite markers. Three urban forest fragments were selected in the municipality of Alta Floresta-MT denominated: Park C/E, J Park and Zoobotanical Park. For the populational structure study, grids were implanted in these fragments and sampled all individuals with CAP > 1 cm. Data were compared to a study at Juruena National Park in 2013. For the reproductive aspects study, the pollen viability based on colorimetric tests and the stigmatic receptivity with hydrogen peroxide within 7 hours of collection were evaluated. To study the genetic diversity, a total of 75 individuals were sampled, 25 in each fragment whose leaves were collected for the genomic DNA extraction. The amplifications were performed by PCR with the use of 9 SSR primers. Concerning the diameter and the height classes, the only urban park which maintained a greater number of individuals in smaller classes (0-5 cm and 0-5 m) as well as the PNJu, was the Zoobotanical Park, showing a populational regenerative capacity with the characteristic model of tropical forests ("J-inverted"), while in the parks C/E and J the species did not follow this pattern. As for the individual distribution pattern, all populations showed aggregate behavior. The flowers have five stamens homodynamous, 5 staminodes and 6 anthers. The gynoecia is pluricarpelar with gamocarpelar soldering, forming an only pistil. The stigma is branched and the ovary is superior with axial placentation. The flowers have an average of 14.89mm length and 19,77mm of width. The pollen viability remained high, regardless the time collection and the dye used, with an average over 94%. The *T. speciosum* stigmas found themselves receptive at all times of evaluation, with an average percentage above 75%. All nine microsatellite loci used for genotyping were polymorphic, and amplified 84 alleles. The expected heterozygosity was higher than that observed in all markers. Most of the genetic variability is intrapopulational. The dendrogram generated by the UPGMA method allowed the formation of three distinct groups as well as the "Structure" grouping, showing that individuals were allocated to their proper populations. Based on the obtained results, we can conclude that this study provides the basis for the establishment of strategies that aim the conservation and the management of these species in these urban fragments.

Keywords: Cacaueiro, Molecular Marker, Forest Fragmentation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo, representando 40% (3.900.000 km²) dos remanescentes mundiais (INPE, 2002), sendo um dos biomas mais ricos e de maior diversidade do planeta. Estima-se que só a comunidade de plantas vasculares tenha cerca de quarenta mil espécies, das quais trinta mil são endêmicas (Mittermeier et al., 2003) com grande potencial para uso na agricultura e melhoramento genético (Souza, 1997). Além disso, a Amazônia representa uma fonte extraordinária de recursos para a população brasileira e um bem incalculável para a população mundial (Barreto et al., 2005).

Entretanto, o uso sustentável destes recursos é um desafio para as próximas gerações, em decorrência do processo de desenvolvimento ao qual a Amazônia vem sendo submetida, levando a formação de mosaicos em fragmentos florestais (Bierregaard et al., 1992), resultando em perda de biodiversidade, isolamento de populações e mudanças nos padrões de migração e dispersão das espécies (Laurance et al., 2002), afetando diretamente na estrutura e na dinâmica das comunidades florestais (Coelho et al., 2013). Nos últimos 10 anos (2004 a 2013), foram cerca de 11,7 milhões de hectares de área florestal convertida na Amazônia para atividades humanas (INPE, 2014).

Devido ao desmatamento acelerado, espécies do gênero *Theobroma* L. estão sofrendo forte erosão genética, principalmente na região sul e sudeste do Pará (Alves et al., 2013), logo, estudos que abordam a estrutura, bem como a dispersão das espécies são necessários para o estabelecimento de programas de conservação, melhoramento e até domesticação (Duarte, 2010). Várias espécies, como o cacau, cupuaçu, cacauí e cupuí têm despertado o interesse da comunidade científica, pois são frutíferas nativas com potencialidade econômica para a região Amazônica (Duarte, 2010).

O Cacauí (*Theobroma speciosum* Willd ex Spreng) é uma planta auto-incompatível (Souza e Venturieri, 1998), com árvores de porte mediano que podem alcançar 15 m de altura, frutos globoídes-elipsóide com cerca de 10 cm, sementes elipsóide-oblonga em número de 20 a 26 por fruto, recobertas por uma polpa de coloração clara e de sabor adocicado (Santos, 2003). As flores são hermafroditas agrupadas em buquet florais, apresentam mecanismos seletivos específicos que servem como atrativo para os polinizadores, como os nectários florais que se

encontram na base da cógula (pétala modificada) (Yong, 1984), esta estrutura protege as anteras e somente pequenos insetos conseguem penetra-la, além disso, existem barreiras físicas entre o giniceu e o androceu que impendem outros visitantes de percorrerem essas estruturas (Silva, 2003). Endress (1994) classificou esse tipo floral como flor armadilha.

Embora *T. speciosum* ser economicamente uma espécie inexpressiva, ela está próxima geneticamente ao cacau (*T. cacao*) e cupuaçu (*T. grandiflorum*), sendo assim uma possível fonte de genes para eles (Souza e venturieri, 2010). Esses genes podem ser de resistência a patologias das espécies cultivadas, como podridão-parda dos frutos do cacaueiro, vassoura-de-bruxa, monilíase e a murcha-vascular-estriada (Dantas Neto et al., 2005).

Segundo Raposo (2007), a falta de conhecimentos biológicos da grande maioria das espécies da flora amazônica é motivo de preocupação, em decorrência da perda destes recursos naturais. O conhecimento da estrutura populacional e da diversidade genética, bem como o entendimento dos processos reprodutivos de espécies arbóreas tropicais, podem fornecer informações importantes para auxiliar nas tomadas de decisões sobre o manejo florestal a fim de garantir a reprodução e a manutenção da diversidade genética das espécies nas áreas manejadas (Maués e Oliveira, 2010; Moura et al., 2009).

Segundo Kageyama (1987), o uso da genética de populações para quantificar a diversidade de populações arbóreas tropicais aponta algumas direções importantes que visam minimizar os impactos ambientais, e a análise do nível de conservação de determinada população, permitindo um mecanismo de seleção atuando em função da adaptabilidade das espécies (Estopa, 2006).

Dentre as técnicas utilizadas para caracterizar a diversidade genética, destacam-se os marcadores moleculares, principalmente os microssatélites (Selkoe e Toonen, 2006), devido a sua eficácia na compreensão de muitos campos da genética, como a estrutura genética de populações, fluxo gênico, análise de paternidade, viabilidade de populações, além de permitir a quantificação dos efeitos da fragmentação de habitats e estabelecer estratégias para a conservação de espécies (Lemes et al., 2003).

Outra forma de verificar o efeito da fragmentação e entender o processo reprodutivo de espécies arbóreas é através de estudos sobre a biologia floral, pois

possibilitam o estabelecimento de estratégias importantes para a conservação e manejo de espécies inseridas em programas de melhoramento genético (Kiill e Costa, 2003), além de ser a chave para o sucesso em polinizações manuais e hibridações artificiais.

Diante do acima exposto, o presente estudo teve como objetivo analisar a estrutura populacional e os aspectos reprodutivos da espécie *T. speciosum* em fragmentos florestais urbanos na cidade de Alta Floresta, MT, bem como avaliar por meio de marcadores microssatélites a diversidade genética da espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Floresta Amazônica

Localizada ao norte da América do Sul, a Floresta Amazônica possui cerca de 6,5 milhões de km², sendo que 85% encontram-se em território brasileiro e o restante dividido entre a Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela (Sivam, 2012). Apresenta um clima equatorial quente e úmido, com pouca variação da temperatura durante todo o ano, a distribuição das chuvas é irregular, com média de 2300mm anuais (Fisch et al., 1998).

A região Amazônica é detentora de um quarto da biodiversidade do planeta e ocupa a segunda posição em termos de diversidade genética de espécies frutíferas tropicais, com potencialidade econômica (Clement, 2001; Araujo et al, 2002). No entanto, o extrativismo e a exploração excessiva dessas espécies aumentaram rapidamente, e devido a tais fatores, a Amazônia tem sido foco de atenção mundial com o objetivo de assegurar sua grande biodiversidade (Fisch et al., 1998).

Segundo Sousa (1997), a perda de recursos genéticos tem sido inevitável na Amazônia, sendo o processo de substituição da vegetação natural por pastagens, responsável pelo desaparecimento de inúmeras populações de espécies vegetais.

Desde 1990 a taxa de desmatamento vem crescendo de forma acelerada e a área cumulativa desmatada na Amazônia legal brasileira chegou cerca de 653 mil km² no ano de 2003, correspondendo a 16,3%, sendo os estados do Pará, Rondônia, Mato Grosso e Maranhão os responsáveis por mais de 90% dessa área desmatada (Ferreiro, 2005).

2.2 *Theobroma speciosum*

A espécie *Theobroma speciosum* é uma frutífera silvestre pertencente à família Malvaceae, conhecida popularmente como cacauí. Está distribuída por toda região Amazônica (Cavalcante, 1991), ocorrendo preferencialmente em mata primária de terra firme não inundável (Lorenzi, 2000), sendo bastante dispersa, não frequente e pouco cultivada (Cavalcante, 1991).

Quanto à morfologia, apresenta árvores de porte mediano com cerca de 8 a 15 metros de altura, dotadas de copa muito frondosa e ramos curtos, troncos cilíndricos, lenhosos, onde, desde a base se inserem as densas e aglomeradas

inflorescências que se destacam na paisagem florestal (Lorenzi, 2000). As flores apresentam cálice e corola pentâmeros, pétalas vermelho-escuro, 5 estaminódios alternando com outros tantos estames (Ferrão, 2001).

As folhas são simples, alternas, dísticas, pecioladas com cerca de 30 a 40 cm de comprimento e 14 a 20 cm de largura, contendo de 5 a 8 pares de nervuras laterais, visivelmente inclinadas para o ápice, o limbo é coriáceo, oblongo, ovado ou elíptico. O fruto mede em torno de 10 a 12 cm de comprimento, contendo uma casca levemente aveludada de cor amarela quando maduro, possui em cerca de 20 sementes imersas numa polpa suculenta, adocicada e quase sem cheiro (Cavalcante, 1976; Cavalcante, 1991; Lorenzi, 2000; Ferrão, 2001; Rondón, 2005).

De acordo com Lorenzi (1998) a floração ocorre durante os meses de agosto a outubro e os frutos amadurecem entre fevereiro e abril. A síndrome floral é adequada à polinização por dípteros saprófagos da família Drosophilidae e Phoridae (Silva, 2003). Anualmente é produzida uma grande quantidade de sementes viáveis, disseminadas pela fauna em geral (Lorenzi, 1998). Devido ao comportamento recalcitrante, as sementes devem ser plantadas logo após a colheita, diretamente em substrato organo-arenoso, mantidas em ambiente sombreado (Carvalho et al., 2001).

Do ponto de vista econômico o cacauí é empregado como alimento humano, cosmético, para fins medicinais e ornamentais. Os frutos são consumidos *in natura* ou preparados como suco, geléias e sorvetes (Cuatrecasas 1964, Cavalcante 2010). As sementes apresentam alto teor de gordura, utilizadas na produção de chocolate artesanal por comunidades nativas da Amazônia (Cuatrecasas, 1964; Gomes, 1972), além de possuir efeito diurético e estimulante com princípios similares à cafeína (Giorgetti, 2007). A amêndoa é rica em diversos alcalóides, cafeína e teobromina e serve para fabricar manteiga de cacau (Saddi, 1977). A casca do fruto, associada à cinza da madeira, é designada para a produção de um sabão artesanal, usado no interior da Amazônia como excelente desodorante (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

T. speciosum poderá ser utilizada em programas de melhoramento genético como uma possível fonte de genes de resistência contra pragas e doenças, como é o caso da vassoura-de-bruxa, que vem prejudicando a produção nas lavouras de cacau e cupuaçu (Santos, 2003).

2.3 Fragmentação florestal

O processo acelerado de fragmentação, em decorrência do crescimento populacional, traz como consequência a formação de mosaicos de vegetação remanescente (Estopa et al., 2006), onde na maioria das vezes ocorre devido à substituição de parte da floresta por pastagem e atividades agrícolas (Carvalho et al., 2005; Oliveira et al., 2003), reduzindo o tamanho das populações naturais, ocasionando alterações nos processos ecológicos e genéticos das espécies que ali ocorrem (Estopa et al., 2006).

Essa ocupação agrícola realizada de modo inadequado vem ocasionando perdas da diversidade genética de espécies nativas da Amazônia (Tabarelli et al., 2004; Araujo et al., 2002), levando ao isolamento de populações de espécies arbóreas, reduzindo o número de indivíduos reprodutivos e a densidade populacional, afetando dessa forma a deriva genética, fluxo de genes, seleção e sistema de reprodução (Young et al., 2000).

De acordo com Melo Junior (2004), além da redução indiscriminada dos biomas e a extinção de espécies, esse efeito também reduz a capacidade das populações naturais a se adaptarem às mudanças ambientais. Desta forma, o estabelecimento de um programa de levantamento da variabilidade genética existente pode minimizar tal situação. Sendo assim torna-se necessário avaliar a diversidade biológica contida nos atuais fragmentos por meio de sua quantificação, compreendendo as variações do ambiente e a direção das mudanças nos processos ecológicos, permitindo a avaliação do potencial de perda e para conservação dos recursos naturais a longo prazo (Carvalho et al., 2005).

2.4 Estrutura populacional

A estrutura genética espacial refere-se à distribuição espacial dos genótipos dos indivíduos dentro da população, sendo determinada na maioria das vezes pelos padrões de dispersão de genes via sementes e via pólen (Moura et al., 2009), densidade de indivíduos adultos, seleção micro ambiental, regeneração e pelo sistema de reprodução (Hamrick e Loveless, 1986; Loiselle et al., 1995).

A análise do padrão espacial ou a estrutura da diversidade genética entre os indivíduos arbóreos é um componente importante para compreender os processos genéticos, ecológicos e evolucionários (Gusson, 2005), observados nas populações

e comunidades florestais, melhorando a eficiência da amostragem para maximizar a diversidade gênica ou minimizar os cruzamentos endogâmicos (Epperson, 1990).

Desta forma, para definir a escala espacial de estudos e permitir fazer inferências sobre a distribuição espacial dos genótipos, é necessário informações sobre a história de vida e sobre os mecanismos de dispersão das espécies (Gonçalves et al., 2010). Segundo Bittencourt e Sebbenn (2008), os cruzamentos endogâmicos podem ser causados devido aos baixos níveis de imigração de pólen e pela dispersão de pólen e sementes próximas à árvore matriz (Vekemans e Hardy, 2004).

2.5 Diversidade genética

Entender os padrões de variabilidade genética entre e dentro de populações é um instrumento importante na adoção de práticas eficientes de conservação, podendo servir de base para técnicas de manejo adequado de fragmentos e fornecer subsídios para medidas de conservação *in situ* (Renau-Morata et al., 2005).

A diversidade genética é fundamental para a sustentabilidade das espécies, pois fornece matéria-prima para a adaptação, evolução e sobrevivência de populações arbóreas (Rajora e Pluhar, 2003), havendo necessidade de preservação e manutenção dessa variabilidade (Araujo et al., 2002), uma vez que a redução de espécies pode ocasionar um maior ataque por pragas e doenças, limitando a produtividade e o melhoramento genético. Assim, a diversidade genética, pode ser vista como fundamental para a sustentabilidade e estabilidade do ecossistema natural (Rajora e Pluhar, 2003).

2.6 Marcadores microssatélites

Os estudos moleculares vêm fornecendo novos métodos para estudos genéticos e de evolução de plantas, com excelentes meios para a aquisição de informações genéticas relevantes a serem empregadas em programas de conservação e melhoramento genético. Para tal estudo, é necessário à utilização de marcadores moleculares que possibilitam avaliar a variabilidade genética existente dentro e entre espécies distintas (Bered et al., 1997).

Os marcadores moleculares são fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (Borém e Caixeta, 2006), sendo

amplamente utilizados em programas de melhoramento de plantas, em estudo da extensão e distribuição da variação entre as espécies, caracterização de populações, como também para investigar questões taxonômicas e evolutivas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Vários são os marcadores moleculares disponíveis para a caracterização da diversidade, sendo os microssatélites (SSR), os mais utilizados, devido ao elevado conteúdo informativo, sua robustez analítica e transferibilidade, indicados para uso em espécies florestais por serem altamente heterozigotas (Grattapaglia, 2007).

Os marcadores microssatélites (SSR) são co-dominantes, multialélicos e possuem alta reprodutibilidade com ampla resolução (Oliveira et al., 2006), apresentam capacidade de detectar polimorfismo, com grande aplicação em estudos genéticos, inclusive em conservação genética, caracterização de cultivares, melhoramento molecular, testes de paternidade e estudos de filogenia (Santos et al., 2010; Zhang et al., 2010). Tais marcadores fornecem níveis elevados de informação genética por loco, podendo ser analisados a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento, com necessidade apenas de uma pequena quantidade de DNA (Souza, 2011).

Consistem de seqüências curtas de 2-5 nucleotídeos repetidas em tandem, flanqueadas por seqüências únicas não repetidas. A variação alélica em locos de microssatélites pode ser facilmente detectada por PCR usando *primers* flanqueadores específicos (Hancock, 2000). Os marcadores microssatélites são específicos para cada espécie, no entanto, pelo fato das regiões flanqueadoras serem, na maioria das vezes, conservadas entre espécies ou gêneros próximos, é possível utilizar iniciadores desenvolvidos para espécies correlacionadas. Essa característica é denominada transferibilidade ou amplificação cruzada (Varshney, 2005; Bravo, 2006). Tal característica pode ser utilizada para minimizar os custos de implementação destes marcadores em espécies para as quais ainda não há iniciadores desenvolvidos.

2.7 Biologia Reprodutiva

O estudo da biologia floral é um fator fundamental para a compreensão da biologia reprodutiva das espécies nas comunidades vegetais (Ramírez, 2002),

inferindo diretamente no seu modo de polinização (Sousa et al., 2010), servindo de base para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético.

Segundo Techio et al. (2006), para o sucesso na seleção de genótipos e cruzamentos em um programa de melhoramento genético, estudos que avaliem a viabilidade do pólen e a receptividade estigmática são indispensáveis. A estimativa da viabilidade do grão de pólen é fator primário para que ele venha a ter oportunidade de germinar no estigma da flor, sendo um estágio decisivo à fertilização (Dafni, 1992), podendo ser realizado através de um grande número de técnicas, incluindo os métodos colorimétricos com corantes químicos específicos que reagem com os componentes celulares presentes nos grãos de pólen maduros, como por exemplo, o lugol, o carmim acético e a solução tripla de Alexander (Pagliarini e Pozzobon, 2004).

A coloração com o Lugol baseia-se em uma reação química que acontece entre o iodo e a molécula de amido. Já o carmim acético reage com o material genético existente no citoplasma, como o DNA (Pagliarini e Pozzobon, 2004), enquanto que o reativo de Alexander utiliza uma solução tripla, composta por *orange G*, fuccina básica e verde malaquita (Alexander, 1969).

Por outro lado, a taxa de fertilização e o sucesso da polinização também podem ser influenciados pela receptividade do estigma (Souza et al., 2004), pois ela determina o período de máxima receptividade, para racionalizar o processo em experimentos de hibridação e em todo e qualquer procedimento que aconteça a polinização artificial, em termos de tempo dispendido e quantidade de pólen utilizada (Bruckner et al., 1995). Uma forma de avaliar a receptividade estigmática é através do uso de peróxido de hidrogênio, onde observa-se a ação da peroxidase pela formação de bolhas de ar, consistindo em um método simples e barato (Dafni, 1992; Kearns e Inouye, 1993).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **StainTechn**, 44: 117-122, 1969.
- ALVES, R. M.; SILVA, C. R. S.; SILVA, M. S. C.; SILVA, D. C. S.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista brasileira de fruticultura**, 35: 818-828, 2013.
- ARAUJO, D. G.; CARVALHO, S. P.; ALVES, R. M. Divergência genética entre clones de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng schum). **Ciência e agrotecnologia**, 1: 13-21, 2002.
- BARRETO, P.; BARRETO, G.; VERÍSSIMO, T. **Pressão humana na floresta amazônica brasileira**, Belém, Ed. Governo do Estado do Pará, 2005.
- BERED, F.; NETO, J. F. B.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no Melhoramento Genético de plantas. **Ciência Rural**, 3: 513-520, 1997.
- BIERREGAARD, R. O. T.; LOVEJOY, T. E.; KAPOV, V.; SANTOS, A.; HUTCHINGS, R. The biological dynamics of tropical rain forest fragments. **Bioscience**, 42: 859-866, 1992.
- BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. Pollen movement in a continuous forest of *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, 3: 855-868, 2008.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Minas Gerais: Folha de Viçosa, 2006, 374p.
- BRAVO, J. P.; HOSHINO, A. A.; ANGELICI, C. M. L. C. D.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, 29: 516-524. 2006.
- BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REGAZZI, A. J.; SILVA, E. M. Self-Incompatibility in Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**, 370: 45-57, 1995.
- CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA FILHO, A. T.; VILELA, E. A.; CURI, N.; VAN DEN BERG, E.; FONTES, M. A. L.; BOTEZELLI, L. Distribuição de espécies arbóreo-arbustivas ao longo de um gradiente de solos e topografia em um trecho de floresta ripária do Rio São Francisco em Três Marias, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 2: 329-345, 2005.
- CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; NASCIMENTO, W. M. O. **Classificação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia de acordo com o comportamento de armazenamento**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 2001. 4p. (Embrapa-CPATU. Comunicado Técnico, 60).

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis na Amazônia**. 7th ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2010. 282 p.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Manaus: CNPq/INPA, 1976, 166p.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5 ed. Belém: CEJUP/CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991. 279p. (Coleção Adolfo Ducke).

CLEMENT, C. R. Melhoramento de Espécies Nativas. Recursos Genéticos & Melhoramento - Plantas. **Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso**, Rondonópolis, 423-441, 2001.

COELHO, R. F. R.; MIRANDA, I. S.; MITJA, D. Conservação das florestas do projeto de assentamento benfica, sudeste da Amazônia. **Ciência Florestal**, 23: 1-17, 2013.

CUATRECASAS, J. A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the U.S. National Herbarium**, 35: 379-607, 1964.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)**. New York, Oxford: University press, 1992. 250p.

DANTAS NETO, A.; CORRÊA, R. X.; MONTEIRO, W. R.; LUZ, E. D. M. N.; GRAMACHOS, K. P.; LOPES, U. V. Caracterização de uma População de Cacaueiro para Mapeamento de Genes de Resistência à Vassoura-de-Bruca e Podridão-Parda. **Fitopatologia Brasileira**, 30: 380-386, 2005.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.

DUARTE, O. R. **Distribuição geográfica de Cupuí em Roraima**. Reunião Regional da SBPC em Boa Vista, Roraima, 2010.

ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambudge Tropical Biology series, 51p, 1994.

EPPERSON, B. K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S., ed. **Plant populationgenetics, breeding and genetic resources**, 229-253, 1990.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M.; MOURA, M. C. O.; BOTREL, M. C. G.; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish). **Scientia Forestalis**, 70: 97-106, 2006.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 2001, v.3, 652p.

FERREIRA, L. V.; ALMEIDA, E. V. S. O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. **Estudos avançados**, 19: 157-166, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares. 3.ed. Brasília: **Embrapa-CENARGEN**, 1998, 220 p.

FISCH, G.; MARENGO, J. A.; NOBRE, C. A. Uma revisão geral sobre o clima da Amazônia. **Acta Amazonica**, 2: 101-126, 1998.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system. A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, 109: 338–347, 2007.

GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel, 1972. 453p.

GONÇALVES, A. C.; REIS, C. A. F.; VIEIRA, F.A.; CARVALHO, D. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 33: 325-332, 2010.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**, 2007, 175-200p.

GUSSON, E.; SEBEN, A. M.; KAGEYAMA P. Y.; Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, 67: 123-135, 2005.

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

HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites Evolution and applications**. New York: Oxford University press, 2000, 1-9p.

INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). 2002. **Monitoramento da floresta amazônica por satélite 2000-2001**. INPE, Brasil.

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (Inpe). 2014. Projeto PRODES: **Monitoramento da Floresta Amazônica por Satélite**. Ministério da Ciência e Tecnologia. Disponível em: <http://www.obt.inpe.br/prodes/index.php>

KAGEYAMA, P. Y. Conservação in situ de recursos genéticos de plantas. **Scientia Forestalis**, 35: 3-37, 1987.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. University Press of Colorado. Niwot Ridge, CO, USA, 1993.

KIILL, L. H. P.; COSTA, J. G. Biologia floral e sistema reprodutivo de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. **Ciência rural**, 33: 851-856, 2003.

