

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS
KELLI ÉVELIN MÜLLER ZORTÉA**

**Comportamento meiótico, viabilidade polínica e estrutura genética
em populações naturais de cajazeira (*Spondias mombin* L.,
Anacardiaceae) no Brasil**

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO, BRASIL
JANEIRO – 2018

KELLI ÉVELIN MÜLLER ZORTÉA

**Comportamento meiótico, viabilidade polínica e estrutura genética
em populações naturais de cajazeira (*Spondias mombin* L.,
Anacardiaceae) no Brasil**

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

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

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO, BRASIL
JANEIRO – 2018

Walter Clayton de Oliveira CRB 1/2049

Z83c ZORTÉA, Kelli Évelin Müller.
Comportamento Meiótico, Viabilidade Polínica e Estrutura Genética em Populações Naturais de Cajazeira (*Spondias mombin* L., Anacardiaceae) no Brasil / Kelli Évelin Müller Zortéa – Alta Floresta/ Cáceres/ Tangará da Serra, 2018.
92 f.; 30 cm.(ilustrações) Il. color. (sim)

Trabalho de Conclusão de Curso
(Dissertação/Mestrado) – Curso de Pós-graduação *Stricto Sensu* (Mestrado Acadêmico) Genética e Melhoramento de Plantas, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Multicampi, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2018.

Orientador: Ana Aparecida Bandini Rossi

1. Cajá. 2. Recursos Genéticos. 3. Biologia Reprodutiva. 4. Diversidade Genética. 5. Conservação. I. Kelli Évelin Müller Zortéa. II. Comportamento Meiótico, Viabilidade Polínica e Estrutura Genética em Populações Naturais de Cajazeira (*Spondias mombin* L., Anacardiaceae) no Brasil: .

CDU 634.442(817.2)

**COMPORTAMENTO MEIÓTICO, VIABILIDADE POLÍNICA E ESTRUTURA
GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE CAJAZEIRA (*Spondias mombin* L.,
ANACARDIACEAE) NO BRASIL**

KELLI ÉVELIN MÜLLER ZORTÉA

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

Aprovado em 29 de janeiro de 2018.

Comissão Examinadora:



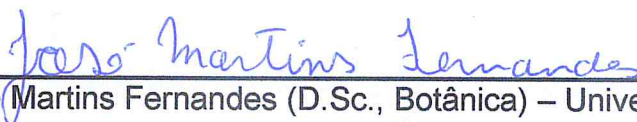
Prof^a. Ana Aparecida Bandini Rossi (D.Sc., Genética e Melhoramento) –
Universidade do Estado de Mato Grosso (Orientadora).



Pesquisadora Eulália Soler Sobreira Hoogerheide (D.Sc., Agronomia - Genética e
Melhoramento de Plantas) – EMBRAPA Agrossilvipastoril, Sinop, MT.



Prof^a. Isane Vera Karsburg (D.Sc., Genética e Melhoramento) – Universidade do
Estado de Mato Grosso



Prof. José Martins Fernandes (D.Sc., Botânica) – Universidade do Estado de Mato
Grosso

*“Equipado com seus cinco sentidos, o homem explora o universo ao seu redor e dá
à aventura o nome de ciência.”*

Edwin P. Hubble

*Aos meus pais, Nestor e Érika
e ao meu esposo Marcos pelo
amor e apoio incondicional.*

DEDICO...

AGRADECIMENTO

À Deus, pela vida, cuidado, proteção, direcionamento e força.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo suporte financeiro do projeto.

À Embrapa Agrossilvipastoril pela oportunidade de executar parte do trabalho de dissertação em suas instalações, agradeço em nome da Dr^a Eulália Soler Sobreira Hoogerheide.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Ana Aparecida Bandini Rossi, a qual tenho enorme admiração pela competência profissional e exemplo de humildade. Agradeço pelos ensinamentos, pela oportunidade e paciência durante todos esses anos. Mais do que uma amiga, uma verdadeira mãe para seus filhos científicos.

Aos meus pais, Nestor e Érika, meus exemplos e meu alicerce. Agradeço pelo apoio incondicional durante toda a minha vida pessoal e acadêmica.

Ao meu esposo, Marcos, pela paciência, compreensão, carinho, por sempre me apoiar e amar sem questionar os meses que precisei me ausentar para cumprir as disciplinas do curso em outras cidades e também por toda a ajuda.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular, não apenas pela colaboração e contribuição no meu trabalho como também pela amizade e bons momentos de risadas e conversas jogadas fora. Meire, Vinícius, Elisa, Jack, Eliane e Auana, obrigada pela ajuda e contribuições.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

Kelli Évelin Müller Zortéa, filha de Nestor Pedro Müller e Érika Müller, casada com Marcos André Zortéa desde 2009, nasceu em Toledo, Paraná, em 12 de outubro de 1989. No ano seguinte, mudou-se com a família para Lucas do Rio Verde, Mato Grosso, onde iniciou sua vida escolar. Em 1999, mudou-se para Alta Floresta, Mato Grosso, onde concluiu o ensino médio na Escola Estadual Ouro Verde, localizada na zona rural do município. Em 2007, iniciou o curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta, o qual concluiu em 2010 sob orientação da Prof^a. Dr^a. Ana Aparecida Bandini Rossi. Durante o período de 2011 a 2015 trabalhou como técnica de meio ambiente na Construtora Norberto Odebrecht SA. Durante esse período também cursou duas especializações na área ambiental. Em 2016, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas na UNEMAT, *Campus* de Alta Floresta, o qual concluiu em janeiro de 2018, também sob orientação da Prof^a. Dr^a. Ana Aparecida Bandini Rossi.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Classificação botânica e distribuição geográfica de <i>S. mombin</i>	3
2.2 Caracterização, fenologia e biologia reprodutiva de <i>S. mombin</i>	4
2.3 Utilização e importância econômica de <i>S. mombin</i>	6
2.4 Estudos Palinológicos.....	7
2.5 Comportamento meiótico.....	8
2.6 Viabilidade Polínica	10
2.7 Diversidade e estrutura genética de populações	11
2.8 Marcadores SSR	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
4. CAPÍTULOS	23
4.1 CAPÍTULO 1.....	23
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	28
Área de estudo	28
Diagnose morfológica de <i>S. mombin</i>	28
Coleta dos botões florais	29
Caracterização morfológica do pólen	29
Viabilidade polínica via teste colorimétrico	31
Germinação do pólen <i>in vitro</i>	32
Comportamento meiótico e índice meiótico	33
Razão pólen/óvulo (P/O).....	34
RESULTADOS	36
Diagnose morfológica	36
Caracterização morfológica do pólen	38
Viabilidade polínica via teste colorimétrico	38
Germinação do pólen <i>in vitro</i>	40
Comportamento meiótico e índice meiótico	42

DISCUSSÃO	46
Diagnose morfológica	46
Caracterização morfológica do pólen	46
Viabilidade polínica via teste colorimétrico	47
Germinação do pólen <i>in vitro</i>	48
Comportamento meiótico e índice meiótico	49
Razão pólen/óvulo (P/O).....	50
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
4.2 CAPÍTULO 2	59
RESUMO.....	59
ABSTRACT	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	64
Área de estudo	64
Coleta do material vegetal	65
Extração do DNA	65
Amplificação via PCR	67
Análise dos dados	69
RESULTADOS	72
Diversidade genética de <i>S. mombin</i>	72
Estrutura genética de populações naturais de <i>S. mombin</i>	75
DISCUSSÃO	80
Diversidade genética de <i>S. mombin</i>	80
Estrutura genética de populações naturais de <i>S. mombin</i>	83
Implicações para conservação	84
CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	93

RESUMO

ZORTÉA, KELLI ÉVELIN MÜLLER; Universidade do Estado de Mato Grosso; Janeiro de 2018. Comportamento meiótico, viabilidade polínica e estrutura genética em populações naturais de cajazeira (*Spondias mombin* L., Anacardiaceae) no Brasil. Orientadora: Ana Aparecida Bandini Rossi.

A cajazeira (*Spondias mombin* L.) é uma espécie arbórea frutífera com potencial de mercado devido a qualidade sensorial de seus frutos, porém o conhecimento sobre os aspectos reprodutivos e diversidade genética desta espécie são escassos. Diante disso, este trabalho objetivou descrever as características morfológicas da planta e do pólen, verificar o comportamento meiótico e a viabilidade polínica, bem como avaliar a diversidade genética de *S. mombin* no estado de Mato Grosso, Brasil. Os aspectos reprodutivos foram verificados por meio da viabilidade polínica via teste colorimétrico e germinação *in vitro*, comportamento meiótico e relação pólen/óvulo, em 16 indivíduos coletados no município de Alta Floresta, MT. A diversidade e estrutura genética foi avaliada em 139 indivíduos distribuídos em dez populações naturais no estado de Mato Grosso, por meio de sete marcadores moleculares microssatélites. *S. mombin* é andromonóica, com pólen prolato, tricolpados, muito grandes, área polar pequena e sexina reticulada a estriada. A viabilidade polínica da espécie é considerada alta (96,47%). A germinação do pólen foi influenciada positivamente pela presença da sacarose e do ácido bórico no meio de cultura. A meiose de *S. mombin* é regular, com 13,26% de células com divisão anormal e índice meiótico alto (96,53%). A razão pólen/óvulo indicou que a espécie possui xenogamia obrigatória. Na caracterização molecular, foram amplificados 46 alelos, com média de 6,6 alelos por locos. Seis populações apresentam H_o maior que H_e . O índice de fixação foi positivo, indicando a presença de endogamia. O PIC variou de 0,048 a 0,700 e apenas dois locos foram pouco informativos. Foram encontrados 27 alelos raros e 16 exclusivos nas populações, sendo que Alta Floresta e Cáceres continham a maior quantidade destes. O maior componente de variação foi intrapopulacional (90,64%) e a estimativa de fluxo gênico foi de 1,99, indicando que as populações não estão geneticamente isoladas. Os agrupamentos geraram dois grupos, com Alta Floresta e Marcelândia separadas das demais populações e observou-se que a estrutura genética não está relacionada com a distância geográfica entre as populações. As informações sobre os aspectos reprodutivos de *S. mombin* auxiliarão no planejamento e implantação de cultivos comerciais e em programas de melhoramento e conservação da espécie. As populações analisadas apresentam diversidade genética e devem ser conservadas *in situ* ou *ex situ*, por constituírem fontes promissoras para coleta de germoplasma.

PALAVRAS-CHAVE: Cajá, Recursos Genéticos, Biologia Reprodutiva, Conservação, Diversidade genética.

ABSTRACT

ZORTÉA, KELLI ÉVELIN MÜLLER; Universidade do Estado de Mato Grosso; January, 2018. Meiotic behaviour, pollen viability and genetic structure in native populations of yellow mombin (*Spondias mombin* L., Anacardiaceae) in Brazil. Adviser: Ana Aparecida Bandini Rossi.

The cajá tree (*Spondias mombin* L.) is a fruit tree species with market potential due to the sensorial quality of its fruits, however the knowledge about the reproductive aspects and genetic diversity of this species are scarce. The objective of this study was to describe the morphological characteristics of the plant and pollen, verify meiotic behavior and pollen viability, as well as evaluate the genetic diversity of *S. mombin* in the state of Mato Grosso, Brazil. The reproductive aspects were verified through pollen viability via colorimetric test and *in vitro* germination, meiotic behavior and pollen/ovule relation, in 16 individuals collected in the city of Alta Floresta, MT. The diversity and genetic structure was evaluated in 139 individuals distributed in ten natural populations in the state of Mato Grosso, through 7 microsatellite molecular markers. *S. mombin* is andromonotic, with prolate, tricolpates, very large pollen, small polar area and sexine reticulated to striate. The pollen viability of the species is considered high (96.47%). Pollen germination was positively influenced by the presence of sucrose and boric acid in the culture medium. *S. mombin* meiosis is regular, with 13.26% cells with abnormal division and high meiotic index (96.53%). The pollen/ovule ratio indicated that the species has mandatory xenogamy. In the molecular characterization, 46 alleles were amplified, with an average of 6.6 alleles per loci. Six populations show H_o larger than H_e . The fixation index was positive, indicating the presence of inbreeding. The PIC ranged from 0.048 to 0.700 and only two loci were poorly informative. Twenty seven rare and 16 unique alleles were found in the populations, with Alta Floresta and Cáceres containing the largest number of them. The largest component of variation was intrapopulation (90.64%) and the gene flow estimate was 1.99, indicating that the populations are not genetically isolated. The clusters generated two groups, with Alta Floresta and Marcelândia separated from the other populations and it was observed that the genetic structure is not related to the geographic distance between the populations. Information on the reproductive aspects of *S. mombin* will assist in the planning and implementation of commercial crops and breeding and conservation programs of the species. The analyzed populations present genetic diversity and must be conserved *in situ* or *ex situ*, as they are promising sources for the germplasm collection.

KEY WORDS: Yellow mombin, Genetic Resources, Reproductive Biology, Conservation, Genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cajazeira (*Spondias mombin* L.) pertencente à família Anacardiaceae, é uma espécie arbórea de grande porte podendo chegar a 30 metros de altura (Lorenzi, 1992). É uma espécie com ampla distribuição pelo mundo, sendo nativa na América tropical, introduzida e cultivada na África e na Ásia (Mitchell e Daly, 2015). A Região Amazônica e a Mata Atlântica são apontadas como centros de diversidade genética da espécie, todavia ela está presente em quase todo o território nacional, seja de forma espontânea ou em cultivos domésticos (Justiniano et al., 2001).

Os frutos da cajazeira apresentam propriedades sensoriais e nutricionais cada vez mais apreciadas, são ricos em vitaminas A, B e C, cálcio, fósforo, potássio, carotenóides, e taninos, e podem ser consumidos *in natura* ou em forma de polpa, néctar, sorvete, doce ou licor (Lima et al., 2011). O aumento da demanda dos frutos da cajazeira tem despertado interesse para o cultivo da espécie em grande escala, uma vez que a produção atual está baseada em exploração extrativista e cultivos domésticos (Soares et al., 2006). Estudos com cajazeira tem se concentrado em técnicas de propagação, e propriedades físico-químicas dos frutos (Silva, 2008), porém, pouca atenção vem sendo dada a estudos relacionados aos aspectos reprodutivos e a diversidade genética da espécie.

Informações acerca dos aspectos reprodutivos e da fertilidade das plantas são essenciais em programas de melhoramento para garantir o sucesso de cruzamentos (Moreira et al., 2017). Este conhecimento também auxilia na produção de frutos em plantios comerciais, uma vez que a fertilidade é fator determinante para a produtividade. De acordo com Moreira et al. (2017), fertilidade de uma espécie, geralmente é medida pela viabilidade do pólen, sendo o resultado da formação normal e equilibrada de gametas durante a meiose.

O conhecimento da diversidade genética da espécie é primordial para sua conservação e sustentabilidade, bem como para a identificação e conservação de genótipos superiores para o cultivo comercial e/ou uso em programas de melhoramento. A diversidade genética é avaliada através das características agronômicas, morfológicas, moleculares, entre outras, e as informações obtidas com as avaliações, são expressas em medidas de dissimilaridade que representam a diversidade no conjunto de populações e genótipos estudados (Cruz et al., 2011).

Vários marcadores moleculares estão disponíveis para a caracterização molecular da diversidade, sendo os microssatélites (SSR), os mais utilizados atualmente. Esses marcadores apresentam muitas características positivas: herança co-dominante, transferibilidade, alto grau de polimorfismo mesmo em linhagens próximas, cobertura genômica extensa e bem distribuída e reprodução via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (Millach, 1999; Tóth, 2000; Grattapaglia, 2007; Kalia et al., 2011).

Sendo assim, este trabalho objetiva descrever as características morfológicas da planta e do pólen, verificar o comportamento meiótico e a viabilidade polínica, bem como acessar a diversidade genética de *S. mombin* no estado de Mato Grosso, com base em informações geradas por marcadores moleculares microssatélites. Este estudo pretende gerar informações que contribuam com a conservação e uso da espécie.

Este trabalho está dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo descreve a morfologia da planta e do pólen e aspectos reprodutivos da espécie. O segundo capítulo, aborda a diversidade e a estrutura genética em populações naturais de *S. mombin* localizadas no estado de Mato Grosso, Brasil, tendo como ferramenta os marcadores moleculares microssatélites.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação botânica e distribuição geográfica de *S. mombin*

A família Anacardiaceae inclui oitenta e um gêneros e oitocentas espécies essencialmente tropicais e no Brasil a família é representada por quatorze gêneros e cinquenta e quatro espécies, das quais treze são restritas ao país (Luz et al., 2013). Pertencem à esta família, diversas frutíferas tropicais de importância econômica, como o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e a mangueira (*Mangifera indica* L.), que fazem parte da produção nacional (Santana, 2010). As características da família que a distingue de outras são a presença de disco intraestaminal dotados de canais resiníferos, cuja seiva adquire coloração preta em contato com o ar, ovário comumente unilocular e fruto tipo drupa (Kiill et al., 2013).

Dentro desta família encontra-se o gênero *Spondias* que compreende 18 espécies distribuídas pela Ásia, Oceania e América Latina, tanto de forma nativa quanto cultivada (Airy Shaw e Forman, 1967). Esse gênero foi estabelecido por Linnaeus em 1753, incluindo apenas a espécie *Spondias mombin* L. e mais tarde se expandiu com a publicação de outras espécies frutíferas como: *Spondias purpurea* L. (ciriguela), *Spondias cytherea* Sonn. (cajá-manga) e *Spondias pinnata* (L.f.) Kurz., entre outras (Mitchell e Daly, 2015). No Brasil o gênero *Spondias* está representado por onze espécies, dentre elas *S. mombin* L. (Flora do Brasil, 2017).

A espécie *Spondias mombin* é uma arbórea perene, amplamente distribuída em toda a América tropical e nativa desde o México até o Brasil (Mitchell e Daly, 2015). Foi introduzida nas regiões tropicais da África e Ásia onde é comumente cultivada (Mitchell e Daly, 2015) (Figura 1A). Os centros de diversidade da espécie são a Mata Atlântica e a Amazônia Ocidental no estado do Acre, no Brasil, e as áreas adjacentes do Peru e da Bolívia (Janick e Paull, 2008). Apesar disso, não há comprovação de que os exemplares da Mata Atlântica brasileira são nativos ou introduzidos (Silva Júnior et al., 2004; Mitchell e Daly, 2015). No Brasil encontra-se distribuída nas regiões: norte, nordeste, centro-oeste e sudeste, abrangendo os biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Flora do Brasil, 2017) (Figura 1B).

No Brasil, as árvores da cajazeira são encontradas isoladas ou em grupos, na natureza ou em quintais domésticos. É uma planta adaptada às áreas úmidas tropicais e áridas, e até mesmo em áreas subtropicais quentes, sem geada, não cresce

satisfatoriamente acima de 1.000m e tolera solos com um estado moderadamente baixo de nutrientes (Janick e Paull, 2008).

Em função da sua distribuição mundial, *S. mombin* chega a ter 96 nomes comuns, dependendo do país onde se encontra (Mitchell e Daly, 2015). No Brasil é popularmente conhecida por: “taperebá” na Amazônia, como “cajazeira-miúda” e “cajá-pequeno” em São Paulo e Minas Gerais, por “cajazeira” e “cajá-mirim” nos estados do Sul, e como “cajá” na maioria dos estados do Nordeste (Pinto et al., 2003).

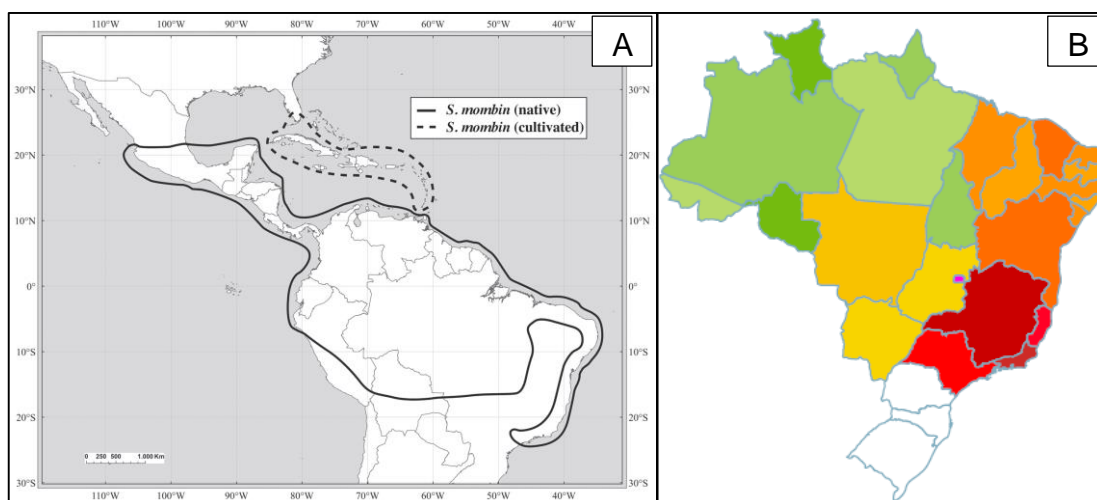


Figura 01. Distribuição geográfica de *Spondias mombin* L. A) Distribuição da espécie em áreas nativas e cultivadas (Fonte: Mitchell e Daly, 2015). B) Estados onde a espécie ocorre no Brasil, indicado pelas áreas coloridas do mapa (Fonte: Flora do Brasil, 2017).

2.2 Caracterização, fenologia e biologia reprodutiva de *S. mombin*

A cajazeira é uma espécie arbórea lenhosa e de grande porte (Figura 2A), podendo atingir até 30 metros de altura; o tronco, revestido por uma casca grossa e rugosa (Figura 2B), é ereto e esgalha e ramifica na parte terminal (Lorenzi, 1992; Souza e Bleicher, 2002). As folhas são compostas, imparipinadas e com 5-9 pares de folíolos opostos (Ramos, 2009).

Possui inflorescência do tipo panícula terminal (Figura 2C), as flores são do tipo pediceladas (Figura 2D), androceu composto por 10 estames de mesmo tamanho, todos com filetes brancos e anteras amarelas (Ramos, 2009). As flores masculinas apresentam pistilódio e as flores hermafroditas possuem gineceu com ovário súpero (Ramos, 2009). O ovário possui 4 (quatro) (Ramos, 2009) ou 5 (cinco) lóculos (Lozano, 1986; Silva, 2003), com um único óvulo em cada um dos lóculos (Lozano, 1986; Silva,

2003; Ramos, 2009). Carneiro e Martins (2012) definiram o sistema sexual como andromonóico, com flores hermafroditas e masculinas em um mesmo indivíduo.

Os frutos são do tipo drupa (Figura 2E), perfumados, com mesocarpo carnosos, amarelo, de sabor agridoce, contendo carotenoides, açúcares e vitaminas A, B e C (Barroso et al., 1999; Ramos, 2009). O endocarpo, comumente chamado de “caroço” é constituído de uma massa de células dura e lignificada, no interior do qual se encontram os lóculos que podem conter uma ou mais sementes ou nenhuma (Souza, 1998; Azevedo et al., 2004).

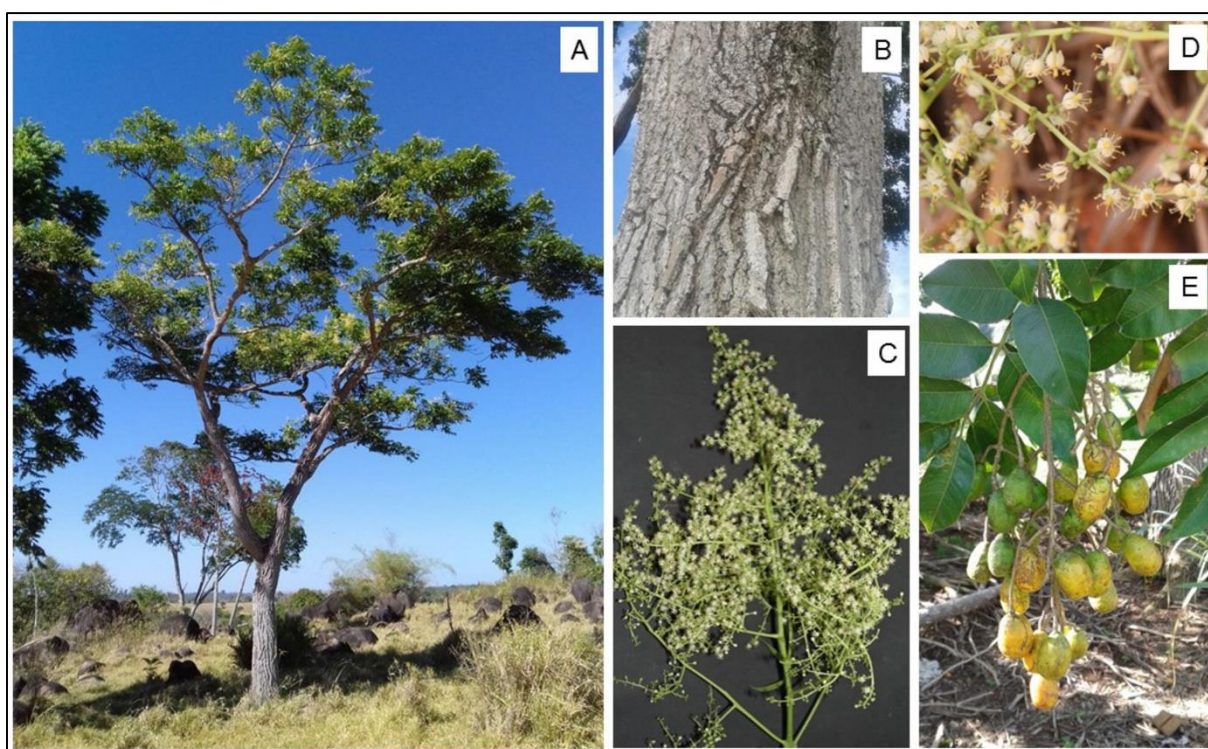


Figura 2. Características morfológicas gerais de *S. mombin*. A) porte arbóreo. B) detalhe do tronco e da casca. C) inflorescência. D) flores. E) frutos. Fonte: a autora.

A fenologia de *S. mombin* é conhecida e descrita por região, devido sua ampla distribuição (Mitchell e Daly, 2015). No Brasil, estudos fenológicos verificaram que a cajazeira apresenta padrão anual de floração e frutificação, com produção de flores na estação seca e de frutos maduros na estação chuvosa (Freitas et al., 2003; Ramos, 2009; Freitas et al., 2010). A espécie apresenta padrão decíduo de mudança foliar, ocorrendo no período seco e antes da floração (Freitas et al., 2003).

Experimentos de polinização controlados realizados em clones por Carneiro e Martins (2012) indicaram que a espécie é alógama e auto-incompatível, mas Oliveira et al., (2012) verificaram que a espécie é preferencialmente alógama e apresenta uma

baixa taxa de autofecundação. A polinização da espécie ocorre por anemofilia e metiofilia (Stacy et al., 1996; Oliveira, 2010). As abelhas são consideradas polinizadores efetivos pela frequência de visitas e por entrarem em contato com os órgãos reprodutivos da planta durante as visitas (Freitas et al., 2003; Ramos, 2009; Oliveira, 2010).

Os possíveis dispersores das sementes de *S. mombin* são: cutias, antas, morcegos e macacos. De acordo com Smythe (1970), as cutias (*Dasyprocta* sp.) consomem a polpa do fruto e depois carregam e enterram o endocarpo. Heithaus et al. (1975) verificaram morcegos carregando sementes de *S. mombin* e Henry et al. (2000) constataram a presença de endocarpos de *S. mombin* intactos no estomago de antas, e as indicou como possíveis dispersores da espécie.

2.3 Utilização e importância econômica de *S. mombin*

O fruto de *S. mombin* vem apresentado crescente valor de mercado, principalmente no norte e nordeste brasileiro, sendo que no Nordeste apresenta lugar de destaque na produção e comercialização da polpa pela excelente qualidade sensorial que apresenta (Pinto et al., 2003). Os frutos podem ser consumidos *in natura*, entretanto, são muito procurados para o processamento de polpas, sucos, geleias, néctares e sorvetes que apresentam excelente qualidade nutricional (Queiroz, 2000; Souza et al., 2006). O tipo de exploração, a falta de cultivos comerciais e a perda elevada de frutos na colheita e transporte causam variações anuais nas safras, que influenciam diretamente na industrialização e o funcionamento das indústrias de processamento do fruto (Santana, 2010). Atualmente, não existem dados confiáveis sobre produção e produtividade de cajá e faltam informações acerca da implantação de pomares comerciais.

Estudo sobre as propriedades nutricionais do fruto de *S. mombin* tem demonstrado que sua polpa tem elevados níveis de potássio, magnésio, fósforo e cobre quando comparado com outros frutos, bem como níveis mais elevados de compostos fenólicos e compostos antioxidantes e carotenoides do que a maioria dos frutos consumidos no Brasil (Mattietto, et al., 2010; Tiburski et al., 2011). Dessa forma, sua composição lhe confere elevado valor nutricional e funcional, que pode ser associado com a prevenção de várias doenças (Tiburski et al., 2011).

Nesse sentido, *S. mombin* tem despertado interesse para a medicina popular e indústria farmacêutica. Alguns estudos indicaram o potencial uso de suas cascas e folhas em casos de: febre, diarreia, disenteria, hemorroida, como antimicrobiano, antibacteriano, anti-helmíntico, promotor de restaurações histopatológicas do estômago e do fígado e no tratamento contra a malária (Corthout et al., 1991; Corthout et al., 1994; Abo et al., 1999; Ademola, et al., 2005; Janick e Paul, 2008; Akinlolu, et al., 2014). Na Nigéria, *S. mombin* é amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de câncer com alegações de eficácia (Oyeyemi e Bakare, 2013). Também estão disponíveis, produtos usados no combate a herpes simples tipo 1, baseados na atividade antiviral de taninos, extraídos das folhas e ramos de *S. mombin* (Janick e Paul, 2008).

A madeira de *S. mombin* é classificada como de qualidade inferior e propensa a ataque de pragas, tem cor amarelada com manchas marrom e flexibilidade elevada (Ayoka et al., 2008). É utilizada em pequenas atividades de marcenaria para interior de casas, na construção de pequenas embarcações, objetos de decoração e a casca é utilizada para tingimentos diversos (Ayoka et al., 2008; Janick e Paul, 2008).

2.4 Estudos Palinológicos

O grão de pólen é um corpúsculo onde está contido o gametófito masculino das angiospermas e gimnospermas, ele é formado nas anteras, apresenta parede externa quimicamente estável e morfologia variada (Salgado-Labouriau, 1973; Mascarenhas, 1990). Em virtude de suas características especiais, o pólen se torna adequado para várias pesquisas, como estudos taxonômicos, morfológicos e paleobotânicos (Salgado-Labouriau, 1973).

O estudo da morfologia do pólen faz parte da Palinologia, este termo foi introduzido para designar os estudos morfológicos do pólen e de esporos, sua dispersão e aplicação (Hyde e Williams, 1945). Erdtman reforçou este termo em 1952 e o designou como a ciência do pólen e do esporo e que trata das paredes do grão de pólen e esporos e não do seu interior vivo (Erdtman, 1986).

Os estudos do grão de pólen têm o foco principal voltado para a comparação das diferentes morfologias polínicas encontradas nas espécies (Martins et al., 2010). Dessa forma, as análises morfológicas auxiliam a sistemática, pois pela diferenciação

das características da estrutura dos grãos de pólen é possível a determinação da planta em níveis taxonômicos, como família e gênero (Takeda et al., 2001).

A estrutura da parede do grão de pólen, ou esporoderma, pode ser descrita de formas diferentes dependendo da literatura e metodologia utilizada, pois não há unanimidade entre os pesquisadores em relação às subdivisões da exina e da intina (Martins et al., 2010). De acordo com Barth (1964) existem duas nomenclaturas principais, a nomenclatura de Feagri que se baseia na afinidade pelos corantes, onde as camadas coradas pela fucsina básica constituem a ectexina (mais externa) e as que são pouco coradas ou não se coram pela fucsina básica, constituem a camada mais interna ou endexina. E a nomenclatura de Erdtman (1952) a morfologia da exina é dividida em uma parte esculturada e mais externa chamada sexina, e em outra, não esculturada, a nexina, ambas subdivididas (Barth, 1964).

Essa diferença na nomenclatura existe por causa dos tipos de microscópios, sendo que na óptica comum, com resolução de até 1000x, não é possível distinguir as estruturas propostas por Faegri, sendo mais adequada a nomenclatura proposta por Erdtman. Já na microscopia eletrônica, distingue-se a ectexina da endexina (Barth, 1964; Martins et al., 2010). Dessa forma, neste estudo será utilizada a nomenclatura proposta por Erdtman (1952).

Além da morfologia da exina, os pólenes podem ser classificados em relação a ornamentação da sexina, forma e tamanho do grão de pólen, tipo e localização das aberturas e índice de área polar (Martins et al., 2010). Para análise da morfologia polínica é necessária a extração do conteúdo celular para melhor visualização da sexina e aberturas do pólen, por esse motivo os grãos de pólen acetolizados apresentam ótima condição para visualização da morfologia (Salgado-Labouriau, 1973). A maioria das investigações morfológicas em Palinologia, utilizam pólen acetolizado (Hesse e Waha, 1989). O método de acetólise foi descrito por Erdtman (1943) e envolve a ebulição do grão de pólen em uma mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico, que destrói e elimina todas as substâncias com exceção da esporopolenina (Hesse e Waha, 1989).

2.5 Comportamento meiótico

A fertilidade das plantas depende da regularidade meiótica durante a formação de grãos de pólen e a identificação das diferentes fases da meiose facilita o

entendimento do processo. Através da meiose, uma célula $2n$, origina quatro células n . Esse processo inicia-se com a duplicação do DNA antes que a célula $2n$ entre em divisão, dessa forma, cada cromossomo passa a apresentar duas cromátides, denominadas cromátides irmãs (Pagliarini e Pozzobon, 2005). A meiose compreende dois ciclos sucessivos de divisão. A meiose I (primeira divisão), apresenta prófase, subdividida em leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese, seguida de metáfase I, anáfase I e telófase I. A meiose II (segunda divisão), não apresenta síntese de DNA e é dividida em prófase II, metáfase II, anáfase II e telófase II (Snustad e Simmons, 2013). Na meiose I ocorre a segregação dos cromossomos homólogos, formando duas células n contendo $2C$ de DNA cada, enquanto na meiose II, ocorre a segregação de cromátides irmãs, originando quatro células filhas n contendo $1C$ de DNA (Pagliarini e Pozzobon, 2005).

A meiose é um evento extremamente organizado, caracterizado por uma sequência de eventos de elevada complexidade mecânica e bioquímica controlado por vários genes e, portanto, pode sofrer com episódios mutacionais, que levam a formação inadequada dos produtos pós meióticos e consequente inviabilidade dos gametas (Pagliarini, 2000; Pagliarini e Pozzobon, 2005).

Dentre as anormalidades mais comuns durante a meiose de plantas estão as pontes cromossômicas, os cromossomos retardatários, cromossomos pegajosos, micronúcleos e as anormalidades nas fibras do fuso, que foram encontradas em diferentes espécies (Kumar et al., 2002; Guerra et al., 2012; Nascimento et al., 2014; Diegues et al., 2015; Pozzobon et al., 2015; Kumari e Saggoo, 2016; Pereira et al., 2017)

A avaliação dos produtos pós meióticos indica a regularidade meiótica da espécie, sendo que quanto maior o índice meiótico, mais regular é o comportamento meiótico da espécie. Nesse sentido, Love (1951) estabeleceu que plantas com índices meióticos abaixo de 90% apresentam instabilidade meiótica. O índice meiótico é obtido através da contagem dos produtos pós meióticos e sua classificação em normais (tétrades) e anormais (tríades, díades, monades e políades).

A meiose é considerada um mecanismo de produção de variabilidade genética importante para os organismos se adaptarem ao meio ambiente em que vivem e, dessa forma, garantir sua perpetuação através da descendência, pois é durante a meiose que ocorre a recombinação gênica (Auler et al., 2006). Sendo assim,

o conhecimento do comportamento meiótico de uma espécie, gera informações importantes para compreender os mecanismos reprodutivos e definir programas de manejo e melhoramento.

2.6 Viabilidade Polínica

A polinização inicia com a liberação dos grãos de pólen maduros que são expostos ao meio ambiente e que devem alcançar o estigma receptivo da planta correta em tempo hábil. Qualquer falha para o grão de pólen germinar e fertilizar o óvulo, acarreta na falta de fecundação. Independentemente do tamanho, forma e modo de dispersão, o mais importante neste momento é a viabilidade do pólen (Dafni, 1992).

Estudos sobre a viabilidade polínica são importantes para o entendimento da biologia reprodutiva das espécies e para auxiliar em programas de conservação e melhoramento. A viabilidade é o fator primário para oportunizar a germinação no estigma, sendo que, em um programa de melhoramento baseado na hibridação o sucesso dos cruzamentos é essencial (Techio et al., 2006; Cabral et al., 2013). A viabilidade do pólen também é fator determinante para garantir a perpetuação da espécie na natureza.

A viabilidade polínica é uma medida da fertilidade masculina, podendo ser determinada por meio de inúmeras técnicas (Dafni, 1992) como aplicações de métodos colorimétricos, utilizando corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes no grão de pólen maduro ou por meio da germinação do pólen *in vivo* e *in vitro*.

Os corantes mais utilizados para as avaliações colorimétricas são: o lugol, Sudan IV, carmin acético, carmin propiônico,orceína acética e a solução tripla de Alexander, sendo este último o que fornece dados mais acurados sobre a viabilidade do pólen, pois os pólenes viáveis e inviáveis apresentam coloração diferente (Pagliarini e Pozzobon, 2005; Hister e Tedesco, 2016). A solução tripla de Alexander é constituída por três corantes: o verde malaquita, a fucsina ácida e o laranja G. Por ter afinidade com a celulose presente na parede celular, o verde malaquita a cora de verde, enquanto a fucsina ácida cora o protoplasma de vermelho/púrpura, dessa forma, o grão de pólen inviável cora-se todo de verde, pois não possui protoplasma (Alexander, 1980).

A análise colorimétrica somente estima da viabilidade do pólen, com base na coloração, mas a fertilidade do pólen deve ser determinada por testes de germinação e crescimento do tubo polínico, uma vez que a presença de conteúdo celular, constatado pela coloração, não garante que o pólen seja metabolicamente ativo e capaz de formar o tubo polínico (Hister e Tedesco, 2016).

A germinação do pólen *in vitro* é um método muito utilizado para determinar a fertilidade do pólen (Souza et al., 2013). Esse método, tenta, através do meio de cultura, simular as condições naturais das plantas, proporcionando um ambiente adequado para o desenvolvimento do tubo polínico (França et al., 2009). Entretanto o desenvolvimento deste método sofre a influência de alguns fatores como: os constituintes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação (Reis et al., 2011). Os meios de cultura geralmente contêm açúcar e ácido bórico, mas dependendo da espécie, podem ser alteradas as concentrações destes componentes e serem adicionados outros nutrientes (Galleta, 1983; Reis et al., 2011), sendo necessários estudos que estabeleçam o meio adequado para a germinação do pólen da espécie de interesse.

2.7 Diversidade e estrutura genética de populações

O delineamento de estratégias para a conservação, manejo sustentável e melhoramento genético de uma espécie inclui o entendimento de sua forma de reprodução, distribuição da diversidade genética dentro e entre populações, níveis de diversidade intrapopulacional, tamanho efetivo e distribuição espacial de genótipos (Kageyama et al., 2003).

O estudo da variação genética em populações naturais envolve a quantificação dos níveis de variabilidade dentro das populações e a caracterização do nível de estruturação genética entre populações (Hamrick, 1983). A variabilidade genética dentro das populações pode ser quantificada de várias maneiras e os principais parâmetros são: número de alelos por loco, proporção de locos polimórficos, heterozigosidade esperada (H_e) e heterozigosidade observada (H_o) sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o índice de fixação ou coeficiente de endogamia (f) (Hamrick, 1983; Petit et al., 1998; Azevedo, 2007).

O número de alelos encontrados por loco é uma informação de grande relevância, visto que quanto maior o número de alelos presentes em uma população,

maior é a sua diversidade (Petit et al., 1998). O número de alelos por locos é maior em função do tamanho da amostra analisada e por consequência, em amostras maiores haverá mais chances de encontrar alelos raros (Azevedo, 2007). A estimativa da frequência alélica é fundamental nos estudos evolutivos, uma vez que as mudanças na frequência alélica indicam mudança genética na população (Nei, 1978).

A frequência de heterozigotos na população também é uma medida de diversidade, uma vez que um heterozigoto carrega dois alelos diferentes que demonstram a existência de variabilidade. Sendo assim, pode-se verificar a heterozigosidade esperada, que é a probabilidade de dois gametas, tomados ao acaso de uma população terem alelos diferentes em um determinado loco, sendo definida como a diversidade genética de Nei (1973) esperada segundo o princípio de Hardy-Weinberg. E a heterozigosidade observada, que representa a real taxa de indivíduos heterozigotos na população (Azevedo, 2007).

A estrutura genética de uma população é definida como sendo a forma pela qual a variabilidade genética é distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie (Hamrick, 1982). Diversos fatores podem promover a diferenciação ou a homogeneização genética das populações naturais de plantas, tais como: seleção natural, deriva genética e mutação, que podem influenciar a distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações, trazendo alterações significativas na estrutura genética (Hamrick, 1989). Existem diferentes métodos estatísticos, para caracterizar a estrutura genética populacional, dos quais citam-se: a estatística F pela qual se obtém o F_{ST} , a AMOVA (Análise de Variância Molecular), as medidas de distância expressas em matrizes e a estatística bayesiana.

Através da estatística F originalmente desenvolvida por Wright (1951) é possível obter o F_{ST} , que corresponde a correlação entre gametas tomados ao acaso nas subpopulações e mede o nível de diferenciação genética entre as subpopulações. O valor de F_{ST} varia de 0 (zero) a 1 (um), onde 1 indica subpopulações completamente homozigotas com a fixação de alelos distintos entre elas e 0 (zero) indica subpopulações com frequências alélicas idênticas, ou seja, ausência de diferença genética entre as subpopulações (Wright, 1965). Wright (1978) sugeriu que valores de F_{ST} entre 0 (zero) e 0,05 indicam pequena diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15 diferenciação genética moderada, de 0,15 a 0,25 grande diferenciação genética e valores superiores a 0,25 diferenciação genética muito grande.

A AMOVA estima os componentes de variância análogos às estatísticas F, denominada estatística ϕ (ϕ_i), refletindo a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. Esta análise trata as distâncias genéticas como desvios da média de um grupo e usa os quadrados dos desvios como variâncias, permitindo a partição da variação genética entre e dentro das populações analisadas (Excoffier et al., 1992). A significância dos componentes de variância e das estatísticas ϕ é testada por meio de permutações. Esta metodologia adapta-se a diferentes tipos de matrizes de entrada, obtidas por diversos tipos de marcadores moleculares, e diferentes tipos de pressuposições evolutivas sem modificar a estrutura básica da análise, sendo facilmente aplicável a diferentes situações, constituindo uma estrutura coerente e flexível para a análise de dados moleculares (Excoffier et al., 1992).

A análise bayesiana tem grande potencial para aplicação em estudos genéticos (Assis, 2015). De acordo com Pritchard et al., (2000), a abordagem bayesiana assume um modelo em que existem populações K (onde K pode ser desconhecido), cada uma das quais é caracterizada por um conjunto de frequências de alelos em cada locus. Esse método tenta atribuir indivíduos às populações com base em seus genótipos, ao mesmo tempo em que estimam as frequências de alelos populacionais. Dessa forma, agrupa os indivíduos geneticamente similares e identifica grupos formados a partir de dados genéticos de uma amostra de indivíduos, assumindo que estes são originados de populações desconhecidas.

2.8 Marcadores SSR

Os microssatélites são sequências simples repetidas em tandem, com um a seis nucleotídeos que estão presentes no genoma de eucariotos e procariotos (Li et al., 2002) e são amplamente distribuídos no genoma das plantas superiores (Caixeta et al., 2016).

Os marcadores moleculares microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeat*) constituem em um par de *primers* complementares às sequências que flanqueiam os microssatélites, e, portanto, amplificam o microssatélite. Neste método, a variação nos produtos de PCR está relacionada com a ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite, que pode ser consequência

de *crossing-over* desigual e erro da DNA polimerase durante a replicação (Kalia, et al., 2011; Caixeta et al., 2016).

Esses marcadores são específicos para cada espécie, porém, as regiões que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie ou gêneros próximos, sendo possível utilizar iniciadores desenvolvidos para espécies correlacionadas. Essa característica é denominada transferibilidade (Varshney, 2005; Bravo, 2006) e já foi aplicada a *S. mombin* por Aguilar-Barajas et al. (2014), a partir de 14 marcadores SSR desenvolvidos para *Spondias radlkoferi* Donn. Sm. Essa característica aparece como uma alternativa para minimizar os custos de implementação destes marcadores em espécies para as quais ainda não há iniciadores desenvolvidos.

Independentemente da origem da variação e do elemento repetitivo, cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (Caixeta et al., 2016). Aliado a esta característica está a alta especificidade e rapidez do método de PCR, que tornam esses marcadores uma ferramenta eficiente para estudos de genética de população de plantas (Caixeta et al., 2016).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, 13: 494-497, 1999.
- ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: studies in vitro and in vivo. **Tropical Animal Health and Production**, 37: 223-235, 2005.
- AGUILAR-BARAJAS, E.; SORK, V. L.; GONZÁLEZ-ZAMORA, A.; ROCHA-RAMÍREZ, V.; ARROYO-RODRÍGUEZ, V.; OYAMA, K. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Spondias Radlkoferi* (Anacardiaceae). **Applications in Plant Sciences**, 11: 1-3, 2014.
- AIRY SHAW, H. K.; FORMAN, L. L. The Genus *Spondias* L. (Anacardiaceae) in Tropical Asia. **Kew Bulletin**. 21: 1-19, 1967.
- AKINLOLU, A. A.; GHAZALI, K. O.; AMEEN, O. M.; ODEWABI, A. O. *Spondias mombin* promotes gastric mucosa and lipid profile status in gastric ulceration. **Journal of Morphological Sciences**, 31: 82-88, 2014.
- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, 55: 13-18, 1980.
- ASSIS, A. L. E. M. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Cabralea canjerana* (Vell.) Martius no Espírito Santo**. Alegre: Universidade Federal do Espírito Santo, 2015. 71p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento).
- 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.
- AYOKA A. O.; AKOMOLAFE R. O.; AKINSOMISOYE O. S.; UKPONMWAN O. E. Medicinal and economic value of *Spondias mombin*. **African Journal of Biomedical Research**, 11: 129-136, 2008.
- AZEVEDO, V. C. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae**. Brasília: Universidade de Brasília, 2007. 207p. (Tese - Doutorado em Biologia Molecular).
- AZEVEDO, D. M.; MENDES, A. M. S.; FIGUEIREDO, A. F. Característica da germinação e morfologia do endocarpo e plântula de taperebá (*Spondias mombin* L.) – Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 26: 534-537, 2004.

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999. 433p.

BARTH, O. M. Catálogo sistemático dos polens das plantas arbóreas do Brasil Meridional – Glossário Palinológico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 63: 133-162, 1965.

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.

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: 2780-2788, 2013.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (eds). **Marcadores moleculares**. Viçosa, UFV, 2016. 315p.

CARNEIRO, L. T.; MARTINS, C. F. Africanized honey bees pollinate and preempt the pollen of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) flowers. **Apidologie**, 43: 474-486, 2012.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, 30: 1129-1130, 1991.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**, 60: 460-463, 1994.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620p.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1992. 250p.

DIEGUES, I. P.; DAMASCENO JÚNIOR, P. C.; RIBEIRO, N. V. S.; REIS, M. V. M.; ABBOUD, A. C. S. Comportamento meiótico e viabilidade polínica na espécie *Jatropha curcas* L. **Semina Ciências Agrárias**, 36: 141-150, 2015.

ERDTMAN, G. **An introduction to pollen analysis**. Waltham, CBC, 1943. 240p.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperm**. Waltham, CBC, 1952. 539p.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperm**. 3° ed. Leiden: EJB, 1986. 553p.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131: 479–491, 1992.

FLORA DO BRASIL. Anacardiaceae. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB4404>>. Acesso em: 29 de dezembro de 2017.

FRANÇA, L. V.; NASCIMENTO W. M.; CARMONA, R.; FREITAS, R. A. Viability of eggplant pollen. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 9: 320-327, 2009.

FREITAS, J. L.; MALHEIROS, M. A. B.; VASCONCELOS, P. C. S. Processos fenológicos de taperebá (*Spondias mombin* L.) e pracaxi (*Pentaclethra macroleoba* (Wild) O. Kutz) em ecossistema florestal de várzea na Ilha do Pará, Afuá, Pará. **Revista Ciências Agrárias**, 39: 163-172, 2003.

FREITAS, J. L.; SANTOS, M. M. L. S.; OLIVEIRA, F. A. Fenologia reprodutiva de espécies potenciais para arranjo em sistemas agroflorestais, na Ilha de Santana, Amapá. **Revista Ciência Agrária**. 53: 78-86, 2010.

GALLETA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. (Eds.). **Methods in fruits breeding**. Indiana: Purdue University, 1983. p.23-47.

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

GUERRA, D.; WITTMANN, M. T. S.; SCHWARZ, S. F.; SOUZA, P. V. D.; CAMPOS, S. S. Reproductive characteristics of citrus rootstocks grown under greenhouse and field environments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 13: 186-193, 2013.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, 69, 10, 1685-1693, 1982.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W. L. (Ed.) **Genetic and conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings., 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J. L. Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P., (Ed.) **Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations**. New York: Chapman and Hall, 1989. p. 87-105.

HEITHAUS, E. R.; FLEMING, T. H.; OPLER, P. A. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a seasonal tropical forest. **Ecology**, 56: 841-854, 1975.

HENRY, O.; FEER, F.; SABATIER, D. Diet of the Lowland Tapir (*Tapirus terrestris* L.) in French Guiana. **Biotropica**, 32: 364-368, 2000.

HESSE, M.; WAHA, M. A new look at the acetolysis method. **Plant Systematics and Evolution**, 163: 147-152, 1989.

HISTER, C. A. L.; TEDESCO, S. B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 18: 135-141, 2016.

HYDE, H. A.; WILLIAMS, D. A. Studies on pollen analysis. **Nature**, 155: 264, 1945.

JANICK, J.; PAULL, R. E. **The Encyclopedia of fruit and nuts**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. 180p.

JUSTINIANO, M. J.; FREDERICKSEN, T. S.; NASH, D. **Ecología y silvicultura de especies menos conocidas – azúcaró *Spondias mombin* L., Anacardiaceae**. Santa Cruz: Editora El País, 2001. 43p.

KAGEYAMA, P. O.; CUNHA, G. C. da; BARRETO, K. D.; GANDARA, F. B.; CAMARGO, F. R. A.; SEBBENN, A. M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Scientia Forestalis**, 64: 108-119, 2003.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, 177: 309-334, 2011.

KIILL, L. H. P.; SILVA, T. A.; ARAÚJO, F. P. **Fenologia reprodutiva de espécies e híbridos do gênero *Spondias* L. (Anacardiaceae) em Petrolina, PE**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2013. 21p.

KUMAR, A.; RAO, S. R.; RATHORE, T. S. Cytological investigations in some important tree species os Rajasthan IV. Male meiosis studies in the genus *Salvadora* L. **Cytologia**, 67: 105-115, 2002.

KUMARI, K.; SAGGOO, M. I. S. Analysis of meiotic behavior in *Eremurus himalaicus* Baker (Liliaceae): a rare endemic perennial from Kinnaur, Himachal Pradesh, India. **Cytologia**, 81: 447-453, 2016.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A. NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, 11: 2453-2465, 2002.

LIMA, A. T. B.; SOUZA, V. A. B.; GOMES, R. L. F.; LIMA, P. S. C. Molecular characterization of cajá, *Spondias mombin* (Anacardiaceae), by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, 10: 2893-2904, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368p.

LOVE, R. M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, 43: 72-76, 1951.

LOZANO, N. B. Contribucion al estudio de la anatomia floral y de la polinizacion del jobo (*Spondias mombin* L.). **Caldasia**, 15: 369-380, 1986.