LAURANCE, W. F.; LOVEJOY, T. E.; VASCONCELOS, H. E.; BRUNA, E. M.; DIDHAN, R. K.; STOUFFER, F. C.; GASCON, C.; BIERRAGAARD, R. O.; LAWRENCE, S. G.; SAMPAIO, E. E. Ecosystem decay of amazonian Forest fragments: a 22-year investigation. **Conservation Biology**, 16: 605-618, 2002.

LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, 12: 2875-2883, 2003.

LOISELLE, B. A.; SORK, V. L. ; NASON J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, 82: 1420-1425, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. v. 2.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.

MAUÉS, M. M.; OLIVEIRA, P. E. A. M. Conseqüências da fragmentação do habitat na ecologia reprodutiva de espécies arbóreas em florestas tropicais, com ênfase na Amazônia. **Oecologia Australis**, 14: 238-250, 2010.

MELO JUNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J. S. P.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, 66: 56-65, 2004.

MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, T. M.; BROOKS, J. D.; PILGRIM, W. R.; KONSTANT, G. A. B.; FONSECA, C.; KORMOS, C. G. Wilderness and biodiversity conservation. **Proceedings of the National Academy of Science** 100: 10309-10313, 2003.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA, G. C. X.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microsatélites. **Scientia Forestalis**, 37: 143-150, 2009.

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

OLIVEIRA, L. C.; VALENTIM, N. W.; FIGUEIREDO, E. O.; FRANKE, I. L. Impactos da exploração seletiva de madeira em áreas em processo de fragmentação florestal na Amazônia Ocidental. **Revista Cerne**, 2: 213-220, 2003.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. (2004) II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF. PARENTE, V. M.; OLIVEIRA, J, R. A. R.; COSTA, A. M. **Projeto Potencialidades**

Regionais Estudo de Viabilidade Econômica – Cacau. Disponível em: <http://www.suframa.gov.br>> Acesso em: 28/10/ 2014.

RAJORA, O. P.; PLUHAR, S. A. Genetic diversity impact of Forest fire, Forest harvesting and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*), **Theoretical and Applied Genetics**, 106: 1203-1212, 2003.

RAMÍREZ, N. Reproductive phenology, life-forms, and habitats of the Venezuelan central plain. **American Journal of Botany**, 89: 836-842 2002.

RAPOSO, A. Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) visando o manejo e a conservação da espécie. **Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)** – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

RENAU-MORATA, B.; MOSSELER, A. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) accessed using random amplified polymorphic DNA. **American Journal of Botany**, 92: 875-884, 2005.

RONDON, J. B.; CUMANA-CAMPOS, L. J. Revisión taxonómica del género *Theobroma* (Sterculiaceae) en Venezuela. **Acta Botânica**, 28: 113-134, 2005.

SADDI, N. A primeira contribuição sobre a flora de Humboldt (Aripuanã, Mato Grosso). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 26. 1975, Rio de Janeiro. **Trabalhos...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1977.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C. Molecular characterization of onion cultivars using microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45: 49–55, 2010.

SANTOS, S. F. **Estrutura Histoquímica de Sementes do Gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae).** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. 105p. (Dissertação – Mestrado em Recursos Genéticos vegetais).

SELKOE K. A.; TOONEN R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology**, 9: 615-629, 2006.

SILVA, A. A. R. **Polinização de Cacaú (*Theobroma speciosum* Wild. ex Spreng. Sterculiaceae): Implicações para a conservação.** Belém: Universidade Federal do Pará, 2003. 77p. (Dissertação - Mestrado em Zoologia).

SIVAM - SISTEMA DE VIGILÂNCIA DA AMAZÔNIA. Amazônia Legal, 2012. Disponível em <[HTTP://www.sivam.gov.br/AMAZONIA/apres1.htm](http://www.sivam.gov.br/AMAZONIA/apres1.htm)>. Acesso em: 20 jul. 2014.

SOUSA, A. C. B.; JUNGSMANN, L.; CAMPOS, T.; SFORÇA, D. A.; BOAVENTURA, L. R.; SILVA, G. M. B.; ZUCCHI, M. I.; JANK, L.; SOUZA, A. P. Development of microsatellite markers in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) and their transferability to other tropical forage grass species. **Plant Breeding**, 130: 104-1011, 2011.

- SOUZA, S. P.; VENTURIERI, G. A. Floral phenology of cacau-cabeça-de-urubu (*Theobroma obovatum*). In- Venturieri, GA. **Biologia aplicada à domesticação de fruteiras amazônicas do gênero Theobroma - Primeiro relatório**: CNPq/Programa de Trópico Úmido - PUT/Proc. n. 63.00.13/95. 105 p. Belém, PA, Brasil, 1998.
- SOUZA, M. S.; VENTURIERI, A. G. Floral Biology of Cacauhy (*Theobroma speciosum* - Malvaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53: 861-872, 2010.
- SOUZA, J. H.; PIGOZZO, C. M.; VIANA, B. F. Polinização de manga (*Mangifera indica* L. - Anacardiaceae) variedade Tommy atkins, no Vale do São Francisco, Bahia. **Oecologia Australis**, 14: 165-173, 2010.
- SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G.; AMARAL, A. T. E.; MADUREIRA, H. C. Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Passifloraceae). **Scientia Horticulturae**, 101: 373-385, 2004.
- SOUZA, N. R. Conservação de recursos fitogenéticos da Amazônia em coleções diversificadas avaliação do estabelecimento de doze espécies. **Boletim de Pesquisa 2. EMBRAPA**, 1997.
- TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.; GASCON, C. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. **Biodiversity and Conservation**, 13: 1419-1425, 2004.
- TECHIO, V. H.; DAVIDE, I. C.; PEDROZO, C. A.; PEREIRA, A. V. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Acta Scientiarum**, 28: 7-12, 2006.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Biotechnology**, 23: 48-55. 2005.
- VEKEMANS, X.; HARDY, J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, 13:921-935, 2004.
- YOUNG, A. M.; SCHALLER, M.; STRAND, M. A. Floral nectaries and trichomes in relation in some species of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae). **American Journal of Botany**, 71: 466-480, 1984.
- YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Eds.) Forest conservation genetics: principles and practice. **Collingwood: CSIRO Publishing**, 2000. p. 239-251.
- ZHANG, X.; ZHANG, Y.; YAN, R.; HAN, J.; HONG, F.; WANG, J. H.; CAO, K. Genetic variation of white clover (*Trifolium repens* L.) collections from China detected by morphological traits, RAPD and SSR. **African Journal of Biotechnology**, 9: 302-304, 2010.

4. CAPÍTULOS

4.1 CAPÍTULO 1

Efeito da fragmentação na diversidade genética de populações naturais de *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng.

RESUMO

A fragmentação florestal reduz o tamanho efetivo das populações naturais, isola indivíduos na paisagem e conseqüentemente provoca alterações no sistema de cruzamento das espécies, como o aumento do grau de parentesco entre indivíduos e a endogamia. Verificar o impacto da degradação do habitat em remanescentes florestais auxilia na avaliação das conseqüências genéticas e ecológicas destas mudanças, e permite formular estratégias de conservação eficazes e sustentáveis para a gestão dos recursos genéticos de espécies que habitam paisagens degradadas. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a diversidade genética em populações fragmentadas de *T. speciosum*, por meio de marcadores microsatélites. Foram selecionados três fragmentos florestais urbanos no município de Alta Floresta-MT denominados: parque C/E, parque J e parque Zoobotânico. Um total de 75 indivíduos foram amostrados, sendo 25 em cada fragmento, dos quais foram coletadas folhas para a extração de DNA genômico. As amplificações foram realizadas via PCR com o emprego de 9 *primers* SSR. Todos os nove locos microsatélites utilizados na genotipagem foram polimórficos e amplificaram 84 alelos. A heterozigotidade esperada apresentou média de 0,97 acima da observada em todos os marcadores. A AMOVA revelou que a maior parte da variabilidade encontra-se dentro das populações (64%) do que entre as populações (36%). O dendrograma gerado pelo método UPGMA possibilitou a formação de 3 grupos distintos, assim como no agrupamento do “Structure”, demonstrando que os indivíduos ficaram alocados nas suas devidas populações. Devido aos elevados níveis de diversidade gênica detectados no presente estudo nas três populações, podemos ressaltar a importância da manutenção e a proteção dessa diversidade ao longo da paisagem estudada.

Palavras-chave: Variabilidade genética, Marcadores SSR, Amazônia.

***Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. fragmentation effect on genetic diversity of natural populations**

ABSTRACT

The Forest fragmentation reduces the effective size of natural populations, isolates individuals in the landscape and consequently causes changes in the species crossing system such as the increasing degree of relatedness between individuals and in breeding. Checking the impact of habitat degradation in forest fragments assist in the assessment of genetic and ecological consequences of these changes, enabling to formulate effective and sustainable conservation strategies to manage the genetic resources of species that in habit degraded landscapes. In this context, the present study aimed to evaluate the *T. speciosum* genetic diversity in fragmented populations using microsatellite markers. Three urban forest fragments were selected in Alta Floresta municipal district-MT denominated: Park C / E, Park J and Zoobotanic Park. A total of 75 individuals were sampled, 25 in each fragment, whose leaves were collected for the genomic DNA extraction. The amplifications were performed by PCR using 9 SSR *primers*. All nine microsatellite loci used for genotyping were polymorphic and amplified 84 alleles. The expected heterozygosity showed a 0,97 average, above the observed one in all markers. The AMOVA test revealed that most of the variability is within populations (64%) than among the populations (36%). The dendrogram generated by UPGMA method enabled the formation of three distinct groups as well as in the "Structure" group, showing that the individuals were allocated to their proper populations. Due to the high levels of genetic diversity detected in all these three populations studied, we can emphasize the importance of maintaining and protecting this diversity along with the investigated landscape.

Keywords: Genetic variability, SSR markers, Amazon.

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma vasta diversidade de tipos de solos e climas, favorecendo o cultivo de diversas frutíferas tropicais, elevando o seu potencial na fruticultura (Simão, 1998). Na Amazônia, essa potencialidade é encontrada nas mais diversas espécies das famílias botânicas, como por exemplo, Fabaceae, Bignoniaceae, Lauraceae, Lecythidaceae, Rubiaceae, Anacardiaceae, Malvaceae, Asteraceae, Araceae, Arecaceae, Poaceae, entre outras (Neto, 2011).

As espécies do gênero *Theobroma* (Malvaceae) são endêmicas da região Amazônica (Dias, 2001) e demandam pesquisas para sua integração aos programas de melhoramento pois representam recursos genéticos com potencialidade para a obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a pragas e doenças (Almeida et al., 2009).

Segundo Souza e Venturieri (2009), a espécie silvestre *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng., apresenta uma possível fonte de genes de resistência a doenças, que poderá servir de base para programas de melhoramento genético das espécies mais relevantes economicamente, como *T. cacao* (cacau) e *T. grandiflorum* (cupuaçu).

Em áreas florestais amazônicas do estado de Mato Grosso, principalmente nas cidades de Aripuanã e Alta Floresta, seus frutos são consumidos *in natura* ou preparados como sucos (Neto, 2011). Corrêa, (1926) relata que no norte do país os frutos são frequentemente encontrados à venda nos mercados, principalmente no estado do Pará, onde segundo Ferrão, (2001) são utilizados na produção de sucos, geleias, doces e sorvetes (Saddi, 1977).

As sementes são amplamente utilizadas na confecção de chocolates, bombons e bebidas como vinhos, licores, vinagres, etc. (Saddi, 1977). A casca do fruto associada à cinza da madeira é designada para a produção de um sabão artesanal, usado no interior da Amazônia como excelente desodorante (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002). A sua ampla utilização confere condições diferenciadas para se estabelecer como uma nova opção no mercado interno e externo de frutas nativas da região Amazônica.

No entanto, as espécies nativas remanescentes do gênero *Theobroma* estão sofrendo forte erosão genética em função da ação antrópica (Alves et al., 2013), levando ao isolamento das populações em pequenos fragmentos reduzindo o

número de indivíduos reprodutivos e a densidade populacional, afetando os processos genéticos como deriva genética, fluxo de genes, seleção e sistema de reprodução (Young e Boyle 2000).

Segundo Costa et al. (2011), informações sobre a variação genética de espécies nativas são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a domesticação e incorporação dessas espécies nos sistemas produtivos regionais, bem como minimizar os impactos ambientais e estabelecer um plano de conservação efetiva.

Os marcadores moleculares são uma das principais ferramentas utilizadas para estimar a estrutura populacional e caracterizar a diversidade genética em populações naturais (Selkoe e Toonen, 2006), pois fornecem uma abordagem mais específica de cada indivíduo e são eficientes para a determinação da variabilidade genética (Yanaka, 2005).

Existem vários marcadores moleculares disponíveis, dentre esses destacam-se os que usam a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como os microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*), sendo o mais utilizado devido ao seu elevado conteúdo informativo, sua robustez analítica e transferibilidade (Grattapaglia, 2007; Santos et al., 2010). São encontrados abundantemente no genoma e apresentam polimorfismo do tipo codominante (Li et al., 2009).

Estudos realizados com marcadores microssatélites vêm evidenciando, a diversidade e caracterização genética da espécie *Theobroma cacao* (Lanaud et al., 1999; Alves et al., 2013; Pugh et al., 2004; Schnell, 2007). *Primers* desenhados para *T. cacao* foram transferidos para outras espécies do gênero como *Theobroma grandiflorum* para amplificar microssatélites (Lanaud et al., 1999).

Avaliar a variabilidade genética é uma estratégia fundamental, principalmente para espécies nativas pouco estudadas, cuja magnitude da diversidade ainda não é totalmente conhecida (Costa et al., 2011).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética em populações de *T. speciosum*, com ocorrência natural em fragmentos florestais urbanos, localizados na cidade de Alta Floresta, MT, por meio de marcadores microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi desenvolvido em três fragmentos urbanos, denominados de parques municipais: C/E que compreende uma área de 9,19 ha, J com uma área de 7,38 ha e o Zoobotânico que possui uma área de 17,6 ha, sendo o maior em extensão. Os fragmentos estão localizados no município de Alta Floresta, região norte do estado de Mato Grosso (Figura 1). A cidade de Alta Floresta está a 283 m de altitude, o clima é equatorial quente e úmido e a temperatura média anual é de 24°C, com máxima de 40°C.

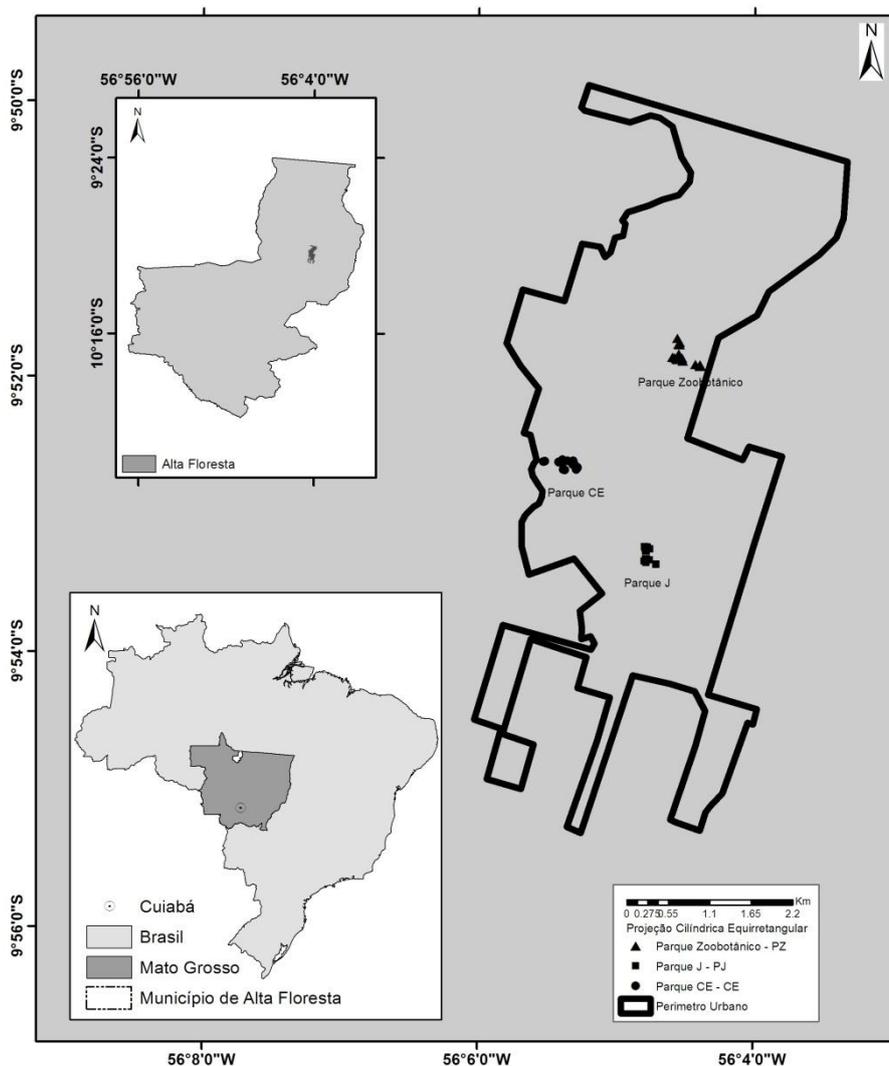


Figura 1. Localização do município de Alta Floresta – MT e dos três fragmentos urbanos em estudo.

Na região, predomina a vegetação do tipo Floresta Ombrófila Aberta. O clima é do tipo AW segundo a classificação de Koopen, sendo verão tropical chuvoso com nítida estação seca no inverno (IBGE, 1997).

Material vegetal

Para a caracterização da diversidade genética, foram amostrados 25 indivíduos de *T. speciosum* em cada um dos fragmentos (Figura 2), totalizando 75 indivíduos. Todos os indivíduos amostrados foram georreferenciados com um receptor de **GPS Garmin Etrex®**.

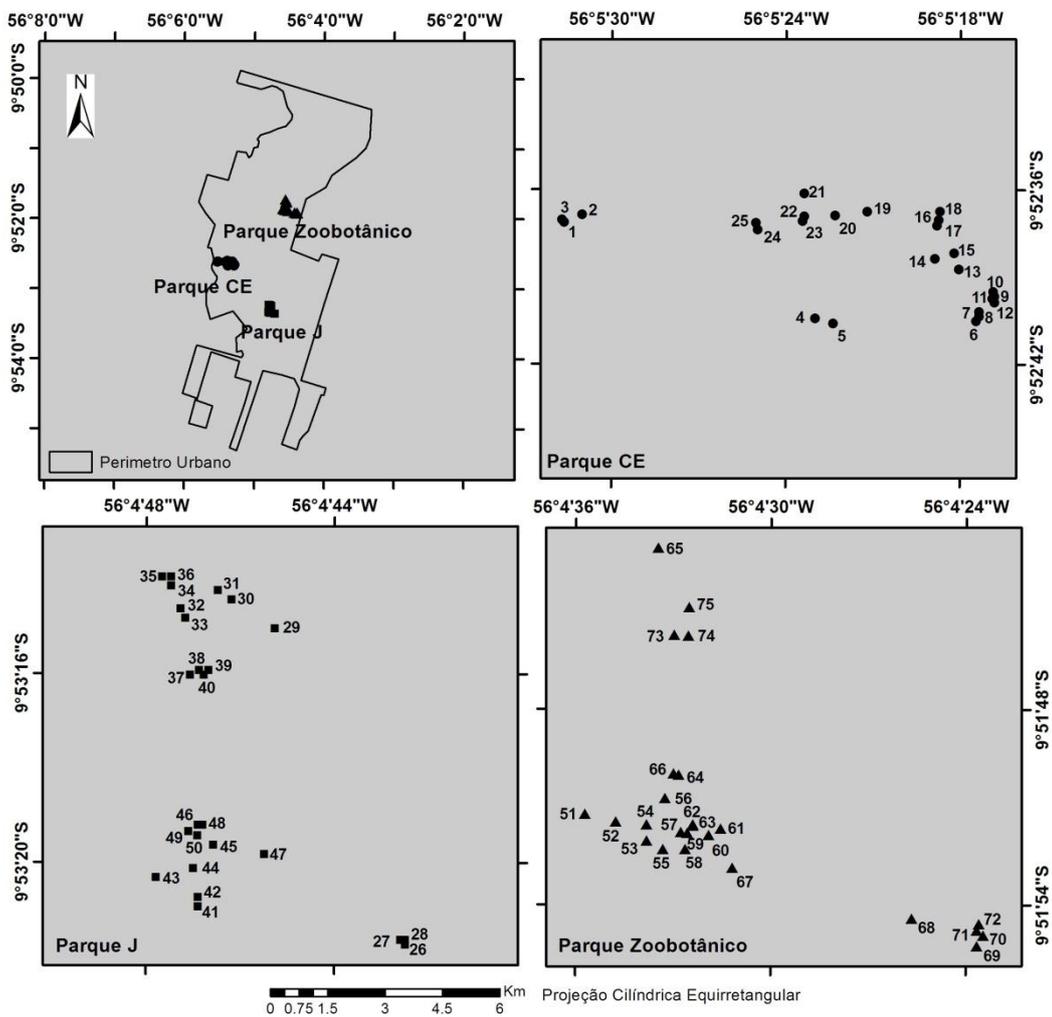


Figura 2. Localização dos indivíduos de *Theobroma speciosum* nas populações amostradas.

Com o auxílio de um podão, foram coletadas amostras de material foliar em cada um dos indivíduos, preferencialmente as que se encontravam em estágio juvenil, sem danos mecânicos ou sinais de doença.

O material coletado foi devidamente identificado e acondicionado ainda em campo em recipientes contendo sílica gel e posteriormente, armazenado em freezer a -20°C no laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), *campus* Universitário de Alta Floresta – MT.

Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 100 mg de folhas, usando o método de CTAB descrito por Doyle & Doyle (1990), com modificações: aumento da concentração de polivinilpirrolidona (PVP) de 1% para 2% e de β -mercaptoetanol de 0,2% para 3% no tampão de extração.

A confirmação da quantidade do DNA extraído foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA extraído foi comparado com DNA padrão (*lambda*) com amplitude de variação de 10, 20, 50 e 100 ng/ μL . O DNA quantificado foi diluído para a obtenção das soluções de trabalho a 2ng/ μL .

Amplificação e genotipagem de locos microssatélites

Foi testada a transferibilidade dos vinte e três pares de *primers* microssatélites (SSR) isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999) para a espécie *T. cacao*, utilizando três indivíduos de *T. speciosum* para amplificação inicial via PCR. Dos vinte e três *primers* testados, nove foram selecionados para análise da diversidade genética de *T. speciosum* (Tabela 1).

Tabela 1. Características de 09 *primers* SSR isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999) selecionados para o estudo da diversidade genética em *T. speciosum*. (Ta) Temperatura de anelamento); (pb) pares de bases

Nome	Sequência (5'-3')	Ta(°C)	Tamanho esperado (pb)
mTcCIR7	ATGCGAATGACAACCTGGT GCTTTCAGTCCTTTGCTT	51	160
mTcCIR9	ACCATGCTTCCTCCTTCA ACATTTATACCCCAACCA	51	274
mTcCIR10	ACAGATGGCCTACACACT CAAGCAAGCCTCATACTC	46	208
mTcCIR11	TTTGGTGATTATTAGCAG GATTCGATTTGATGTGAG	46	298
mTcCIR17	AAGGATGAAGGATGTAAGAG CCCATACGAGCTGTGAGT	51	271
mTcCIR19	CACAACCCGTGCTGATTA GTTGTTGAGGTTGTTAGGAG	46	376
mTcCIR22	ATTCTCGCAAAAACCTTAG GATGGAAGGAGTGTAATAG	46	289
mTcCIR26	GCATTCATCAATACATTC GCACTCAAAGTTCATACTAC	46	298
mTcCIR28	GATCAATCAGAAGCAAACACAT TAAAGCAGCCTACCAAGAAAAG	46	336

As reações de amplificação via PCR foram realizadas em termociclador Biocycler com um volume final de 13 µL, sendo 0,12µL de Taq DNA polimerase (Phoneutria); 1,5µL Tampão 10x [10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 50m MKCl, 0,1% de tween, 10mM MgCl₂]; 0,5µL MgCl₂ (50mM); 2µL de *primer* F; 2µL de *primer* R; 3µL de dNTPs; 1µL de DNA; 2,88 µL de água destilada e autoclavada.

O programa de amplificação utilizado foi de acordo com o descrito por Lanaud et al. (1999), com modificações: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguido por 32 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 46°C – 51°C (dependendo do *primer* utilizado) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 1 ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 4% (m.v⁻¹) em tampão de corrida TBE 1X, em voltagem constante de 85V por aproximadamente quatro horas. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação, com o marcador molecular de 100 pb DNA Ladder. A coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo (0,6 ngmL⁻¹). Em

seguida os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados com câmara digital.