LUZ, C. L. S.; PIRANI, J. R.; VALENTE, A. S. M.; FERNANDEZ, E. P.; PENEDO, T. S. A.; BORGES, R. A. X. Anacardiaceae. In: MARTINELLI, G; MORAES, M. A. (Orgs.). **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1.100p.

MARTINS, K. C.; SOUZA, S. A. M.; CUCHIARA, **Morfologia polínica: aplicações, estudos e metodologias**. 1º ed. Rio de Janeiro: CBJE, 2010. 75p.

MASCARENHAS, J. P. Gene activity during pollen development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 41: 317-338, 1990.

MATTIETTO, R. A.; LOPES, A. S.; MENEZES, H. C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. **Brazilian Journal of Food Technology**, 13: 156-164, 2010.

MILLACH, S. C. K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (eds). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido, 1999.1066p.

MITCHELL, J. D.; DALY, D. C. A revision os *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the Neotropics. **Phytokeys**, 55: 1-92, 2015.

MOREIRA, N. F.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, K. C. Meiotic analysis of interspecific hybrids between *Capsicum frutescens* and *Capsicum chinense*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 17: 159-163, 2017.

NASCIMENTO, L. S.; BENEVENUTI, A. S.; LEITE, D. M.; SILVA, D. D.; MOURA, E. A.; MIRANDA, D.; MELLO, V.; DAHMER, N.; KARSBURG, I. V. Estimativa da viabilidade polínica e índice meiótico de *Delonix regia*. **Estudos**, 41: 83-88, 2014.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 70: 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.

OLIVEIRA, M. O. **Abelhas visitantes florais e potenciais polinizadores da cajazeira (*Spondias mombin* L.) sob cultivo, na Chapada do Apodi, Ceará**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2010. 63p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia).

OLIVEIRA, M. O.; SOUZA, F. X.; FREITAS, B. M. Abelhas visitantes florais, eficiência polinizadora e requerimentos de polinização na cajazeira (*Spondias mombin*). **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, 10: 277-284, 2012.

OYEYEMI, I. T.; BAKARE, A. A. Genotoxic and anti-genotoxic effect of aqueous extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrica* L. on *Allium cepa* root tip cells. **Caryologia**, 66: 360-367, 2013.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, 23: 997-1002, 2000.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização do germoplasma. In: Peñaloza, A, P. S. (Ed.). **Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 89p.

PEREIRA, T. N. S.; GERONIMO, I. G. C.; ROSSI, A. A. B.; PEREIRA, M. G. *Passiflora cristalina* and *Passiflora miniata*: meiotic characterization of two wild species for use in breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 17: 267-273, 2017.

PETIT, R. J.; MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, 12: 844-855, 1998.

PINTO, W. DA S.; DANTAS, A. C. V. L.; FONSECA, A. A. O.; LEDO, C. A. DA S.; JESUS, S. C. DE; CALAFANGE, P. L. P.; ANDRADE, E. M. Caracterização física, físico-química e química de frutos de genótipos de cajazeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 38: 1059-1066, 2003.

POZZOBON, M. T.; BIANCHETTI, L. B.; SANTOS, S.; CARVALHO, S. I. C. C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO, C. S. C. Comportamento meiótico em acessos de *Capsicum chinense* Jacq. do Banco de Germoplasma da Embrapa, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, 13: 96-100, 2015.

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

QUEIROZ, J. A. L. **Produção de mudas de taperebá**. Macapá: Embrapa, 2000. Recomendações Técnicas. 3p.

REIS, R. V.; MORAIS-LINO, L. S.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S.; VIANA, A. P. Variabilidade *in vitro* de grãos de pólen de bananeira sob diferentes concentrações de ácido bórico e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**, 35: 547-553, 2011.

RAMOS, M. da. C. **Ecologia da polinização de taperebá (*Spondias mombin* L., Anacardiaceae) em área de floresta secundária no município de Santo Antônio Do Tauá, Pará, Brasil**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2009. 64p. (Dissertação – Mestrado em Zoologia).

SALGADO-LABOURIAU, M. L. **Contribuição à palinologia dos cerrados**. Rio de Janeiro: Clip Produções Gráficas e Jornalísticas, 1973. 293p.

SANTANA, F. F. **Caracterização de genótipos de cajazeira**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2010. 109p. (Tese – Doutorado em Agronomia).

SILVA, L. M. **Superação de dormência de diásporos de cajazeira (*Spondias mombin* L.)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. 82p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).

SILVA, L. R. da. **Qualidade e atividade antioxidante de frutos de genótipos de umbucajazeiras (*Spondias* sp.) oriundos da microrregião de Iguatu, CE**. Areia: Universidade Federal da Paraíba, 2008. 138p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).

SILVA JÚNIOR, J. F.; BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; ALVES, M. A.; MELO NETO, M. L. Collecting, *ex situ* conservation and characterization of “caja´-umbu” (*Spondias mombin* x *Spondias tuberosa*) germplasm in Pernambuco State, Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 51: 343–349, 2004.

SMYTHE, N. Relationships between fruiting seasons and seed dispersal methods in a neotropical forest. **The American Naturalist**, 104: 25-35, 1970.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos da genética**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 739p.

SOARES, E. B.; GOMES, R. L. F.; MELLO E CARNEIRO, J. G.; NASCIMENTO, F. N.; SILVA, I. C. V.; COSTA, J. C. L. Caracterização física e química de frutos de cajazeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28: 518-519, 2006.

SOUZA, F. X. ***Spondias* agroindustriais e os seus métodos de propagação**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 1998. 26p.

SOUZA, F. X.; BLEICHER, E. Comportamento da cajazeira enxertada em umbuzeiro em Pacajus-CE. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 24: 790-792, 2002.

SOUZA, F. X.; COSTA, J. T. A.; LIMA, R. N. Características morfológicas e fenológicas de clones de cajazeira cultivados na Chapara do Apódi, Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, 37: 208-215, 2006.

SOUZA, V. A. B.; VALE, E. M.; GOMES, S. O.; COSTA, M. P. S. D.; GUIMARÃES, A. R. C. Efeito da concentração de sacarose na germinação *in vitro* do pólen de cinco acessos de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 35: 677-684, 2013.

STACY, E. A.; HAMRICK, J. L.; NASON, J. D.; HUBBELL, S. P.; FOSTER, R. B.; CONDIT, R. Pollen Dispersal in Low-Density Populations of Three Neotropical Tree Species. **The American Naturalist**, 148: 275-298, 1996.

TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V.; SOUZA, M. K.; GELINSKI, V. V. Catálogo polínico do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná – 2º parte. **Biological and Health Sciences**, 7: 7-18, 2001.

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

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R. L. DE O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, 44: 2326–2331, 2011.

TÓTH, G.; GASPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, 10: 967-981, 2000.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite makers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, 23: 48-55, 2005.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, 15: 395-420, 1951.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F- statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, 19: 395-420, 1965.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations: variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 590p.

4. CAPÍTULOS

4.1 CAPÍTULO 1

COMPORTAMENTO MEIÓTICO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE POLÍNICA DE *Spondias mombin* L.

RESUMO

A cajazeira (*Spondias mombin* L.) é uma espécie arbórea frutífera com grande potencial de mercado devido a qualidade sensorial de seus frutos, crescendo assim o interesse pelo seu cultivo comercial. Este estudo objetivou verificar o comportamento meiótico, a viabilidade polínica e caracterizar o pólen de *S. mombin*. O estudo foi realizado no município de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. A diagnose morfológica foi realizada a partir de excisatas de cinco indivíduos. Botões florais em diversos estágios de desenvolvimento foram coletados de 16 indivíduos para realizar a análise meiótica, a viabilidade polínica e a caracterização do pólen. Para caracterização dos pólenes utilizou-se o método de acetólise com ácido sulfúrico, sendo realizadas as avaliações em 25 pólenes. Estimou-se a viabilidade polínica com reativo de Alexander em flores masculinas e bissexuais de oito indivíduos, contabilizando-se 2.000 grãos de pólenes por tipo floral em cada indivíduo. A germinação *in vitro* foi testada em oito meios de culturas sendo contabilizado o número de pólenes germinados em 12, 24 e 36 horas, mensurando o tamanho dos tubos polínicos após 36 horas de germinação. O comportamento meiótico foi verificado pela contagem das células em divisão celular normal e anormal. O índice meiótico foi obtido avaliando-se 2.000 produtos pós-meióticos em oito indivíduos. A razão pólen/óvulo foi estimada por meio da divisão do número de pólenes pela quantidade de óvulos presente na mesma flor, em 8 indivíduos. *S. mombin* é uma planta andromonóica, seus pólenes são do tipo prolato, tricolpados, muito grandes, possuem área polar pequena e sexina com ornamentação reticulada a estriada. A viabilidade polínica não diferiu entre as flores masculinas (96,26%) e bissexuais (96,69%) e a média geral de pólenes viáveis foi considerada alta (96,47%). A germinação do pólen ocorreu em todos os meios testados, sendo o tratamento que continha 20% de sacarose e 50 mg ml⁻¹ de ácido bórico o mais adequado. As melhores médias de germinação ocorreram após 36h. A meiose de *S. mombin* mostrou-se regular, sendo encontrado apenas 13,26% de células com divisão anormal. O IM foi alto, com 96,53%. A razão pólen:óvulo indicou que a espécie possui xenogamia obrigatória. As informações obtidas sobre *S. mombin* auxiliam no entendimento de seus processos reprodutivos e podem ser utilizados no planejamento e implantação de cultivos comerciais e de programas de melhoramento e conservação da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Cajazeira, Germinação polínica, Índice meiótico, Recurso genético.

MEIOTIC BEHAVIOUR, POLLEN CHARACTERIZATION AND VIABILITY OF *Spondias mombin* L.

ABSTRACT

The cajá tree (*Spondias mombin* L.) is a fruit tree species with great market potential due to the sensorial quality of its fruits, thus increasing the interest for its commercial cultivation. This study aimed to verify meiotic behavior, pollen viability and to characterize *S. mombin* pollen. The study was carried out in the city of Alta Floresta, Mato Grosso, Brazil. The morphological diagnosis was made from the excicatas of five individuals. Flower buds at various stages of development were collected from 16 individuals to perform meiotic analysis, pollen viability and pollen characterization. For the characterization of the pollens the method of acetolysis with sulfuric acid was used, and the evaluations were carried out in 25 pollen. The pollen viability with Alexander's reactive in male and bisexual flowers of eight individuals was estimated, accounting 2,000 pollen grains per floral type in each individual. The in vitro germination was tested in eight cultures medium, counting the number of pollen germinated in 12, 24 and 36 hours, measuring the size of the pollen tubes after 36 hours of germination. The meiotic behavior was verified by counting the cells in normal and abnormal cell division. The meiotic index was obtained by evaluating 2,000 post-meiotic products in eight individuals. The pollen/ovule ratio was estimated by dividing the number of pollens by the number of eggs present in the same flower in 8 individuals. *S. mombin* is an andromanoic plant, with very large pollen grains which are prolate, tricolpate, with small polar area and sexine with reticulated to striated ornamentation. Pollen viability did not differ significantly between male (96.26%) and bisexual flowers (96.69%) and average of viable pollen was considered high (96.47%). Pollen germination occurred in all tested culture mediums, with the treatment consisting of 20% sucrose and 50 mg ml⁻¹ boric acid best suited for germination. The best germination averages occurred after 36 hours. Meiosis of *S. mombin* was regular, with abnormal division in just 13.6% of cells. The MI was high (96.53%). The pollen/ovule ratio indicated that the species presents obligatory xenogamy. The information obtained in this study on *S. mombin* assists in the understanding of its reproductive processes and may be used in planning and implanting commercial cultivation and breeding programs, and for the species conservation.

KEY WORDS: Yellow mombin, Pollen germination, Meiotic index, Genetic resource.

INTRODUÇÃO

O gênero *Spondias* pertence à família Anacardiaceae e destaca-se por agrupar espécies frutíferas importantes que são exploradas economicamente em áreas tropicais e subtropicais do mundo (Souza, 2005). Dentro deste gênero encontra-se *Spondias mombin* L., conhecida popularmente no Brasil como cajazeira ou taperebá (Pinto et al., 2003; Mitchell e Daly, 2015), uma espécie arbórea e frutífera de grande porte (Lorenzi, 1992).

Os frutos de *S. mombin* são perfumados, carnosos e de sabor agridoce, ricos em carotenoides e vitaminas A, B e C (Barroso et al., 1999; Sacramento e Souza, 2000; Ramos, 2009). O fruto tem grande valor de mercado, principalmente no norte e nordeste e ocupa lugar de destaque na produção de polpas, devido sua excelente qualidade nutricional e sensorial (Cassimiro et al., 2009).

O aumento da demanda por frutos de *S. mombin* vem despertando o interesse para o cultivo da espécie, que ainda é considerada em fase de domesticação (Cassimiro et al., 2009). A produção de fruto é proveniente de exploração extrativista e de pomares domésticos, resultando em variações anuais nas safras que influenciam a indústria de processamento de polpa e suas demandas de mercado (Souza, 1998; Santana, 2010). O pouco conhecimento e informações inexistentes sobre *S. mombin* e toda a sua cadeia produtiva dificultam a elaboração de um sistema de produção (Souza et al., 2006). Neste sentido, são necessários conhecimentos que auxiliem no estabelecimento de pomares comerciais que mantenham a produção e atendam as demandas de mercado, incluindo caracterização morfológica, reprodução e técnicas de manejo.

Descrições morfológicas para *S. mombin* foram realizadas por Lozano (1986a), Lozano (1986b), Janick e Paull (2008), Ramos (2009) e Mitchel e Daly (2015), sendo verificadas algumas variações. A variação mais encontrada relaciona-se com a morfologia das flores, e, por estar relacionada a reprodução é de extrema importância para o cultivo e conservação da espécie. Lozano (1986a) informou a existência de quatro tipos florais (flores bissexuais, masculinas e dois tipos de flores femininas), onde as flores consideradas femininas possuíam estaminódios ou estames com pólenes inviáveis, caracterizando uma flor funcionalmente feminina. Justiniano et al. (2001), Janick e Paull (2008) e Mitchell e Daly (2015), informaram a existência de três

tipos de flores: bissexuais, masculinas e femininas. Ramos (2009) e Carneiro e Martins (2012) encontraram flores bissexuais e masculinas, caracterizando um sistema andromonóico. A descrição adequada dos tipos florais é imprescindível no entendimento da reprodução da espécie, e podem ajudar a elucidar dúvidas em relação ao sistema reprodutivo de *S. mombin*.

A reprodução é um dos principais pilares para a manutenção de uma cultura economicamente viável, seja ela por meio de propagação vegetativa ou sexuada (Silva e Pinheiro, 2007). Além disso, é responsável pela perpetuação das espécies, para a manutenção da variabilidade e conseqüentemente pela sua conservação. O conhecimento dos aspectos reprodutivos da planta, auxilia na implantação de sistemas de produção, programas de melhoramento e nas práticas de conservação (Souza et al., 2003; Zen e Acra, 2005; Souza et al., 2006).

Em espécies com reprodução sexuada, o grão de pólen é responsável por transportar o gameta masculino para o estigma na flor feminina, desempenhando um papel vital no programa de reprodução e na produtividade da planta. Sendo assim, o rendimento das culturas geralmente depende de grãos de pólen viáveis (Patel e Mankad, 2014). Quando objetiva-se iniciar um programa de melhoramento em fruteiras, um dos pontos importantes a ser estudado, refere-se ao pólen e sua viabilidade, além das condições adequadas para testes de viabilidade (Frazon et al., 2006). Para obter sucesso nos cruzamentos em espécies frutíferas é importante detectar a viabilidade do pólen antes de ir a campo (Chagas et al., 2009), garantindo assim, mais sucesso nos cruzamentos.

A viabilidade polínica pode ser estimada por técnicas de germinação *in vitro* ou *in vivo* e por testes colorimétricos (Dafni, 1992; Nogueira et al., 2015). A germinação *in vitro* consiste em depositar o pólen em um meio de cultura composto por elementos orgânicos e inorgânicos, que reproduza, de forma mais similar possível, as condições oferecidas pelo estigma ao receber o grão de pólen (Silva et al., 2017). Os meios de cultura variam de uma espécie para outra, mas a grande maioria possui sacarose e ácido bórico em sua constituição básica (Reis et al., 2011), sendo necessário o teste da concentração adequada. Dentre os corantes utilizados nos testes colorimétricos, destaca-se a solução tripla de Alexander (Alexander, 1980), que reage com o protoplasma e com a parede celular, corando os pólenes viáveis de vermelho/púrpura e os inviáveis de verde. Estas metodologias ainda não foram

testadas para *S. mombin*, sendo necessário o estabelecimento das condições adequadas para verificação da viabilidade da espécie.

O grão de pólen origina-se a partir da meiose (microsporogênese), uma divisão celular caracterizada por apenas uma duplicação cromossômica para cada duas divisões nucleares, gerando quatro células haploides (n) a partir de uma célula-mãe diploide (2n) (Martins et al., 2010). A meiose é um processo integrado e altamente coerente, controlado por um grande número de genes, mas que pode ser afetado pela presença de genes mutantes, que levam a formação de produtos anormais (Pagliarini, 2000). As anormalidades na meiose podem levar a formação de gametas com número cromossômico desbalanceado, e geralmente inviáveis, e à baixa produtividade da planta (Nascimento et. al., 2014).

Além de ser imprescindível para a reprodução, o grão de pólen pode ser utilizado para distinção das espécies, devido sua variação morfológica (Karsburg e Battistin, 2005). Mitchel e Daly (2015) informaram a existência de trabalhos que caracterizaram o pólen de *S. mombin*, porém descreve a necessidade de estudos mais aprofundados. Os estudos sobre a morfologia do pólen necessitam de técnicas para extrair o conteúdo celular e facilitar a visualização das estruturas. O método de acetólise, descrito por Erdtman (1943), possibilita as condições ideais para estes estudos.

Dados sobre a viabilidade polínica de *S. mombin* via teste colorimétrico são escassos e informações acerca da germinação *in vitro* do pólen e comportamento meiótico são inexistentes. Diante da importância da espécie para o incremento do mercado de frutas brasileiras, do pouco conhecimento acerca dos aspectos reprodutivos e das incoerências encontradas nas descrições morfológicas de *S. mombin*, este trabalho objetivou verificar o comportamento meiótico, a viabilidade polínica e caracterizar o pólen de *S. mombin*, a fim de gerar conhecimentos para serem incorporados na implantação de cultivos, planejamento de programas de melhoramento genético e na conservação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Alta Floresta, localizado no extremo norte do Estado de Mato Grosso, à 830 km da capital Cuiabá (Figura 1).

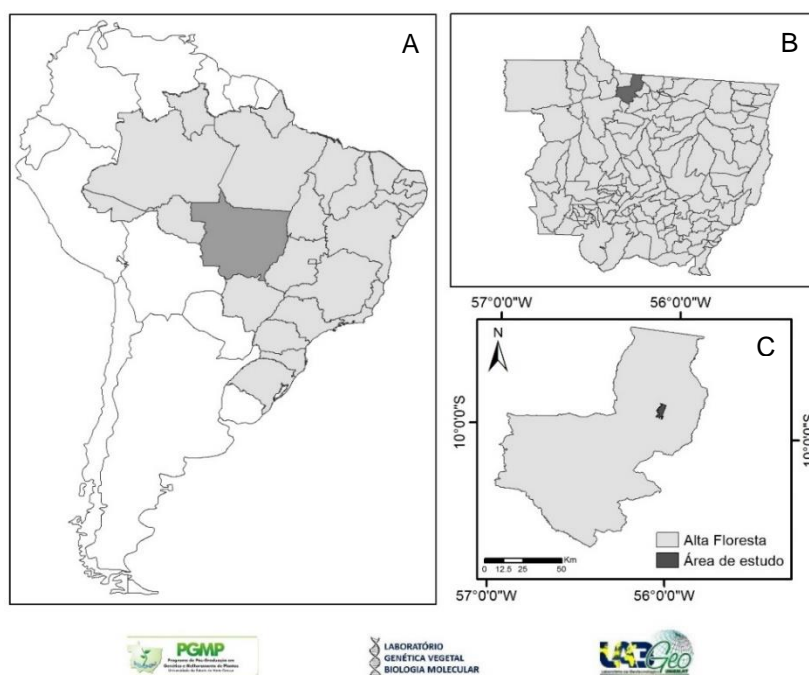


Figura 1. Localização da área de estudo. A) Estado de Mato Grosso no centro-oeste do Brasil. B) Município de Alta Floresta no extremo norte do estado de Mato Grosso. C) Limite do município de Alta Floresta e limite urbano, onde foram realizadas as coletas.

O município apresenta clima do tipo Am de acordo com a classificação de Alvares et al. (2013), com estação seca e chuvosa definidas. A temperatura anual varia de 19,6°C à 32,4°C, a precipitação pluviométrica anual está entre 2.800 a 3.100 mm e umidade relativa média anual é de 70% (Tarifa, 2011; Alvares et al., 2013). A vegetação é classificada como floresta ombrófila aberta e densa, floresta semidecidual e decidual (Lira, 2011; Zappi et al., 2011).

Diagnose morfológica de *S. mombin*

Para diagnose morfológica foram selecionados cinco indivíduos de *S. mombin* localizados no município de Alta Floresta, MT. Em cada indivíduo selecionado, foram coletados cinco ramos com folhas e inflorescência, durante o período de floração (agosto de 2016) e cinco ramos com folhas e frutos, durante o período de frutificação

(janeiro de 2017) sendo o material levado ao HERBAM (Herbário da Amazônia Meridional) da Universidade do Estado de Mato Grosso, para montagem das exsiccatas e posterior descrição. A coleta, preservação e herborização do material foi realizada conforme metodologia proposta por Fidalgo e Bonomi (1989). O material foi depositado sob os números de tomo: 15289, 15290, 15291, 15292 e 15293.

A diagnose foi realizada no Laboratório de Morfologia Vegetal do HERBAM, com auxílio de esteriomicroscópio, papel milimetrado e régua, utilizando as nomenclaturas propostas por Radford et al. (1974) e Souza e Lorenzi (2008). A ilustração botânica foi realizada no Herbário VIC, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Coleta dos botões florais

A coleta dos botões florais foi realizada em 16 indivíduos localizados no perímetro urbano do município de Alta Floresta, MT. Foram necessárias várias coletas durante o período de floração, a fim de se obter os botões com as características necessárias, sendo assim, coletou-se separadamente botões florais masculinos e bissexuais em diferentes estágios de desenvolvimento.

Os botões foram fixados em solução de álcool etílico absoluto e ácido acético glacial (3:1 v/v) no momento da coleta e transferidos para álcool 70% após 24 horas, sendo mantidos sob refrigeração. Para a avaliação da germinação *in vitro* utilizou-se botões florais em pré-antese coletados no mesmo dia da análise.

Caracterização morfológica do pólen

Para a análise da morfologia do pólen, as anteras dos botões florais foram retiradas e submetidas ao método de acetólise descrito por Erdtman (1943) com modificações: diminuição da quantidade de ácido acético de 1000µL para 500µL, aumento da temperatura do banho-maria de 70 a 80 °C para 100 °C por dois minutos, e aumento do tempo em contato com a mistura de glicerina e água destilada de dez minutos para 2 (duas) horas, sem retirada da solução antes do preparo das lâminas.

As anteras foram cortadas e depositadas em microtubos de 1,5 mL, com 500µL de ácido acético, por 20 minutos. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 5 (cinco) minutos e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente adicionou-se no microtubo 1 (um) mL da solução acetólica na

proporção 9:1 (anidrido acético: ácido sulfúrico). Esta solução tem a função de remover o conteúdo celular do grão de pólen através da hidrólise ácida, e assim facilitar a visualização e reconhecimento de sua morfologia. Os grãos de pólen ficaram imersos na mistura acetólica durante 2 (dois) minutos em banho-maria a uma temperatura de aproximadamente 100 °C. Os tubos passaram então por outra centrifugação a 3.000 rpm por 5 (cinco) minutos e a mistura acetólica foi cuidadosamente descartada. Em seguida, acrescentou-se 1 (um) mL de água destilada com 100 µL (duas gotas) de álcool etílico absoluto e o material foi novamente centrifugado. Procedeu-se o descarte do sobrenadante, ficando no microtubo apenas o pólen. Depois, foi acrescentado 1 mL de solução de água destilada e glicerina na proporção 3:1. Os pólenes foram mantidos nesta solução por 2 (duas) horas antes do preparo das lâminas.

As lâminas foram preparadas e os pólenes fotografados no mesmo dia em que se realizou a acetólise, com o intuito de evitar intumescimento e alterações no tamanho dos pólenes. Essas alterações ocorrem devido a membrana externa do grão de pólen (exina) ser elástica e permitir que o pólen seja modificado de acordo com seu grau de hidratação (Salgado-Labouriau, 1973). As lâminas foram observadas em microscópio óptico binocular Biocam com magnitude de 40X. As imagens foram obtidas por câmera CMOS 1.3 acoplada ao microscópio e com auxílio do sistema de captura de imagens Tsview 1.0.0.1.

Foram mensurados o diâmetro polar e equatorial em vista equatorial (grão de pólen perpendicular à vista polar), o diâmetro equatorial em vista polar (grão de pólen com a área polar voltada para o observador) dos grãos de pólen, da espessura das camadas da exina (sexina e nexina) e do apocolpo. As mensurações foram realizadas em 25 (vinte e cinco) grãos de pólen em vista equatorial e 25 (vinte e cinco) grãos de pólen em vista polar.

A classificação quanto a forma do grão de pólen foi realizada através da relação entre o eixo polar e o eixo equatorial (P/E) em vista equatorial, proposta por Erdtman (1943). Essa classificação apresenta 9 (nove) classes, que estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos grãos de pólen com base na razão P/E (eixo polar / eixo equatorial), descrita por Erdtman (1943)

P/E	Denominação	
0,50	Peroblato	
0,50-0,74	Oblato	
0,75-0,87	Suboblato	
0,88-0,99	Oblato esferoidal	Subesferoidal
1,00	Esférico	
1,01-1,14	Prolato-esferoidal	
1,15-1,33	Subprolato	
1,34-2,00	Prolato	
2,00	Perprolato	

Em relação ao tamanho, o grão de pólen foi classificado de acordo com Erdtman (1945), baseado no comprimento do eixo maior nas seguintes classes: muito pequenos (< 10 μm), pequenos (10-25 μm), médios (25-50 μm), grandes (50-100 μm), muito grandes (100-200 μm) e gigantes (> 200 μm).