Análise dos dados

Os fragmentos de SSR (produtos de amplificação) foram analisados no programa GelQuant Pro® (DNR, 2006) para a construção de uma matriz com base no tamanho das bandas (pb) encontradas nos géis. Os dados da matriz foram analisados pelo programa GenAlEx 6.5® (Peakall e Smouse 2006) para a obtenção da análise das coordenadas principais (PCA) e da variância molecular (AMOVA), utilizada para inferir sobre a estrutura genética das populações por meio da decomposição total nos componentes entre e dentro de populações.

O programa Power Marker V.3.25 (Liu e Mouse, 2005) foi utilizado para a determinação da frequência alélica, diversidade gênica, heterozigosidade observada e esperada e PIC (Conteúdo de informação de polimorfismo). A matriz dos valores de distância genética de Nei (1983) entre os indivíduos, gerada pelo programa Power Marker V.3.25, foi importada para o MEGA 6.5 (Kumaret al., 2004) para a construção do dendrograma utilizando o método UPGMA.

O programa “Structure” (Pritchard et al., 2000), baseado em estatística bayesiana foi utilizado para inferir o número de grupos (k). Foram realizadas 20 corridas para cada valor de K, 200.000 “burn-ins” e 500.000 simulações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). Para definição do K mais provável em relação aos propostos foram utilizados os critérios de Pritchard e Wen (2004) e também o critério de Evano et al. (2005), sendo os resultados enviados para o site Structure Harvester.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os nove locos microssatélites utilizados na genotipagem dos 75 indivíduos de *T. speciosum* foram todos polimórficos e amplificaram 84 alelos, com variação de seis a treze alelos por loco com média de 9,33 por *primer*. O número máximo de alelos (13) foi encontrado no *primer* (mTcCIR19) e o mínimo (6) no *primer* (mTcCIR7) (Tabela 2).

Segundo Alves et al. (2007), a maioria das espécies arbóreas tropicais apresentam um grande número de alelos por loco e conseqüentemente uma alta

heterozigosidade esperada. Entretanto, Lanaud et al. (1999) analisando genótipos de *T. cacao* e Alves et al. (2013), em acessos de *T. grandiflorum*, obtiveram médias inferiores ao encontrado para *T. speciosum* neste estudo, sendo 4,4 alelos por locus para *T. cacao* e 3,21 para *T. grandiflorum*.

A diversidade gênica (Dg) variou de 0,69 para o *primer* mTcCIR22 a 0,89 para o *primer* mTcCIR28 com média de 0,79 por *primer* (Tabela 2).

Todos os locos apresentaram um elevado conteúdo de informação polimórfica (PIC), variando de 0,65 a 0,88 com média de 0,76 (Tabela 2), demonstrando a qualidade dos marcadores, pois segundo Botstein et al. (1980), marcadores que apresentam PIC acima de 0,50 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,50 são mediantemente informativos e valores inferiores a 0,25 pouco informativos. Assim, destaca-se os *primers* mTcCIR17, mTcCIR19 e mTcCIR28, pois apresentaram valores superiores a 0,75. De acordo com Boza et al. (2013), marcadores altamente polimórficos, são úteis na identificação da diversidade genética. O alto valor de PIC encontrado para *T. speciosum* indicou a existência de uma alta variabilidade genética.

Tabela 2. Número de alelos (Na), Diversidade Gênica (Dg), Heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho) e PIC para os 9 *primers* SSR, com base na amplificação de 75 indivíduos de *Theobroma speciosum* das três populações amostradas no município de Alta Floresta, MT

Loco	Na	Dg	He	Ho	PIC
mTcCIR7	6	0,78	0,94	0,02	0,75
mTcCIR9	8	0,80	0,90	0,02	0,77
mTcCIR10	8	0,75	0,96	0,34	0,71
mTcCIR11	8	0,71	0,97	0,04	0,67
mTcCIR17	11	0,85	0,97	0,10	0,83
mTcCIR19	13	0,85	1	0,36	0,84
mTcCIR22	10	0,69	0,97	1	0,65
mTcCIR26	8	0,79	1	0	0,77
mTcCIR28	12	0,89	1	0,33	0,88
Total	84	-	-	-	-
Média	9.33	0.79	0.97	0.25	0.76

A média da heterozigozidade observada foi de 0,24 com valor máximo de 1 para o *primer* mTcCIR22 e mínimo de 0,02 para o *primer* mTcCIR7, já nom TcCIR26 não foi observado heterozigosidade (0) (Tabela 2). A heterozigozidade esperada apresentou média de 0,97, estando sempre acima da observada em todos os marcadores, com exceção do marcador mTcCIR22 que foi superior (Tabela 2).

Todos os marcadores com exceção do mTcCIR22 apresentaram nível reduzido de heteroziguidade, com valores inferiores a 50%.

Corroborando com esses resultados, Zhang et al. (2012), em estudo com populações de *T. cacao*, utilizando 15 locos microssatélites, obtiveram também valores superiores para H_e (0,56) em comparação com H_o (0,38). Da mesma forma ocorreu para a espécie *T. grandiflorum* em um estudo com 21 marcadores microssatélites, onde H_e (0,41) e H_o com (0,35) (Alves et al., 2007). Motamayor et al. (2002) e Sereno et al. (2006) em pesquisas com *T. cacao*, obtiveram valores equivalentes, $H_e = 0,54$ e $0,56$; $H_o = 0,34$ e $0,41$, respectivamente.

Segundo Carvalho (2010), a baixa taxa de heteroziguidade está associada ao isolamento reprodutivo causado pela fragmentação florestal, pois a redução continua no tamanho das populações as submetem a perda de variabilidade genética por deriva genética (Sebbenn e Etori, 2001). A perda de variabilidade genética nos fragmentos florestais em estudo levou a população de *T. speciosum* a apresentar altos índices de endogamia, com uma média de 0,61 para a população do parque C/E, 0,59 para o parque J e 0,52 para o parque zoobotânico (Tabela 3).

Observamos que esse alto índice de endogamia pode ser explicado pela ação dos dispersores que deixam as sementes perto dos seus parentais, levando a espécie a apresentar um padrão de distribuição agregado. A dispersão de sementes perto da árvore materna favorece a formação de uma estrutura genética espacial (Sobierajski et al., 2006), que aumenta a possibilidade de cruzamento entre indivíduos da mesma família, gerando endogamia biparental e conseqüentemente, depressão por endogamia biparental. Sebbenn et al. (2011), em um estudo com *Copaifera langsdorffii*, relatam que um fragmento urbano pequeno pode influenciar a distância de dispersão de sementes, pois limita as áreas disponíveis para o estabelecimento das plântulas.

Todas as populações apresentaram uma alta diversidade gênica, entretanto a população do parque C/E demonstrou a maior diversidade com 0,62 (Tabela 3). A heteroziguidade esperada foi de 0,97 para a população do parque C/E, 0,94 para o parque J e 0,99 para o Zoobotânico, estando sempre acima da heteroziguidade observada.

Já o conteúdo de informação polimórfica foi alto para todos os fragmentos, sendo de 0,55 para o parque C/E, 0,50 para o parque J e 0,47 para o parque Zoobotânico.

Tabela 3. Comparação da diversidade genética entre as três populações estudadas via índice de diversidade gênica de Nei (H)

População	D.G	He	Ho	F	PIC
Parque C/E	0,62	0,97	0,24	0,61	0,55
Parque J	0,56	0,94	0,23	0,59	0,50
Parque Zoo	0,54	0,99	0,26	0,52	0,47

A análise de coordenadas principais (PCA) explicaram 41,11% da variação total entre as amostras, sendo de 18,45% para o primeiro componente, 13,96% para o segundo e 8,70% para o terceiro. Observou-se a formação de três grupos distintos conforme demonstrado na Figura 3, onde os indivíduos ficaram alocados de acordo com a sua similaridade genética e a distribuição geográfica.

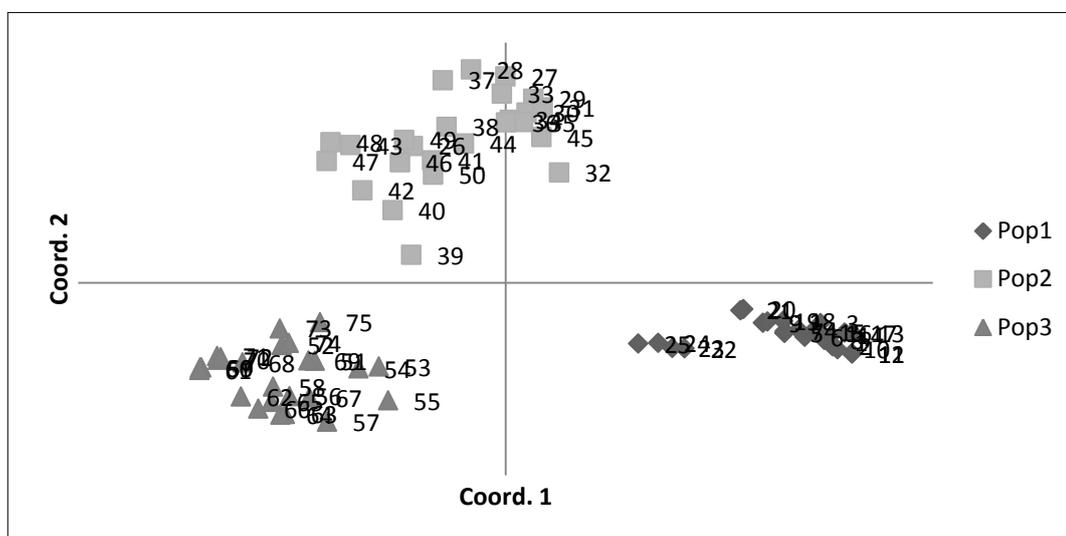


Figura 3: Dispersão gráfica a partir da análise das coordenadas principais dos 75 indivíduos de *Theobroma speciosum* provenientes dos três parques florestais urbanos amostrados em Alta Floresta, MT.

A AMOVA revelou que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações com 64% do que entre as populações que representam 36%. Espécies perenes de fecundação cruzada, assim como *T. speciosum*, acumulam maior variabilidade genética dentro de suas populações, e de acordo com Hamrick

et al. (1991), representam menor diferenciação entre populações. Segundo Loveless e Hamrick (1984), muitas espécies arbóreas possuem efetivos meios de dispersão de genes e, com isto, mantêm altos níveis de variação genética dentro de populações.

Theobroma speciosum é uma espécie de planta com sistema reprodutivo auto-incompatível (Souza e Venturieri, 1998), sendo, portanto, eficientemente polinizada somente se seus polinizadores (*Drosophila* sp.) visitarem outros indivíduos na população, Silva e Martins (2004). Apesar deste estudo não abranger os meios de polinização de *T. speciosum* por meio dos resultados de diversidade, pode-se inferir que ocorreu troca gênica entre os indivíduos das populações.

O dendrograma gerado a partir da distância genética de Nei (1983) pelo método UPGMA, possibilitou a formação de 3 grupos distintos, onde os agrupamentos formados representam as populações isoladamente, pois todos os indivíduos ficaram alocados nas suas devidas populações (Figura 4), revelando que existe uma maior similaridade genética entre os genótipos de cada população.

O grupo I (G1) foi formado pela população do parque C/E (genótipos de 1-25). Neste agrupamento pode ser detectado a formação de três subgrupos, sendo o subgrupo I constituído pelos indivíduos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25; o subgrupo II pelo indivíduo 3 e o subgrupo III pelos indivíduos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 (Figura 4). Nesse grupo os indivíduos que apresentaram maior similaridade foram o 11 e o 12 e o mais dissimilar foi o indivíduo 3.

O grupo II (G2) foi formado pela população do parque J (genótipos do 26-50). Neste agrupamento pode ser detectado a formação de dois subgrupos, sendo o subgrupo I formado pelos indivíduos 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 46 e 47; o subgrupo II 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 49 e 50. Dentro desta população os indivíduos mais similares foram: 27, 28, 49 e 50, já o indivíduo que apresentou a maior dissimilaridade foi o indivíduo 45 (Figura 4).

O grupo III (G3) foi formado pela população do parque zoobotânico (genótipos do 51-76). Neste agrupamento observou-se a formação de três subgrupos, sendo o subgrupo I formado pelos indivíduos 52 e 53; o subgrupo II 54, 55, 56, 57, 62, 63, 64, 65 e 66; o subgrupo III 51, 58, 59, 60, 61, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 e 75. Os indivíduos mais similares nessa população foram: 59, 60, 64 e 66, e o mais dissimilar foi o indivíduo 51 (Figura 4).

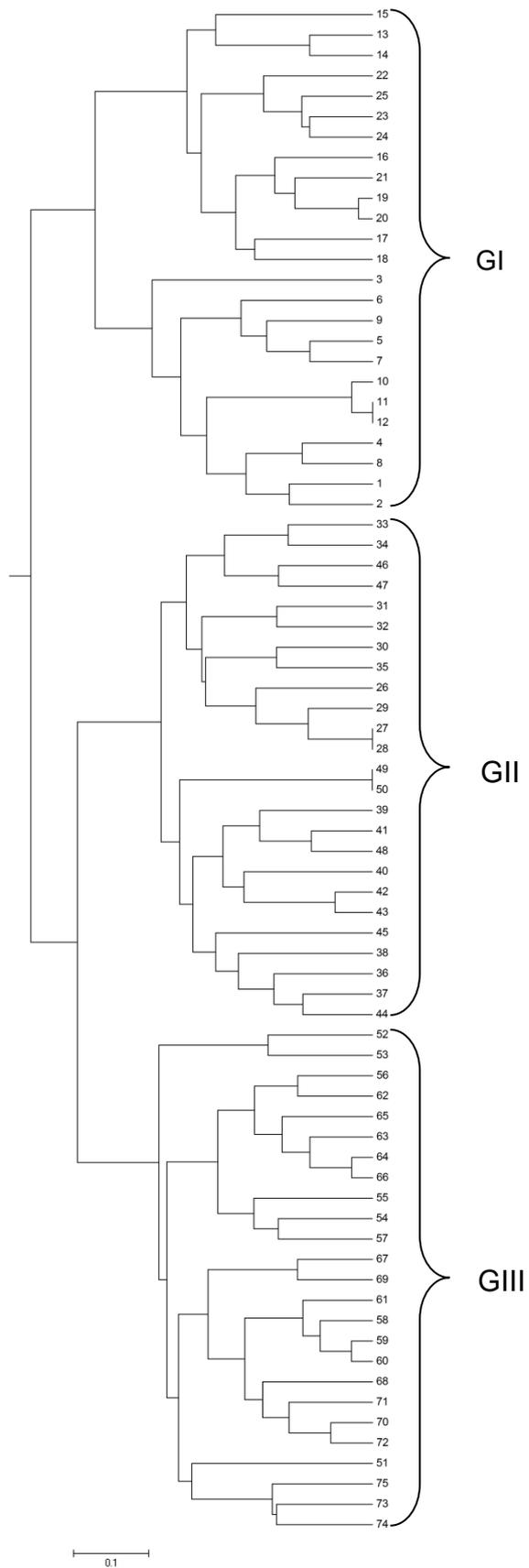


Figura 4. Dendrograma gerado a partir da distancia genética de Nei (1983), pelo método UPGMA dos indivíduos de *T. speciosum* das três populações amostradas. Grupo I: Parque C/E; Grupo II: Parque J e Grupo III: Parque Zoobotânico.

A população do parque C/E formou um grupo isolado em relação às outras duas populações, provavelmente em virtude da sua localização, pois encontra-se na zona central da cidade, e conseqüentemente foi o primeiro fragmento a ficar isolado na malha urbana do município de Alta Floresta, MT, por volta de 1990. Enquanto que o parque J e o parque Zoobotânico estão localizados na mesma direção na periferia da cidade, região onde os loteamentos, e conseqüentemente a fragmentação, ocorreram mais tarde. Tendo em vista que o parque J e Zoobotânico encontram-se na mesma direção e foram isolados mais recentemente, podemos inferir que havia um corredor que possibilitava a troca de material genético.

Os indivíduos mais dissimilares encontrados nas três populações dos parques C/E, J e Zoobotânico apresentam potencial para seleção de plantas matrizes na formação de bancos de germoplasma, visto que são geneticamente os mais distantes dentro dos diferentes grupos.

Com base na análise bayesiana determinada pelo “Structure”, verifica-se que os indivíduos estão distribuídos em três grupos (Figura 5), onde todos alocaram 25 indivíduos respectivamente. Observa-se uma correspondência entre o dendrograma UPGMA e o agrupamento gerado pelo “Structure”, pois os indivíduos ficaram alocados devidamente dentro de suas populações; entretanto, a correspondência não foi completa entre os tipos de subgrupos gerados, isto porque segundo Romão et al. (2011) o agrupamento feito pelo “Structure” tende a gerar uma diferenciação mais profunda de subgrupos.

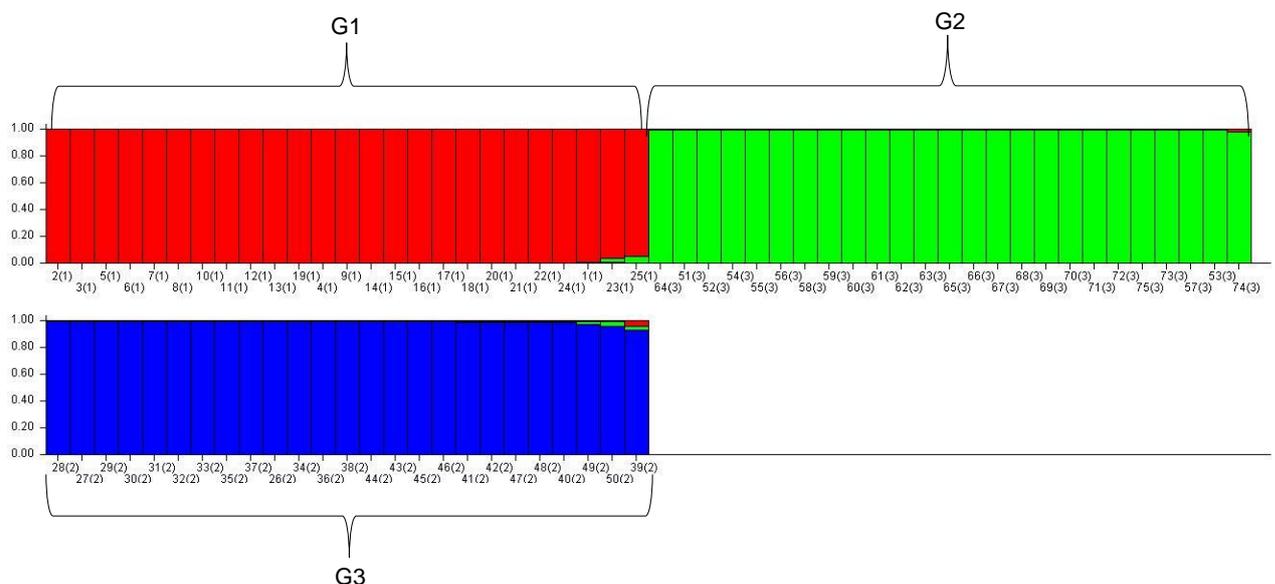


Figura 5. Representação da distribuição dos 75 indivíduos de *T. speciosum* em grupos

segundo dados moleculares de 9 *primers* SSR, utilizando o programa “Structure”. Os indivíduos estão representados por barras verticais com colorações de acordo com o grupo ao qual pertencem (três grupos, K = 3). G1: Parque C/E, G2: Parque Zoobotânico e G3: Parque J.

Devido aos elevados níveis de diversidade gênica detectados nas três populações dos parques C/E, J e Zoobotânico, podemos ressaltar a importância da manutenção e a proteção dessa diversidade ao longo da paisagem estudada, visando à conservação *in situ*, bem como a coleta de germoplasma para a conservação *ex situ*. Tendo em vista, que se trata de populações fragmentadas onde a exploração predatória dos frutos impede a sua dispersão, e conseqüentemente, o estabelecimento natural das plântulas, podendo ocasionar a perda da diversidade genética, levando a erosão genética da espécie nas próximas gerações.

CONCLUSÕES

Todos os *primers* utilizados no estudo apresentaram polimorfismo. O maior número de alelos foi identificado pelos *primers* mTcCIR19 (13 alelos) e mTcCIR28 (12 alelos). A qualidade dos marcadores foi confirmada pelo conteúdo de informação polimórfica, com média de 0,76. Os genótipos de cada população ficaram agrupados dentro de sua população de origem, revelando uma estrutura geográfica. A diversidade genética é maior em nível intrapopulacional do que interpopulacional.

O genótipo 3 do parque C/E, o 45 do parque J e o 51 do parque zoobotânico podem servir como plantas matrizes em um programa de melhoramento genético, visto que esses foram os mais dissimilares dentro das populações estudadas. O presente estudo revela informações importantes para adoção de estratégias para a conservação, caracterização e prospecção da espécie *T. speciosum* nos fragmentos florestais urbanos, gerando indicadores para estabelecimento e manejo de reservas genéticas *in situ*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. M. V. C.; DIAS, L. A. S.; SILVA, A. P. Caracterização agrônômica de acessos de cacau. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 44: 368-373, 2009.
- ALVES, R. M.; SEBBENN, A. M.; ARTERO, A. S.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Tree Genetics & Genomes**, 3: 289–298, 2007.
- ALVES, R. M.; SILVA, C. R. S.; SILVA, M. S. C.; SILVA, D. C. S.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 35: 818-828, 2013.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLMICK, H.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, 32: 314-331, 1980.
- BOZA, E. J.; IRISH, B. M.; MEEROW, A. W.; TONDO, C. L.; RODRIGUEZ, O. A.; VENTURA-LÓPEZ, M.; GOMEZ, J. A.; MOORE, J. M.; ZHANG, D.; MOTAMAYOR, J. C.; SCHNELL, R. J. Genetic diversity, conservation, and utilization of *Theobroma cacao* L.: genetic resources in the Dominican Republic. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 60: 605-619, 2013.
- CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; MORAES, M. L. T.; STRANGHETTI, V.; ALZETE-MARTINS, A. L.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. **Revista Brasileira de Botânica**, 33: 599-606, 2010.
- CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**, Imprensa Nacional, Vol. I, 747p, 1926.
- COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LEDÓ, A. S.; SANTOS, A. R. F.; SILVA JÚNIOR, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 46: 499-508, 2011.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.
- DIAS, L. A. S. **Melhoramento genético do cacauzeiro**. Viçosa: Funape, 2001. 578p. DNR Bio-Imaging Systems, **Gel Quant Pro**. 2006. Disponível em: <<http://www.dnr-is.com/Product.asp?Par=3.19&id=81>>. Acesso em: 20, dezembro, 2014.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:1315, 1990.
- EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14: 2611-2620. 2005.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 2001. p. 652p.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**, 1: 175-200, 2007.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; MURAWSKI, D. A.; LOVELESS, M. D. Correlations between species traits and allozyme diversity: in implications for conservation biology. In: Genetic and conservation of rare plants (Falk DA and Holsinger KE, eds.). Oxford University Press, New York, 75-86. 1991.

IBGE - INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Recursos Naturais e Meio Ambiente: uma visão do Brasil**. Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. 2ª de. Rio de Janeiro – RJ: IBGE, 1997.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequencea lignment. **Briefings in Bioinformatics**, 5: 150-163, 2004.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A. M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET, A.; LAGODA, P. J. L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, 8: 2141–2143, 1999.

LI, P.; WANG, Y.; SUN, X.; HAN, J. Using microsatellite (SSR) and morphological markers to assess the genetic diversity of 12 falcata (*Medicago sativa* spp. Falcata) populations from Eurasia. **African Journal of Biotechnology**, 8: 2102-2108, 2009.

LIU, K.; MUSE, S. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, 21: 2128-2129, 2005.

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

MOTAMAYOR, J. C.; RISTERUCCI, A. M.; LOPEZ, P. A.; ORTIZ, C. F.; MORENO, A.; LANAUD, C. Cacao domestication In: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, 89: 308-386, 2002.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, 19: 153-170, 1983.

NETO, G. G.; SILVA, F. H. B. Plantas da Amazônia Mato-Grossense: o cacauí – *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng (Malvaceae). **Flovet**, 3, 2011.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology**, 6: 288-295, 2006.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Documentation for structure software: Version 2.1**. Disponível em: <http://pritch.bsd.uchicago.edu.>, 2004. Acesso em: 21 de 12 de 2014.

PRITCHARD, J; STEPHENS, M; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155: 945–959, 2000.