Os pólenes também foram classificados em relação ao Índice de Área Polar (IAP) proposto por Barth e Melhem (1988 citado por Martins et al., 2010), que é dado pela relação entre as extremidades de duas aberturas adjacentes (ou suas margens) e a maior largura do grão de pólen em vista polar (Tabela 2). As descrições polínicas e as terminologias adotadas foram baseadas no glossário de Barth (1964) e Punt et al. (2007).

Tabela 2. Classificação dos grãos de pólen em relação ao Índice de Área Polar (IAP)

Denominação	Intervalo do I.A.P.
Sem área polar	0
Área polar muito pequena	<0,25 (abertura muito longa)
Área polar pequena	0,25 - 0,50 (abertura longa)
Área polar grande	0,50 – 0,75 (abertura curta)
Área polar muito grande	>0,75 (abertura muito curta)

Viabilidade polínica via teste colorimétrico

A viabilidade polínica via teste colorimétrico foi estimada em botões florais masculinos e bissexuais em pré-antese de 8 (oito) indivíduos, separadamente, a fim de verificar se havia diferença estatística significativa entre os tipos de flores e entre os indivíduos. O resultado desta análise norteou a metodologia das análises

posteriores, uma vez que não havendo diferença estatística entre os tipos florais, os demais aspectos reprodutivos não seriam avaliados por tipo floral.

Para visualização dos pólenes viáveis e inviáveis utilizou-se o método de Alexander (1980), que utiliza uma solução tripla de corantes, com a qual os pólenes viáveis apresentam protoplasma corado de roxo e parede corada de verde e os inviáveis apresentam coloração verde.

No preparo das lâminas, as anteras foram separadas e levemente maceradas junto a uma gota de solução tripla de Alexander (aproximadamente 50µL). Para cada lâmina utilizou-se um botão floral. Foram montadas 16 lâminas por indivíduo, sendo 8 (oito) lâminas com botões florais masculinos e 8 (oito) lâminas com botões florais bissexuais. As lâminas foram observadas em microscópio binocular modelo Photonics Bio 2 LED da marca BEL em objetiva de 10x. Foram contados 250 pólenes em cada lâmina, totalizando 4.000 pólenes por indivíduo, sendo 2.000 para cada tipo floral. Para o cálculo da porcentagem de germinação utilizou-se a fórmula:

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

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias significativas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa Genes (Cruz, 2013).

Germinação do pólen *in vitro*

Para germinação *in vitro*, utilizou-se o pólen de botões florais frescos em pré-antese de 3 (três) indivíduos diferentes de *S. mombin* coletados no período vespertino. Por não haver na literatura informações sobre a germinação *in vitro* de pólen para *S. mombin* ou espécies do mesmo gênero, a metodologia baseou-se em trabalhos realizados com outras espécies, a fim de estabelecer uma metodologia para *S. mombin* (Pio et al., 2004; Reis et al., 2011).

Foram testados 8 (oito) meios de cultura líquidos para germinação do pólen, com variações nas quantidades de sacarose e ácido bórico. Os tratamentos foram: T1: sacarose 0% e ácido bórico 0 mg mL⁻¹; T2: sacarose 0% e ácido bórico 50 mg mL⁻¹; T3: sacarose 5% e ácido bórico 0 mg mL⁻¹; T4: sacarose 5% e ácido bórico 50 mg mL⁻¹; T5: sacarose 10% e ácido bórico 0 mg mL⁻¹; T6: sacarose 10% e ácido bórico

50 mg mL⁻¹; T7: sacarose 20% e ácido bórico 0 mg mL⁻¹; T8: sacarose 20% e ácido bórico 50 mg mL⁻¹. Também foram avaliados três horários de contagem, sendo 12, 24 e 36 horas após a montagem do experimento.

Os meios de cultura foram distribuídos em placas de acrílico de 6 (seis) cm de diâmetro, cada placa recebeu 10 (dez) mL de meio. As anteras foram separadas dos botões e levemente maceradas para remoção dos grãos de pólen, que em seguida foram distribuídos nas placas. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 8x3 (8 = tratamentos; 3 = horários de contagem) e 4 (quatro) repetições. As placas foram mantidas em câmara B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) com temperatura de 25 °C (± 2 °C) e no escuro.

Foram contabilizados 250 pólenes (germinados e não germinados) por repetição em cada tratamento e em cada horário de contagem (12, 24 e 36 horas) e realizada a medição do comprimento do tubo polínico após 36 horas de germinação. Foram considerados germinados, os grãos de pólen onde o comprimento do tubo polínico atingisse ou ultrapassasse o seu diâmetro (Reis et al., 2011). Para medição do tubo polínico, foram selecionados aleatoriamente dez tubos polínicos em cada tratamento, que foram fotografados por câmera CMOS 1.3 acoplada ao microscópio e com auxílio do sistema de captura de imagens Tsview 1.0.0.1. As mensurações foram realizadas no programa ANATI QUANT versão 2.0. A porcentagem de pólenes germinados foi obtida pela fórmula:

$$\text{Germinação} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de pólenes germinados}}{\text{N}^\circ \text{ total de pólenes contados}} \times 100$$

Os dados de porcentagem foram transformados utilizando o arco-sen $\sqrt{\frac{x}{100}}$ e em seguida foram submetidos a análise de variância. As médias significativas foram comparadas entre si via teste de comparação de médias, com nível de significância a 5% de probabilidade utilizando o programa GENES (Cruz, 2013). Para montagem das tabelas utilizou-se as médias originais sem transformação.

Comportamento meiótico e índice meiótico

Os botões florais utilizados para análise do comportamento meiótico e para a estimativa do índice meiótico foram medidos, a fim de associar o tamanho do botão floral com as fases meióticas e de desenvolvimento do grão de pólen.

O comportamento meiótico de *S. mombin* foi avaliado por meio da contagem de células em meiose obtidas de botões florais de 10 (dez) indivíduos coletados em *bulk*. Para preparo das lâminas as anteras foram separadas e levemente maceradas sob uma gota de corante carmim acético 2% (Guerra e Souza, 2002). As observações e contagens das lâminas foram realizadas em microscópio binocular, modelo Photonics Bio 2 LED da marca BEL em objetiva de 40x. Foram contabilizadas todas as fases normais e anormalidades encontradas. As imagens foram obtidas por câmera CMOS 1.3 acoplada ao microscópio Bioval e com auxílio do sistema de captura de imagens Tsview 1.0.0.1.

Para estimativa do índice meiótico foram utilizados botões jovens de 8 (oito) indivíduos de *S. mombin*. A montagem das lâminas e sua observação em microscópio, seguiu a mesma metodologia descrita para o comportamento meiótico. Foram montadas 8 (oito) lâminas por indivíduo e contabilizados 250 produtos pós-meióticos por lâmina, totalizando 2.000 produtos pós-meióticos por indivíduo. Tétrades com quatro células de mesmo tamanho foram consideradas normais e qualquer desvio (mônade, díade, tríade e políade) foram consideradas como anormais, sendo o IM obtido através da fórmula:

$$IM = \frac{\text{N}^\circ \text{ de tétrades normais}}{\text{N}^\circ \text{ total de produtos pós meióticos}}$$

Os dados do índice meiótico foram submetidos a análise de variância e as médias significativas foram comparadas entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa GENES (Cruz, 2013).

Razão pólen/óvulo (P/O)

Para a estimativa da razão pólen/óvulo (P/O) foram utilizados botões florais bissexuais em pré-antese de 8 (oito) indivíduos de *S. mombin*. Utilizou-se a metodologia proposta por Cruden (1977), onde contabilizou-se o número de pólenes em uma antera e multiplicou-se pelo total de anteras da flor e em seguida dividiu-se esse valor pelo número de óvulos contados no mesmo botão. Para contagem dos pólenes, a antera foi separada, colocada sobre uma lâmina e cortada, em seguida foi macerada junto a uma gota de carmim acético 2%. Sobre o material foi colocada uma lamínula. A lâmina foi visualizada em microscópio binocular modelo Photonics Bio 2

LED da marca BEL em objetiva de 10x. Por meio da técnica de varredura, foram contabilizados todos os pólenes presentes na lâmina.

A partir da média da razão P/O foi realizada a inferência sobre o sistema reprodutivo de *S. mombin*, com base na classificação proposta por Cruden (1977) descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Sistema reprodutivo com base na razão pólen/óvulo conforme Cruden (1977)

Sistema Reprodutivo	Razão pólen/óvulo
Cleistogamia	2,7 – 5,4
Autogamia obrigatória	18,1 – 39,0
Autogamia facultativa	31,9 – 396,0
Xenogamia facultativa	244,7 – 2.588,0
Xenogamia obrigatória	2.108,0 – 195.525,0

RESULTADOS

Diagnose morfológica

***Spondias mombin* L., Sp. pl. 371. 1753.**

Árvores 5-20 m de altura. Folhas compostas, imparipinadas, alternas, espiraladas; pulvino 0,4-0,7 cm, pecíolo 3-6,5 cm, pubescente a esparso pubescente, raque 10-23,5 cm compr., pubescente a esparso pubescente; folíolos 4-7 pares, medianos; peciólulo 0,5-0,8 cm compr., 10,5-13 x 3,5-5 cm, base oblíqua, ápice cuspidado, faces abaxial e adaxial glabras a glabrescentes, nervação peninérvia, principal excêntrica. Inflorescências terminais, panículas, 16,5-36 cm compr. Brácteas 1-2x0,5 mm, triangulares. Flores bissexuais: pedicelo 2-3,5 mm compr., bractéolas presentes, 5 sépalas, 0,3-0,4 mm compr., curtamente campanulado, glabrescente, cor verde claro; 5 pétalas, 3-3,5 mm compr., dialipétalas, glabras, brancas; 10 estames livres, filete 2-2,2 mm compr., antera 1 mm compr.; pistilo 2 mm, ovário súpero 0,8-1 mm compr., com 4-5 lóculos, 1 óvulo por lóculo, estilete 0,5-0,6 mm compr., estigma 0,3-0,6 mm compr., levemente clavado; nectários florais presentes. Flores masculinas: pedicelo 2,5-3 mm compr., bractéolas 0,4-0,5 mm compr., glabrescentes; 5 sépalas, 0,3-0,5 mm compr., curtamente campanulado, glabrescente, cor verde claro; 5 pétalas, 2-3 mm compr., dialipétalas, glabras, brancas; 10 estames, filete 1,8-2 mm compr., antera 1 mm compr., pistilódio 1 mm compr. Fruto nuculânio, 3,2-2,7 x 1,9-1,4 cm, epicarpo amarelo alaranjado, liso, brilhante, aroma agridoce. Sementes 12-16 x 2-2,5 mm, estreitamente oblongas.

Os detalhes da morfologia de *S. mombin* podem ser observados na ilustração botânica (Figura 2).

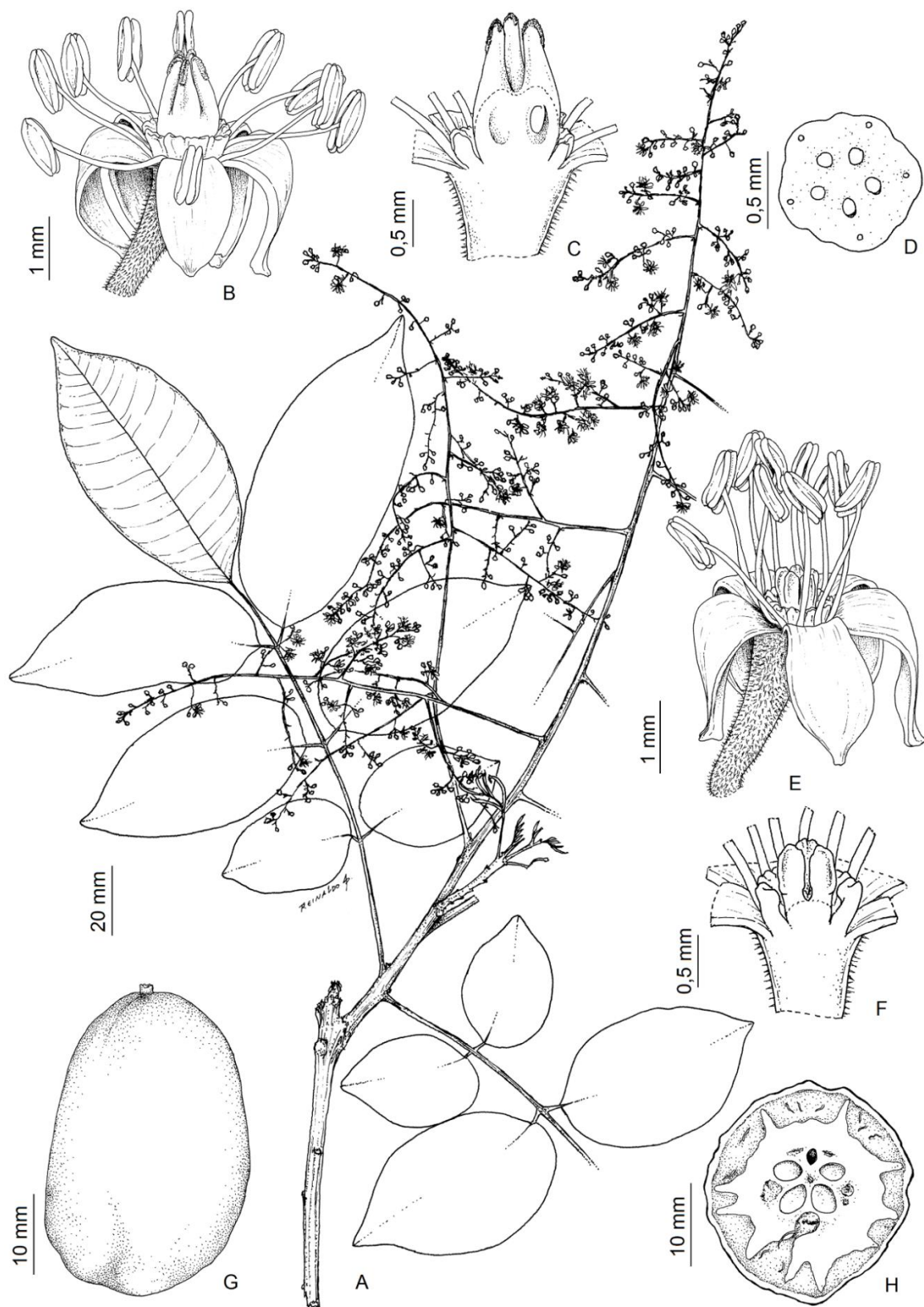


Figura 2. Ilustração botânica de *S. mombin*. A) Ramo com detalhe das folhas e inflorescência. B) Flor bissexual. C) Corte longitudinal da flor bissexual. D) Gineceu em corte transversal evidenciando cinco lóculos do ovário (flor bissexual). E) Flor masculina. F) Corte longitudinal da flor masculina com detalhe do pistilódio. G) Fruto. H) Corte transversal do fruto evidenciando os lóculos. Ilustração: Reinaldo A. Pinto.

Caracterização morfológica do pólen

Os grãos de pólen de *S. mombin* são 3-colporados, apresentando 67,88 a 78,04 μm de diâmetro equatorial e 92,48 a 107,58 μm de eixo polar (Tabela 4). São considerados muito grandes, pois a medida do maior eixo encontra-se entre 100-200 μm .

A exina tem em média 3,89 μm e apresenta a sexina microestriada a microreticulada na região polar (Figura 3). Os pólenes de *S. mombin* são classificados como prolato e apresentam área polar pequena (Tabela 4).

Tabela 4. Medidas dos pólenes de *S. mombin* coletados no município de Alta Floresta, MT e submetidos ao método de acetólise

Medida	Mín. – Máx. (μm)	$x \pm sx$ (μm)	IC 95% (μm)	CV (%)
Diâmetro Equatorial (VE)	67,88 - 78,04	$72,68 \pm 2,69$	71,57 - 73,79	3,70
Eixo Polar (VE)	92,48 - 107,58	$101,07 \pm 4,25$	99,31 - 102,82	4,21
Diâmetro equatorial (VP)	63,74 - 78,77	$72,45 \pm 3,80$	70,89 - 74,02	5,24
Nexina	1,05 - 2,17	$1,70 \pm 0,34$	1,56 - 1,84	20,03
Sexina	1,72 - 2,61	$2,19 \pm 0,24$	2,09 - 2,29	11,08
Exina	3,13 - 4,47	$3,89 \pm 0,36$	3,74 - 4,03	9,16
P/E	1,29 - 1,51	$1,39 \pm 0,06$	1,36 - 1,42	4,52
I.A.P	0,26 - 0,49	$0,35 \pm 0,06$	0,32 - 0,37	15,92

x = média; sx = desvio padrão da média; IC = intervalo de confiança; CV (%) = coeficiente de variação; VE = Vista Equatorial; VP = Vista Polar; P/E = Razão entre eixo polar sobre diâmetro equatorial; I.A.P.= Índice de área polar.



Figura 3. Fotomicrografias dos grãos de pólen de *S. mombin*. A) Vista equatorial com detalhe dos colpos. B) Vista polar com detalhe das aberturas dos colpos. C) Detalhe da superfície (ornamentação). Barra = 20 μm .

Viabilidade polínica via teste colorimétrico

A análise de variância demonstrou que os indivíduos analisados apresentaram viabilidade polínica significativamente diferentes entre si, porém não

houve diferença estatística significativa entre a viabilidade polínica dos tipos florais, o que indica que tanto as flores bissexuais quanto as flores masculinas contribuem com pólen para a reprodução da espécie (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da Análise de Variância (ANOVA) para a viabilidade polínica de diferentes indivíduos e tipos florais de *S. mombin* via teste colorimétrico

Fonte de Variação	GL ¹	Viabilidade Polínica ²
Indivíduos	7	24,220**
Tipos florais	1	6,125 ^{ns}
Indivíduos x Tipos florais	7	5,442 ^{ns}
Média		96,47
C.V.(%)		2,38

¹ Grau de liberdade. ² Valor do quadrado médio para a variável viabilidade polínica. ^{ns}, **: não significativo e significativo a 1%.

Todos os indivíduos dentro dos tipos florais apresentaram viabilidade superior a 90%. A viabilidade polínica média de *S. mombin* contemplando todos os indivíduos e os dois tipos florais foi de 96,47% (Tabela 6).

Tabela 6. Viabilidade polínica de *S. mombin* estimada por teste colorimétrico com a solução tripla de Alexander

Indivíduos	Viabilidade Flor Masculina	Viabilidade Flor Bissexual	Viabilidade média do indivíduo
1	96,10 ab	97,50 a	96,80 ab
2	96,85 ab	96,95 ab	96,90 ab
3	97,05 ab	96,45 ab	96,75 abc
4	97,15 ab	98,40 a	97,77 a
5	94,85 ab	93,65 b	94,25 c
6	98,15 a	97,50 a	97,82 a
7	95,40 ab	97,30 a	96,35 abc
8	94,50 b	95,80 ab	95,15 bc
Média	96,26 A	96,69 A	96,47
C.V. (%)			2,38

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Os pólenes viáveis possuíam protoplasma e parede celular íntegras, indicados pela coloração violeta do protoplasma e pelo contorno verde da parede celular. Os grãos de pólen inviáveis e que, portanto, não possuíam protoplasma, apresentaram tonalidade esverdeada (Figura 4).

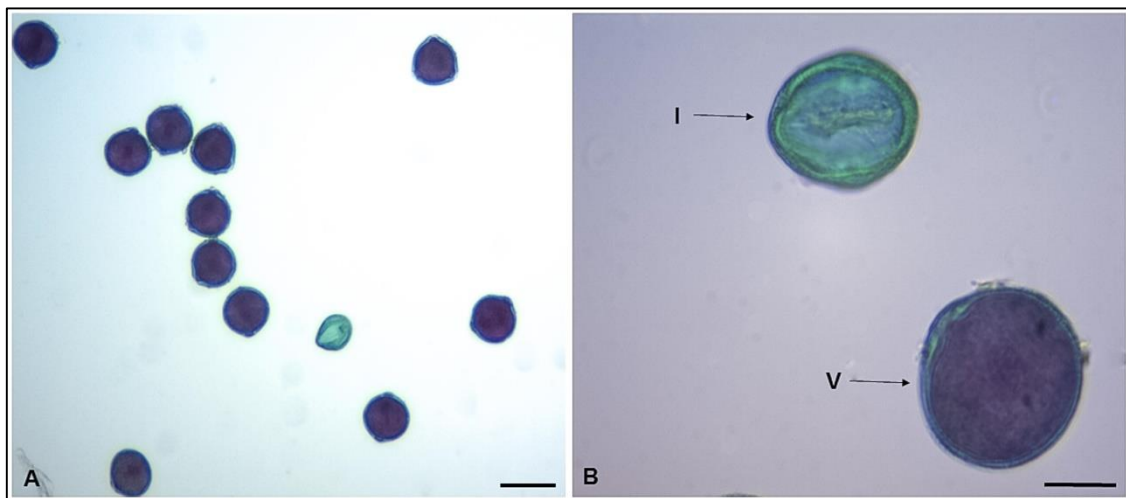


Figura 4. Pólen de *S. mombin* corados com solução tripla de Alexander. A) Padrão de visualização dos pólen para contagem em objetiva de 10x (Barra = 100 µm). B) Detalhe do pólen viável (V) e inviável (I) em objetiva de 40x. Barra = 30 µm.

Germinação do pólen *in vitro*

Os meios de cultura avaliados neste estudo permitiram a germinação do pólen de *S. mombin* (Figura 5). A análise de variância demonstrou que houve interação significativa entre os tratamentos e os horários de contagem sobre a germinação do pólen (Tabela 7).

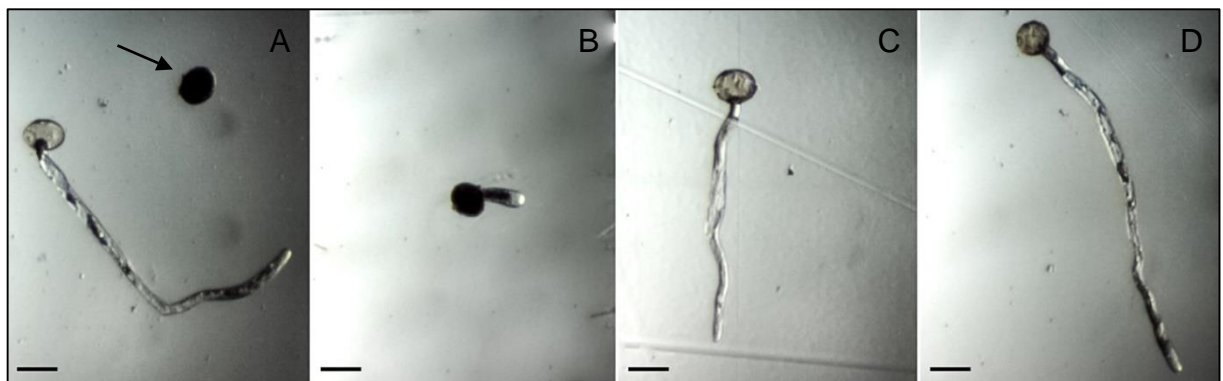


Figura 5. Pólen de *S. mombin* germinado *in vitro*. A) pólen germinado e pólen não germinado (seta). B a D) diferentes estágios de desenvolvimento do tubo polínico. Barra = 50 µm.

Tabela 7. Resumo da Análise de Variância (ANOVA) para germinação *in vitro* do pólen de *S. mombin* submetido a diferentes meios de cultura e horários de contagem

Fonte de Variação	GL ¹	% de Germinação ²
Tratamentos	7	13,058**
Horário de contagem	2	51,998**
Tratamentos x Horário de contagem	14	4,877**
Média		37,57
C.V.(%)		15,20

¹ Grau de liberdade. ² Valor do quadrado médio para a variável porcentagem de germinação de pólen. **: significativo a 1%.

O tempo influenciou positivamente a germinação dos pólenes, sendo que nos tratamentos T2, T4, T7 e T8, a maior porcentagem de pólenes germinados foi encontrada na contagem de 36 horas após a montagem do experimento (Tabela 8). De modo geral, todas as médias foram superiores na contagem de 36 horas apesar de não diferirem estatisticamente dos outros horários de contagem em todos os tratamentos. Os tratamentos T4 e T8 apresentaram as melhores médias de germinação após 36 horas. Ambos continham sacarose e ácido bórico. Apesar do tratamento T8 não diferir estatisticamente do tratamento T4 na contagem de 36 horas, ele apresentou maior média de germinação. Além disso, a partir da segunda contagem (24 horas) a média de pólenes germinados no T8 foi superior e estatisticamente diferente dos demais tratamentos.

Tabela 8. Porcentagem média de germinação do pólen de *S. mombin* sob diferentes tratamentos e horários de contagem. S= Sacarose e AB= Ácido bórico

Tratamentos	Horários de Contagem		
	12h	24h	36h
T1 (S 0% e AB 0 mg)	26,10 Aa	34,40 Ab	32,80 Ac
T2 (S 0% e AB 50 mg)	16,50 Ba	27,10 Bb	80,50 Ab
T3 (S 5% e AB 0 mg)	27,10 Aa	23,40 Ab	30,10 Ac
T4 (S 5% e AB 50 mg)	22,40 Ba	34,40 Bb	89,50 Aa
T5 (S 10% e AB 0 mg)	19,30 Aa	25,40 Ab	26,40 Ac
T6 (S 10% e AB 50 mg)	18,40 Aa	25,30 Ab	27,10 Ac
T7 (S 20% e AB 0 mg)	21,60 Ba	31,00 Bb	74,80 Ab
T8 (S 20% e AB 50 mg)	38,10 Ca	54,81 Ba	95,30 Aa
C.V. (%)		18,42	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott ($p < 0.05$).

O comprimento do tubo polínico de *S. mombin*, após 36 horas de germinação, foi influenciado pelos tratamentos (Tabela 9). O tratamento T1, constituído apenas de água destilada, propiciou a menor média de comprimento e foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos, que continham apenas sacarose ou sacarose combinada com ácido bórico. Esse resultado indica que a presença destes componentes contribui para o crescimento do tubo polínico.