PUGH, T.; FOUET, O.; RISTERUCCI, A. M.; BROTTIER, P.; ABOULADZE, M.; DELETREZ, C.; COURTOIS, B.; CLEMENT, D.; LARMANDE, P.; N'GORAN, J. A. K.; LANAUD, C. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 108: 1151-1161, 2004.

ROMAO, L. R. C; PERSEGUINI, J. M. K. C.; RUBIANO, L. B.; GONÇALVES, P. S.; MONDEGOM, J. C. M. **Divergência Genética de Seringueira Baseado em Marcadores EST-SSRs**. 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2011 9 a 11 de agosto de 2011 – Campinas, SP, 2011.

SADDI, N. A primeira contribuição sobre a flora de Humboldt (Aripuanã, Mato Grosso). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 26., 1975, Rio de Janeiro. **Trabalhos...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1977.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45: 49-55, 2010.

SCHNELL, R. J.; KUHN, D. N.; BROWN, J. S.; OLANO, C. T.; PHILLIPS-MORA, W.; AMORES, F. M.; MOTAMAYOR, J. C. Development of a Marker Assisted Selection Program for Cacao. **Phytopathology**, 97: 1664-1669, 2007.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Journal of Heredity**, 106: 134-145, 2011.

SEBBENN, A. M.; ETTORI, L. C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênes misto. **Revista do Instituto Florestal**, 13: 201-211, 2001.

SELKOE K. A.; TOONEN R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology**, 9: 615-629, 2006.

SERENO M. L.; ALBUQUERQUE P. S. B.; VENCOSKY R.; FIGUEIRA A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, 6: 13-24, 2006.

SILVA, A. R.; MARTINS, M. B. A new anthophilic species of *Drosophila* Fallén belonging to the bromeliae group of species (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 21: 435-437, 2004.

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 762p.

SOBIERAJSKI, R. R.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em nove populações de *Mimosa scabrella* Bentham (Leguminosaceae). **Scientia Forestalis**, 71: 37-49, 2006.

SOUZA, M. S.; VENTURIERI, G. A. (2009). Fenologia Floral e Sistema de Cruzamento do Cacaúí (*Theobroma speciosum*). Disponível em: <http://www.ccb.usfc.br/~giorgini/resumcong.htm>. Acesso em: 12/09/2014.

SOUZA, M. S.; VENTURIERI, G. A. Floral phnology and breeding system of cacauhy (*Theobroma speciosum* Willd enow – Sterculiaceae). Projeto: Biologia aplicada a domesticação de fruteiras amazônicas do gênero *Theobroma*. In: **Primeiro relatório**, Belém, 105p, 1998.

YANAKA, F. Y.; DALL´AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DIAS, P. M. B.; GOMES, K. E. Variabilidade genética em populações naturais de *Bromusau leticus* Tris. ex Ness (Poaceae) com base em isoenzimas e marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 34: 1897-1904, 2005.

YOUNG, A.; BOYLE, T. 2000. Forest Fragmentation. *In* Forest conservation genetics: principles and practice. (A.Young, D. Boshier & T. Boyle, eds.) CSIRO Publishing, Collingwood, p.123-132.

ZHANG, D.; MARTÍNEZ, W. J.; JOHNSON, E. S.; SOMARRIBA, E.; PHILLIPS-MORA, W.; ASTORGA, C.; MISCHKE, S.; MEINHARDT, L. W. Genetic diversity and spatial structure in a new distinct *Theobroma cacao* L. population *in* Bolivia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 59: 239-252, 2012.

4.2 CAPÍTULO 2

Estrutura populacional e distribuição espacial de *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng no norte do Estado de Mato Grosso

RESUMO

A análise dos padrões de distribuição espacial é uma ferramenta muito utilizada para avaliar os processos sucessionais, genéticos e ecológicos, os quais são fundamentais para a compreensão de um sistema florestal. Neste estudo foram analisadas a estrutura populacional e a distribuição espacial de *Theobroma speciosum* (cacauí), em três fragmentos florestais urbanos no município de Alta Floresta-MT, e comparados com os resultados de um estudo realizado em 2013, no Parque Nacional do Juruena. Foi amostrado um total de 323 indivíduos de *T. speciosum*, sendo 50 no fragmento do parque C/E (6,32 ha), 32 no fragmento do parque J (3,92 ha), 76 no fragmento do parque Zoobotânico (15,84 ha) e 165 no Parque Nacional do Juruena (3,2 ha). A menor densidade de indivíduos encontrados nos parques urbanos pode estar correlacionada com o processo de fragmentação atual, visto que o PNJu é uma unidade de conservação permanente de floresta contínua e apresentou maior densidade de indivíduos. Com relação às classes diamétricas e de altura, o único parque urbano que manteve um maior número de indivíduos nas menores classes (0-5 cm e 0-5 m), assim como o PNJu, foi o parque Zoobotânico, demonstrando capacidade regenerativa populacional, apresentando o modelo característico das florestas tropicais (“J-invertido”), enquanto que nos parques C/E e J não seguiu-se esse padrão. Essa diferença provavelmente deve-se a um histórico de perturbações mais intensas e recentes nos parques C/E e J. Quanto ao padrão de distribuição dos indivíduos, todas as populações apresentaram comportamento agregado, com os indivíduos jovens próximos aos prováveis parentais.

Palavras-chave: Cacauí, Amazônia, Distribuição Diamétrica.

Populational structure and spatial distribution of *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng in northern state of Mato Grosso

ABSTRACT

The analysis of spatial distribution patterns is a widely used tool that evaluates the successional, genetic and ecological processes which are fundamental to the understanding of a forest system. In this study, the *Theobroma speciosum* (cacaui) populational structure and spatial distribution were analyzed in three urban forest fragments located in Alta Floresta city MT, comparing to results of one study conducted in 2013 at Juruena National Park. A total of 323 individuals of *T. speciosum* were sampled, 50 in park fragment C/E (6.32 ha), 32 at Park J fragment (3.92 ha), 76 at Zoobotanic Park (15, 84 ha) and 165 at Juruena National Park (3.2 ha). The lowest density of individuals found in these urban parks can be correlated with the current fragmentation process since the PNJu is a permanent conservation area of continuous forest and evidenced a higher density of individuals. Regarding the diameter classes and height, the only urban park that kept a greater number of individuals in smaller classes (0-5cm and 0-5m) as well as at the PNJu was the Zoobotanic park, demonstrating the regenerative capacity of population within the tropical forests characteristic model ("J-inverted"), while in parks C/E and J this pattern was not observed. This difference is probably due to the most intense and recent disturbances in parks C/E and J. About the individual distribution pattern, all populations showed an aggregated behavior of younger individuals close to the likely parentals.

Keywords: Cacaui, Amazon, Diametric distribution.

INTRODUÇÃO

O Cacauí (*Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng) é uma espécie frutífera nativa da floresta Amazônica (Duck, 1953), desenvolve-se preferencialmente em mata de terra firme não inundável, sendo bastante dispersa e pouco cultivada (Cavalcante, 1991).

Comunidades nativas da Amazônia consomem os frutos de cacauí *in natura*, além de utilizá-los na produção de sucos, geléias e sorvetes (Ferrão, 2001; Saddi, 1977). Miranda et al. (2004), relatam que *T. speciosum* é promissora para a produção de biodiesel em seus estudos realizados na Reserva Extrativista do Capanã Grande (Manicoré-Am). Os ácidos graxos encontrados nas suas sementes possuem composição muito similar à encontrada na manteiga de cacau (Gilabert-Escrivá et al., 2002).

Em decorrência do crescimento populacional, a espécie vem sofrendo o efeito da fragmentação dos seus habitats, trazendo como consequência a formação de mosaicos de vegetação remanescente (Carvalho et al., 2010), onde na maioria das vezes ocorre devido à substituição de parte da floresta por pastagem (Carvalho et al., 2005; Oliveira et al., 2003), reduzindo o tamanho das populações naturais (Estopa et al., 2006), alterando o funcionamento e a organização dos ecossistemas florestais. Estas alterações causam a redução do fluxo gênico entre populações (Laurance e Vasconcellos, 2009), atuando diretamente no padrão de distribuição espacial das espécies.

Mudanças na dinâmica e composição das populações e das comunidades, bem como nas interações tróficas e nos processos ecossistêmicos são as principais consequências da fragmentação florestal (Laurance e Vasconcelos, 2009). A intensidade dessas perturbações é responsável pela formação das diferentes estruturas florestais secundárias, como a baixa densidade de árvores de maior porte e redução significativa na cobertura do dossel (Alves, 2006).

Dentro da paisagem florestal, os indivíduos jovens são considerados como indicadores da estrutura de comunidade futura, e dependem somente de condições favoráveis para se desenvolverem. (Felfili et al., 2001). Logo, para que uma população arbórea específica se mantenha numa determinada comunidade florestal, espera-se encontrar representatividade da espécie em todos os extratos da vegetação (Salles e Schiavini, 2007).

Os estudos populacionais podem demonstrar a dinâmica das mudanças presentes em populações naturais com relação à estrutura etária, regeneração, sobrevivência e mortalidade (Guilherme e Oliveira, 2011), e assim contribuir para o monitoramento das mudanças temporais decorrentes dos efeitos do ambiente (Silva et al., 2014), fornecendo informações para a criação de estratégias de manejo e ações de conservação (Anjos, 2004).

Apesar da importância econômica e ecológica do gênero *Theobroma*, ainda existem poucos estudos com estas espécies principalmente as silvestres. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a estrutura populacional e a distribuição espacial de *Theobroma speciosum* (cacauí) em três fragmentos florestais urbanos no município de Alta Floresta-MT, e comparar com a distribuição espacial encontrada por Dardengo (2014) em um estudo com *T. speciosum* no Parque Nacional do Juruena-MT.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi conduzido no município de Alta Floresta, localizado no norte do estado de Mato Grosso (Figura 1), onde o clima é caracterizado, segundo Köpen como do tipo AWI (tropical chuvoso com estação seca), sendo a temperatura média anual de 26 °C e pluviosidade média anual 2.750 mm (IBGE, 1997).

O município está a uma altitude de 250 a 450 m acima do nível do mar, com solos variáveis, predominando o grupo de Podzólico (Amarelo e Vermelho-Amarelo) e, em pequenos percentuais, Latossolos e Hidromórficos (Prefeitura Municipal De Alta Floresta, 2013). Já o relevo pode ser dividido em quatro unidades geomorfológicas, sendo a Depressão Interplanáltica da Amazônia Meridional, Planaltos dos Apicás-Sucunduri, Planalto Dissecado da Amazônia e os Planaltos residuais do Norte de Mato Grosso (Radambrasil, 1980). A vegetação é predominantemente do tipo Floresta Ombrófila Aberta (IBGE, 2012).

Para o estudo, foram selecionados três parques municipais que constituem fragmentos florestais urbanos: Parque C/E, Parque J e o Parque Zoobotânico (Figura 1).

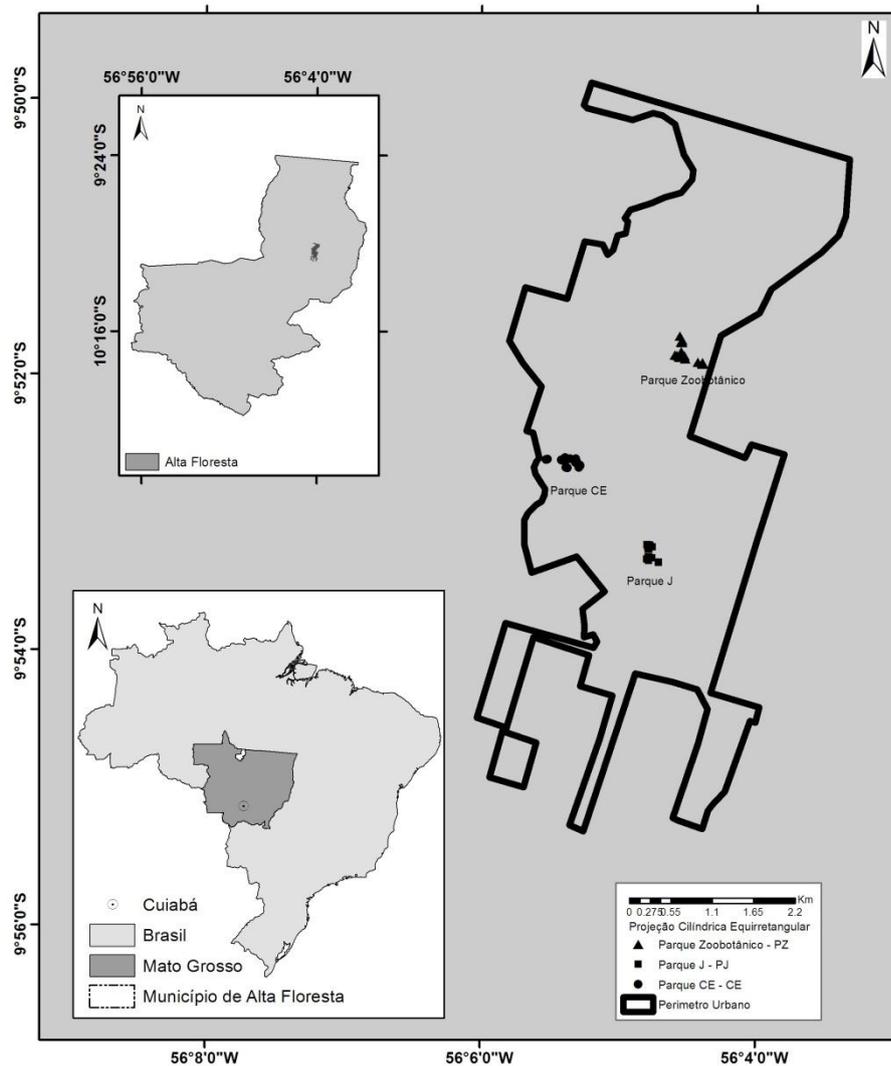


Figura 1. Localização do município de Alta Floresta – MT e dos três fragmentos urbanos onde foram implantadas as grades de estudo.

Foram utilizados também, os dados de um levantamento realizado no Parque Nacional do Juruena – Mato Grosso, em 2013 (Dardengo, 2014) (Figura 2). O Parque Nacional do Juruena (PNJu) é uma Unidade de Conservação de Proteção Integral, administrada pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio). Localiza-se no norte do estado de Mato Grosso e Sudeste do Amazonas, entre os municípios de Apuí e Maués (AM) e Apicás, Cotriguaçu e Nova Bandeirantes (MT).

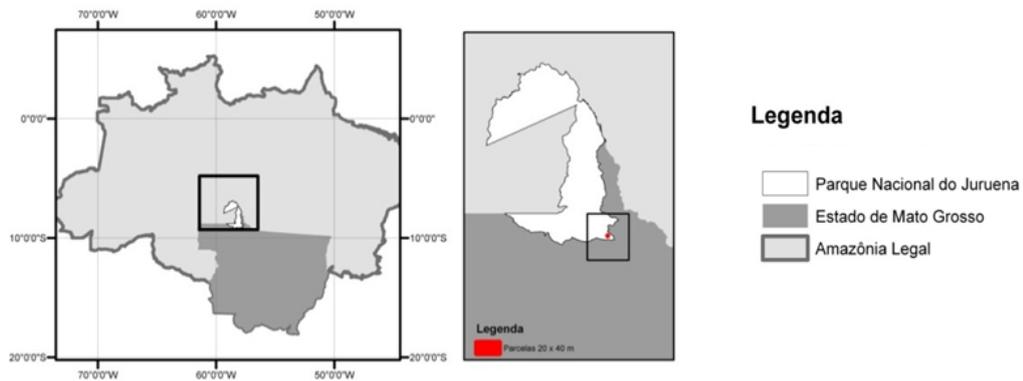


Figura 2. Localização do Parque Nacional do Juruena (PNJu) e da parcela implantada no PNJu no Estado de MT. Fonte: Dardengo (2014).

Amostragem

No parque C/E foi implantada uma parcela de 420x160m (6,72 ha.grade⁻¹) dividida em 84 subparcelas de 20x40m. No parque J uma parcela de 280x140m (3,92 ha.grade⁻¹) dividida em 49 subparcelas (20x40), e no parque Zoobotânico uma parcela de 440x360m (15,84 ha.grade⁻¹), dividida em 198 subparcelas (20x40). As parcelas foram estabelecidas aleatoriamente em cada parque.

No PNJu implantou-se uma parcela de 200x160m (3,2 ha.grade⁻¹) dentro dos módulos do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio), onde foram distribuídas 40 subparcelas contíguas com dimensões de 20 x 40m (800 m²) (Dardengo, 2014).

Dentro das parcelas foi mensurado o diâmetro de todos os indivíduos arbóreos vivos que apresentaram CAP (circunferência a altura do peito) > 1 cm, sendo todos georreferenciados com auxílio do **GPS Garmin Etrex®**. Para os indivíduos que apresentaram ramificação, foi anotado apenas o maior valor de CAP. A altura foi estimada visualmente, tendo como base a altura de uma pessoa.

Os dados para testar a existência de diferenças entre as estruturas de tamanho dos indivíduos foram analisados através do teste de Kolmogorov-Smirnov ao nível de significância de 5% de probabilidade (Zar, 1966). As análises foram realizadas utilizando o software R (R Development Core Team, 2005).

O padrão de distribuição espacial foi estimado através do índice de Morisita (I_d), conforme recomendações de Brower e Zar (1977):

$$I_d = \frac{n \cdot (\sum_{i=1}^s X_i^2 - N)}{N \cdot (N - 1)}$$

Em que, Id: índice de Morisita; n: número total de parcelas amostradas; N: número total de indivíduos por espécie, contidos em n parcelas; X^2 : quadrado do número dos indivíduos por parcela; s: número de espécies amostradas.

A significância dos valores calculados para o índice de Morisita (Id) foi obtida mediante o teste do qui-quadrado a um nível de 0,05 de probabilidade de erro. Valores de Id menores do que 1 indicam a inexistência de agrupamento; iguais a 1 indicam distribuição regular e maiores do que 1 distribuição agregada (Krebs, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram amostrados um total de 323 indivíduos de *T. speciosum*, sendo 50 no fragmento do parque C/E com densidade de 7,44 ind. ha⁻¹ (6,72 ha), 32 no fragmento do parque J com densidade de 8,16 ind. ha⁻¹ (3,92 ha), 76 no fragmento do parque Zoobotânico, densidade de 4,79 ind. ha⁻¹ (15,84 ha) e 165 no Parque Nacional do Juruena, densidade de 51,56 ind. ha⁻¹ (3,2 ha).

As parcelas dos parques urbanos (C/E; J e Zoobotânico) apresentaram uma menor densidade de indivíduos quando comparadas com a parcela do PNJu, o que pode correlacionar com o processo de fragmentação atual dos parques urbanos, visto que o PNJu é uma unidade de conservação permanente, área de acesso restrito, com proteção integral e de floresta contínua. Segundo Paglia et al. (2006), fragmentos florestais apresentam menor diversidade de habitats do que florestas contínuas, o que pode prejudicar na riqueza e abundância de espécies (Vasconcelos et al., 2006), assim como verificado no presente estudo.

Resultados semelhantes ao dos parques urbanos, foram encontrados em estudos realizados por Campbell et al. (1986), nas proximidades do Rio Xingú, no estado do Pará, onde amostraram um total de 48 indivíduos de *T. speciosum* em uma área de 4,5 ha, com densidade de 10,67 ind. ha⁻¹. Já para a espécie *Theobroma subincanum* Souza et al. (2012), amostraram 37 indivíduos em uma área de 9 ha, com uma densidade de 33.63 ind. ha⁻¹.

A distribuição diamétrica e de altura (Figura 3 e 4) dos indivíduos de *T. speciosum* nos parques Zoobotânico e PNJu tendeu a seguir uma função exponencial negativa “J invertido”, o que segundo Machado et al. (2010), é característico da maioria das florestas nativas. Ribeiro et al., (2001) relatam que isso ocorre no momento em que as populações de plantas apresentam uma

predominância de indivíduos menores, decaindo exponencialmente à medida que se tornam maiores, indicando um balanço positivo entre recrutamento e mortalidade, sendo característico de populações auto-regenerativas, onde os indivíduos menores substituem, sucessivamente, os indivíduos adultos na população, permitindo a continuidade da sucessão ecológica nesses ambientes (Silva Júnior, 2004; Carvalho e Nascimento, 2009).

Esses dados nos permite inferir que nos parques Zoobotânico e PNJu há uma maior taxa regenerativa, já que existem maiores proporções de espécimes jovens nas classes iniciais, evidenciando possíveis estratégias que a espécie escolheu para tamponar os efeitos da fragmentação, representando uma estratégia adaptativa importante para a permanência e continuidade da espécie no local, uma vez que a população encontra-se estável e em regeneração. Por outro, lado esses dois ambientes apresentam uma maior cobertura vegetal para o desenvolvimento da espécie, principalmente o PNJu que é uma unidade de conservação.

Os indivíduos de *T. speciosum* nos parques C/E e J não seguiram o padrão característico das espécies de florestas nativas (J invertido), pois apresentaram um menor número de indivíduos distribuídos na primeira classe em relação às classes subsequentes. No parque urbano C/E, foram amostrados poucos indivíduos na menor classe de DAP (0-5 cm) e altura (0-5 m), ao contrário do parque J que apresenta um maior número de indivíduos na menor classe de DAP, porém para as classes de altura o parque J assemelha-se ao parque C/E (Figura 3 e 4). Tais resultados demonstram uma baixa taxa de regeneração da espécie nestes dois ambientes, evidenciando uma maior pressão antrópica do que o PNJu e o fragmento do parque Zoobotânico, sendo as duas menores áreas estudadas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2013), com a mesma espécie e por Souza et al. (2011), com a espécie *T. subincanum*. Essa baixa taxa de regeneração encontrada pode estar associada à reprodução, visto que *T. speciosum* é uma espécie alógama e apresenta barreiras físicas que favorecem a auto-incompatibilidade, ou até mesmo por fatores ambientais, como os causados pela fragmentação dos habitats que pode ocasionar dificuldades na germinação, no crescimento e na sobrevivência das plântulas.

Macacos e formigas predam os frutos de *T. speciosum* antes da sua maturação, prejudicando o banco de sementes que daria continuidade a sucessão

ecológica nesses ambientes. Lana et al. (2013), relatam que a perda de frutos e sementes pode gerar uma desconfiguração dessa curva (J invertido), indicando uma influência negativa no ingresso de indivíduos das menores classes para as de maiores dimensões. Este padrão de florestas nativas pode também ser influenciado por fatores bióticos, abióticos ou até mesmo fatores intrínsecos à espécie, dificultando a sua regeneração nessas populações, fazendo com que a taxa de mortalidade supere a taxa de crescimento (Souza et al., 2011).

A distribuição diamétrica dos indivíduos do parque C/E não diferiu significativamente da do parque J, através do teste de Kolmogorov-Smirnov ($D=0.18$, $P=0.58$), entretanto diferiu do parque Zoobotânico ($D=0.26$, $P=0.03$). O PNJu tem uma distribuição parecida com a do parque J e do parque Zoobotânico, divergindo marginalmente ($D = 0.2$, $P = 0.08$) do parque C/E. Enquanto, para a distribuição de altura dos indivíduos, não houve diferença significativa entre os fragmentos em estudo, quando comparados par a par pelo teste de Kolmogorov-Smirnov conforme observado na Tabela 1.

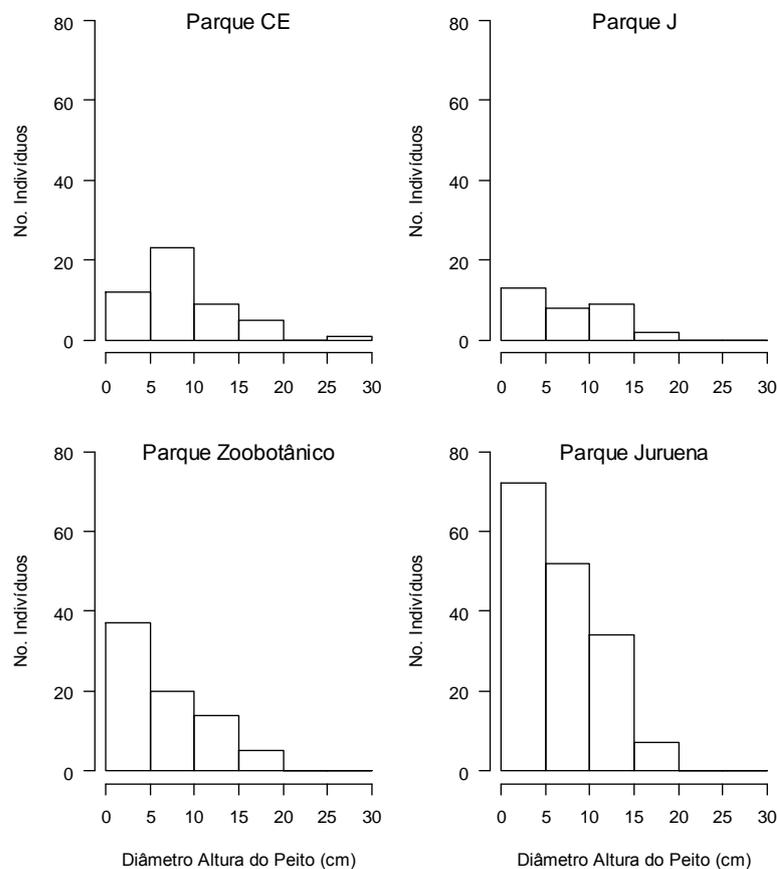


Figura 3. Distribuição por classes diamétricas dos indivíduos de *T. speciosum* amostrados nos três fragmentos florestais urbanos e no PNJu em estudo.

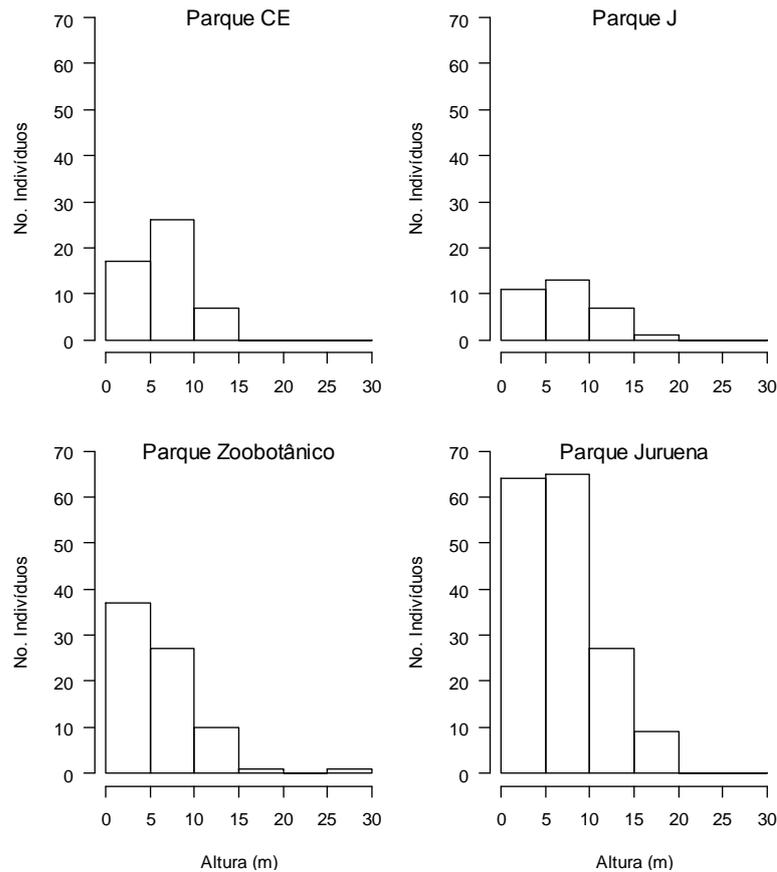


Figura 4. Distribuição por classes de altura dos indivíduos de *T. speciosum* amostrados nos três fragmentos florestais urbanos e no PNJu em estudo.

Tabela 1. Comparação da estrutura de diâmetro e altura dos indivíduos de *T. speciosum* nos quatro fragmentos florestais pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com nível de significância de 0,05

Combinação	Distribuição Diamétrica		Distribuição de Altura	
	V. da Estatística	Probabilidade	V. da Estatística	Probabilidade
PNJu x C/E	D = 0,20	p = 0,08	D = 0,15	p = 0,39
PNJu x J	D = 0,21	p = 0,19	D = 0,12	p = 0,83
PNJu x Zoo	D = 0,12	p = 0,41	D = 0,13	p = 0,31
C/E x J	D = 0,18	p = 0,58	D = 0,12	p = 0,94
C/E x Zoo	D = 0,26	p = 0,03	D = 0,16	p = 0,42
J x Zoo	D = 0,23	p = 0,20	D = 0,17	p = 0,54

PNJu: Parque Nacional do Juruena; C/E: Parque C/E; J: Parque J; Zoo: Parque Zoobotânico.

O valor do Índice de Dispersão de Morisita (I_d), para as quatro populações (C/E, J, Zoobotânico e PNJu), indicou um padrão de distribuição espacial agregado ($I_d = 3,23$; $I_d = 5,35$; $I_d = 10,07$ e $I_d = 1,69$; respectivamente), sugerindo que há, provavelmente, baixa taxa de competição intraespecífica na população, dispersão restrita de sementes próximas à planta-mãe ou presença de distúrbios ou fatores ambientais que limitam sua distribuição.

Corroborando com esses resultados, Silva et al. (2013) encontraram os mesmos padrões ao avaliarem a distribuição das espécies *T. speciosum* e *T.*

subincanum no PNJu, o que pode ocorrer em função da heterogeneidade ambiental, pois segundo Bernasol e Lima-Ribeiro (2010), as espécies se agrupam em lugares que oferecem as condições favoráveis para a sua reprodução e sobrevivência. Além disso, Bruzina et al. (2013), relatam que o padrão de distribuição agregado pode indicar que a espécie apresenta uma dispersão limitada em relação à fonte de propágulos, ou é exigente em condições micro-ambientais específicas.

Dentre os trabalhos que procuram determinar o padrão de distribuição espacial de espécies arbóreas, alguns encontraram o mesmo detectado nesse estudo (Bruzina et al., 2013; Bernasol e Lima-Ribeiro, 2010; Almeida e Cortines, 2008; Souza e Coimbra, 2005).

Analisando a figura 5 e 6 para a distribuição de diâmetro e altura dos indivíduos de *T. speciosum* nas quatro populações em estudo, observa-se uma agregação de indivíduos menores próximos aos de maior porte, isso pode ser consequência do modo de dispersão dos frutos e sementes que são deixados pelos seus dispersores perto da planta-mãe, pois segundo Crawley (1986), a distribuição espacial de sementes e plântulas de uma determinada espécie depende da interação de alguns fatores como à forma que as plantas produtoras de sementes estão localizadas no espaço, a existência de locais mais favoráveis à germinação (Parker et al., 1997), o padrão da chuva de sementes ao redor de cada planta-mãe (Crawley, 1986).

Por outro lado, Andreazzi et al. (2009) relatam que ambientes fragmentados ocasionam a extinção de espécies dispersoras, o que afeta a taxa de remoção das sementes, a distância de dispersão para a planta-mãe e o recrutamento das espécies de plântulas por esses animais (Andreazzi et al., 2009) atingindo diretamente na distribuição da espécie nesses ambientes (Rabello et al., 2010).

Estudos que descrevem a forma de dispersão de *Theobroma speciosum* ainda não foram realizados; no entanto, observamos durante as avaliações nos fragmentos urbanos que macacos consomem os frutos perto da planta-mãe ou até mesmo sem retirá-los das árvores, também foram encontradas muitas plantas com seus frutos fixos no caule até o apodrecimento. Dados como esses podem explicar o agrupamento de indivíduos menores próximos aos de maior porte, uma vez que não foram encontrados frutos disseminados longe de seus parentais.

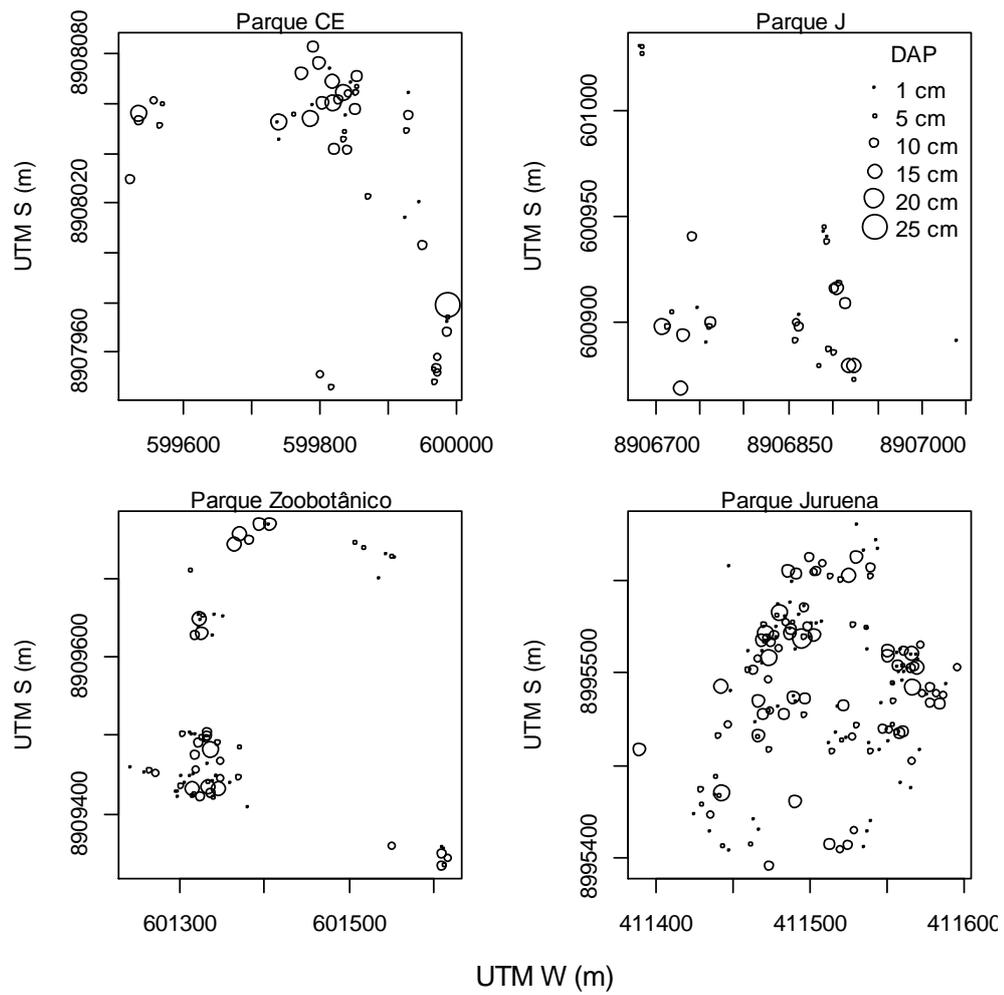


Figura 5. Distribuição espacial com relação à localização geográfica e o DAP dos indivíduos de *T. speciosum* amostrados nos quatro fragmentos avaliados.

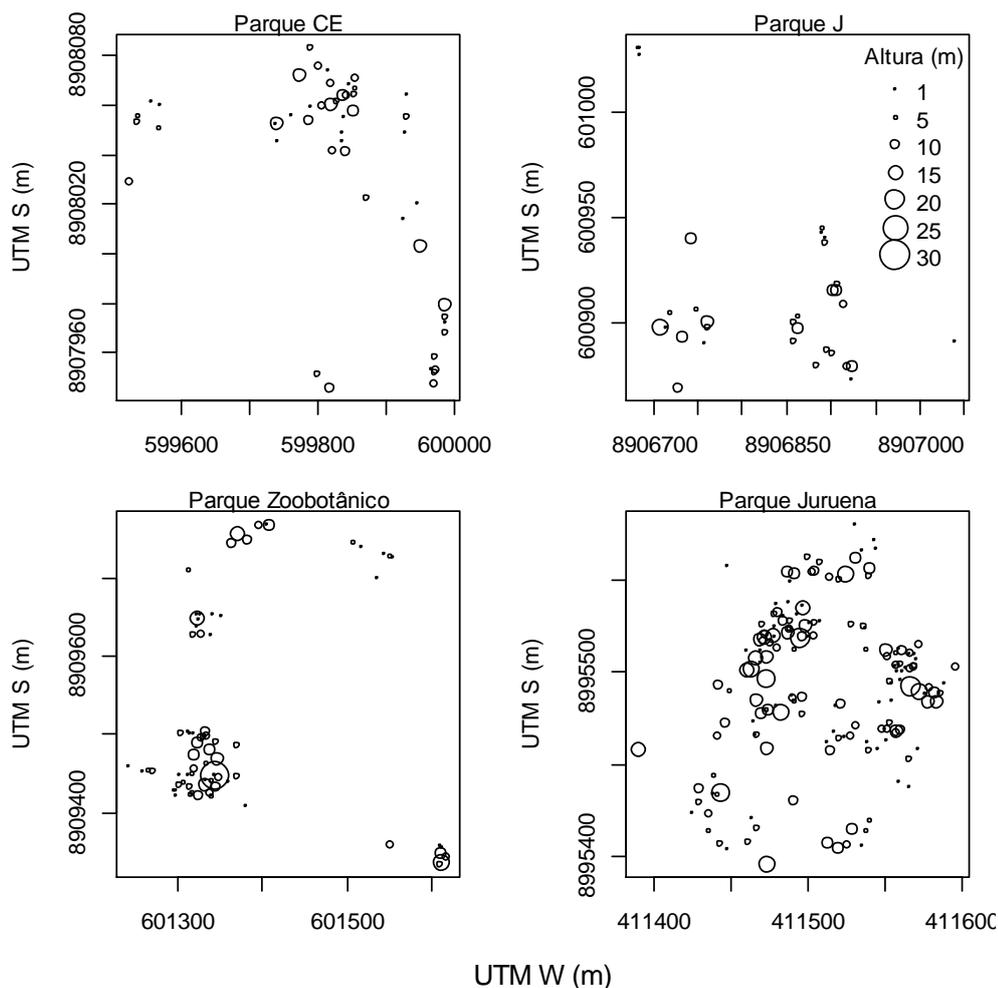


Figura 6. Distribuição espacial com relação à localização geográfica e a altura dos indivíduos de *T. speciosum* amostrados nos quatro fragmentos avaliados.

CONCLUSÕES

A distribuição diamétrica dos indivíduos de *Theobroma speciosum* no parque Zoobotânico e PNJu seguiu o padrão característico encontrado para espécies de florestas tropicais, enquanto que nos parques C/E e J não seguiu-se esse padrão. Essa diferença provavelmente deve-se a um histórico de perturbações mais intensas e recentes nos parques C/E e J. Quanto ao padrão de distribuição dos indivíduos, todas as populações apresentaram comportamento agregado, com os indivíduos jovens próximos aos prováveis parentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. S.; CORTINES, E. Estrutura populacional e distribuição espacial de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Mac br. **Floresta e Ambiente**,15: 18-23, 2008.
- ALVES, L. F.; METZGER, J. P. A regeneração florestal em áreas de floresta secundária na Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia, SP. **Biota Neotropica**, 6: 1-26, 2006.
- ANDREAZZI, C. S.; PIRES, A. S.; FERNANDEZ, A. S. Mamíferos e palmeiras neotropicais: interações em paisagens fragmentadas. **Oecologia Brasiliensis**,13: 554-574, 2009.
- ANJOS, A.; MAZZA, M. C. M.; SANTOS, A. C. M. C.; DELFINE, L. T. Análise de distribuição espacial de araucária (*Araucaria augustifolia*) em algumas áreas do Estado do Pará, utilizando a função K de Ripley. **Scientia Florestalis**, 66: 38-45, 2004.
- BERNASOL, W. P.; LIMA-RIBEIRO, M. S. Estrutura espacial e diamétrica de espécies arbóreas e seus condicionantes em um fragmento de cerrado sentido restrito no sudoeste goiano. **Revista Hoehnea**, 37: 181-198, 2010.
- BROWER, J. E.; ZAR, J. H. **Field and laboratory methods for general Ecology**. 2. ed. Dubique: Win. C. Brown Publishers, 226 p. 1977.
- BRUZINGA, J. S.; OLIVEIRA, M. L. R.; MACHADO, E. L. M.; LEITE, H. G.; PEREIRA, I. M.; NOGUEIRA, G. S. Distribuição espacial de indivíduos adultos de pequi. **Scientia Forestalis**, 41: 249-256, 2013.
- CAMPBELL, D. G.; DALY, D. C.; PRANCE, G. T.; MACIEL, U. N. Quantitative ecological inventory of terra firme and várzea tropical forest on the Rio Xingu, Brazilian Amazon. **Brittonia**, 38: 369-393, 1986.
- CARVALHO, A. L.; FERREIRA, E. J. L.; LIMA, J. M. T. Comparações florísticas e estruturais entre comunidades de palmeiras em fragmentos de floresta primária e secundária da Área de Proteção Ambiental Raimundo Irineu Serra – Rio Branco, Acre, Brasil. **Acta Amazônica**, 40: 657-666, 2010.
- CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA FILHO, A. T.; VILELA, E. A.; CURI, N.; VAN DEN BERG, E.; FONTES, M. A. L.; BOTEZELLI, L. Distribuição de espécies arbóreo-arbustivas ao longo de um gradiente de solos e topografia em um trecho de floresta ripária do Rio São Francisco em Três Marias, MG, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, 28: 329-345, 2005.
- CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T. Estrutura diamétrica da comunidade e das principais populações arbóreas de um remanescente de floresta atlântica sub montana (Silva Jardim-RJ, Bradil). **Revista Árvore**, 33: 327-337, 2009.
- CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: CEJUP/CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991. (Coleção Adolfo Ducke).

CRAWLEY, M. J. 1986. **Plant Ecology**. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

DARDENGO, J. F. E. **Diversidade genética, distribuição espacial e anatomia foliar de *Theobroma* L. em população natural no norte do estado de Mato Grosso**. Alta Floresta: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2014. 88p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos).

DUCKE, A. As espécies brasileiras do gênero *Theobroma* L. **Boletim Técnico: Instituto Agrônomo**, 28: 1-20, 1953.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M.; MOURA, M. C. O.; BOTREL, M. C. G.; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish). **Scientia Forestalis**, 70: 97-106, 2006.

FELFILI, J. M. **Distribuição de diâmetros de quatro áreas de cerrado sensu stricto na Chapada do Espigão Mestre do São Francisco**. In FELFILI, J. M.; SILVA JÚNIOR, M. C. S, organizadores. Biogeografia do bioma cerrado: estudo fitofisionômico da Chapada do Espigão Mestre do São Francisco. Brasília: UnB; 2001.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis**. v. 3. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 2001. 652p.

GILABERT-ESCRIVÁ, M. V.; GONÇALVES, L. A. G.; SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. Fatty acid and triacyl glycerol composition and thermal behavior of fats from seeds of Brazilian Amazonian *Theobroma* species. **Journal of Science of Food and Agriculture**, 82: 1425- 1431, 2002.

GUILHERME, F. A. G.; OLIVEIRA, A. S. Estrutura populacional de *Butia purpurascens* Glassman (Arecaceae) em duas áreas de Cerrado sensu stricto no estado de Goiás. **Revista Biológica Neotropical**, 7: 37-45, 2011.

IBGE - INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Recursos Naturais e Meio Ambiente: uma visão do Brasil**. Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. 2ª de. Rio de Janeiro – RJ: IBGE, 1997.

IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Séries Manuais técnicos em geociências. 2 ed., p. 271, 2012.

KREBS, C. J. **Ecological Methodology**. New York: University of British Columbia, 1989, 653 p.

LANA, M. D.; BRANDÃO, C. F. L. S.; NETTO, S. P.; MARANGON, L. C.; RETSLAFF, F. A. S. Distribuição diamétrica de *Escheweilera ovata* em um fragmento de floresta ombrófila densa - Igarassu, PE. **Revista Floresta**, 43: 59-68, 2013.

LAURANCE, W. F.; VASCONCELOS, H. Consequências ecológicas da fragmentação florestal na Amazônia. **Oecologia Brasiliensis**, 13: 434-451, 2009.

MACHADO, E. L. M.; GONZAGA, A. P. D.; CARVALHO, W. A. C.; SOUZA, J. S.; HIGUCHI, P.; SANTOS, R. M.; SILVA, A. C.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. Flutuações temporais nos padrões de distribuição diamétrica da comunidade arbóreo-arbustivo e de 15 populações em um fragmento florestal. **Revista Árvore**, 34: 723-732, 2010.

MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A.; BARBOSA, E.; RAMOS, J. F.; MORAIS, F. F.; OLIVEIRA, J. G. Levantamento quantitativo de espécies oleaginosas para produção de biodiesel na Reserva Extrativista do Capanã Grande – Município de Manicoré-Am. Relatório final do Projeto realizado na RESEX Capanã Grande no Município de Manicoré-AM, CTAgro/MCT/CNPq. 2004, 48p.

OLIVEIRA, L. C.; VALENTIM, N. W.; EVANDRO ORFANÓ FIGUEIREDO, E. O.; FRANKE, I. L. Impactos da exploração seletiva de madeira em áreas em processo de fragmentação florestal na Amazônia Ocidental. **Revista Cerne**, 9: 213-220, 2003.

PAGLIA, A. P.; FERNANDEZ, F. A. S.; MARCO, P. Efeitos da fragmentação de habitats: quantas espécies, quantas populações, quantos indivíduos, e serão eles suficientes? p. 281-316. In: Rocha, C. F. D.; Bergallo, H. G.; Van Sluys, M.; Alves, M. A. S. (Org.). **Biologia da conservação**: São Carlos: RIMA Editora, 2006. 582p.

PARKER, K. C.; PARKER, A. J.; BEATY, R. M.; FULLER, M. M.; FAUST, T. D. Population structure and spatial pattern of two coastal populations of Ocala sand pine (*Pinus clausa*). **Journal of the Torrey Botanical Society**, 124: 22-33, 1997.

PREFEITURA MUNICIPAL DE ALTA FLORESTA. **Estado de Mato Grosso**. 2013. Disponível em: <http://www.altafloresta.mt.gov.br/geografia/> Acesso em: 20 de dezembro de 2014.

PROJETO RADAMBRASIL. Aspectos Físicos: Relevo, Cobertura vegetal, Hidrografia e Solos. Folha – 21, Juruena. Rio de Janeiro, 1980. (Levantamento de Recursos naturais, v. 20).

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2005. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

RABELLO, A.; RAMOS, F. N.; HASUI, E. Efeito do tamanho do fragmento na dispersão de sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Delf.). **Biota Neotropica**, 10: 47-54, 2010.

RIBEIRO, J. F.; C. E. L.; FONSECA, J. C. S.; SILVA. 2001. Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria. Embrapa Cerrados, Planaltina.

SADDI, N. A primeira contribuição sobre a flora de Humboldt (Aripuanã, Mato Grosso). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 26., 1975, Rio de Janeiro. **Trabalhos...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1977.

SALLES, J. C.; SCHIAVINI, I. Estrutura e composição do estrato de regeneração em um fragmento florestal urbano: implicações para a dinâmica e a conservação da comunidade arbórea. **Acta botânica brasílica**, 21: 223-233, 2007.

SILVA JÚNIOR, M. C. Fitossociologia e estrutura diamétrica da mata de galeria do Taquara, na reserva ecológica do IBGE, DF. **Revista Árvore**, 28: 419-428, 2004.

SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; CARVALHO, M. L. S.; SILVA, C. J. Estrutura e padrões de distribuição espacial de duas espécies de *Theobroma* em um parque de preservação permanente no norte do estado de Mato Grosso, **Enciclopédia Biosfera**, 9: 2789, 2013.

SILVA, R. A. R.; ARAUJO, L. H. B.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Distribuição espacial de *Protium heptaphyllum* (aubl.) march.: uma espécie arbórea dioica em um fragmento de floresta atlântica no nordeste do Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, 10: 1316, 2014.

SOUZA, C. S. C.; GOMES, S. C. P.; SOUZA, V. C.; SILVA, D. A. S.; APARÍCIO, W. C. S.; GUEDES, M. C.; APARÍCIO, P. S. Caracterização estrutural da espécie *Theobroma subincanum* Mart (cupuí) na reserva extrativista do rio Cajari, Amapá-BRASIL. 5º Simpósio Latino Americano de manejo florestal, 2012.

SOUZA, C. S. C.; GOMES, S.; SOUSA, V. C. C.; SILVA, D. A. S.; APARÍCIO, W. D. S.; GUEDES, M.; APARÍCIO, P. D. S. Caracterização estrutural da espécie *Theobroma subincanum* Mart (Cupuí) na reserva extrativista do Rio Cajari, Amapá-Brasil. In Embrapa Amapá-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 5., 2011, Santa Maria. Sustentabilidade florestal: **anais...** Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2011. p.799-806.

SOUZA, J. P.; COIMBRA, F. G. Estrutura populacional e Distribuição espacial de *Qualea parviflora* Mart. em um Cerrado sensu stricto. **Biosciência**, 21: 65-70, 2005.

VASCONCELOS, H. L.; VILHENA, J. M. S.; MAGNUSSON, W.; ALBERNAZ, A. L. K. M. Long-term effects of forest fragmentation on Amazonian ant communities. **Journal of Biogeography**, 33: 1348–1356, 2006.