Tabela 9. Comprimento do tubo polínico de *S. mombin* após 36 horas de germinação em diferentes meios de cultura

Tratamentos	Comprimento (µm)
T1	170,96 b
T2	277,36 a
T3	239,04 ab
T4	276,21 a
T5	250,26 a
T6	310,37 a
T7	259,94 a
T8	311,60 a
Média	261,96
C.V. (%)	21,53

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Comportamento meiótico e índice meiótico

A partir da visualização das células em divisão, na fase de diacinese foi possível contabilizar 15 pares de cromossomos em *S. mombin* (Figura 6B).

A meiose de *S. mombin* apresentou-se regular, totalizando apenas 13,26% de células com alguma anormalidade. As anormalidades encontradas podem ser visualizadas na Figura 6 (K a P) e estão descritas na Tabela 10. A divisão assincrônica apresentou-se como a anormalidade mais frequente.

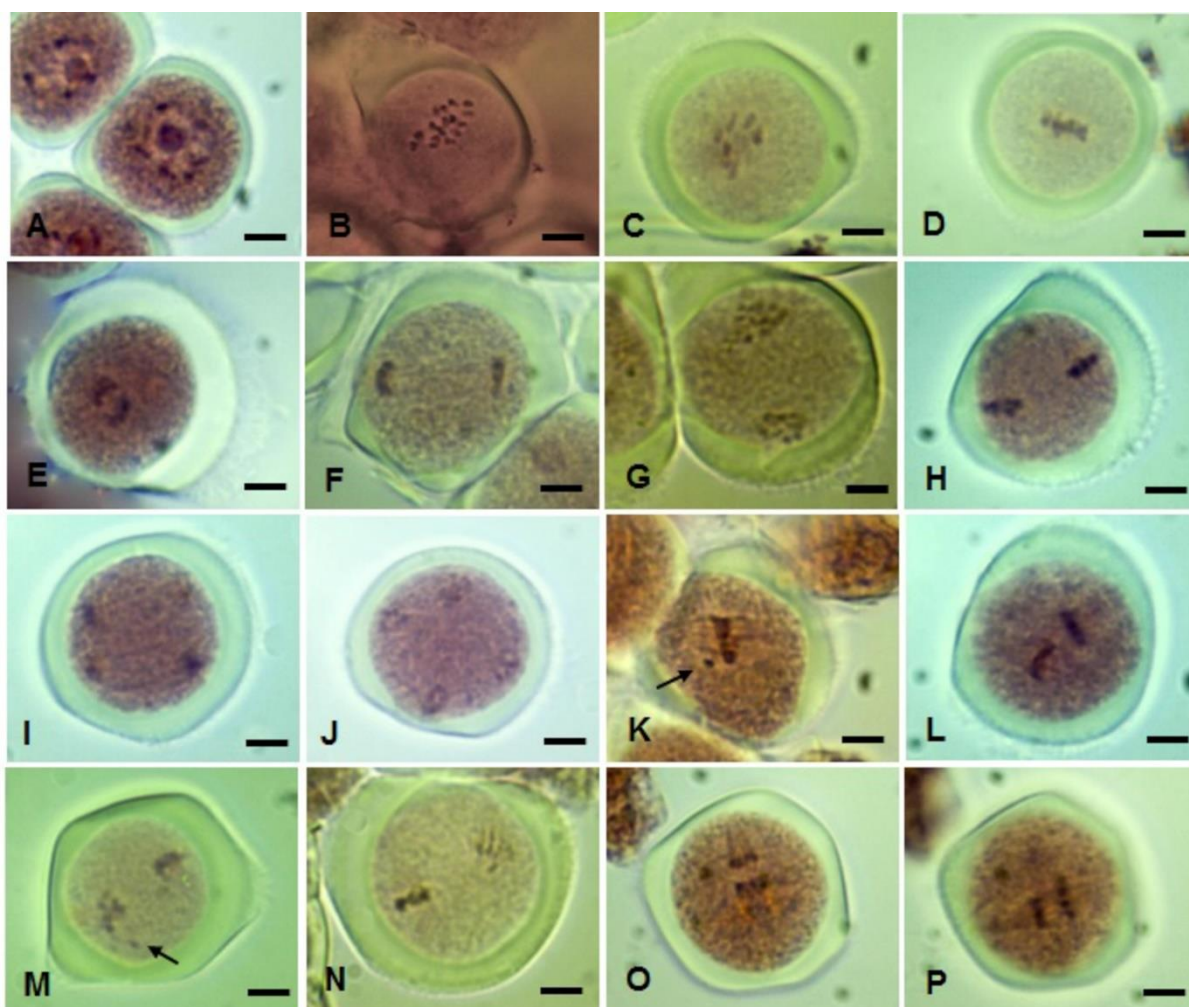


Figura 6. Fases da meiose de *S. mombin*. A) Prófase I – subfase paquíteno. B) Prófase I – subfase diacinese apresentando 15 pares de cromossomos. C) Prófase I – subfase diacinese, os cromossomos iniciam a migração para a faixa equatorial da célula. D) Metáfase I normal. E) Anáfase I normal. F) Telófase I normal. G) Prófase II normal. H) metáfase II normal. I) Anáfase II normal. J) Telófase II normal. K) Metáfase I com cromossomo atrasado (seta). L) Metáfase II com cromossomos alinhados em “T”. M) Divisão assincrônica e com um cromossomo adiantado (seta). N) Divisão assincrônica. O e P) Anáfase II, mesma célula em dois focos para demonstrar a falta de orientação das fibras do fuso. Barra = 10 μ m.

Tabela 10. Anormalidades observadas na meiose de *S. mombin*

Anormalidade	% de anormalidade
Cromossomo fora da placa equatorial - Metáfase I	14,41%
Cromossomo retardado/adiantado Anáfase I	9,90%
Divisão assincrônica	62,16%
Falta de orientação das fibras do fuso	13,51%
Número de células anormais	111
Total de células analisadas	837
Porcentagem de células anormais	13,26 %

Os 8 (oito) indivíduos de *S. mombin* analisados apresentaram índice meiótico estatisticamente diferentes, onde o maior IM foi encontrado no indivíduo 3 (98,45%) e o menor no indivíduo 7 (95,30%). Apesar de haver diferenças estatísticas entre os indivíduos, a análise dos produtos pós-meióticos indicou que o nível de irregularidade meiótica para a espécie é baixo. A média do IM para a espécie foi de 96,53% (Tabela 11). A anormalidade encontrada com maior frequência consistiu em tríades (Figura 7).

Tabela 11. Produtos pós-meióticos e índice meiótico (IM) observados em *S. mombin*

Indivíduo	Tétrades	Mônodos	Díades	Tríades	Políades	IM (%)
1	1.936	0	0	54	10	96,80 abc
2	1.960	0	0	30	10	98,00 ab
3	1.969	0	0	22	9	98,45 a
4	1.910	1	1	85	3	95,50 c
5	1.912	4	1	76	7	95,60 c
6	1.935	3	0	61	1	96,75 abc
7	1.906	19	0	53	22	95,30 c
8	1.916	6	0	77	1	95,85 bc
Total	15.444	33	2	458	63	16.000
Média	1.930,50	4,12	0,25	57,25	7,87	96,53
C.V. (%)	1,78					

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

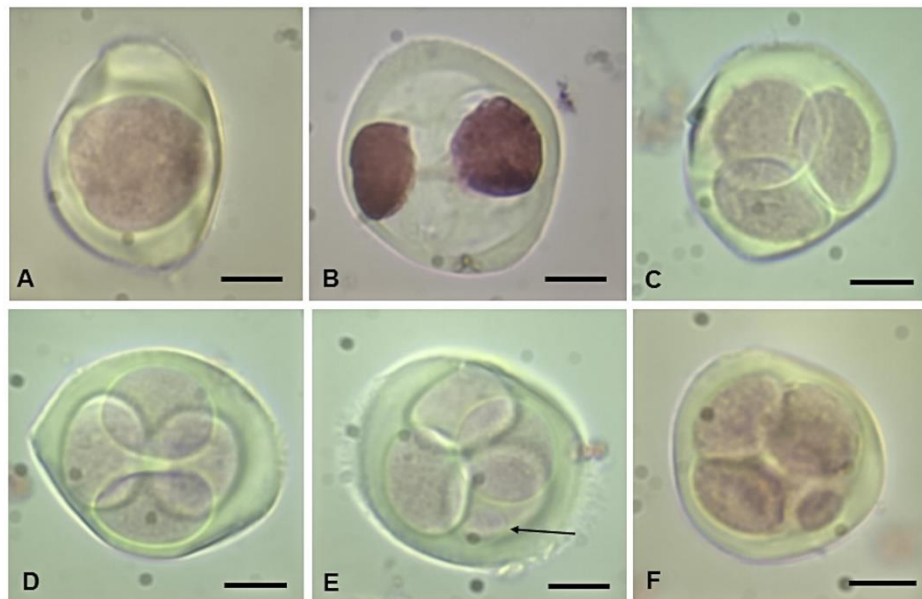


Figura 7. Produtos pós-meióticos observados em *S. mombin*. A) Mônade. B) Díade apresentando citomixia. C) Tríade. D) Tétrade normal. E e F) Políades apresentando uma das células reduzidas (seta). Barra = 20 μm .

A divisão celular de *S. mombin*, não apresentou sincrônia, pois foram encontradas diferentes fases da meiose em um mesmo botão floral, bem como produtos pós-meióticos junto a células em divisão. As células em divisão foram encontradas em botões florais com comprimento entre 1,17-1,45 mm (média = $1,32 \pm 0,08$ mm). Em botões com tamanhos inferiores não foi possível visualizar células em divisão. Botões florais com comprimento entre 1,22-1,51 mm (média: $1,38 \pm 0,08$ mm) apresentaram produtos pós-meióticos. Botões com comprimento superior apresentavam pólen.

Razão pólen/óvulo (P/O)

A razão pólen/óvulo de *S. mombin* foi de 2.772,62, indicando que a espécie apresenta sistema reprodutivo do tipo xenogâmico obrigatório de acordo com a classificação proposta por Cruden (1977).

DISCUSSÃO

Diagnose morfológica

Foram verificadas algumas variações morfológicas em *S. mombin* em relação as descrições disponíveis para a espécie. De acordo com Janick e Paull (2008) as características morfológicas mais variáveis de *S. mombin* são: divisão das folhas, as margens dos folhetos, presença ou ausência de veia intra-marginal, inflorescência, número de carpelos e forma e estrutura do endocarpo. Também são observadas variações na descrição da espécie com relação aos tipos florais (Lozano, 1986; Janick e Paull, 2008; Ramos, 2009; Carneiro e Martins, 2012; Mitchel e Daly, 2015).

Neste estudo observou-se que o número de lóculos do ovário nas flores bissexuais de *S. mombin*, variou de quatro e cinco, correspondendo com descrições realizadas por Ramos (2009), Lozano (1986) e Silva (2003).

A espécie foi descrita por Mitchell e Daly (2015) como sendo hermafrodita, mas neste estudo, verificou-se que a espécie, possui flores masculinas e bissexuais, caracterizando um sistema andromonóico. Esta característica havia sido sugerida por Carneiro e Martins (2012).

As flores estaminadas e bissexuais são descritas com cinco pétalas brancas, cinco sépalas esverdeadas, 10 estames livres com filetes brancos e anteras amarelas (Lozano, 1986; Janick e Paull, 2008; Ramos, 2009), assim como encontrado nesta descrição. Não foram observadas grandes variações em relação as características morfológicas de inflorescências, frutos e sementes.

As variações morfológicas descritas na literatura podem estar relacionadas a híbridos da espécie, pois a hibridação parece ser comum neste gênero, apesar de não serem comprovados todos os casos, e, a ocorrência de uma série de intermediários distintos entre *S. mombin* e várias outras espécies, sugere a possibilidade de esta espécie, ser propensa a hibridação (Mitchel e Daly, 2015). Neste caso, descrição morfológica adequada para a espécie pode auxiliar na identificação dos híbridos.

Caracterização morfológica do pólen

Os pólenes de *S. mombin* são 3-colporados, corroborando com a descrição para a família Anacardiaceae informada por Erdtman (1986). As medidas mensuradas

para eixo polar, diâmetro equatorial, nexina, sexina e exina, foram superiores às apresentadas por Mitchell e Daly (2015), para *S. mombin*, *S. purpurea* e *S. radlkoferi*.

A forma do tipo prolato corresponde, em parte, com resultados apresentados por Mitchell e Daly (2015), que descreveram os pólenes de *S. mombin* com formato prolato a subprolato. Segundo Moore e Webb (1978) citado por Martins et al. (2010) a forma do pólen pode variar consideravelmente dentro de um tipo de grão de pólen, ou até mesmo dentro de uma mesma espécie. Considerando que os estudos sobre a morfologia do pólen de *S. mombin* até então foram realizados em outros países, eram esperadas algumas diferenças relacionadas a provável diversidade genética da espécie, uma vez que de acordo com Souza et al. (2010), a morfometria polínica pode servir de parâmetro em estudos de diversidade genética.

A exina (sexina) dos grãos de pólen de *S. mombin* apresentam superfície microestriada e microreticulada quando vistos da região polar, assim como descrito por Oliveira et al. (1998) citado por Mitchell e Daly (2015). Esta característica está de acordo com a descrição de Müller (1979) e Erdtman (1986) para pólenes da família Anacardiaceae.

A descrição do pólen de *S. mombin* poderá auxiliar em estudos voltados para a Paleobotânica, Melissopalínologia, Paleoecologia, Zooecologia, Taxonomia vegetal entre outras (Takeda et al., 2001), devido fornecer informações básicas para diferencia-lo do pólen de outras espécies do gênero.

Viabilidade polínica via teste colorimétrico

A ausência de diferença estatística entre a viabilidade polínica dos tipos florais em *S. mombin*, comprova o sistema sexual andromonóico da espécie, descrito por Carneiro e Martins (2012) e encontrado nos estudos morfológicos do presente trabalho. Resultados semelhantes foram encontrados por Nadia et al. (2007) ao estimarem a viabilidade polínica de *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro), onde a viabilidade não diferiu entre as flores masculinas e hermafroditas.

A viabilidade polínica diferiu estatisticamente entre os indivíduos de *S. mombin*. De acordo com Santos Neto et al. (2006) a viabilidade do pólen pode ter variações consideráveis, tanto entre indivíduos de uma espécie, quanto entre amostras de um mesmo indivíduo. O período de florescimento (Dafni, 1992), a longevidade da flor (Hoffmann e Varassin, 2011), as alterações ambientais e as

diferenças genotípicas (Vasil, 1987) podem contribuir com essa variação. Dessa forma, para avaliar a fertilidade masculina é importante realizar estudos populacionais com amostras distintas (Hoffmann e Varassin, 2011), assim como realizado neste estudo.

A viabilidade polínica de *S. mombin* foi considerada alta, com valores superiores a 90% em todos os indivíduos avaliados. Conforme Souza et al. (2002), a viabilidade polínica acima de 70% pode ser considerada alta. Resultado semelhante foi obtido por Nadia et al. (2007) que encontraram viabilidade polínica superior a 90% em *Spondias tuberosa*.

Germinação do pólen *in vitro*

A porcentagem de germinação do pólen foi influenciada tanto pelos tratamentos quanto pelo tempo de incubação. Neste trabalho foram testadas diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico. A sacarose possui a função de fornecer energia para o desenvolvimento do tubo polínico e promover o equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o pólen (Stanley e Linskens, 1974). O ácido bórico estimula o crescimento do tubo polínico e evita que estes se rompam (Frazon et al., 2006).

O tratamento mais adequado para a germinação do pólen de *S. mombin* neste estudo (T8), continha ácido bórico e a maior concentração de sacarose testada (20%). Todos os tratamentos em que estavam presentes o ácido bórico ou a sacarose apresentaram média significativamente superior no comprimento do tubo polínico, em relação ao tratamento T1, que não possuía estes componentes, demonstrando que para *S. mombin* o ácido bórico e a sacarose melhoram as condições de germinação. De acordo com Patel e Mankad (2014) a germinação e o crescimento do tubo polínico aumentam com o acréscimo da concentração de ácido bórico e Almeida et al. (1987) afirma que a adição de ácido bórico aumenta a eficiência da sacarose, tanto na germinação quanto no crescimento do tubo polínico.

O tempo de incubação também influenciou significativamente a germinação do pólen, sendo que a porcentagem de pólenes germinados aumentou com o tempo de incubação. Castro et al. (1999) corrobora com este resultado afirmando que as maiores porcentagens de germinação de pólen *in vitro* são obtidas em períodos prolongados de incubação.

Os dados da viabilidade obtidos pela germinação *in vitro* confirmam os dados obtidos pelo teste colorimétrico. Em ambos os testes a viabilidade foi superior a 90%, levando em consideração o meio de cultura mais adequado entre os avaliados (T8).

Comportamento meiótico e índice meiótico

A partir da visualização das células em divisão, foi possível confirmar o número cromossômico de *S. mombin* ($2n = 2x = 30$), descrito por Macêdo (2011).

A anormalidade com maior frequência encontrada na meiose de *S. mombin* foi a divisão assincrônica (62,16%), verificada quando os dois núcleos na meiose II não alcançaram a mesma fase simultaneamente, encontrando-se em fases diferentes. O assincronismo durante a divisão perturba a segregação cromossômica e leva a formação de tríades (Souza e Pereira, 2011). A divisão assincrônica gera telófases com três núcleos na meiose II, porém não foi possível verificar esta irregularidade neste estudo, provavelmente devido à pouca quantidade de telófases encontradas, ou por algum mecanismo de reparo da própria célula como descrito por Damasceno Junior et al. (2010).

A falta de orientação das fibras do fuso também foi observada em *S. mombin* e se caracterizou por apresentar cromossomos alinhados na placa equatorial em forma de “T”, ou seja, em fuso transversal. Essa anormalidade foi descrita por Shamina (2005) que a considerou responsável pela segregação cromossômica tripolar. De acordo com Souza et al. (2014) a irregularidade na orientação das fibras do fuso pode prejudicar a segregação normal dos cromossomos, vindo a gerar produtos pós-meióticos anormais como: tríades, díades, mônades e políades. Dessa forma, as anormalidades verificadas na meiose de *S. mombin*, explicam os produtos pós-meióticos anormais encontrados.

Cromossomos fora da placa equatorial, retardatários e adiantados, foram observados na metáfase e anáfase I. Essa é a anormalidade mais frequente durante a divisão nuclear, de acordo com Pagliarini (2000), porém não ocorreram com grande frequência em *S. mombin* (14,41% e 9,90% respectivamente). As migrações precoces estão geralmente associadas a cromossomos univalentes formados no final da prófase I e pela terminação precoce dos quiasmas na metáfase I (Utsunomiya et al., 2002; Suaki et al., 2003). Independente da origem, essa anormalidade pode originar micronúcleos na meiose II (Pagliarini, 2000). Os micronúcleos também podem ser

observados nos produtos pós-meióticos e estão associados à formação de gametas desequilibrados e a consequente formação de gametas inviáveis (Battistin et al., 2006). No caso de *S. mombin*, não foram observados micronúcleos, mas verificou-se a presença de políades com uma célula bastante reduzida em relação às demais, que podem estar relacionadas com essa anormalidade da meiose.

Apesar das anormalidades meióticas influenciarem diretamente os produtos pós-meióticos (Horner e Palmer, 1995), as anormalidades observadas em *S. mombin* não prejudicaram acentuadamente a formação dos produtos pós-meióticos da espécie, uma vez que ela apresentou IM de 96,53% e segundo Love (1951), plantas que apresentam IM superior a 90% possuem alta estabilidade meiótica.

A fertilidade das plantas depende da regularidade meiótica durante a formação de grãos de pólen (Pereira et al., 2017). A regularidade e estabilidade meiótica de *S. mombin* está refletida na alta viabilidade polínica da espécie estimada tanto pelo teste colorimétrico, quanto pela germinação do pólen *in vitro*.

De acordo com Souza et al. 2006, *S. mombin* produz um grande número de flores, mas poucas são fertilizadas e geram frutos, em geral devido a fatores climáticos como: ventos, altas temperaturas, baixa umidade e fatores fisiológicos que causam abscisão das flores. Esses mesmos autores também verificaram que as flores fecundadas, raramente sofrem abscisão, ou seja, a fecundação garante a produção do fruto. Esta característica confirma a estabilidade meiótica e viabilidade polínica encontrada neste estudo, demonstrando que os pólenes que chegam ao estigma são capazes de fecundar o óvulo.

Mesmo diante da ausência de sincronia durante a divisão celular de *S. mombin*, foi possível estabelecer o comprimento mínimo e máximo do botão em relação as fases de divisão celular. Este tipo de informação é importante para direcionar a coleta de botões florais em estudos da formação e desenvolvimento do grão de pólen, e em pesquisas que envolvam a técnica de cultura de anteras (Souza et al., 2002) e consequentemente, auxiliam no melhoramento da espécie.

Razão pólen/óvulo (P/O)

Pela análise da razão P/O, *S. mombin* apresenta xenogamia obrigatória. Cruden (1977) definiu que espécies xenogâmicas apresentam protandria, são auto-incompatíveis e a maioria requer um polinizador. Esse resultado concorda com os

dados obtidos por Carneiro e Martins (2012), ao realizarem cruzamentos controlados em clones de *S. mombin*. Estes autores sugeriram que a espécie é auto-incompatível, protândrica, andromonóica e polinizada por abelhas. Já Oliveira et al. (2012), verificou que *S. mombin*, apesar de ser preferencialmente alógama, apresenta baixa taxa de autogamia. De acordo com Schifino-Wittmann e Dall'Agnol (2002), mesmo em espécies altamente auto-incompatíveis é possível a existência de autofecundação.

O conhecimento do sistema reprodutivo de *S. mombin* é fundamental para auxiliar programas de melhoramento genético, devido as particularidades reprodutivas da espécie, pois conforme Gomes et al. (2001), o conhecimento da estrutura floral e da biologia reprodutiva auxiliam na escolha da técnica adequada de emasculação e polinização, aumentando assim o sucesso dos cruzamentos.

CONCLUSÕES

Este trabalho definiu as características morfológicas principais da planta e do pólen de *S. mombin* com ocorrência na Amazônia brasileira, bem como os aspectos reprodutivos relacionados com a fertilidade da espécie. *S. mombin* é uma espécie andromonóica, apresenta xenogamia obrigatória e alta estabilidade e regularidade meiótica. Como reflexo da meiose regular, a viabilidade polínica encontrada nos dois métodos testados foi alta, sendo estas características importante para o sucesso reprodutivo da espécie.

Na avaliação da viabilidade polínica *in vitro* de *S. mombin* recomenda-se a utilização de meio de cultura líquido contendo 20% de sacarose e 50 mg mL⁻¹ ácido bórico com incubação de 24 a 36 horas em câmara B.O.D. com temperatura de 25 °C (± 2 °C) e no escuro.

Estas informações, auxiliarão na identificação da espécie e em estudos de áreas do conhecimento que necessitem de informações morfológicas, tais como a Paleobotânica, Paleoecologia, taxonomia vegetal, entre outras. Também poderão ser utilizadas na implantação e manutenção de cultivos e programas de melhoramento que envolvam a espécie, pois facilitarão a escolha de indivíduos adequados para a hibridação, seja ela inter ou intraespecífica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, 55: 13-18, 1980.
- ALMEIDA, F. C. G.; SILVA, J. F.; ALVES, J. F.; SILVA, F. P.; ALMEIDA, F. A. G. Estudo da germinação do pólen do algodão, *Gossypium hirsutum* L. *in vitro*: II - efeitos do ácido bórico e do sulfato de manganês. **Ciência Agrônômica**, 18: 117-123, 1987.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, 22: 711-728, 2013.
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999. 433p.
- BARTH, O. M. Catálogo sistemático dos polens das plantas arbóreas do Brasil Meridional – Glossário Palinológico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 63: 133-162, 1965.
- BATTISTIN, A.; CONTERATO, I. F.; PEREIRA, G. M.; PEREIRA, B. L.; DA SILVA, M. F. Biologia floral, microsporogênese e número cromossômico em cinco espécies de plantas utilizadas na medicina popular no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8: 56-62, 2006.
- CARNEIRO, L. T.; MARTINS, C. F. Africanized honey bees pollinate and preempt the pollen of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) flowers. **Apidologie**, 43: 474-486, 2012.
- CASSIMIRO, C. M.; MACÊDO, L. S.; MENINO, I. B. Avaliação de acessos de cajazeira (*Spondias mombin*) no Banco Ativo de Germoplasma da Emepa, PB. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, 3: 01-06, 2009.
- CASTRO, J. S.; BARRALES, L. V.; PEÑA, I. R. Efecto de la temperatura y tiempo de incubacion en la germinacion del polen *in vitro*, de cinco cultivares de almendro (*Prunus dulcis* (Mill) Webb). **Ciencia e Investigacion Agraria**, 26: 61-66, 1999.
- CHAGAS, E. A.; BARBOSA, W.; PIO, R.; DALL'ORTO, F. A. C.; TIZATO, L. H. G.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; SCARPARE FILHO, J. A. Germinação *in vitro* de pólen de *Prunus persica* (L.) Batsch *vulgaris*. **Bioscience Journal**, 25: 8-14, 2009.
- CRUDEN, R. W., Pollen-ovulo ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, 31: 32-46, 1977.
- CRUZ, C. D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, 35: 271-276, 2013.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1992. 250p.

DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; FREITAS NETO, M.; PEREIRA, M. G. Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. **Caryologia**, 63: 229-236, 2010.

ERDTMAN, G. **An introduction to pollen analysis**. Waltham, CBC, 1943. 240p.

ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy. III. Morina L. with an addition on pollenmorphological terminology. **Svensk Botanisk Tidskr**, 39: 279-285, 1945.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperm**. 3° ed. Leiden: EJB, 1986. 553p.

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1989. 62p.

FRAZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B.; WAGNER JUNIOR, A. Germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* BERG). **Revista Ceres**, 53: 129-134, 2006.

GOMES, J.E.; PAVANI, M.C.M.D.; PERECIN, D.; MARTINS, A.B.G. Morfologia floral e biologia reprodutiva de genótipos de aceroleira. **Scientia Agrícola**, 58: 519-523, 2001.

GUERRA, M., SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. 1° ed. Ribeirão Preto, FUNPEC, 2002. 131p.

HOFFMANN, G. M.; VARASSIN, I. G. Variação da viabilidade polínica em *Tibouchina* (Melastomataceae). **Rodriguésia**, 62: 223-228, 2011.