ZAR, J. H. 1966. **Biostatistical Analysis**, 3rd Edn. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. pp. 662.

4.3 CAPÍTULO 3

Morfometria floral e estimativa da viabilidade polínica de *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng.

RESUMO

Theobroma speciosum é uma espécie nativa com potencial de uso pelas comunidades locais da Amazônia e também para programas de melhoramento genético, visando o melhoramento de espécies já domesticadas como o cacau e o cupuaçu. O sucesso da introdução de uma espécie em um programa de melhoramento é influenciado pelo conhecimento detalhado dos processos reprodutivos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a morfometria floral e a viabilidade polínica de *T. speciosum* em populações nativas localizadas em fragmentos urbanos no norte do estado de MT. Para a análise morfométrica foram coletadas 90 flores frescas, nas quais foram mensuradas 14 características com auxílio de um paquímetro digital: comprimento da flor da base ao topo, largura da flor aberta, comprimento da lâmina da sépala, largura da lâmina da sépala, na porção média, comprimento da lâmina da lígula, largura da lâmina da lígula, na porção média, comprimento da cógula, na porção média, largura da cógula, na porção média, comprimento do pedúnculo, largura do pedúnculo, na porção média, comprimento dos estaminóides, comprimento do ovário, largura do ovário, na porção média e comprimento do estigma. Para a estimativa da viabilidade polínica foram coletados botões florais em 10 genótipos de cada fragmento. Os testes colorimétricos foram realizados com três corantes: reativo de Alexander, lugol 1% e carmim acético 2%. As análises foram realizadas com o auxílio do programa GENES. O Cacauí possui inflorescência caulinar, com flores hermafroditas, diclamídeas com cálice e corola pentâmeras, presença de pétalas modificadas em lígula e cógula. As flores possuem 5 estames homodínamos, 5 estaminódios e 6 anteras. O ginceu é pluricarpelar, com soldadura gamocarpelar, formando um só pistilo. O estigma é ramificado e o ovário é súpero com placentação axial. As flores medem de 9,86mm a 18,36mm de comprimento com uma média de 14,89mm e largura de 10,34mm a 24,7mm, tendo uma média de 19,77mm. Os pólenes de *T. speciosum* apresentaram uma média acima de 97% de viabilidade para os três testes colorimétricos utilizados. Observou-se diferença estatística significativa na viabilidade polínica de *T. speciosum* estimada com o corante carmim acético a 1% de probabilidade ($p < 0,01$), entre os três fragmentos em estudo. O fragmento do parque Zoobotânico apresentou a maior viabilidade polínica em todos os testes colorimétricos utilizados. Apesar do alto percentual de viabilidade polínica encontrado para os três testes colorimétricos, recomenda-se a utilização da solução tripla de Alexander para estimar a viabilidade dos pólenes de *T. speciosum*, pois nas práticas laboratoriais, este corante se mostrou mais eficaz, distinguindo com maior precisão os pólenes viáveis dos inviáveis, promovendo uma fácil e segura visualização.

Palavras-chave: Cacauí, Biologia Floral, Testes Colorimétricos.

Floral morphometry and pollen viability estimate of *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng.

ABSTRACT

Theobroma speciosum is a native species with potential for use by local communities in the Amazon and also for genetic breeding programs for the improvement of species already domesticated as cocoa and cupuaçu. The successful introduction of a species into a breeding program is influenced by a detailed knowledge of reproductive processes. Thus, the aim of this study was to evaluate the *T. speciosum* floral morphology and the pollen viability in native populations located in urban fragments in the northern Mato Grosso state. For the morphometric analysis, 90 fresh flowers were collected, in which 14 characteristics were measured with the aid of a digital pachymeter: the flower length, the flower open width, the sepal length, the sepal width, the ligule length, the ligule width, the cowl length, the cowl width, the peduncle length, the peduncle width, the staminodes length, the stigma width and the ovary length. To estimate pollen viability, flower buds were collected in 10 genotypes of each fragment. Colorimetric tests were performed with three dyes: reactive Alexander, Lugol at 1% and the acetic carmine at 2%. The analyzes were performed with the aid of the GENES program. Cacaui has stem inflorescence with hermaphrodite flowers, dichlamydeous with calyx and corolla pentamerous, and presence of petals modified in ligule and cowl. The flowers have five stamens homodynamous, 5 staminodes and 6 anthers. The gynoecia is pluricarpelar with gamocarpelar soldering, forming an only pistil. The stigma is branched and the ovary is superior with axial placentation. The flowers measure from 9,86mm to 18,36mm of length, with an average of 14.89mm and a width from 10,34mm to 24,7mm, having an average of 19,77mm. The *T. speciosum* pollen had an average above 97% of viability for the three colorimetric tests used. There was a significant statistical difference in the *T. speciosum* pollen viability estimated with acetic carmine dye to 1% of probability ($p < 0.01$) between the three fragments studied. The Zoobotanical Park fragment had the highest pollen viability in all colorimetric tests used. Despite the high pollen viability percentage found for the three colorimetric tests, it is recommended to use the triple solution Alexander to estimate the viability of the *T. speciosum* pollen because in laboratory practice, this dye was more efficient, distinguishing the accurate viable pollen from the unviable one, promoting a safe and easy viewing.

Keywords: Cacaui, Floral Biology, Colorimetric tests.

INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica é detentora da maior biodiversidade do mundo, incluindo espécies vegetais com grande potencial econômico e que ainda não foram domesticadas (Maués e Couturier, 2002). Dentre essas, encontram-se as do gênero *Theobroma* L., sendo as de maior importância dentro da família Malvaceae (Purseglove, 1968), despertando grande interesse da comunidade científica internacional (Duarte et al., 2010).

No volumoso grupo de espécies com aproveitamento convencional ou mesmo com potencialidades de uso encontra-se o *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng., destacando-se entre os populares “cacaos” (Guarin Neto, 2011). É considerada de acordo com Balée (1994), como a espécie ecologicamente mais importante do gênero.

No Brasil é conhecida popularmente como cacauí, cacao azul, cacau-da-mata e cacau-de-macaco (Cavalcante 1991). Seus frutos, embora tendo menor importância econômica que *Theobroma cacao* (cacau) e *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), são apreciados pela população local, consumidos tanto como fruta fresca, quanto na forma de refresco (Ferrão, 2001). Em relação às sementes, possuem o teor de gordura mais próximo do cacau, podendo ser utilizadas para a fabricação de chocolates (Cavalcante, 1991; Silva, 2003).

Além da sua ampla utilização, o cacauí poderá também contribuir para experimentos direcionados a formação de híbridos (Silva, 2003), uma vez que hibridações interespecíficas entre espécies do gênero *Theobroma* L. são estratégias potenciais para *T. cacao* e *T. grandiflorum* (Venturieri e Venturieri, 2004), visto que os parentes selvagens fornecem genes valiosos para a resistência a doenças, alto teor de proteína, resistência a seca e outros atributos economicamente desejáveis (Hajjar e Hodgkin, 2007).

O sucesso da introdução de *T. speciosum* em um programa de melhoramento de plantas necessita de um conhecimento detalhado de sua genética (Santos et al., 2012) e biologia floral, pois além de proporcionarem um entendimento do sistema reprodutivo, são pontos fundamentais da biologia reprodutiva da espécie, considerados a base para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético (Maués et al., 2002).

Estimativas da viabilidade polínica constituem um importante parâmetro em programas de melhoramento genético e em análises de fluxo gênico (Martins et al., 1981; Botto, 1997), visto que uma boa viabilidade polínica ligada ao conhecimento da morfologia das plantas, pode aumentar a eficácia nos cruzamentos em programas de hibridações (Einhard et al., 2006).

De acordo com Pagliarini e Pozzobon (2004), a avaliação da viabilidade polínica pode ser realizada com base em parâmetros citológicos, como a reação a corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes nos grãos de pólen maduro, como por exemplo, o lugol, o carmim acético e a solução tripla de Alexander.

Há relatos de alguns trabalhos abordando a biologia reprodutiva em algumas espécies do gênero *Theobroma*, como em *Theobroma grandiflorum* (NETO e MAUÉS, 2008; ANTONIO, 2004; VENTURIERI e RIBEIRO FILHO, 1995; MAUÉS et al., 2001), *Theobroma cacao* (GODOY et al., 2009; CABRAL et al., 2013; WINDER e SILVA, 1972) e *Theobroma speciosum* (SOUZA e VENTURIEI, 2010; SILVA, 2003; YOSHIMOTE et al., 2008); entretanto, escassas são as informações referentes à biologia floral de espécies silvestres do gênero *Theobroma* L., sendo necessárias para a ampliação do conhecimento sobre os aspectos reprodutivos.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a morfometria floral e a viabilidade polínica de *T. speciosum* em populações nativas localizadas em fragmentos urbanos no norte do estado de MT.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi conduzido no município de Alta Floresta, localizado no norte do estado de Mato Grosso (Figura 1), onde o clima é caracterizado, segundo Köpen como do tipo AWI (tropical chuvoso com nítida estação seca), sendo a temperatura média anual de 26 °C e pluviosidade média anual de 2.750mm (IBGE, 1997).

Para o estudo, foram selecionados três parques municipais que constituem fragmentos florestais urbanos: o parque C/E, o parque J e o parque Zoobotânico (Figura 1), onde a espécie *Theobroma speciosum* ocorre naturalmente.

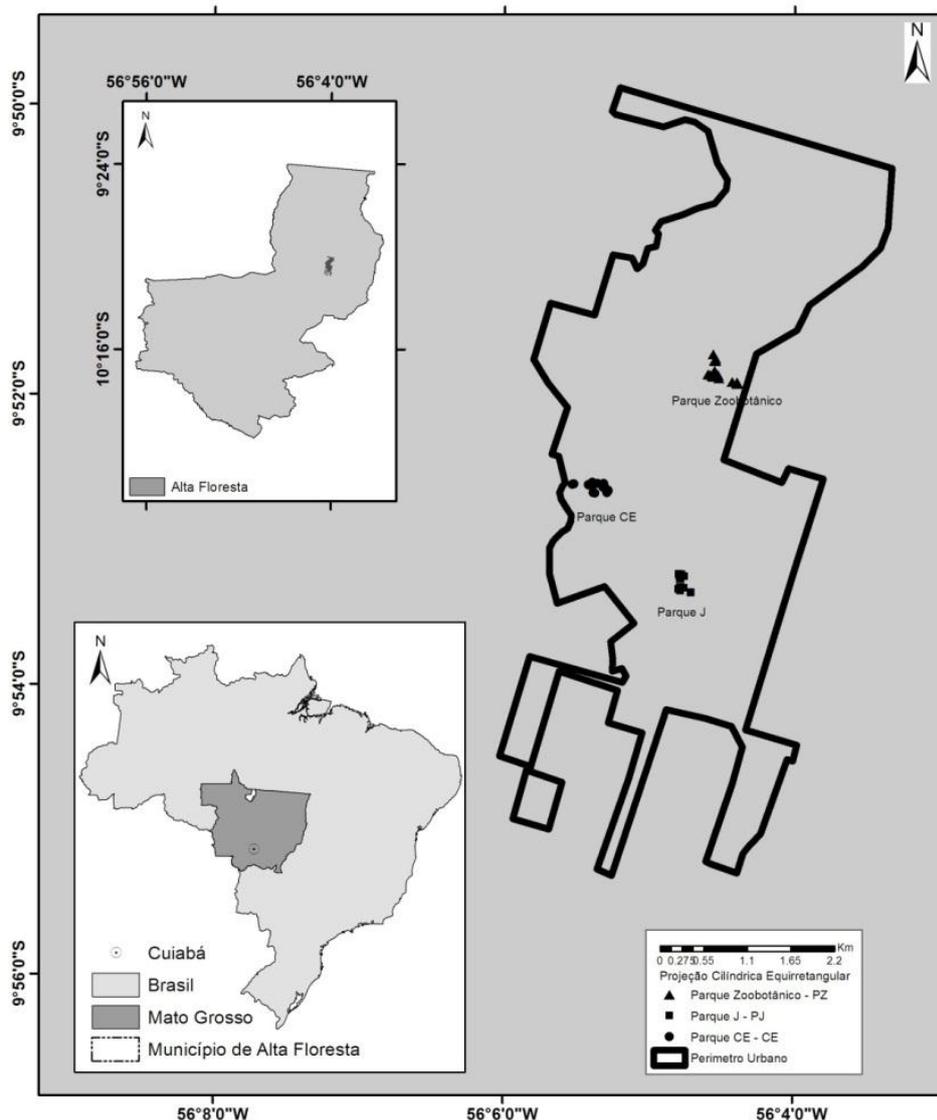


Figura 1. Localização do município de Alta Floresta – MT e dos fragmentos em estudo.

Morfologia e Morfometria Floral

Para a realização do estudo da morfologia floral foram utilizadas flores frescas de *T. speciosum*, coletadas no mês de setembro de 2013. A morfologia externa e interna foi observada em Lupa estereoscópica e descrita de acordo com o Manual de Organografia de Vidal e Vidal (2003).

Para a análise morfométrica foram coletadas flores de nove (09) indivíduos selecionados aleatoriamente em três fragmentos urbanos (Figura 1). Em cada indivíduo foram coletadas 10 flores, totalizando 90 flores.

A caracterização morfométrica das flores foi realizada utilizando 14 caracteres de acordo com Alves et al. (2003), com auxílio de um paquímetro digital: comprimento da flor da base ao topo (CFL), largura da flor aberta (LFL),

comprimento da lâmina da sépala (CSE), largura da lâmina da sépala, na porção média (LSE), comprimento da lâmina da lígula (CLI), largura da lâmina da lígula, na porção média (LLI), comprimento da cógula, na porção média (CCG), largura da cógula, na porção média (LCG), comprimento do pedúnculo (CPE), largura do pedúnculo, na porção média (LPE), comprimento dos estaminoides (CES), comprimento do ovário (COV), largura do ovário na porção média (LOV), comprimento do estigma (CEST).

Para todas as variáveis avaliadas foi realizada análise estatística descritiva pelo programa GENES, sendo calculada a média, os valores mínimos, máximo, desvio padrão e o coeficiente de variação. Todas as análises foram executadas no programa GENES (Cruz, 2013).

Testes de Viabilidade Polínica

Para a estimativa da viabilidade polínica, foram coletadas flores em 30 genótipos de *T. speciosum* distribuídos nos três fragmentos florestais urbanos, sendo 10 genótipos em cada fragmento. As flores foram coletadas pela manhã, fixadas em solução de etanol/ácido acético (3:1), mantidos em temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, foram transferidos para o freezer até o preparo das lâminas.

Os testes de viabilidade polínica foram realizados utilizando três diferentes corantes: Solução tripla de Alexander (Orange G, fucsina básica, verde malaquita) (Alexander, 1969), onde os grãos de pólen viáveis são detectados pela presença da cor vermelha ou púrpura noprotoplasma, enquanto que os grãos de pólen inviáveis apresentam coloração verde; carmim acético (Kearns e Inouye, 1993) que indica a viabilidade do pólen pela coloração vermelha; lugol (Dafni, 1992) que indica a viabilidade pela coloração marrom.

Foram preparadas 8 lâminas por localidade, utilizando a técnica de esmagamento das anteras (Guerra e Souza, 2002). Foi adicionada uma gota do corante correspondente sobre a lâmina; em seguida, as anteras foram colocadas sobre o corante e maceradas com o auxílio de um bastão de vidro. Após a retirada dos resquícios das anteras, o material foi coberto com uma lamínula. Foram contabilizados 250 grãos de polens por lâmina, perfazendo um total de 2.000 grãos de pólen por corante e por fragmento. Na avaliação, os pólenes foram classificados

como normais/viáveis (N/V) e anormais/inviáveis (A/I) de acordo com a reação de coloração. A visualização do material foi feita em microscópio óptico em dimensão de 40x (10x ocular e 4x objetiva).

Para comparar as médias entre cada corante e analisar as diferenças entre os mesmos, foi realizada a análise dos dados da viabilidade polínica através do intervalo de confiança para proporção, empregando o método de amostragem simples ao acaso. Já para indicar qual o melhor corante na estimativa da viabilidade polínica e comparar as localidades, os resultados foram submetidos a uma análise de variância e comparados pelo teste de média de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram executadas no programa GENES (Cruz, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfologia e Morfometria floral

O Cacauí possui inflorescência caulinar (Figura 2A), com flores hermafroditas, diclamídeas com cálice e corola pentâmeras, presença de pétalas modificadas em lígula e cógula (Figura 2C e D). A cógula forma uma câmara de formato côncavo na base das pétalas, assim como verificado pelos autores Cavalcante (1991), Ferrão (2001), Young (1984). Segundo Cuatrecasas (1964), as inflorescências medem de 1,5 a 2,0 cm de comprimento, contendo em média 250 flores com cores variando de vermelho a púrpura.

A cógula tem uma função importante para a reprodução de *T. speciosum*, pois além de proteger as estruturas reprodutivas, atuam como uma armadilha para os polinizadores, que ao entrarem na câmara, ficam com seus corpos cobertos de grãos de pólen (Yong, 1984). Souza e Venturieri (1998) relatam que em espécies do gênero *Theobroma* essas estruturas possuem odor acentuado, parecendo com um forte cheiro de limão, considerado por Silva (2003), como um atrativo para Drosófilas (polinizadores). Estruturas como a cógula favorecem a alogamia e a autoincompatibilidade da espécie (Souza e Venturieri, 2010).

Em relação à estrutura do androceu, as flores possuem 5 estames homodínamos (Figura 2E), 5 estaminódios inférteis que formam um círculo em volta do ovário (Figura 2F) e 6 anteras (contendo duas tecas) com deiscência longitudinal extrorsa (Figura 2G). Andrade (2009) relata que os estaminódios atuam como uma

barreira física entre os órgãos reprodutivos das flores, favorecendo a polinização cruzada, e conseqüentemente, aumentam a variabilidade dentro da espécie.

O giniceu é pluricarpelar (5 carpelos) (Figura 2 H e I), com soldadura gamocarpelar, formando um só pistilo. O estigma é ramificado e ovário é súpero com placentação axial.



Figura 2. Detalhe das inflorescências, flores e peças florais de *T. speciosum*. (A) inflorescência; (B) flor com seta indicando a sépala; (C) seta indicando a lígula; (D) flor com seta indicando a cógula; (E) seta indicando os estames; (F) seta indicando os estaminódios em círculo; (G) seta indicando as anteras; (H) seta indicando o gineceu; (I) ovário plurilocular, setas indicando os carpelos.

As flores de *T. speciosum* medem de 9,86mm a 18,36mm de comprimento com uma média de 14,89mm, a largura de 10,34mm a 24,7mm, tendo uma média de 19,77mm (Tabela 1).

Com relação à estrutura da corola, a lígula mede em média 7,58mm de comprimento e 8,66mm de largura, enquanto que a cógula mede de 8,66mm de

comprimento e largura de 7,24mm. Já o cálice apresenta sépalas com 11,16mm de comprimento e 4,45mm de largura.

O comprimento médio do ovário é de 3,04mm e a largura média é de 2,50mm, e encontra-se envolvido por um círculo de estaminoides inférteis, com comprimento médio de 8.78mm (Tabela 1).

Os valores da morfometria floral de *T. speciosum* para os caracteres CLL, LLL, CES, COV e LOV encontrados neste estudo, foram maiores do que os encontrados por Santos et al. (2012), em um estudo com a mesma espécie na coleção de germoplasma do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) em Ilhéus, Bahia, Brasil. De acordo com os resultados obtidos, podemos inferir que as flores de *T. speciosum* variam de tamanho de acordo com a região em que se encontram.

Tabela 1. Caracterização biométrica de flores de *Theobroma speciosum* coletadas em fragmentos florestais urbanos de Alta Floresta, MT, Brasil. (n=90)

	Média (mm)	Mínimo (mm)	Máximo (mm)	D.P.
CFL	14.89	9.86	18.36	2.03
LFL	19.77	10.34	24.7	2.54
CSE	11.16	3.46	13.29	1.41
LSE	4.45	3.2	6.81	0.74
CLI	7.58	5.29	9.99	0.95
LLI	8.66	5.55	10.7	1.23
CCG	8.66	4.73	8.71	0.75
LCG	7.24	3.25	7.64	0.66
CES	8.78	6.44	11.35	1.24
COV	3.04	1.39	3.77	0.44
LOV	2.50	2.3	3.88	0.34
CET	2.57	2.04	3.7	0.28
CPE	22.40	15.2	29.74	3.3
LPE	1.50	0.98	2.23	0.22

CFL: comprimento da flor; LFL: largura da flor; CSE: comprimento da sépala; LSE: largura da sépala; CLI: comprimento da lígula; LLI: largura da lígula; CCG: comprimento da cógula; LCG: largura da cógula; CES: comprimento do estaminoide; CET: comprimento do estigma; COV: comprimento do ovário; LOV: largura do ovário; CPE: comprimento do pedúnculo; LPE: largura do pedúnculo. D.P.: Desvio Padrão.

Viabilidade Polínica

Os pólenes de *T. speciosum* apresentaram uma média acima de 97% de viabilidade em todos os três testes colorimétricos utilizados. O reativo de Alexander corou o grão de pólen viável de púrpura no protoplasma com fino contorno azul-esverdeado na parede celular (Figura 3A), indicando que em média 97,88% dos

grãos possuíam protoplasma e parede celular íntegra, já os inviáveis apresentaram coloração esverdeada (Figura 3B).

O carmim acético 2% corou em média 97,88% dos grãos de pólen de vermelho intenso (Figura 3C), demonstrando a sua integridade cromossômica, pois segundo Munhoz et al. (2008), um alto valor de viabilidade revelado pelo corante carmim acético evidencia que o material genético do grão de pólen possui uma boa integridade.

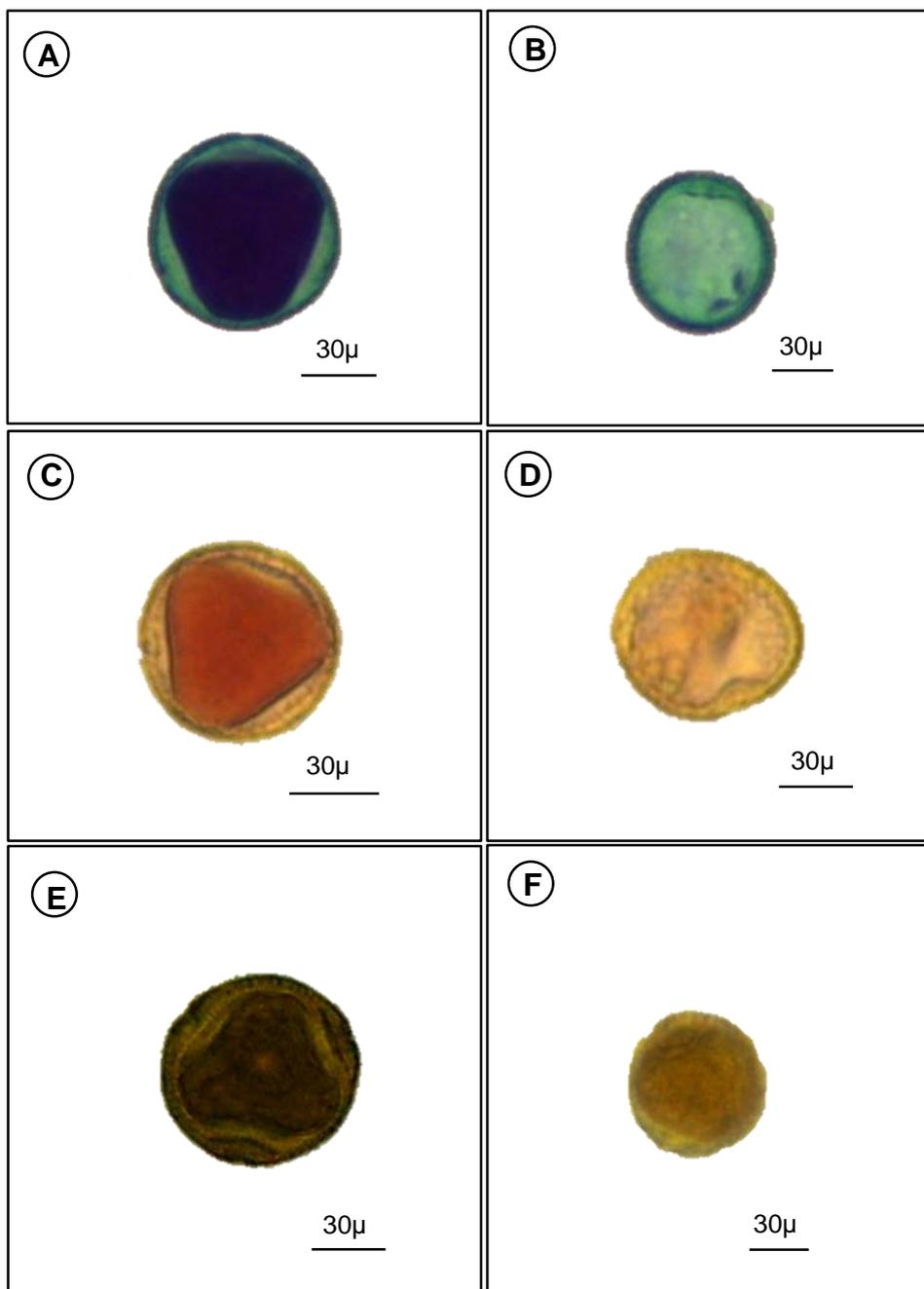


Figura 3. Fotomicrografias dos grãos de pólen de *T. speciosum*. (A) Reativo de Alexander (pólen viável); (B) Reativo de Alexander (pólen inviável); (C) Carmim acético (pólen viável); (D) Carmim acético (pólen inviável); (E) Lugol (pólen viável); (F) Lugol (pólen inviável).