HORNER, H. T.; PALMER, R. G. Mechanisms of genic male sterility. **Crop Science**, 35: 1527-1535, 1995.

JANICK, J.; PAULL, R. E. **The Encyclopedia of fruit and nuts**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. 180p.

JUSTINIANO, M. J.; FREDERICKSEN, T. S.; NASH, D. **Ecología y silvicultura de especies menos conocidas – azúcaró *Spondias mombin* L., Anacardiaceae**. Santa Cruz: Editora El País, 2001. 43p.

KARSBURG, I. V.; BATTISTIN, A. Meiose e número cromossômico de cinco espécies da família Urticaceae do Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, 4: 47-60, 2006.

LIRA, G. **Conhecendo o Estado de Mato Grosso – IV Microrregião de Alta Floresta**, Mato Grosso, 2011. 38p.

LOVE, R. M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, 43: 72-76, 1951.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368p.

LOZANO, N. B. Contribucion al estudio de la anatomia floral y de la polinizacion del jobo (*Spondias mombin* L.). **Caldasia**, 15: 369-380, 1986a.

LOZANO, N. B. Desarrollo y anatomia del fruto del jobo (*Spondias mombin* L.). **Caldasia**, 14: 465-490, 1986b.

MACÊDO, F. I. A. **Identificação da Região Organizadora Nucleolar (NOR) e estabelecimento de protocolo de propagação *in vitro* de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae)**. Alta Floresta: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2011. 29p. (Monografia – Licenciatura Plena em Ciências Biológicas).

MARTINS, K. C.; SOUZA, S. A. M.; CUCHIARA, **Morfologia polínica: aplicações, estudos e metodologias**. 1º ed. Rio de Janeiro: CBJE, 2010. 75p.

MITCHELL, J. D.; DALY, D. C. A revision os *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the Neotropics. **Phytokeys**, 55: 1-92, 2015.

MÜLLER, J. Form and function in Angiosperm pollen. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 66: 593-632, 1979.

NADIA, T. L.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Polinização de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) e análise da partilha de polinizadores com *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), espécies frutíferas e endêmicas da caatinga. **Revista Brasileira de Botânica**, 30: 89-100, 2007.

NASCIMENTO, L. S.; BENEVENUTI, A. S.; LEITE, D. M.; SILVA, D. D.; MOURA, E. A.; MIRANDA, D.; MELLO, V.; DAHMER, N.; KARSBURG, I. V. Estimativa da viabilidade polínica e índice meiótico de *Delonix regia*. **Estudos**, 41: 83-88, 2014.

NOGUEIRA, P. V.; SILVA, D. F.; PIO, R.; SILVA, P. A. O.; BISO, R. B.; BALBI, R. V. Germinação do pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. **Bragantia**, 74: 9-15, 2015.

OLIVEIRA, M. O.; SOUZA, F. X.; FREITAS, B. M. Abelhas visitantes florais, eficiência polinizadora e requerimentos de polinização na cajazeira (*Spondias mombin*). **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, 10: 277-284, 2012.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, 23: 997-1002, 2000.

PATEL, R. G.; MANKAD, A. U. *In vitro* pollen germination – A Review. **International Journal of Science and Research**, 3:304-307, 2014.

PEREIRA, T. N. S.; GERONIMO, I. G. C.; ROSSI, A. A. B.; PEREIRA, M. G. *Passiflora cristalina* and *Passiflora miniata*: meiotic characterization of two wild species for use in breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 17: 267-273, 2017.

PINTO, W. S.; DANTAS, A. C. V. L.; FONSECA, A. A. O.; LEDO, C. A. DA S.; JESUS, S. C. DE; CALAFANGE, P. L. P.; ANDRADE, E. M. Caracterização física, físico-química e química de frutos de genótipos de cajazeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 38: 1059-1066, 2003.

PIO, L. A. S.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M.; RAMOS, J. D.; ARAÚJO, A. G. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, 10: 293-296, 2004.

PUNT, W.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology**, 143: 1- 81, 2007.

RADFORD, A. E.; DICKISON, W. D.; MASSEY, J. R.; BELL, C. R. **Vascular plant systematics**. New York, Harper e Row, 1974.

REIS, R. V.; MORAIS-LINO, L. S.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S.; VIANA, A. P. Variabilidade *in vitro* de grãos de pólen de bananeira sob diferentes concentrações de ácido bórico e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**, 35: 547-553, 2011.

RAMOS, M. C. **Ecologia da polinização de taperebá (*Spondias mombin* L., Anacardiaceae) em área de floresta secundária no município de Santo Antônio Do Tauá, Pará, Brasil**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2009. 64p. (Dissertação – Mestrado em Zoologia).

SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F. X. **Cajá (*Spondias mombin* L.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 42p.

SALGADO-LABOURIAU, M. L. **Contribuição à palinologia dos cerrados**. Rio de Janeiro: Clip Produções Gráficas e Jornalísticas, 1973. 293p.

SANTANA, F. F. **Caracterização de genótipos de cajazeira**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2010. 109p. (Tese – Doutorado em Agronomia).

SANTOS NETO, O. D.; KARSBURG, I. V.; YOSHITOME, M. Y. Variabilidade e germinabilidade polínica de populações de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, 4: 67-74, 2006.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, 32: 1083-1090, 2002.

SHAMINA, N. V. A catalogue of abnormalities in the division spindles of higher plants. **Cell Biology International**, 29: 384-391, 2005.

SILVA, A. L. G.; PINHEIRO, M. C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 1, p. 235-247, 2007.

SILVA, D. F.; PIO, R.; NOGUEIRA, P. V.; SILVA, P. A. O.; FIGUEIREDO, A. L. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. **Revista Ciência Agronômica**, 48: 365-373, 2017.

SOUZA, F. X. **Spondias agroindustriais e os seus métodos de propagação**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 1998. 26p.

SOUZA, F. X. **Crescimento e Desenvolvimento de Clones enxertados de Cajazeira na Chapada do Apodi, Ceará**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2005. 80 p. (Tese – Doutorado em agronomia).

SOUZA, F. X.; COSTA, J. T. A.; LIMA, R. N. Características morfológicas e fenológicas de clones de cajazeira cultivados na Chapara do Apódi, Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, 37: 208-215, 2006.

SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S.; ROSA, S. M. Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, 26: 175-184, 2003.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S. Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. **Revista Brasileira de Botânica**, 34: 63-72, 2011.

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 e Agrotecnologia**, 26: 1209-1217, 2002.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G.; BERNACCI, L. C.; SUDRÉ, C. P.; SILVA, L. C. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). **Caryologia**, 56: 161-169, 2014.

SOUZA, S. A. M. Morfometria polínica: uma contribuição aos estudos de diversidade genética. In: MARTINS, K. C.; SOUZA, S. A. M.; CUCHIARA (Eds). **Morfologia polínica: aplicações, estudos e metodologias**. 1º ed. Rio de Janeiro: CBJE, 2010. 75p.

SOUZA, V. C; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG II**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer, 1974. 172p.

SUAKI, R. M.; PAGLIARINI, M. S.; CECATTO, U. Microsporogenesis in Brazilian varieties of *Avena sativa* and *Avena strigosa* under agronomic forage selection. **Cytologia**, 68: 295-302, 2003.

TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V.; SOUZA, M. K.; GELINSKI, V. V. Catálogo polínico do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná – 2º parte. **Biological and Health Sciences**, 7: 7-18, 2001.

TARIFA, J. R. Alterações climáticas resultantes da ocupação agrícola no Brasil. **Revista do Departamento de Geografia**, 8: 15-27, 2011.

UTSUNOMIYA, K. S.; BIONE, N. C. P.; PAGLIARINI, M. S. How many different kinds of meiotic abnormalities could be found in a unique endogamous maize plant? **Cytologia**, 67: 169-176, 2002.

VASIL, I. K. Physiology and culture of pollen. *International Review of Cytology*, 107: 127-144, 1987.

ZAPPI, D. C.; SASAKI, D.; MILLIKEN, W.; IVA, J.; HENICKA, G. S.; BIGGS, N.; FRISBY, S. Plantas vasculares da região do Parque Estadual Cristalino, norte de Mato Grosso, Brasil. **Acta Amazônica**, 41: 29-38, 2011.

ZEN, D. M.; ACRA, L. A. Biologia floral e reprodutiva de *Agapanthus africanus* (L.) Hoffmanns (Liliaceae). **Estudos de Biologia**, 27: 35-39, 2005.

4.2 CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Spondias mombin* L. NO ESTADO DE MATO GROSSO

RESUMO

Os frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) vêm ganhando destaque para consumo *in natura* e na agroindústria devido sua qualidade sensorial e funcional. Existe pouco conhecimento sobre a diversidade genética desta espécie que auxiliem na implantação de cultivos, sendo a produção atual baseada no extrativismo. Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *S. mombin* no estado de Mato Grosso, por meio de marcadores moleculares microssatélites visando auxiliar na implementação de estratégias de conservação e coleta de recursos genéticos. Coletou-se material foliar de 139 indivíduos de *S. mombin*, distribuídos em dez municípios do estado de Mato Grosso, sendo cada área considerada uma população. O DNA foi extraído pelo método CTAB e as amplificações via PCR foram realizadas com sete *primers* microssatélites marcados com fluorescência. Os produtos de PCR foram separados por sequenciador automático e os eletroferogramas foram analisados no programa GeneMarker. Com base na matriz do tamanho dos fragmentos amplificados, foi caracterizada a diversidade genética por meio do número de alelos, heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), PIC, índice de fixação (f), alelos raros e exclusivos. A estrutura genética foi avaliada pela AMOVA, pelo dendrograma UPGMA e pela análise estatística bayesiana no programa Structure. Foram amplificados 46 alelos, com média de 6,6 alelos por locos. A H_e foi maior que H_o e o f foi positivo, indicando presença de endogamia. O PIC variou de 0,048 a 0,700 e apenas dois locos foram pouco informativos. Foram encontrados 27 alelos raros e 16 exclusivos nas populações, sendo que Alta Floresta e Cáceres continham a maior quantidade destes. O maior componente de variação foi intrapopulacional (90,64%), revelando que a maior diversidade está entre os indivíduos dentro das populações. A estimativa de fluxo gênico foi de 1,99, indicando que não há isolamento genético entre as populações e assim justificando o valor de F_{ST} encontrado (0,0963). As dez populações analisadas foram agrupadas em dois grupos, pelos dois métodos utilizados, sendo que Alta Floresta e Marcelândia constituíram um grupo isolado das demais populações. O teste de Mantel demonstrou que a estrutura genética não está relacionada com a distância geográfica entre as populações. Os sete locos microssatélites foram eficientes em acessar a diversidade genética de *S. mombin* e podem auxiliar estudos futuros. A diversidade genética de *S. mombin* é moderada, porém as populações analisadas devem ser conservadas *in situ* ou *ex situ*, devido a diversidade que apresentam e por serem fontes promissoras para coleta de germoplasma.

PALAVRAS-CHAVE: Cajazeira, Conservação, Microssatélite, Variabilidade genética.

DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE IN NATIVE POPULATIONS OF *Spondias mombin* L. IN MATO GROSSO STATE, BRAZIL

ABSTRACT

The yellow mombin fruits (*Spondias mombin* L.) have been gaining prominence for *in natura* consumption and agroindustry due to its sensorial and functional quality. There is little knowledge about the genetic diversity of this species that helps in the implantation of crops, being the current production based on extractivism. Thus, this study aimed to evaluate the diversity and genetic structure of natural populations of *S. mombin* in the state of Mato Grosso, through molecular microsatellite markers aiming to assist in the implementation of strategies for conservation and collection of genetic resources. Foliar material was collected from 139 individuals of *S. mombin*, distributed in 10 cities in the state of Mato Grosso, each area being considered as a population. The DNA was extracted by the CTAB method and PCR amplifications were performed with seven microsatellite primers labeled with fluorescence. The PCR products were separated by a sequencer and the electropherograms were analyzed in the GeneMarker program. Based on the amplified fragment size matrix, genetic diversity was characterized by the number of alleles, expected heterozygosity (H_e) and observed heterozygosity (H_o), PIC, fixation index (f), rare and exclusive alleles. The genetic structure was evaluated by the AMOVA, by the UPGMA dendrogram and by the Bayesian statistical analysis in the program Structure. A total of 46 alleles were amplified, with an average of 6.6 alleles per loci. H_e was higher than H_o and f was positive, indicating presence of inbreeding. The PIC ranged from 0.048 to 0.700 and only two loci were poorly informative. Twenty seven rare and sixteen unique alleles were found in the populations, with Alta Floresta and Cáceres containing the largest number of them. The largest component of variation was intrapopulation (90.64%), revealing that the greatest diversity is among the individuals within the populations. The gene flow estimate was 1.99, indicating that there is no genetic isolation between the populations and thus justifying the F_{ST} value found (0.0963). The 10 populations analyzed were grouped into two groups, by the two methods used, and Alta Floresta and Marcelândia constituted an isolated group of the other populations. The Mantel test demonstrated that the genetic structure is not related to the geographic distance between populations. The seven microsatellite loci were efficient in accessing the genetic diversity of *S. mombin* and could support future studies. The genetic diversity of *S. mombin* is moderate, but the populations analyzed must be conserved *in situ* or *ex situ*, due to their diversity and as they are promising sources for germplasm collection.

KEY WORDS: Yellow mombin, Conservation, Microsatellite, Genetic variability.

INTRODUÇÃO

O Brasil tem potencial para a produção de inúmeras variedades de frutas, graças a sua extensão territorial, variados tipos de solos e condições climáticas (Carvalho et al., 2017), características que fazem o país ser o terceiro maior produtor mundial de frutas, atrás apenas da China e da Índia (FAO, 2017). Além das condições adequadas para cultivo, o Brasil possui grande diversidade de frutas nativas, muitas delas ainda desconhecidas ou pouco exploradas comercialmente, mas que vêm apresentando crescente valor de mercado, dentre as quais encontra-se a cajazeira (*Spondias mombin* L.) (Freitas e Mattietto, 2013).

S. mombin é uma espécie frutífera arbórea pertencente à família Anacardiaceae. Seus frutos vêm ganhando destaque para o consumo *in natura* e na agroindústria (Silva, 2003), principalmente devido a sua qualidade sensorial (Pinto et al., 2003). Além disso, o fruto possui elevados teores de carotenoides, taninos e compostos fenólicos, sendo considerada uma fonte natural de antioxidantes (Mattietto et al., 2010; Freitas e Mattietto, 2013). O aumento da demanda por frutos gera interesse para o cultivo comercial, porém *S. mombin* é considerada uma espécie em fase de domesticação, sendo escassas as informações que auxiliem na implantação de pomares comerciais viáveis (Souza et al., 2006).

A domesticação e incorporação de espécies nativas em sistemas produtivos, bem como, o desenvolvimento de estratégias de conservação eficientes, necessitam de informações sobre a variação genética e do conhecimento da dimensão e da distribuição da variabilidade genética nas populações naturais (Costa et al., 2011).

O germoplasma de *Spondias* comercialmente importante, conservado tanto *in situ* quanto *ex situ* é bastante restrito e considerado vulnerável, sendo que sua preservação não acompanha a extensa erosão genética a que estas espécies foram submetidas, especialmente a fragmentação florestal e a exploração irracional dos recursos naturais (Silva Junior et al., 2004). A degradação ambiental, o desmatamento, a urbanização e o estresse ambiental, causam extinção de espécies de plantas e perda da variabilidade genética, podendo ser perdidas informações genéticas antes mesmo de serem conhecidas (Silva Junior et al., 2004; Govindaraj et al., 2015). Nesse sentido, avaliar o estado de conservação de uma espécie é imprescindível para nortear ações de conservação (Dias e Hoft, 2013).

S. mombin tem ampla distribuição, muitas vezes grandes populações e é cultivada até mesmo em países onde não é nativa, dessa forma, não é considerada ameaçada de extinção de acordo com os critérios e categorias da Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN), que classifica as espécies em alto risco de extinção global. Embora não haja risco atual de extinção, a diversidade genética da espécie pode ser comprometida devido a destruição de seus habitats (Mitchell e Daly, 2015).

O conhecimento da distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações naturais, permite um melhor entendimento de como a seleção está atuando em função da adaptabilidade, pois quanto maior a variabilidade genética existente na população, maior é a chance de perpetuação da espécie (Estopa et al., 2006). Além disso, a avaliação da estrutura genética populacional e níveis de diversidade genética são importantes para entender os efeitos da fragmentação ambiental e sua influência sobre a dinâmica populacional, ajudando a orientar programas de melhoramento e conservação de plantas (Sujii et al., 2015).

A diversidade genética pode ser verificada por meio de características morfológicas, agronômicas, moleculares, entre outras. Mas as técnicas moleculares possibilitam acelerar o processo de análise da variabilidade e seleção principalmente quando se trabalha com espécies perenes, pois não necessitam que a planta complete seu ciclo reprodutivo, não sofrem interferência do meio e, ainda, apresentam alta eficiência para discriminação de materiais (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A diversidade genética de *S. mombin* foi acessada por meio de isoenzimas (Gois et al., 2009), caracteres morfológicos do fruto (Silva et al., 2017), marcadores moleculares RAPD (Lima et al., 2011) e ISSR (Silva et al., 2016), porém não estão disponíveis estudos de diversidade e estrutura genética baseados em marcadores moleculares microssatélites.

Os microssatélites constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis hoje e apresentam vantagens sobre os demais marcadores baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) por serem codominantes, altamente reproduzíveis, requerer pequenas quantidades de DNA, ter alto poder de resolução e altos níveis de polimorfismo (Caixeta et al., 2016). A grande limitação destes marcadores está na necessidade de serem isolados e desenvolvidos especificamente para a espécie em estudo. Esse processo envolve um custo elevado

e é bastante demorado, porém essa desvantagem é compensada pela facilidade e eficiência em seu uso depois de pronto e pela possibilidade de transferência destes marcadores entre espécies próximas, ou seja, do mesmo gênero ou família (Barbará et al., 2007; Caixeta et al., 2016).

Diante do aumento da demanda por frutos de *S. mombin* e da falta de conhecimentos que auxiliem na implantação de futuros plantios comerciais, principalmente no que concerne ao entendimento da diversidade genética que a espécie possui, este trabalho objetivou avaliar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *S. mombin* no estado de Mato Grosso, por meio de marcadores moleculares microssatélites. Estas informações serão úteis para o delineamento de estratégias de conservação e coleta de recursos genéticos para enriquecimento de bancos de germoplasma.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado em 10 (dez) municípios do estado de Mato Grosso. Em cada município selecionou-se uma área de ocorrência natural da espécie. Cada área foi avaliada como uma população natural de *S. mombin*, totalizando dez populações (Figura 1). Foram amostrados 139 indivíduos distribuídos da seguinte forma: Alta Floresta (AF) 19 (desenove), Apicás (AP) 7 (sete), Cáceres (CC) 15 (quinze), Colíder (CL) 14 (quatorze), Marcelândia (MR) 18 (dezoito), Nobres (NB) 8 (oito), Nova Bandeirantes (NA) 18 (dezoito), Porto Estrela (PE) 15 (quinze), Tangará da Serra (TS) 17 (dezessete) e Vila Bela da Santíssima Trindade (VB) 8 (oito). Todas as áreas amostradas apresentavam forte influência antrópica, apresentando árvores isoladas em meio a matriz de pastagem, matriz urbana ou fragmentos florestais desconectados.

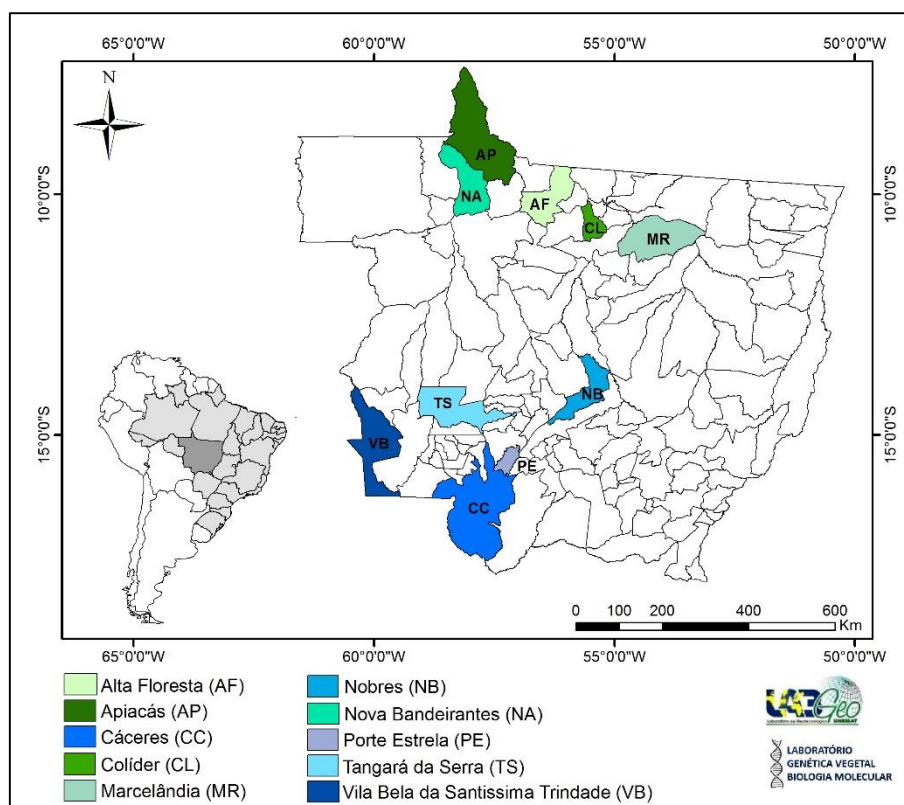


Figura 1. Localização geográfica das 10 (dez) populações naturais de *S. mombin*, no estado de Mato Grosso, Brasil. Fonte: a autora.

O estado de Mato Grosso apresenta dois tipos climáticos dependendo da região conforme a classificação proposta por Alvares et al. (2013). De acordo com essa classificação os municípios de: Cáceres, Nobres, Porto Estrela e Tangará da Serra, possuem clima tipo Aw, caracterizado por precipitação anual de 1.300 a 2.500mm, temperatura média de 24 °C a 26°C e inverno sem chuvas. Os municípios de: Alta Floresta, Apiacás, Colíder, Marcelândia, Nova Bandeirantes e Vila Bela da Santíssima Trindade possuem clima tipo Am, caracterizado por precipitação anual de 2.500 a 3.100mm, temperatura média superior a 26°C e estação seca bem definida.

As populações de *S. mombin* coletadas contemplam os três biomas existentes no estado de Mato Grosso: Amazônia, Pantanal e Cerrado. As populações Apiacás, Alta Floresta, Nova Bandeirantes, Marcelândia, Colíder, Vila Bela da Santíssima Trindade e Tangará da Serra, fazem parte do bioma Amazônia, as populações Nobres e Porto Estrela, fazem parte do Cerrado e a população Cáceres está localizada no Pantanal, de acordo com a delimitação dos biomas proposta pelo Ministério do Meio Ambiente (2018).

Coleta do material vegetal

A amostragem dos indivíduos das populações foi realizada de forma aleatória priorizando indivíduos em idade reprodutiva com maior espaçamento entre si e de acordo com a quantidade de indivíduos encontrado em cada localidade.

Coletou-se material foliar de cada indivíduo selecionado com auxílio de atiradeira manual e/ou podão, com preferência para folhas jovens, sem danos e sinais de doenças. O material foliar foi identificado ainda em campo e armazenado em sacos plásticos contendo sílica gel. Em seguida foi transportado para o laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular da Universidade do Estado de Mato Grosso, campus universitário de Alta Floresta, sendo armazenado em freezer (-20°C).

Material testemunha foi herborizado e depositado no Herbário da Amazônia Meridional – HERBAM, conforme metodologia de Fidalgo e Bonomi (1989) e sob os números de tombo: 15289, 15290, 15291, 15292 e 15293.

Extração do DNA

O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 100 mg do material foliar seguindo o método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987) com modificações

para a espécie: aumento da concentração de polivinilpirolidona (PVP) de 1% para 2% e de β -mercaptoetanol de 0,2% para 1,8% no tampão de extração; adição de 0,4% de proteinase K no tampão de extração; redução do tempo de incubação de 65°C por 60' para 30'.

Após lavagem em água corrente o material foliar foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. O pó resultante foi transferido para microtubos de 2mL, aos quais adicionou-se 800 μ L de tampão de extração (100mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 5% CTAB; 2% PVP e 1,8% β -mercaptoetanol). Após agitação de um minuto em vórtex os tubos foram incubados a 65°C por 30'. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 700 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v:v) em cada microtubo que foram agitados em vórtex e centrifugados a 12.000 rpm por 10'. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo ao qual adicionou-se novamente 700 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v:v). Os microtubos foram agitados em vórtex e centrifugados mais uma vez a 12.000 rpm por 10'. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5mL sendo em seguida adicionado 500 μ L de isopropanol gelado (-20°C). Os microtubos foram armazenados por 30 minutos em freezer a -20 °C para precipitação do DNA. Após esse período os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10' e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, uma vez com etanol 95% e seco à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspendido em 40 μ L de TE 0,1mM (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase na concentração de 40 μ g/ μ L e incubados em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 30'. Posteriormente as amostras de DNA foram armazenados em geladeira a 4 °C por 24h e depois em freezer (-20 °C).

A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e fotografado sob luz ultravioleta (Figura 2). A quantificação e verificação da pureza do DNA foram realizadas em espectrofotômetro de microvolume NanoDrop 2000 Thermo Scientific™. A partir da quantificação foram realizadas as diluições das amostras de DNA para a concentração de 20ng/ μ l para uso nas ampliações via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

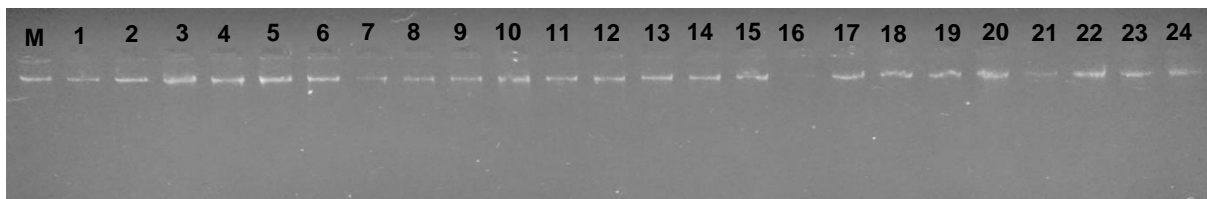


Figura 2. Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1% com amostras de DNA de 24 indivíduos de *S. mombin* extraído pelo método CTAB. M: marcador 100 ng.

Amplificação via PCR

As amplificações foram realizadas via PCR utilizando 7 (sete) pares de *primers* SSR desenvolvidos por Aguilar-Barajas et al. (2014) para *Spondias radlkoferi* e com transferência comprovada para *S. mombin*. O *primer* F de cada par foi marcado com fluorescência (Tabela 1).

As reações foram realizadas em um volume final de 10µL, contendo: 1,5µL de tampão 10X (100mM Tris-HCl pH 8,3; 500mM KCl); 1,5 mM MgCl₂; 0,2mM de cada dNTP; 0,5µM de cada primer (F e R); 0,12µL de Taq DNA polimerase (5U/µL); 20 ng de DNA e água ultrapura. As amplificações foram conduzidas em termociclador Aeris™ (Esco®) seguindo o programa descrito por Aguilar-Barajas et al. (2014): 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 15 (quinze) minutos; 35 (trinta e cinco) ciclos com desnaturação de 94°C por 30 (trinta) segundos, anelamento a 58-60°C (dependendo do primer utilizado) por 1 (um) minuto e 30 (trinta) segundos e extensão a 72°C por 1 (um) minuto; um ciclo de extensão final de 10 (dez) minutos a 72°C após os ciclos.

Tabela 1. Relação dos microssatélites utilizados na caracterização molecular de 10 populações de *S. mombin*

Primer	Motivo	Amplitude de amplificação (pb)	Ta (°C)	Fluorescência
SPO3	(TTAA) ₆	172-188	60	5' FAM
SPO12	(CTT) ₁₀	184-214	60	5' HEX
SPO18	(CT) ₉	319-333	58	5' NED
SPO21	(CT) ₆	303-335	58	5' NED
SPO22	(AT) ₉	186-244	58	5' FAM
SPO31	(AAT) ₉	222-240	58	5' NED
SPO40	(ATGT) ₇	202-240	58	5' HEX

Ta = Temperatura de anelamento.

A confirmação da amplificação dos produtos da PCR foi realizada a partir da aplicação de 3 µL da reação em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (10mg/mL) e visualizado em Transiluminador UVB LBT-20x20 STi Loccus Biotecnologia. As imagens do gel foram obtidas com fotodocumentador L-Pix STi Loccus Biotecnologia (Figura 3).

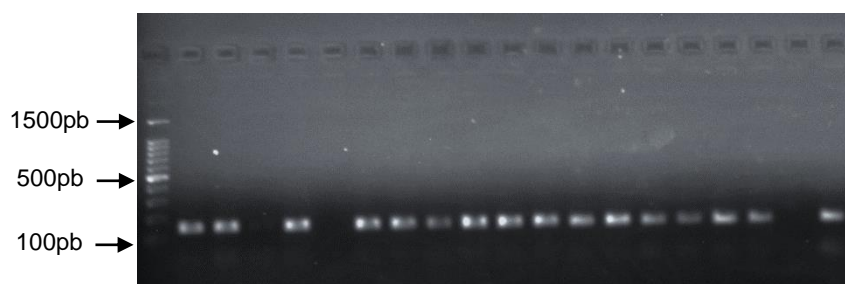


Figura 3. Confirmação da amplificação do primer SPO3 em 19 indivíduos de *S. mombin*. Gel de agarose 1,5%. Primeiro poço com marcador Ladder 100pb.

Após a confirmação da amplificação, as amostras foram encaminhadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco, Universidade de São Paulo, São Paulo (USP), para separação dos fragmentos em sequenciador automático modelo ABI 3730 (Applied Biosystems). A detecção automatizada dos microssatélites foi possível devido a presença do fluorocromo ligado à extremidade 5' do *primer* F. Esta técnica permite que mais de um loco seja analisado por corrida, dessa forma, foram montados conjuntos duplex e multiplex de locos marcados com fluorocromo diferente, conforme demonstrado na tabela 2. Foram utilizados três fluorocromos: FAM (emite fluorescência azul), HEX (verde) e NED (amarelo).

Tabela 2. Relação dos conjuntos duplex e multiplex utilizados nas amplificações dos 139 indivíduos de *S. mombin*

Conjunto multiplex 1	Conjunto duplex 1	Conjunto duplex 2
SPO12 (HEX)	SPO3 (FAM)	SPO21 (NED)
SPO18 (NED)	SPO31 (NED)	SPO40 (HEX)
SPO22 (FAM)		

A genotipagem foi realizada através da identificação do tamanho dos alelos amplificados para cada microssatélite. A leitura no sequenciador automático gerou arquivos contendo os picos de eletroferogramas, que foram visualizados e analisados com auxílio do programa computacional GeneMarker v. 2.6.3 Demo (Figura 4). A

estimativa de tamanho dos fragmentos amplificados (alelos) foi realizada através da comparação dos picos gerados pelos *primers* com os picos do marcador padrão GeneScan 500 (35 a 500 pb) marcado com o fluorocromo ROX (vermelho). O arredondamento dos tamanhos dos alelos foi realizado através do software AlleloBin (Prasanth et al., 2006).

As informações do tamanho dos fragmentos foram utilizadas para montagem da matriz com cada par de *primer* para cada indivíduo, que foi submetida a análises de diversidade e estrutura genética.

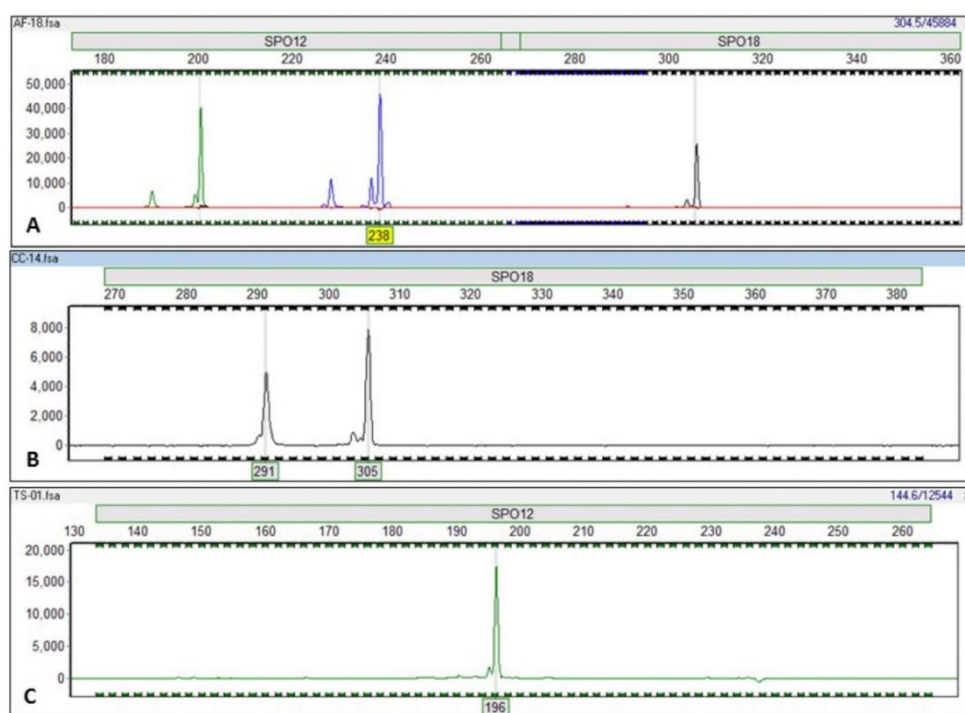


Figura 4. Eletroferogramas gerados pela leitura em sequenciador automático e visualizados no programa GeneMarker. A) leitura do conjunto multiplex com fluorocromos verde (HEX), azul (FAM) e preto (NED). B) indivíduo heterozigoto apresentando dois picos com tamanhos diferentes para o loco SPO18. C) indivíduo homozigoto, apresentando apenas um pico no loco SPO12.

Análise dos dados

A diversidade genética das populações de *S. mombin* foi caracterizada quanto ao número de alelos e número médio de alelos por locos (N_a) e heterozigosidade observada (H_o) e esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) e conteúdo de informação polimórfica (PIC). Também foi calculado o coeficiente de endogamia (f) de acordo com o método de Weir e Cockerham (1984) para cada população e para cada loco. Este índice varia de -1 a +1, onde valores positivos indicam excesso de

homozigotos e valores negativos, excesso de heterozigotos (Azevedo, 2007). Estas análises foram realizadas com auxílio do software Power Marker v. 3.25 (Liu e Mouse, 2005).

Obteve-se a frequência dos alelos na espécie, por meio do software Power Marker v. 3.25, sendo os gráficos montados no Excel. A frequência de alelos por locos dentro de cada população foi obtida com auxílio do suplemento do Excel GenAlEx 6.5® (Peakall e Smouse, 2012). Os alelos foram classificados de acordo com sua frequência e ocorrência. Quanto à frequência, foram considerados raros os alelos que possuíam frequência igual ou inferior a 0,05 e comuns os que possuíam frequência superior a 0,05 (Sebbenn, 2003). Em relação a ocorrência, os alelos foram considerados como amplamente distribuídos se fossem encontrados em mais de 25% das populações e de distribuição local caso fossem encontrados em menos de 25% das populações analisadas (Sebbenn, 2003). Considerou-se exclusivos, os alelos que ocorreram em apenas uma população, independente da frequência. Para cada população e para cada loco foram classificados os alelos raros e exclusivos. Para a espécie foi feita a classificação proposta por Sebbenn (2003) quanto aos alelos raros locais, raros amplamente distribuídos, comuns locais e comuns amplamente distribuídos.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi utilizada para inferir sobre a estrutura genética das populações por meio da decomposição total nas componentes entre e dentro de populações. Esta análise foi realizada conforme Excoffier et al. (1992) com auxílio do software Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2006).

O fluxo gênico (N_m) foi obtido conforme Nei (1987) no programa PopGene 1.32 (Yeh et al., 1999), através da equação: $N_m = 0,25 (1 - F_{ST}) / F_{ST}$.

A matriz dos valores de distância genética de Nei (1983) entre as populações gerada pelo programa Power Marker v.3.25, foi importada para o Genes (Cruz, 2013) para a construção do dendrograma utilizando o método UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic averages*). Optou-se por este método de agrupamento, devido ser o que melhor representou a variação genética em estudo, com base no valor do coeficiente de correlação cofenética (CCC), estresse e distorção.

O programa "Structure" (Pritchard et al., 2000), baseado em estatística bayesiana foi utilizado para inferir o número de grupos (k). Foram realizadas 20 (vinte) corridas para cada valor de K (1 a 13), 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 propostos por Pritchard e Wen (2004) e também o critério proposto por Evano et al. (2005), sendo os resultados enviados para o site Structure Harvester (Earl, 2012).

Para verificar se havia correlação entre a similaridade genética e a distância geográfica nas diferentes populações analisadas, foi realizado o teste de Mantel, com 10.000 permutações. Essa análise foi executada no programa Genes (Cruz, 2013).

RESULTADOS

Diversidade genética de *S. mombin*

Os sete microssatélites utilizados em *S. mombin* amplificaram um total de 46 (quarenta e seis) alelos, com variação de 5 (cinco) (SPO3 e SPO22) a 10 (dez) (SPO12) e média de 6,6 alelos por loco. O PIC variou de 0,048 (SPO21) a 0,700 (SPO40) com média de 0,317. A *He* foi maior do que *Ho* para seis locos, com exceção do loco SPO18, e apresentou médias de 0,335 e 0,300 respectivamente. O índice de fixação foi positivo e diferente de 0 (zero), indicando maior número de homozigotos nos locos e presença de endogamia. Apenas o loco SPO18 apresentou valor negativo.

Tabela 01. Estimativa da diversidade genética de *S. mombin*, obtidas em sete locos microssatélites

Locos	N	A	PIC	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>f</i>
SPO3	134	5	0,185	0,193	0,164	0,153
SPO12	135	10	0,250	0,256	0,178	0,310
SPO18	126	6	0,294	0,316	0,350	-0,103
SPO21	124	5	0,048	0,048	0,024	0,495
SPO22	137	7	0,470	0,500	0,445	0,111
SPO31	136	6	0,272	0,294	0,287	0,028
SPO40	99	7	0,700	0,742	0,646	0,134
Média	127,28	6,6	0,317	0,335	0,300	0,112

N = número de indivíduos utilizados na análise, com exceção dos dados perdidos; A = Número de alelos; *He* = Heterozigosidade esperada; *Ho* = Heterozigosidade observada; PIC = Conteúdo de informação polimórfica; *f* = índice de fixação (endogamia).

A média de alelos encontrados por população foi de 18,3, dentre as quais a população Cáceres (CC) apresentou o maior número de alelos (24). A *He* foi maior do que a *Ho* nas populações Alta Floresta (AF), Cáceres (CC), Porto Estrela (PE) e Tangará da Serra (TS). A população Apiacás (AP) apresentou maior *He* e *Ho* (0,486 e 0,833, respectivamente), enquanto a população Vila Bela (VB) apresentou a menor *He* (0,199) e a população Tangará da Serra (TS) a menor *Ho* (0,169). A maior quantidade de heterozigotos, estimada pelo índice de fixação, foi encontrada em Nobres (NB) e a maior quantidade de homozigotos na população Tangará da Serra (TS). Este resultado para TS é explicado também pelo menor valor de *Ho*. As populações PE e TS apresentaram maior taxa de endogamia em relação as demais populações (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativa da diversidade genética de populações de *S. mombin*, obtidas com sete locos microssatélites

Populações	N	A	PIC	He	Ho	f
AF	19	23	0,340	0,380	0,354	0,095
AP	7	17	0,368	0,486	0,833	-0,245
CC	15	24	0,326	0,359	0,349	0,073
CL	14	21	0,305	0,375	0,500	-0,076
MR	18	20	0,279	0,314	0,344	-0,064
NB	8	15	0,465	0,211	0,298	-0,351
NA	18	16	0,482	0,251	0,284	-0,091
PE	15	17	0,228	0,263	0,227	0,187
TS	17	16	0,224	0,250	0,169	0,357
VB	8	14	0,174	0,199	0,235	-0,115
Espécie	139	46	0,317	0,335	0,300	0,112

N = número de indivíduos utilizados na análise, com exceção dos dados perdidos; A = Número de alelos; He = Heterozigosidade esperada; Ho = Heterozigosidade observada; PIC = Conteúdo de informação polimórfica; f = índice de fixação (endogamia). Populações = AF: Alta Floresta; AP: Apiacás; CC: Cáceres; CL: Colíder; MR: Marcelândia; NB: Nobres; NA: Nova Bandeirantes; PE: Porto Estrela; TS: Tangará da Serra; VB: Vila Bela da Santíssima Trindade.

Seis dos sete locos tiveram distribuição menos uniforme com maior frequência de um alelo (Figura 5). O loco SPO40 apresentou distribuição mais uniforme dos alelos, o que explica o maior PIC.

Na avaliação da frequência alélica geral para as 10 (dez) populações, foram encontrados 10 (dez) alelos raros locais, 13 (treze) alelos comuns locais e 23 (vinte e três) alelos comuns amplamente distribuídos.

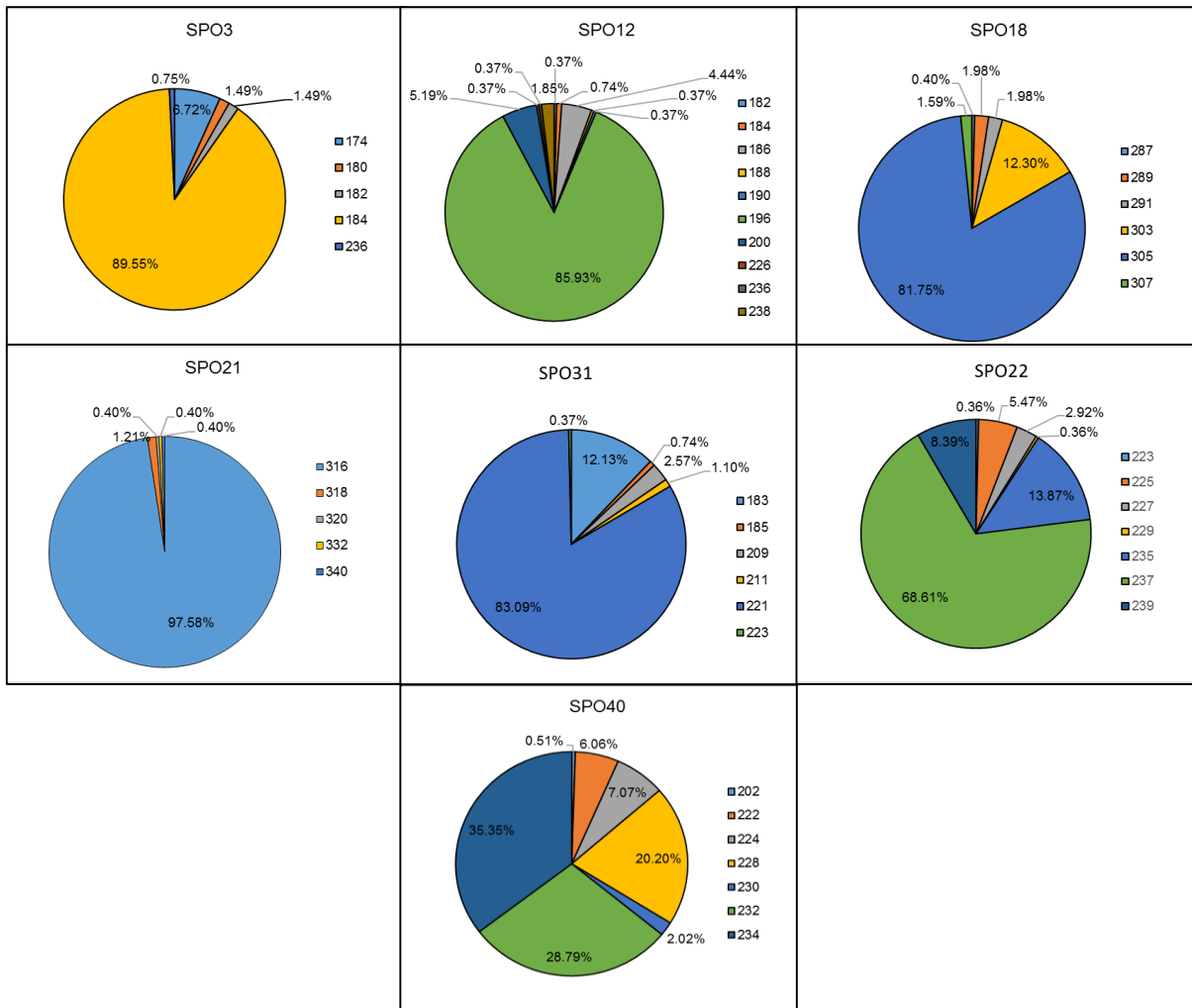


Figura 5. Distribuição da frequência alélica nos 7 (sete) locos microssatélites analisados nas 10 (dez) populações naturais de *S. mombin*.

Dentre os locos analisados, o que apresentou maior número de alelos raros e exclusivos foi o SPO12. O loco SPO21 apresentou o menor PIC (0,048), porém agregou quatro alelos raros e três exclusivos (Tabela 4).

Tabela 4. Alelos raros e exclusivos encontrados em cada loco microssatélite de *S. mombin*

Locos	Na	Alelos raros	Alelos exclusivos
SPO3	5	-	1
SPO12	10	7	5
SPO18	6	3	1
SPO21	5	4	3
SPO22	7	4	2
SPO31	6	2	2
SPO40	7	2	2
Total	46	22	16

Avaliando a frequência alélica por populações, foram encontrados 27 alelos raros (frequência <0,05), distribuídos em 8 (oito) das 10 (dez) populações de *S. mombin* analisadas. Em alguns casos o mesmo alelo era raro em populações diferentes. A população Cáceres (CC) apresentou o maior número de alelos raros (Tabela 3).

Além dos alelos raros, foram encontrados 16 alelos exclusivos, ou seja, que apareceram em apenas uma das 10 populações (Tabela 3). O fato do alelo ser raro em uma população, não significa que seja exclusivo ou vice-versa, uma vez que o alelo pode ser encontrado em mais de uma população, mas com baixa frequência, ou pode ser encontrado em apenas uma população, com frequência superior a 0,05. O maior número de alelos exclusivos foi encontrado na população Alta Floresta (AF).

Tabela 3. Alelos raros e exclusivos encontrados nas populações de *S. mombin* para os 7 (sete) locos microssatélites

Populações	Alelos raros	% Alelos raros	Alelos exclusivos	% Alelos exclusivos
AF	6	20,01	4	17,39
AP	-	-	2	11,76
CC	7	29,17	2	8,33
CL	3	14,28	3	14,28
MR	2	10,00	1	5%
NB	2	13,33	-	-
NA	2	12,5	-	-
PE	3	17,65	3	17,65
TS	2	12,5	1	6,25
VB	-	-	-	-
Total	27	-	16	-

Estrutura genética de populações naturais de *S. mombin*

A análise de variância molecular demonstrou que houve diferenciação genética significativa ($p < 0,000$) entre as populações e que o maior componente de variação encontra-se dentro das populações (90,64%) (Tabela 5). A estimativa de fluxo gênico foi de 1,99 indicando que não há isolamento genético entre as populações e assim justificando o valor de F_{ST} encontrado (0,0963).

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) das 10 (dez) populações de *S. mombin* estudadas a partir de 7 (sete) marcadores microsatélites

Fonte de Variação	GL	SQ	CV	VT (%)	Valor de p
Entre populações	9	31,686	0,112	9,36	<0.000
Dentro de populações	268	257,646	1,084	90,64	
Total	277	289,332	1,196		

Grau de Liberdade (GL), Soma dos Quadrados (SQ), Componente de Variância (CV), Variância Total (VT) e p são as probabilidades de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso. As probabilidades foram calculadas por 1.023 permutações ao acaso. $F_{ST} = 0,0963$.

O dendrograma UPGMA proporcionou a formação de dois grupos, sendo o primeiro grupo (GI) formado por 8 (oito) populações e o segundo grupo (GII) por 2 (duas) populações. As populações Alta Floresta (AF) e Marcelândia (MR) ficaram isoladas no GII (Figura 6).

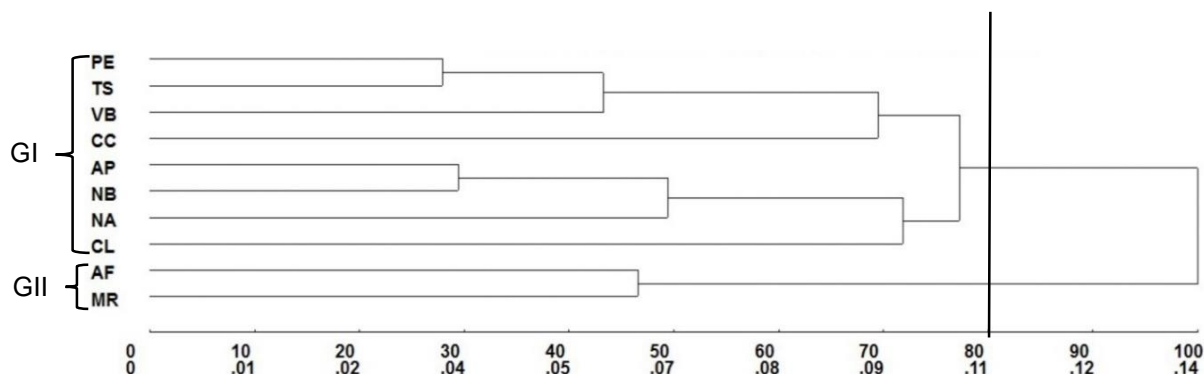


Figura 6. Dendrograma UPGMA, gerado a partir da matriz de distância genética de Nei (1983), com base nos dados de sete locos microsatélites para 10 (dez) populações naturais de *S. mombin*. CCC = 0,78; Distorção = 3,79%; Estresse = 19,47%.

A análise bayesiana obtida pelo “Structure”, agrupou os 139 indivíduos de *S. mombin* em 2 (dois) grupos ($k = 2$) (Figura 7).

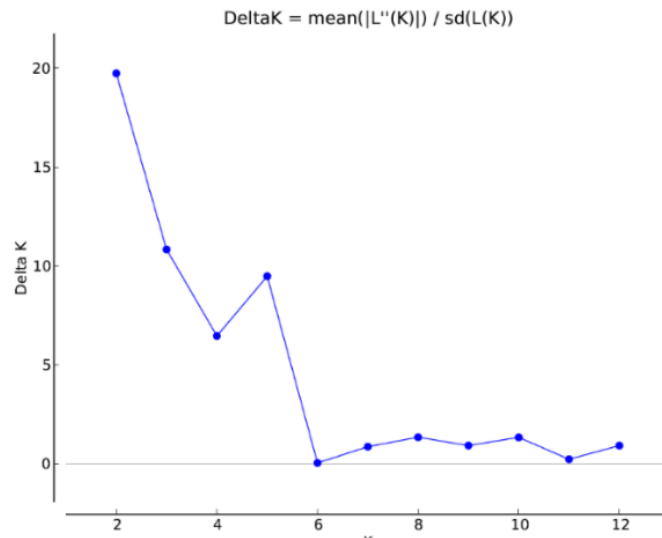


Figura 7. Estimativa do número de grupos (K) a partir de 20 corridas independentes para K = 1-13, que melhor se encaixa no conjunto de dados de *S. mombin*, conforme Evanno et al. (2005).

A contribuição de cada população para os grupos gerados pelo “Structure” pode ser verificada na figura 8. As populações Alta Floresta (AF) e Marcelândia (MR) apresentaram maior contribuição do grupo vermelho e o restante das populações apresentaram maior contribuição do grupo verde. Este agrupamento está de acordo com o dendrograma UPGMA, onde as populações Alta Floresta (AF) e Marcelândia (MR) são mais similares geneticamente formando um grupo separado das demais populações. Verifica-se que há indivíduos das populações Alta Floresta (AF) e Marcelândia (MR), com maior contribuição para o grupo verde, assim como indivíduos das outras populações apresentam contribuição maior para o grupo vermelho. Esta estrutura demonstra que a variação genética entre as populações é menor do que dentro das populações e concorda com o resultado da AMOVA.