A presença de amido como reserva foi observada em 97,68% dos grãos de pólen pelo teste com Lugol a 1% que reagiu com o amido presente, proporcionando coloração marrom intensa (Figura 3E). Apesar do Lugol ser usado para estimar a viabilidade polínica de várias espécies, ele está associado mais especificamente na detecção de amido, que pode estar presente tanto em grãos de pólen maduros como nos abortados (King, 1960; Beyhaut, 1988; Rodriguez-Riano e Dafni, 2000). Com base nos resultados obtidos os pólenes de *T. speciosum* apresentam uma grande quantidade de amido como reserva.

A análise de variância revelou diferença estatística para a viabilidade polínica entre os fragmentos apenas para o corante carmim acético (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para viabilidade polínica de *T. speciosum*, entre os três fragmentos de estudo, submetidos a três diferentes testes colorimétricos

	Corantes		
	Reativo de Alexander	Lugol 1%	Carmim Acético 2%
Média Geral	97,88	97,68	97,88
Graus de Liberdade	2	2	2
F	0,21 ^{ns}	1,85 ^{ns}	0,44 ^{**}
Coefficiente de Variação (%)	1,52	2,21	1,49

^{ns} não significativo. ^{**} significativo a 1%.

Os três testes colorimétricos revelaram um maior percentual médio de viabilidade polínica nos indivíduos amostrados no fragmento Zoobotânico, sendo que apenas com o carmim acético ocorreu diferença estatística significativa, com os indivíduos do fragmento C/E apresentando o menor percentual de viabilidade (Tabela 03). Porém os testes colorimétricos revelaram um percentual médio acima de 96% para os indivíduos dos três fragmentos, segundo Biondo e Battistin (2001), a elevada taxa de viabilidade pode indicar alto potencial de fertilidade dos gametas masculinos.

Tabela 03. Comparação do percentual médio de viabilidade polínica de *T. speciosum* entre os três fragmentos em estudo para cada teste colorimétrico utilizado

Fragmentos	Corantes		
	Reativo de Alexander	Lugol 1%	Carmim acético 2%
C/E	97,6 a	96,5 a	96,55 b
J	98,1 a	98,1 a	97,8 ab
Zoobotânico	98,45 a	98,45 a	99,3 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Cabral et al. (2013), obtiveram resultados semelhantes ao analisarem a viabilidade polínica com o Carmin acético 2% e o Lugol 1% em sete acessos de *Theobroma cacao*, demonstrando porcentagens acima de 95% para ambos os corantes. Gomes et al. (2013), utilizando Carmim acético, Lugol e reativo de Alexander, em duas populações de *Mauritia flexuosa* no município de Alta floresta, MT, também encontraram alta viabilidade polínica, com estimativas superiores a 90%.

A alta porcentagem da viabilidade polínica encontrada é muito importante para a reprodução da espécie, pois quanto mais alta esta for, maior será o índice de fertilização; além disso, a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos, e em última análise, de variabilidade genética é maior (Souza et al., 2002).

Todos os corantes testados foram eficazes na determinação da viabilidade, apresentando percentual médio acima de 97%. Entretanto, o reativo de Alexander proporcionou uma maior confiabilidade visual na distinção entre pólenes viáveis e inviáveis. Segundo Munhoz et al. (2008), essa facilidade de distinção de pólenes viáveis e inviáveis devido às colorações diferenciadas, faz com que esse corante seja considerado por muitos uma ferramenta valiosa, podendo ser utilizado até mesmo na identificação de híbridos.

Outros estudos, tais como, Techio et al. (2006) com Capim-elefante e milho; Damasceno Júnior, (2008) com a espécie *Carica papaya* e Auler et al. (2006), com a espécie *Baccharis trimera*, também recomendaram a utilização da solução de Alexander para o monitoramento da viabilidade de grãos de pólen frescos ou armazenados. Portanto, recomenda-se a utilização do reativo de Alexander para a análise da viabilidade polínica da espécie *T. speciosum*.

CONCLUSÕES

A espécie *Theobroma speciosum* apresenta morfologia típica do gênero *Theobroma*, possuindo flores hermafroditas, pentâmeras e diclamídeas. A presença de estruturas modificadas, tais como a cógula e os estaminoides, funcionam como uma barreira que favorecem a alogamia da espécie e a polinização por pequenos insetos. A viabilidade polínica mostrou-se alta com média acima de 97% em todos os três testes colorimétricos utilizados; entretanto, o reativo de Alexander

proporcionou uma maior confiabilidade visual na distinção entre pólenes viáveis e inviáveis, sendo assim recomendado para análise da viabilidade polínica de *T. speciosum*.

O teste com o Lugol a 1% revelou a presença de amido como reserva em 97,68% dos grãos de pólen de *Theobroma speciosum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and non aborted pollen. **Stain Techn**, 44:117-122, 1969.
- ALVES, R. M.; GARCIA, A. A. F.; CRUZ, E. D.; FIGUEIRA, A. Seleção de descritores botânico-agronômicos para caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro⁽¹⁾. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 38: 807-818, 2003.
- ANDRADE, I. S. **Mapeamento da autoincompatibilidade sexual do cacau e certificação genética dos clones tsh-1188 e ccn-51 por meio de marcadores microssatélites**. Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2009. 77p. (Dissertação – Mestrado em Produção Vegetal).
- ANTONIO, I. C. Germinação *in vitro* do pólen de *Theobroma grandiflorum* (Willd enow ex Sprengel) Schumann. **Científica**, 32: 101-106, 2004.
- AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8: 55-63, 2006.
- BALÉE, W. **Foot prints of the Forest – Ka’aporethno botany – the historical ecology of Plant Utilization by an Amazonian people**. New York: Columbia University Press, 1994, 369p.
- BEYHAUT, R. Estúdio comparado de técnicas para viabilidade de polens em *Vitis vinifera*. **Notas Técnicas**, 5. Faculdade de Agronomia, Montevideo, 1988.
- BIONDO, E.; BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) e *Rhynchosia* LOUR (Leguminosae-Faboideae), nativas na região sul do Brasil. **Bioikos**, 15: 39- 44, 2001.
- BOTTO, V. O. 1997. Cruzamiento interspecíficos en *Eucalyptus* sp. In: Acta sdel XI **Congreso Forestal Mundial**, Antalya, Turquia 8:1-9. Disponível em http://www.fao.org/forestry/docrep/wfcxi/publi/v8/es/v8s_e5.htm (acesso em dezembro/2014).
- CABRAL, J. C.; ROSSI, A. A. B.; KLEIN, M. E.; VIEIRA, F. S.; GIUSTINA, L. D. Estimativa da Viabilidade Polínica em acessos de *Theobroma cacao* L. baseada em testes colorimétricos. **Enciclopédia Biosfera**, 9: 2780, 2013.
- CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: CEJUP/CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991. (Coleção Adolfo Ducke).
- CRUZ, C.: D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, 35: 271-276, 2013.

CUATRECASAS, J. A. Taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the U. S. National Herbarium**, 35: 379-607, 1964.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)**. New York, Oxford: Universitypress. 250 p, 1992.

DAMASCENO JÚNIOR, P. C. **Estudos citogenéticos, genéticos e moleculares como ferramenta auxiliar no melhoramento genético do mamoeiro**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008. 139p. (Tese – Doutorado em Genética e Melhoramento de Pantas).

DUARTE, O. R.; ALBUQUERQUE, T. C. S.; OLIVEIRA, J. M. F.; PASSOS, M. A. B.; SCHWENGBER, D. R.; GAMA NETO, J. Distribuição geográfica de Cupuí em Roraima. In: REUNIÃO REGIONAL DA SBPC EM BOA VISTA, 2010, Roraima. **Anais...** Roraima: SBPC, 2010. 1 CD-ROM.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28: 5-7, 2006.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 2001. p. 652p.

GODOY, P. R. E.; SOUZA, M. M.; ROZA, F. A.; LAWINSCKY, P. R.; ARAÚJO, I. S.; AHNERT, D. Performace polínica em cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) autocompatíveis e autoincompatíveis. **Revista Brasileira de Botânica**, 32: 617-620, 2009.

GOMES, A. D.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; SILVA, B. M.; SILVA, I. V. Razão sexual e viabilidade polínica de *Mauritia flexuosa* L. (Arecaceae), **Enciclopédia Biosfera**, 9: 2864-2870, 2013.

GUARIM NETO, G.; SILVA, F. H. B. Plantas da amazônia mato-grossense: o cacauí – *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng (Malvaceae). **Flovet**, 3: 1806-8863, 2011.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 191p.

HAJJAR, R.; HODGKIN, T. The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. **Euphytica**, 156: 1-13, 2007.

IBGE - INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Recursos Naturais e Meio Ambiente: uma visão do Brasil**. Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. 2ª de. Rio de Janeiro – RJ: IBGE, 1997.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 1993. 579p.

KING, J. R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. **Stain technology**, 35: 22-57, 1960.

MARTINS, M. E.; PRERA, L. E. H.; KAGEYAMA, P. Y. 1981. Manejo de pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético. **Circular Técnica n. 18**, IPEF, Piracicaba.

MAUÉS, M. M.; COUTURIER, G. Biologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dúbia* (H. B. K.) Mc Vaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 25: 441-448, 2002.

MAUÉS, M. M.; SOUZA, L. A.; MIYANAGA, R. Insetos polinizadores do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd. ex Sprengel) Schum. Sterculiaceae) no estado do Pará, Brasil). Belém: Embrapa CPATU, p.1-19, 2001. (Embrapa Amazônia Oriental: **Circular Técnica 12**).

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira Botânica**, 31: 209-214, 2008.

NETO, W. V. C.; MAUÉS, M. M. Manutenção de uma criação de *Plebeia minima* e *Tetragonis caangustula* (Apidae, Meliponini) para a polinização do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). In: **SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA**, 6.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL (AVALIAÇÃO - 2008), 12., 2008, Belém, PA. A importância da iniciação científica para a pós-graduação: anais. Belém, PA: UFRA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. (2004) **Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF. PARENTE, V. M.; OLIVEIRA. JR. A. R.; COSTA, A. M. **Projeto Potencialidades Regionais Estudo de Viabilidade Econômica – Cacau**. Disponível em:<http://www.suframa.gov.br>>Acessoem: 28/10/ 2014.

PURSEGLOVE, J. W. 1968. Tropical Crops-Dicotyledons. Longman Green London, London.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to asses pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, 12: 241-244, 2000.

SANTOS, R. C. S.; PIRES, J. L.; CORREA, R. X. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. **Genetic Resources Crop Evolution**, 59: 327–345, 2012.

SILVA, A. A. R. **Polinização de Cacaú (*Theobroma speciosum* Wild. ex Spreng. Sterculiaceae): Implicações para a conservação**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2003. 77p. (Dissertação - Mestrado em Zoologia).

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Revista Ciência Agropecuária**, 26: 1209-1217, 2002.

SOUZA, M. S.; VENTURIERI, A. G. Floral Biology of Cacauihy (*Theobroma speciosum* - Malvaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53: 861-872, 2010.

SOUZA, S. P.; VENTURIERI, G. A. (1998), Floral phenology of cacau-cabeça-de-urubu (*Theobroma obovatum*). In- Venturieri, G. A. Biologia aplicada à domesticação de fruteiras amazônicas do gênero *Theobroma* - Primeiro relatório: CNPq/Programa de Trópico Úmido - PUT/Proc. n. 63.00.13/95. p.105 Belém, PA, Brasil.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEDROZO, C. A.; PEREIRA, A. V. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Revista Acta Scientia Biologica**, 28: 7-12, 2006.

VENTURIERI, G. A.; RIBEIRO FILHO, A. A. Polinização manual do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). **Acta Amazônica**, 25: 181-191, 1995.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae)¹. **Acta Amazonica**, 34: 507-511, 2004.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. Botânica – organografia; quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos. **rev. ampl.** – Viçosa: UFV, 4. ed. 2003.

WINDER, J. A.; SILVA, P. Cacao pollination: Microdiptera of cacao farms and some of their breeding places. **Bulletin of Entomological Research**, 61: 651-655, 1972.

YOSHITOME, M. Y.; SOUZA, M. F. P.; KARSBURG, I. V. Caracterização dos cromossomos mitóticos e índice meiótico de *Theobroma speciosum* (L.) Willd. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, 6: 21-28, 2008.

YOUNG, A. M.; SCHALLER, M.; SRAND, M. A. Floral nectaries and trichomes in relation to pollination in some species of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae). **American Journal of Botany**, 17: 466-480, 1984.

4.4 CAPÍTULO 4

Viabilidade polínica e receptividade do estigma de cacauí (*Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng.)

RESUMO

Estimativas da viabilidade polínica e receptividade estigmática constituem um importante parâmetro para programas de melhoramento genético, especialmente quando se utilizam técnicas de polinização artificial para a hibridação de espécies. Neste contexto, o presente trabalho objetivou estimar a viabilidade polínica e avaliar a receptividade do estigma durante a antese de *Theobroma speciosum*. O estudo foi realizado durante o período de floração da espécie em genótipos distribuídos em fragmentos florestais urbanos na cidade de Alta Floresta, MT. Os registros sobre os eventos florais, viabilidade polínica e receptividade estigmática foram realizados em um período de 24h com intervalos de 4h, sendo que o primeiro horário de coleta iniciou-se às 22h finalizando 24h depois, às 22h. Para a análise da viabilidade polínica foram coletadas flores/ botões e fixadas em etanol: ácido acético (3:1). Posteriormente foram confeccionadas lâminas e a estimativa da viabilidade foi realizada por meio do Reativo de Alexander. A receptividade do estigma foi avaliada com peróxido de hidrogênio a 3%. As flores de cacauí iniciaram o processo da abertura as 2h com rupturas nas sépalas, apresentando flores totalmente abertas após as 6h. A viabilidade polínica permaneceu alta independente do horário de coleta analisado, com média superior a 94%. Os estigmas de *T. speciosum*, encontraram-se receptivos em todos os horários de avaliação, com percentual médio acima de 75% de receptividade; entretanto, os horários das 2h e 10h da manhã apresentaram as maiores taxas com média de 95%. Assim, recomenda-se que as polinizações controladas sejam realizadas entre as 2h e 10h, período de maior receptividade estigmática e maior disponibilidade de pólen nas flores.

Palavras-chave: Biologia Reprodutiva, Recursos Genéticos, Melhoramento vegetal.

Cacauí (*Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng.) pollen viability and stigma receptivity

ABSTRACT

Estimates of pollen viability and stigmatic receptivity are an important parameter in genetic breeding programs, especially when employing artificial pollination techniques for species hybridization. In this context, the present study aimed to estimate the pollen viability and evaluate the stigma receptivity during the *Theobroma speciosum* anthesis. The study was conducted during the flowering period of the species in genotypes distributed in urban forest fragments in Alta Floresta municipal district - MT. The floral events records, the pollen viability and the stigmatic receptivity were conducted in a 24-hour period within 4 hours intervals, being the first collection at 22:00 pm, 24 hours after finishing at 22:00 pm. For the analysis of the pollen viability, flowers / buttons were collected and fixed in ethanol: acetic acid (3:1). Subsequently, were made blades and an estimated viability was performed through the Alexander Reactive. The stigma receptivity was evaluated with 3% hydrogen peroxide. The cacauí flowers started the process of opening at 2 pm with the sepal breaks, and presented flowers fully open after 6:00 pm. The pollen viability remained high regardless the collection time analyzed, presenting an average above 94%. The *T. speciosum* stigmas were receptive at all times of evaluation, with an average receptivity percentage above 75%, though the timing between 2:00 am and 10:00 am had the highest values, with an average of 95%. Thus, it is recommended that the controlled pollinations should be performed between 2:00 am and 10:00 am, period of greater stigmatic receptivity and flower pollen availability.

Keywords: Reproductive Biology, Genetic Resources, Plant Breeding.

INTRODUÇÃO

O gênero *Theobroma* pertence à família Malvaceae e possui aproximadamente 22 espécies, das quais 13 ocorrem no Brasil (Esteves, 2014), tendo como representantes mais ilustres o cacau (*T. cacao*) e o cupuaçu (*T. grandiflorum*) (Venturieri, 1993), as únicas espécies do gênero cultivadas comercialmente (Silva et al., 2011).

A espécie silvestre *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. é conhecida popularmente como cacauí e possui o teor de gordura mais próximo do cacau (Silva et al., 2004). Seus frutos são consumidos *in natura* ou preparados como suco, e as suas sementes são utilizadas na produção de chocolate, geralmente nas comunidades nativas da Amazônia (Lorenzi, 2009).

O cacauí é uma planta de porte ereto, atingindo aproximadamente 15 m de altura, com copa muito frondosa e ramos curtos, troncos cilíndricos, lenhosos, onde, na base do caule já se inserem as densas e aglomeradas inflorescências multiflorais vermelho-púrpuras, que se destacam na paisagem florestal. As flores apresentam cálice e corola pentâmeros, pétalas vermelho-escuro, 5 estaminódios alternando com outros tantos estames (Ferrão 2001).

A espécie apresenta síndrome floral adequada à polinização por dípteros saprófagos da família Drosophilidae e Phoridae que visitam as flores no horário de maior receptividade (Martins e Silva, 2003). Sua floração pode ser observada nos meses de agosto a outubro, com os frutos amadurecendo entre fevereiro e abril (Lorenzi, 1998).

Estudos sobre a biologia reprodutiva de espécies nativas são de fundamental importância para determinar as estratégias a serem adotadas em um programa de melhoramento genético (Stiehl-Alves e Martins, 2008) e oferecem dados para entender os processos de domesticação dessas espécies. O conhecimento da viabilidade do grão de pólen e a variação da receptividade estigmática são extremamente importantes para escolha de progenitores a serem usados em casos de hibridações artificiais (Stiehl-Alves et al., 2008; Takehana et al., 2013).

A viabilidade polínica é essencial para o sucesso da fertilização uma vez que o tamanho do fruto, o número de sementes e a porcentagem de frutos, aumentam se

a quantidade de grãos de pólen acima do requerido for depositada no estigma da flor (Akamine e Girolami, 1957). Outra forma de facilitar os cruzamentos artificiais é através da variação da receptividade estigmática, período em que a porção feminina encontra-se receptiva ao grão-de-pólen (Stiehl-Alves e Martins, 2008). Galen et al. (1987), descrevem a receptividade do estigma como o estágio mais importante da maturação da flor, pois exerce grande influência na taxa de polinização. Um dos fatores que prejudicam a polinização é a escassez de informações sobre o melhor horário de receptividade do estigma, fazendo com que várias polinizações sejam repetidas como forma de assegurar a produção de sementes (Souza e Pinto Junior, 1994).

Tendo em vista a importância de espécies nativas na obtenção de híbridos interespecíficos, torna-se necessário o conhecimento sobre os melhores horários de coleta do pólen e o período em que o estigma da flor apresenta-se mais receptivo. Neste contexto, o presente trabalho objetivou estimar a viabilidade polínica e avaliar a receptividade do estigma durante a antese de *Theobroma speciosum*, uma espécie nativa da região Amazônica, e assim ampliar as informações sobre os aspectos reprodutivos da espécie e contribuir com programas de melhoramento genético e conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi conduzido em um fragmento florestal urbano remanescente, denominado Parque C/E, localizado no município de Alta Floresta, MT, onde a espécie *Theobroma speciosum* ocorre naturalmente. O Município está situado entre as coordenadas geográficas de 9° 02' 29" a 11°15' 45" de Latitude Sul e 54° 44' 55" a 58° 45' 10" de Longitude Oeste (Figura 1).

O município de Alta Floresta apresenta clima do tipo AWI – classificação Köppen – tropical chuvoso com nítida estação seca, e com temperaturas entre 20 °C a 38 °C, com pluviosidade média anual de 2.750mm (IBGE, 1997). A cobertura vegetal dominante no município é do tipo floresta ombrófila aberta tropical. O relevo é formado pelo Planalto Apicás–Sucurundi e a Depressão Interplanáltica da Amazônia Meridional (Butturi et al., 2013).

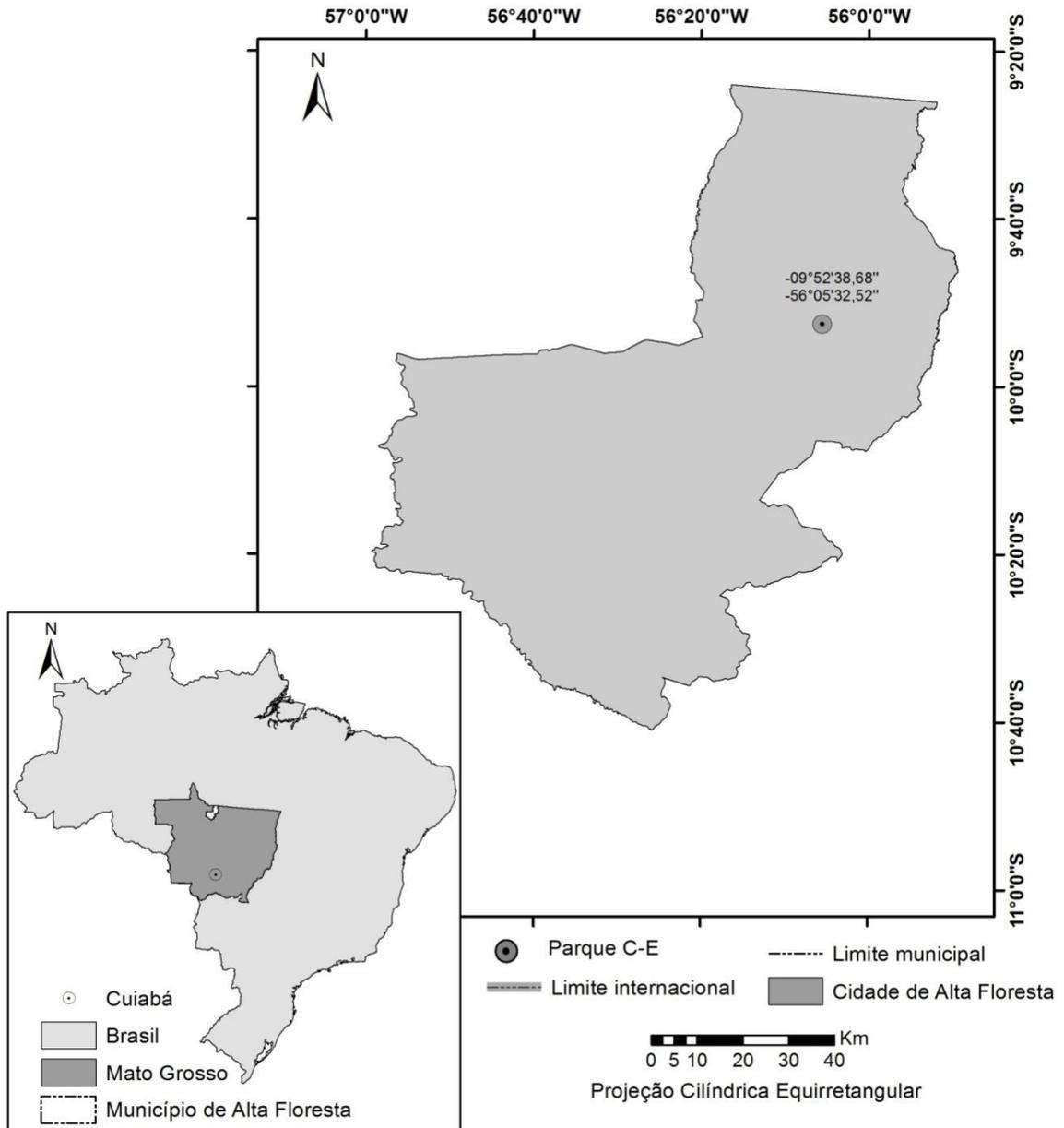


Figura 1: Localização do Município de Alta Floresta-MT com destaque no fragmento florestal urbano C/E.

Material Vegetal

No período de florescimento da espécie, em setembro de 2014, foram coletados botões florais e flores abertas para análise da receptividade do estigma e da viabilidade polínica. A coleta foi realizada em um período de 24h com intervalos de 4h, sendo que o primeiro horário de coleta iniciou-se às 22h com coleta de botões, e o último horário foi 24h após as 22h, período em que as flores estavam totalmente abertas.

Durante o período de coleta foi observado em campo o desenvolvimento das inflorescências e das flores de cacauí. Foram identificados e descritos quatro estágios de desenvolvimento floral, tendo como base a abertura da flor durante o período de 24h de coletas.

Viabilidade Polínica

Para a determinação da viabilidade polínica utilizou-se um mix de pólen para cada um dos horários estabelecidos. O material coletado foi fixado em solução carnoy (etanol: ácido acético, na proporção 3:1), mantidos em temperatura ambiente por 24 horas, e posteriormente foram transferidos para o freezer até o preparo das lâminas.

O teste de viabilidade polínica foi realizado utilizando a solução tripla reativo de Alexander, que consiste na diferenciação dos pólen viáveis dos inviáveis pela coloração; os viáveis apresentam cor púrpura no protoplasma e um contorno verde da parede celular, e os inviáveis, pela ausência do núcleo, coloração esverdeado (Alexander, 1969).

Para cada horário de coleta foram preparadas oito lâminas, confeccionadas através do método de esmagamento das anteras (Guerra e Souza, 2002), com auxílio de um bastão de vidro para à liberação dos grãos de pólen. Após a retirada dos resquícios das anteras, o material foi coberto com uma lamínula e observado através do método de varredura, sob microscópio fotômico binocular com lente objetiva de 40x (BEL Photonics e Primo Star Zeiss), sendo contabilizados 250 grãos de pólen por lâmina, totalizando 2.000 grãos de pólen por horário avaliado.

Na avaliação, os grãos de pólen foram classificados como normais/ viáveis (N/V) e anormais/ inviáveis (A/I) de acordo com a reação da coloração. Com os dados obtidos em cada horário, calculou-se a porcentagem de pólen viáveis.

Para obtenção das imagens de interesse foi utilizado um capturador de imagens, acoplado ao fotomicroscópio Leica DMLB, com o auxílio do programa Leica IM50.

Para comparar as médias da viabilidade polínica entre os horários, foi realizado o intervalo de confiança, e posteriormente os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2013).

Receptividade estigmática

A receptividade estigmática foi determinada em campo por três dias consecutivos, perfazendo sete horários de avaliação como relacionado acima, completando um ciclo de 24h de observação. Para cada horário foram analisados 10 estigmas de botões ou flores dependendo do horário de avaliação. Os estigmas foram retirados e imersos em peróxido de hidrogênio a 3%, sendo observado com lupa manual (10x), seguindo a técnica de Dafni (1992).

A receptividade do estigma foi estimada de acordo com a intensidade de formação de bolhas na superfície estigmática. Para obter resultados confiáveis, estigmas danificados ou com pólen na superfície não foram utilizados. Foram determinadas cinco notas de avaliação da receptividade sendo de acordo com a intensidade de formação de bolhas na superfície estigmática, nos seguintes percentuais de 0% não receptivo, 25% pouco receptivo, 50% parcialmente receptivo, 75% muito receptivo e 100% totalmente receptivo.

O efeito dos horários sob a receptividade do estigma foi observado com base no percentual médio em cada intervalo de observação e através da análise de regressão obtida com o auxílio do Programa SISVAR (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biologia Floral

O cacauí possui flores hermafroditas agrupadas em inflorescências densas e aglomeradas que se inserem no caule desde a base, possui coloração vermelho-púrpura que se destaca na paisagem florestal (Figura 2A e B). As inflorescências de *T. speciosum* são constituídas de botões, flores novas e velhas em disposições variadas (Figura 2 A e B), segundo Cuatrecasas (1964), cada inflorescência possui em média 250 flores. As flores são diclamídeas, actinomorfas com cálice e corola pentâmeros.

T. speciosum é uma espécie auto-incompatível (Souza e Venturieri, 1998), cuja estrutura floral descrita por Silva (2003), apresenta barreiras físicas entre o gineceu e o androceu favorecendo a alogamia e a especialização por polinizadores.



Figura 2. Estágios de desenvolvimento floral de *T. speciosum*. (A) Inflorescência com botões fechados e flor aberta, indicados pela seta; (B) Seta indicando botões em pré-antese; (C) Flor semi-aberta; (D) Flor aberta.

Os quatro estágios florais identificados e utilizados para avaliação da viabilidade polínica e receptividade estigmática neste estudo estão representados na Figura 2. O estágio I caracteriza-se por botões fechados em pré-antese, sendo este o primeiro estágio a ser coletado nas plantas às 22h (Figura 2A); estágio II, botões iniciando a abertura (quando começa a ruptura nas costuras naturais das sépalas), coletados às 2h (Figura 2B); estágio III, flores semi-abertas (flores com sépalas e pétalas semi-abertas) coletado as 6h (Figura 2C) e estágio IV, antese (quando as pétalas estão totalmente abertas) coletado as 10h, 14h, 18h e 22h, último horário de coleta (Figura 2D).

Os horários em que ocorreram os estágios florais neste estudo diferiram dos

encontrados por Souza e Venturieri (2010), pois segundo estes autores, o rompimento das sépalas de *T. speciosum* (pré-antese) inicia-se por volta das 14h, com rupturas em qualquer ponto ao longo das costuras naturais entre as sépalas e atingem a sua maior frequência às 22h, com a antese ocorrendo entre as 2h e 6h.

Viabilidade Polínica

A análise de variância demonstrou diferenças significativas ($p < 0,01$) para a viabilidade polínica entre os horários de coleta das flores de *T. speciosum* (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância da viabilidade polínica de *T. speciosum* para os sete horários avaliados (22:00h, 2:00h, 6:00h, 10:00h, 14:00h, 18:00h, 22:00)

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio (%)	F
Horários	6	29,39	0,0**
Resíduos	49	2,55	
C.V. (%)	1,64		

Apesar do nível de significância dos resultados obtidos, observa-se que não houve a prevalência de grãos de pólen inviáveis (Figura 3B) em nenhum dos horários avaliados, e sim uma alta porcentagem de pólen viáveis (Figura 3A) com média acima de 94% independente do horário, conforme Tabela 2, sendo este, um fator importante para a reprodução da espécie pois a produção de grãos de pólen inviáveis reduz a eficácia na polinização.

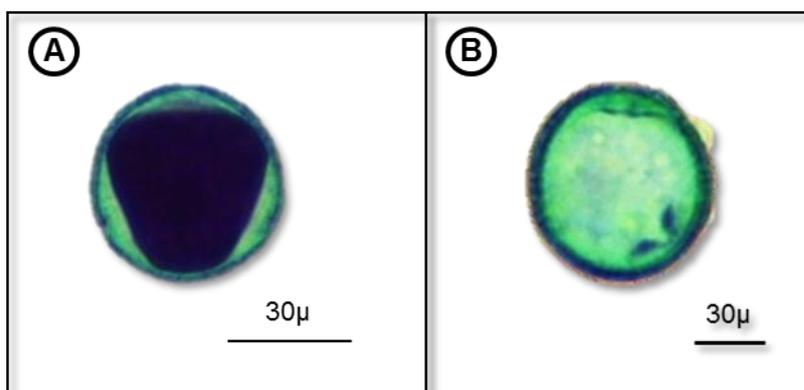


Figura 3. Pólen Viáveis (A) e inviáveis (B) de *T. speciosum*, resultantes da reação de coloração com Reativo de Alexander.

Resultados semelhantes foram obtidos por Cabral et al. (2013), ao realizarem um estudo com a espécie *T. cacao*, encontrando porcentagens acima de 95% para botões florais e acima de 80% em flores abertas, através de análises com o corante carmim acético, e acima de 95% e 86% com olugol.

Tabela 2. Média da viabilidade polínica de *T. speciosum* estimada pelo corante Reativo de Alexander para os sete horários de coleta do pólen

Horários	Médias (%)	C. V. (%)
22:00 h	99,20 a	0,68
02:00 h	95,30 cd	1,41
06:00 h	96,50 bc	1,19
10:00 h	98,45 ab	1,01
14:00 h	94,00 d	3,66
18:00 h	97,55 abc	0,71
22:00 h	98,65 ab	0,99

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. C.V., Coeficiente de Variação.

Os maiores índices de pólen viáveis obtidos através do teste colorimétrico com o corante reativo de Alexander, foram encontrados no primeiro horário de coleta do pólen (22h), no momento em que as flores mostraram-se totalmente abertas (10h), e no último horário de coleta às 22h do dia seguinte, com médias acima de 98%, respectivamente. Às 14h houve uma queda da viabilidade polínica, apresentando a menor média de 94% dentre os sete horários analisados (Tabela 2).

Para a espécie *T. speciosum*, as avaliações de viabilidade polínica revelaram que os grãos de pólen podem ser coletados em qualquer um dos horários avaliados pois o menor percentual médio encontrado foi de 94%, entretanto, recomenda-se, pelo critério de disponibilidade de pólen nas anteras, que as coletas de pólen a serem utilizados em polinizações e hibridações artificiais sejam realizadas nos primeiros horários da antese, pois segundo Venturieri (1994), as anteras apresentam um maior número de grãos de pólen próximos à antese floral. Conseqüentemente, as polinizações realizadas neste período proporcionam uma maior deposição de pólen nos braços estigmáticos.

Analisando o intervalo de confiança a 95% da viabilidade polínica de *T. speciosum* nos diferentes horários de coleta (Figura 4), observa-se que o maior intervalo de confiança foi encontrado às 14h, com um limite inferior de 90,83% e

limite superior de 96,77%, enquanto que às 22h (horário inicial de avaliação) apresentou o menor intervalo de confiança, com um limite inferior de 98,57% e superior de 99,73%.

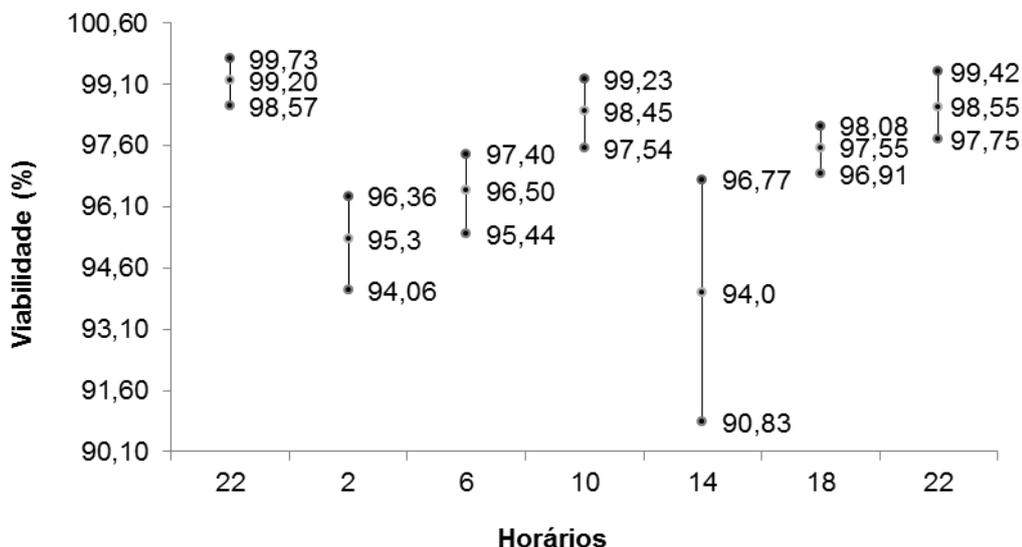


Figura 4. Intervalos de confiança a 95% dos resultados da coloração com o corante reativo de Alexander para os sete horários de coleta de pólen de *T. speciosum*.

De acordo com Loguercio e Batisttin (2004), com estudos de viabilidade polínica é possível obter uma visão prévia sobre a infertilidade das plantas, bem como o conhecimento do potencial de reprodução de uma população. Assim, é possível inferir que a população de cacauí do Parque C/E apresenta alto potencial de viabilidade nos gametas masculinos, podendo ser utilizados em polinizações artificiais.

A alta viabilidade polínica encontrada para *T. speciosum* é um fator muito importante para as populações manterem seus níveis de variabilidade genética, uma vez que a espécie é alógama, e quanto maior for a viabilidade polínica, maior será o índice de fertilização e a produção de combinações entre alelos distintos.

Receptividade estigmática

Os estigmas de *T. speciosum*, encontram-se receptivos em todos os horários de avaliação, com percentual médio acima de 75% (Tabela 3). Segundo Spira et al. (1992), a permanência da receptividade do estigma por um longo período proporciona maiores chances de êxito na polinização, uma vez que aumenta o tempo para deposição de pólen.

De acordo com Silva et al. (2010), a receptividade estigmática é resultado da maturação do gameta feminino e pode influenciar a taxa de fecundação e o sucesso da polinização. Assim, um maior período de receptividade do estigma facilita a introdução da espécie em um programa de melhoramento genético, visto que o pólen de *T. speciosum* da população do parque C/E pode ser depositado no estigma floral a qualquer hora do dia.

Tabela 3. Médias percentuais da receptividade estigmática de *T. speciosum* em 7 horários por 3 dias consecutivos

Horário	Receptividade			
	1º Avaliação	2º Avaliação	3º Avaliação	Média geral
22:00	78%	78%	98%	85%
02:00	85%	100%	100%	95%
06:00	75%	95%	95%	88%
10:00	93%	95%	95%	94%
14:00	83%	70%	88%	80%
18:00	70%	80%	85%	78%
22:00	83%	80%	80%	81%

No horário inicial às 22h, os estigmas dos botões florais já estavam receptivos com o percentual médio de 85%, variando de 78 a 98%. Foi observado que no início da antese às 2h da manhã e quando a flor estava totalmente aberta às 10h, ocorreram os maiores percentuais de estigmas receptivos, com média de 95% e 94%, respectivamente. Posteriormente, nos horários das 14h, 18h e 22h houve uma redução desses valores (80%, 78% e 81%) (Figura 4), sendo as menores taxas observadas nos dois últimos horários de avaliação (Tabela 3).

Corroborando com esses resultados Souza e Venturieri (2010), analisando a receptividade estigmática de *T. speciosum* em cinco horários (06:00, 10:00, 14:00, 18:00 e 22:00), relatam o maior índice de receptividade no período das 6h às 10h. Silva (2003) encontrou resultados semelhantes ao trabalhar com a mesma espécie, sendo os horários das 08h às 11h o momento de maior receptividade floral. O mesmo padrão foi encontrado para outras espécies do gênero, como *T. cacao*, *T. subincanum*, *T. grandiflorum* e *T. obovatum* (Sampayan, 1966; Rodrigues e Venturieri, 1997; Venturieri e Ribeiro-Filho, 1995; Souza e Venturieri, 1998). Os resultados obtidos evidenciam que o período da manhã é o mais indicado no caso

de polinizações controladas para *T. speciosum*, uma vez que uma alta taxa de receptividade aumenta o sucesso da fertilização.

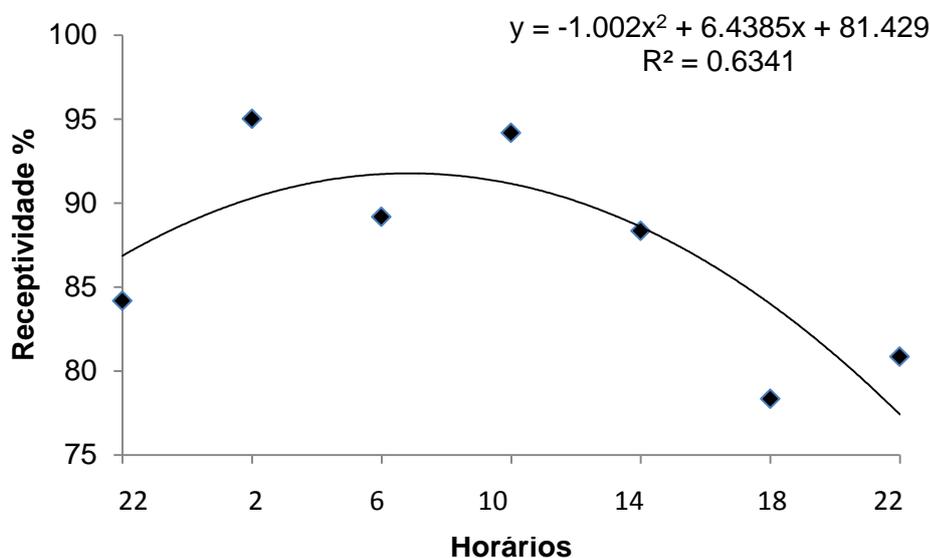


Figura 4. Estimativa de estigmas receptivos de *T. speciosum* ao longo de 24 horas de avaliação em setembro de 2014.

Observamos que a espécie *T. speciosum* apresentou grãos de pólen viáveis e estigmas receptivos antes da abertura das flores. Estes dados são importantes, pois permitem ao melhorista fazer cruzamentos controlados no período em que as flores ainda não foram polinizadas.

CONCLUSÕES

A viabilidade polínica permaneceu alta independente do horário de coleta analisado, com média superior a 94%. Os estigmas permaneceram receptivos durante todo o período de observação; entretanto, às 18h foi encontrada a menor receptividade, com média de 78%, os maiores percentuais de receptividade foram observados nos horários das 2h e 10h da manhã.

Recomenda-se que as polinizações controladas sejam realizadas entre as 2h e 10h da manhã, período de maior receptividade estigmática e maior disponibilidade de pólen nas flores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAMINE, E. K. E.; GIROLAMI, D. G. Problems in fruit set in yellow passion fruit Hawaii. **Farm Science**, 2: 3-5, 1957.
- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and non aborted pollen. **StainTechn**, 44: 117-122, 1969.
- BUTTURI, W.; NUNES, E. J. S.; SILVA, E. P. Banco de dados geográfico aplicado ao cadastro ambiental rural do município de Alta Floresta – MT. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, 11: 1-8, 2013.
- CABRAL, J. C.; ROSSI, A. A. B.; KLEIN, M. E.; VIEIRA, F. S.; GIUSTINA, L. D. Estimativa da Viabilidade Polínica em acessos de *Theobroma cacao* L. baseada em testes colorimétricos. **Enciclopédia Biosfera**, 9: 27-80, 2013.
- CRUZ, C.: D. GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, 35: 271-276, 2013.
- CUATRECASAS, J. A. Taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions U. S. National Herbarium**, 35: 379-607, 1964.
- DAFNI, A. **Pollination ecology - a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1992.
- ESTEVES, G. *Theobroma* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23617>>. Acesso em: 20 Dez. 2014.
- FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 2001. p. 652p.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, 6: 36-41, 2008.
- GALEN, C.; ZIMMER, K. A.; NEWPORT, M. E. A. Pollination in floral scent morphs of *Polemonium columbianum*: a mechanism for disruptive selection on flower size. **Evolution**, 41: 599-606, 1987.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 191p.
- IBGE - INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Recursos Naturais e Meio Ambiente: uma visão do Brasil**. Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. 2ª ed. Rio de Janeiro – RJ: IBGE, 1997.
- LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A. Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Myrtaceae e oriundos do Rio Grande do Sul – Brasil. **Ver. Fac. Zootec. Vet. Agro**, 11: 192-205, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 3. ed. vol. 2. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. v. 2.

MARTINS, M. B.; SILVA, A. R. Insetos polinizadores e conservação da biodiversidade. Um estudo de caso com *Theobroma speciosum* (Sterculiaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA, Belém, PA. 2003 **Anais...** Belém: MPEG/ UFRA/ EMBRAPA, 2003. p.111-114.

RODRIGUES, A. A.; VENTURIERI, G. A. *Floral biology of "cupuí" (Theobroma subincanum) Sterculiaceae*. In: I Encontro de Botânica Econômica de Espécies Nativas da América Latina, Campinas, SP. 1997 **Anais...** Campinas: CATI, 1997. P. 21-22.

SAMPAYAN, T. S. Flower biology, fruiting habit and compatibility relationship in cacao. **Philippine Journal of Plant Industry**, 31: 193-201, 1966.

SILVA, A. A. R. **Polinização de Cacauí (*Theobroma speciosum* Wild. ex Spreng. Sterculiaceae): Implicações para a conservação**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2003. 77p. (Dissertação - Mestrado em Zoologia).

SILVA, C. R.; VENTURIERI, G. A.; FIGUEIRA, A. Description of Amazonian *Theobroma* L. collections, species identification and characterization of interspecific hybrids. **Acta Botanica Brasilica**, 2: 333-341, 2004.

SILVA, C. R. S.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; ERVEDOSA, F. R.; MOTA, J. W. S.; FIGUEIRA, A.; SEBBENN, A. M. Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon. **Heredity**, 106, 973-985, 2011.

SILVA, L. A. C.; PAGLIARINI, M. S.; SANTOS, S. A.; VALLE, C. B. (2010). Receptividade dos Estigmas de Acessos da grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* Lucas), Pantanal. 5º Simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do pantanal. Corumbá, MS. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/869600/1/038R.pdf>.

SOUZA, M. S.; VENTURIERI, A. G. Floral Biology of Cacaui (*Theobroma speciosum* - Malvaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53: 861-872, 2010.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência Agropecuária**, 26: 1209-1217, 2002.

SOUZA, S. P.; VENTURIERI, G. A. (1998), Floral phenology of cacau-cabeça-de-urubu (*Theobroma obovatum*). In- Venturieri, G. A. Biologia aplicada à domesticação de fruteiras amazônicas do gênero *Theobroma* - Primeiro relatório: CNPq/Programa de Trópico Úmido - PUT/Proc. n. 63.00.13/95. p.105 Belém, PA, Brasil.

SOUZA, V. A.; PINTO JÚNIOR, J. E. Receptividade estigmática em *Eucalyptus dunnii*. **Embrapa/CNP florestas**, 47: 44-49, 1994.

SPIRA, T. P.; SNOW, A. A.; WHIGHAM, D. F.; LEAK, A. J. Flower visitation, pollen deposition, and pollen-tube competition in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae). **American Journal of Botany**, 79: 428-433, 1992.

STIEHL-ALVES, E. M.; MARTINS, P. M. Biologia reprodutiva de *Acacia mearnsii* de Wild.: Receptividade de estigmas. **Revista Árvore**, 32: 609-616, 2008.

TAKEHANA, C. L. I.; OHASHI, T. S.; JARDIM, M. A. G.; SANTOS, J. M. Biologia floral e visitantes florais de *Anacardium giganteum* W. Hancock ex. Engl. (Anacardiaceae) no município de Bragança, Pará. **Ciências Agrárias**, 56: 202-211, 2013.

VENTURIERI, G. A. 1994. Floral biology of Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willd enow ex Sprengel) Schumann). PHD thesis, University of Reading, UK, 211p.

VENTURIERI, G. A.; RIBEIRO-FILHO, A. A. A polinização manual no cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd enow ex Sprengel) Schumann). **Acta Amazônica**, 25: 181-192, 1995.

VENTURIERI, G. A. (1993), Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos, e processamento, Clube do Cupu, Belém.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram um padrão de distribuição agregado para a espécie *T. speciosum* nos três fragmentos florestais analisados. A qualidade dos marcadores utilizados no estudo da diversidade genética foi confirmada pelo conteúdo de informação polimórfica, apresentando uma média de 0,76 por loco. Os genótipos de cada população ficaram agrupados dentro de sua população de origem, revelando uma estrutura geográfica. A diversidade genética é maior em nível intrapopulacional do que interpopulacional.

O estudo da morfologia floral revelou que a espécie possui flores hermafroditas, pentâmeras e diclamídeas, com presença de estruturas modificadas, tais como a cógula, lígula e estaminóides que funcionam como uma barreira reprodutiva favorecendo a alogamia da espécie e a polinização por pequenos insetos. Quanto à viabilidade polínica, tanto na comparação entre os três estes colorimétricos como na comparação entre diferentes horários de coleta, foi encontrada alta taxa de pólenes viáveis com médias acima de 94%. Os estigmas permaneceram receptivos durante todo o período de observação, entretanto, nos horários das 2h e 10h da manhã foram encontradas as médias mais altas.

As informações obtidas com o presente estudo, podem ser utilizadas no estabelecimento de estratégias de conservação e de melhoramento genético da espécie.