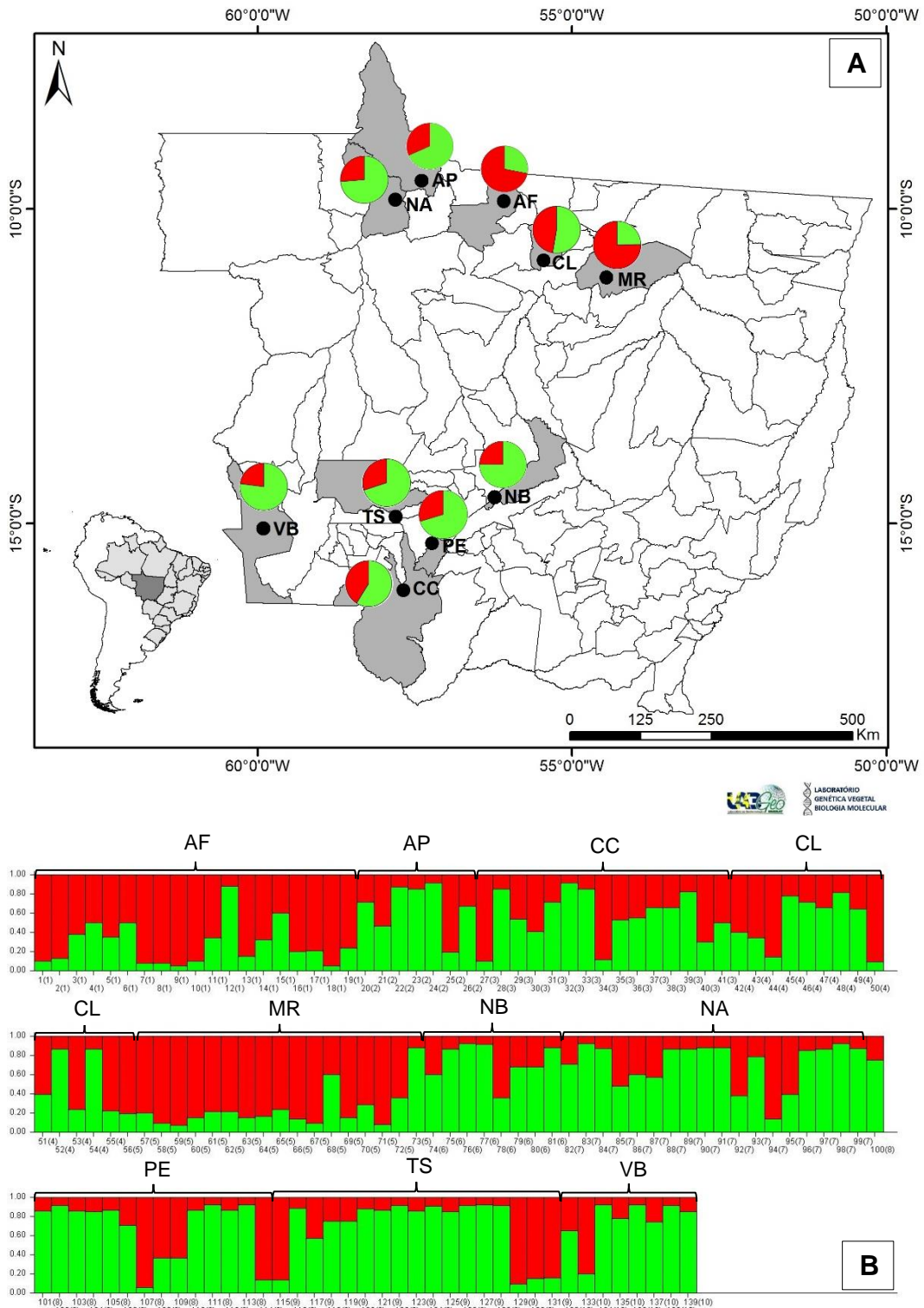


Figura 8. Análise de agrupamento e distribuição geográfica dos agrupamentos gerados pelo “Structure”. A) Cada população está representada por um gráfico, as cores indicam a proporção de contribuição de cada população para os grupos formados no “Structure” ($K = 2$). B) Distribuição dos dois grupos genéticos gerados pelo “Structure”. As linhas verticais ao longo do eixo x representam os indivíduos e os segmentos coloridos ao longo do eixo y demonstram o coeficiente de associação de cada indivíduo atribuído a cada um dos inferidos K. Verificar a codificação das populações na figura 1.

As populações mais similares geneticamente são Tangará da Serra (TS) e Porto Estrela (PE) e as menos similares são Colíder (CL) e Alta Floresta (AF). Enquanto que as mais próximas geograficamente são Apiacás (AP) e Nova Bandeirantes (NA) e as mais distantes são Vila Bela da Santíssima Trindade (VB) e Marcelândia (MR) (Tabela 6). Verifica-se, portanto, que a estrutura genética de *S. mombin* não é determinada pela estrutura geográfica, uma vez que as populações mais similares geneticamente não são as mais próximas geograficamente. Este resultado é suportado pelo teste de Mantel, que revelou correlação negativa (-0,158) e não significativa entre as matrizes de similaridade genética e distância geográfica. Para ilustrar melhor este resultado, pode-se citar o exemplo da população Alta Floresta (AF) que nas análises fica agrupada com a população MR que está mais distante geograficamente do que as populações Apiacás (AP), Colíder (CL) e Nova Bandeirantes (NA).

Tabela 6. Matriz de distância genética* de Nei (1983) e de distâncias geográficas** (Km) entre as 10 (dez) populações naturais de *S. mombin*

	AF	AP	CC	CL	MR	NB	NA	PE	TS	VB
AF	----	0.146	0.147	0.188	0.066	0.128	0.095	0.150	0.131	0.167
AP	154	----	0.134	0.116	0.148	0.042	0.083	0.140	0.126	0.098
CC	705	718	----	0.107	0.146	0.096	0.101	0.093	0.098	0.105
CL	126	253	632	----	0.168	0.079	0.112	0.164	0.156	0.093
MR	220	359	655	102	----	0.107	0.087	0.170	0.136	0.163
NB	528	570	225	432	439	----	0.058	0.105	0.100	0.069
NA	192	62	677	270	376	540	----	0.096	0.074	0.101
PE	650	674	68	570	588	157	630	----	0.040	0.068
TS	588	584	130	524	560	174	544	104	----	0.055
VB	714	680	261	685	733	403	620	298	231	----

*Distância genética acima da diagonal. **Distâncias geográficas, abaixo da diagonal. Populações = AF: Alta Floresta; AP: Apiacás; CC: Cáceres; CL: Colíder; MR: Marcelândia; NB: Nobres; NA: Nova Bandeirantes; PE: Porto Estrela; TS: Tangará da Serra; VB: Vila Bela da Santíssima Trindade.

DISCUSSÃO

Diversidade genética de *S. mombin*

O número médio de alelos por loco encontrado neste estudo foi superior ao encontrado por Aguilar-Barajas et al. (2014) para os mesmos locos em 20 indivíduos de *S. mombin* no México. Estes autores testaram a transferência dos *primers* SSR desenvolvidos para *Spondias radlkoferi* em *S. mombin* e encontraram média de 6,4 alelos por locos, com variação de 5 (cinco) a 7 (sete) alelos por loco.

A heterozigidade esperada e observada foram inferiores ao encontrado por Aguilar-Barajas et al. (2014) para os mesmos locos. *He* e *Ho* também foram inferiores ao encontrado por Silva et al. (2009) ao analisar por meio de isoenzimas, a diversidade genética de quatro populações de *S. mombin* na Zona da Mata de Pernambuco. Outros estudos de diversidade genética com base em marcadores microssatélites, em espécies arbóreas tropicais com predominância de fecundação cruzada, também demonstraram valores superiores de *He* e *Ho* (Carvalho et al., 2010; Vieira, 2014; Varella et al., 2016).

A taxa de heterozigidade menor encontrada para *S. mombin* em relação a outras espécies arbóreas tropicais, pode estar relacionada com a fragmentação da floresta e com a redução do tamanho das populações. Esses fatores podem afetar processos genéticos como: deriva genética, fluxo de genes, seleção, sistemas de reprodução, além de causar isolamento reprodutivo, aumento da estrutura espacial dentro da população e conseqüentemente a perda de variabilidade genética (Young et al., 1996; Carvalho et al., 2010). Todas as populações de *S. mombin* analisadas neste estudo encontrava-se em áreas com forte ação antrópica e fragmentadas, sendo que alguns indivíduos localizavam-se isolados em uma matriz de pastagem ou matriz urbana.

A frequência de heterozigotos na população também é uma medida de diversidade (Nei, 1973), sendo que, um heterozigoto apresenta variabilidade devido carregar 2 (dois) alelos diferentes no mesmo locos. *Ho*, foi superior a *He* em 6 (seis) das 10 (dez) populações e quando *Ho* é maior que *He*, entende-se que há mais heterozigotos na população do que o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Gois et al., 2009).

O valor do índice de fixação positivo nos locos indica maior quantidade de homozigotos e presença de endogamia, ainda que em baixa proporção. Quatro populações apresentaram endogamia, expressa pelo valor positivo de f . A endogamia é consequência da redução do número de indivíduos reprodutivos na população, que induz a autofecundação e os cruzamentos entre indivíduos aparentados (Young et al., 1996; Reis et al., 2011). Como *S. mombin* é uma espécie preferencialmente alógama, com baixa taxa de autofecundação e com tendência a auto-incompatibilidade (Carneiro e Martins, 2012; Oliveira et al., 2012), é pouco provável que apenas a autofecundação seja responsável pela endogamia, podendo ser causada pelos cruzamentos entre indivíduos aparentados ou por acasalamentos preferenciais.

Um dos fatores que pode favorecer o cruzamento entre indivíduos aparentados e dessa forma, aumentar o nível de endogamia e diminuir a quantidade de heterozigotos, é a forma de dispersão de sementes. A forma como as sementes são dispersas, pode favorecer a formação de uma estrutura genética espacial, com indivíduos aparentados mais próximos (Sobierajski et al., 2006). Verificou-se durante as coletas, que embaixo dos indivíduos havia grande quantidade de endocarpos, bem como indivíduos jovens de *S. mombin* em um raio próximo. As cutias, antas, morcegos e macacos são considerados dispersores de sementes de *S. mombin* (Smythe, 1970; Heithaus et al., 1975; Henry et al., 2000), porém não foram realizados estudos sobre a distância de dispersão das sementes realizada por estes animais. Neste caso, se eles consomem a polpa e deixam o endocarpo próximo a árvore mãe e as sementes germinam dando origem a um novo indivíduo, forma-se uma estrutura genética espacial que possibilita o cruzamento entre indivíduos aparentados aumentando a endogamia. Além disso, existe a possibilidade de sementes germinarem de frutos que caem próximos à planta mãe, sem a necessidade de um dispersor interferir no processo.

Outro fator que pode contribuir é a polinização ou os agentes polinizadores da espécie. Turner et al. (1982) verificou que quando os polinizadores realizam a polinização preferencialmente em plantas vizinhas ou próximas, são encontrados altos níveis de endogamia, mesmo em plantas que apresentam auto-incompatibilidade. A polinização de *S. mombin* é realizada por pequenas abelhas, principalmente *Apis mellifera* e *Scaptotrigona tubiba* (Oliveira et al., 2012; Carneiro e Martins, 2012). Este tipo de abelha calcula gastos de energia para a coleta de recursos, dessa forma, opta

por deslocamentos mais curtos em busca de economia energética (Bizotto e Santos, 2015). Dessa forma, os polinizadores podem preferir forragear plantas próximas para não elevar os gastos de energia, auxiliando assim na fecundação entre indivíduos aparentados.

A média do PIC demonstrou que os locos analisados foram mediamente informativos, sendo 2 (dois) pouco informativos ($PIC < 0,25$), 4 (quatro) mediamente informativos (PIC variando entre 0,25 e 0,50) e 1 (um) altamente informativo ($PIC > 0,50$), conforme a classificação de Botstein et al. (1980). Apesar de não serem todos altamente informativos, foi possível, através destes locos, verificar a diversidade genética de *S. mombin* e encontrar alelos raros e exclusivos.

As populações Cáceres (CC) e Alta Floresta (AF) apresentaram a maior quantidade de alelos raros e merecem mais atenção quanto a conservação, uma vez que de acordo com Raposo et al. (2007), populações que apresentam maior proporção de alelos raros são mais sensíveis a perda da diversidade genética decorrente da deriva genética.

Sete populações apresentaram alelos exclusivos, sendo que a população AF agregou o maior número deles. A presença de alelos exclusivos pode indicar populações e áreas prioritárias para a conservação, pois auxiliam na maximização da proteção da diversidade genética (Montagna et al., 2012). Sendo assim, a população AF é prioritária para a conservação, por apresentar maior número de alelos raros e exclusivos.

A distribuição desuniforme dos alelos nos locos indica a presença de alelos comuns, amplamente distribuídos e compartilhados por todas as populações. A maioria dos alelos encontrados em *S. mombin*, foi classificada como comuns e amplamente dispersos. Também foram encontrados 13 alelos comuns com distribuição local, esses alelos são importantes para a conservação da espécie porque, supostamente, são os que garantem a adaptação à ambientes específicos e dessa forma, podem ter grande valor em casos de mudanças ambientais bruscas ou mesmo como fonte de variabilidade genética para resistência ao ataque de pragas e doenças (Sebbenn, 2003).

Estrutura genética de populações naturais de *S. mombin*

O maior componente de variação genética em *S. mombin* foi intrapopulacional. Este resultado é similar ao encontrado por Silva et al. (2016) em um estudo com 3 (três) populações naturais de *S. mombin* usando marcadores moleculares ISSR, onde a maior variação estava dentro das populações. Os padrões de distribuição da variabilidade genética estão relacionados com o sistema reprodutivo das espécies (Hamrick, 1982), sendo que espécies alógamas possuem alta diversidade genética dentro de populações e baixa diferenciação genética entre populações (Hamrick e Godt, 1996). Dessa forma, este resultado era esperado para a espécie, uma vez que *S. mombin* é preferencialmente alógama e apresenta tendência a auto-incompatibilidade (Carneiro e Martins, 2012).

O dendrograma UPGMA demonstrou que as populações formaram 2 (dois) grupos, um com as populações MR e AF e outro contendo as demais populações. A correlação cofenética mostrou uma associação de 78% (CCC = 0,78) entre as distâncias obtidas na matriz de dissimilaridade e a matriz cofenética. Segundo Rohlf (1970), valores de CCC maiores que 0,70 refletem boa concordância entre matrizes. Os dados do dendrograma foram confirmados pelo agrupamento do Structure, onde AF e MR novamente apresentaram-se no mesmo grupo.

A distância geográfica das populações não está relacionada com a similaridade genética entre as mesmas, o que pôde ser constatado por meio do teste de Mantel. Este resultado é similar ao encontrado por Cota et al. (2017) em populações naturais de *Anacardium humile* (Anacardiaceae) no cerrado de Minas Gerais, onde as populações não apresentaram estruturação genética relacionada com padrões geográficos. Estes autores também encontraram níveis elevados de endogamia e atribuíram a diferenciação genética entre as populações à presença de estrutura genética intrapopulacional.

Apesar da ausência de relação entre a estrutura genética e as distâncias geográficas para a espécie, a presença de alelos exclusivos nas populações pode indicar que esse processo de diferenciação está em andamento e que o tempo e os mecanismos evolutivos ainda não foram suficientes para diferenciar as populações a níveis geográficos, além disso, a espécie apresenta alelos com alta frequência, que diminuem a diferenciação entre as populações.

O valor do fluxo gênico revelou que as populações não estão isoladas geneticamente, uma vez que foi superior a 1 (um). De acordo com Wright (1931), valores de Nm superiores a 1 (um) são suficientes para evitar a perda aleatória de alelos dentro da população. Porém, essa informação deve ser avaliada com cuidado, uma vez que, devido a distância elevada entre a maioria das populações o fluxo de genes atual via pólen ou dispersão de sementes é pouco provável. Dessa forma, este valor pode se referir ao fluxo gênico histórico entre as populações ao longo do tempo e durante a dispersão da espécie pelo estado, que ajudou a tornar as frequências alélicas similares entre elas.

Implicações para conservação

A conservação da diversidade genética é uma preocupação fundamental na biologia da conservação, pois fornece matéria-prima para a mudança evolutiva e, portanto, é importante para manter a capacidade de uma população responder e adaptar-se às mudanças ambientais (Aguilar et al., 2008; Chaves et al., 2011). As análises com base nos 7 (sete) locos microssatélites demonstraram que há diversidade genética entre as populações de *S. mombin*. A menor taxa de heterozigotos encontrada na espécie, em relação a outras espécies tropicais com as mesmas características reprodutivas, indica que ela vem sofrendo perda de variabilidade genética, uma vez que por ser alógama e preferencialmente auto-incompatível, era esperado valor negativo para o índice de fixação.

Os recursos genéticos de *S. mombin* são importantes e sua caracterização pode dar suporte para sua exploração e conservação (Silva et al., 2009). A conservação dos recursos genéticos, tanto *in situ* quanto *ex situ*, exige estudos genéticos para maximizar a eficiência no planejamento da conservação, especialmente quando se trata de espécies arbóreas (Clement et al., 2009). As análises dos locos microssatélites demonstraram a existência de alelos exclusivos nas populações de *S. mombin* que auxiliam na maximização da proteção da diversidade genética. Quando se identificam alelos raros e exclusivos na população, estratégias para a conservação *in situ* e *ex situ* são fundamentais para conservar e garantir a manutenção da variabilidade genética da espécie (Guidugli, 2011). Nesse sentido, apesar de ser extremamente importante que todas as populações sejam conservadas

por apresentarem alta diversidade intrapopulacional, Alta Floresta (AF) e Cáceres (CC) são consideradas prioritárias para conservação.

CONCLUSÃO

As populações de *S. mombin* do estado de Mato Grosso apresentam diversidade genética e são fontes promissoras de recursos genéticos que podem ser selecionados, coletados e propagados, tais como, os alelos comuns locais que indicam adaptação a ambientes específicos.

A diversidade genética é maior a nível intrapopulacional, dessa forma, propõem-se a conservação *in situ* ou *ex situ* de indivíduos de cada uma das populações estudadas, a fim de possibilitar a manutenção da diversidade genética e a conservação efetiva de *S. mombin*.

As populações Alta Floresta (AF) e Cáceres (CC) são consideradas prioritárias para a conservação, por apresentarem maior quantidade de alelos raros e exclusivos.

O conhecimento sobre a diversidade genética de *S. mombin* auxiliará na implementação de estratégias de conservação, pois revela como essa diversidade está distribuída no espaço e sinaliza como a perda da variabilidade genética vem ocorrendo na espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-BARAJAS, E.; SORK, V. L.; GONZÁLEZ-ZAMORA, A.; ROCHA-RAMÍREZ, V.; ARROYO-RODRÍGUEZ, V.; OYAMA, K. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Spondias Radlkoferi* (Anacardiaceae). **Applications in Plant Sciences**, 11: 1-3, 2014.
- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; AHSWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, 17: 5177-5188, 2008.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, 22: 711-728, 2013.
- AZEVEDO, V. C. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae**. Brasília: Universidade de Brasília, 2007. 207p. (Tese - Doutorado em Biologia Molecular).
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, 16: 3759–3767, 2007.
- BIZOTTO, L. A.; SANTOS, R. S. S. Dinâmica de voo e coleta de recursos por *Apis mellifera* em pomar de macieira. **Enciclopédia Biosfera**, 11: 3499-3506, 2015.
- 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.
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (eds). **Marcadores moleculares**. Viçosa, UFV, 2016. 315p.
- CARNEIRO, L. T.; MARTINS, C. F. Africanized honey bees pollinate and preempt the pollen of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) flowers. **Apidologie**, 43: 474-486, 2012.
- CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; MORAES, M. L. T.; STRANGHETTI, V.; ALZATE-MARIN, 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.
- CARVALHO, C.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; TREICHEL, M.; FILTER, C. F. **Anuário brasileiro da fruticultura 2017**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2017. 88p.

CHAVES, L. J.; VENKOVSKY, R.; SILVA, R. S. M.; TELLES, M. P. C.; ZUCCHI, M. I.; COELHO, A. S. G. Estimating inbreeding depression in natural plant populations using quantitative and molecular data. **Conservation Genetics**, 12: 569-576, 2011.

CLEMENT, C. R.; BORÉM, A.; LOPES, M. T. G. Da domesticação ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Eds.). **Domesticação e Melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa: Suprema Editora, 2009. 486p.

COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, 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.

COTA, L.G.; MOREIRA, P. A.; BRANDÃO, M. M.; ROYO, V. A.; MELO JUNIOR, A. F.; MENEZES, E. V.; OLIVEIRA, D. A. Structure and genetic diversity of *Anacardium humile* (Anacardiaceae): a tropical shrub. **Genetics and Molecular Research**, 16: gmr16039778, 2017.

CRUZ, C. D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, 35: 271-276, 2013.

DIAS, B. F. S.; HOFT, R. Desafios para a implementação da Estratégia Global para a Conservação de Plantas no Brasil. In: MARTINELLI, G; MORAES, M. A. (Orgs.). **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochem Bulletin**, 19: 11-15, 1987.

EARL, D. A.; VON, H.; BRIDGETT, M. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, 4: 359-361, 2012.

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.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131: 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin 3.01. An integrated software package for population genetics data analysis**. Berne: University of Berne, 2006. 145p.

EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, 4: 2611-2620, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220p.

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1989. 62p.

FREITAS, D. G. C.; MATTIETTO, R. A. Ideal sweetness of mixed juices from Amazon fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 33: 148-154, 2013.

GOIS, I. B.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. Variabilidade genética de *Spondias lutea* L. em uma população do baixo São Francisco sergipano, por meio de isoenzimas. **Scientia Forestalis**, 37: 55-60, 2009.

GOVINDARAJ, M.; VETRIVENTHAN, M.; SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. **Genetics Research International**, 2015: ID 431487, 14p.

GUIDUGLI, M. C. **Estudos genéticos da espécie florestal *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze: diversidade, sistema de cruzamento e fluxo gênico contemporâneo**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2011.169p. (Tese – Doutorado em Ciências).

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W. L. (eds.). **Genetic and Conservation**. Menlo Park, Benjamin Cummings, 1982. p. 335-348.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. (eds.). **Conservation genetics, case histories from nature**. New York, Chapman and Hall, 1996. p. 281-304.

HEITHAUS, E. R.; FLEMING, T. H.; OPLER, P. A. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a seasonal tropical forest. **Ecology**, 56: 841-854, 1975.

HENRY, O.; FEER, F.; SABATIER, D. Diet of the Lowland Tapir (*Tapirus terrestris* L.) in French Guiana. **Biotropica**, 32: 364-368, 2000.

LIMA, A. T. B.; SOUZA, V. A. B.; GOMES, R. L. F.; LIMA, P. S. C. Molecular characterization of cajá, *Spondias mombin* (Anacardiaceae), by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, 10: 2893-2904, 2011.

LIU, K.; MOUSE, S. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, 21: 2128–2129, 2005.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Download de dados geográficos**. Disponível em: <http://mapas.mma.gov.br/i3geo/datadownload.htm>. Acesso em 21 de fevereiro de 2018.

MATTIETTO, R. A.; LOPES, A. S. MENEZES, H. C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. **Brazilian Journal of Food Technology**, 13: 156-164, 2010.

MITCHELL, J. D.; DALY, D. C. A revision os *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the Neotropics. **Phytokeys**, 55: 1-92, 2015.

MONTAGNA, T.; FERREIRA, D. K.; STEINER, F.; FERNANDES, C. D.; BITTENCOURT, R.; SILVA, J. Z.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. A importância das unidades de conservação na manutenção da diversidade genética de xaxim (*Dicksonia sellowiana*) no estado de Santa Catarina. **Biodiversidade Brasileira**, 2: 26-32, 2012.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 70: 3321-3323, 1973.

OLIVEIRA, M. O.; SOUZA, F. X.; FREITAS, B. M. Abelhas visitantes florais, eficiência polinizadora e requerimentos de polinização na cajazeira (*Spondias mombin*). **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, 10: 277-284, 2012.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. FAO. **FAOSTAT: Divisão de estatística**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 29 de dezembro de 2017.

PEAKALL, R.; SMOUSE P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, 28: 2537-2539, 2012.

PINTO, W. S.; DANTAS, A. C. V. L.; FONSECA, A. A. O.; LEDO, C. A. DA S.; JESUS, S. C. DE; CALAFANGE, P. L. P.; ANDRADE, E. M. Caracterização física, físico-química e química de frutos de genótipos de cajazeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38: 1059-1066, 2003.

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

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Documentation for structure software: Version 2**. Chicago, University of Chicago, 2004. 39p.

PRASANTH, V. P.; CHANDRA, S.; HOISINGTON, D. A.; JAYASHREE, B. **AlleloBin-a program for allele binning of microsatellite markers based on the algorithm of Idury and Cardon, 1997**. Delhi: ICRISAT, 2006.

RAPOSO, A.; MARTINS, K. CIAMPI, A. Y.; WADT, L. H. O.; VEASEY, E. A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42: 1291-1298, 2007.

REIS, R. V.; OLIVEIRA, E. J.; VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, M. G. M. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro -

amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46: 51-57, 2011.

ROHLF, J. Adaptive Hierarchical Clustering Schemes. **Systematic Zoology**, 19: 58-82, 1970.

SEBBENN, A. M. Número de populações para conservação genética *in situ* de espécies arbóreas. **Revista do Instituto Florestal**, 15: 45-51, 2003.

SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; TIAGO, A. V.; SCHMITT, K. F. M.; DARDENGO, J. F. E.; SOUZA, S. A. M. Genetic diversity of Cajazeira (*Spondias mombin* L.) in three geographic regions. **Genetics and Molecular Research**, 16: gmr16018946, 2016.

SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; TIAGO, P. V.; SILVEIRA, G. F.; SOUZA, S. A. M. Genetic divergences between *Spondias mombin* (Anacardiaceae) genotypes found through morphological traits. **Revista de Biologia Tropical**, 65: 1337-1346, 2017.

SILVA, E. F.; MARTINS, L. S. S.; OLIVEIRA, V. R. Diversity and genetic structure in cajá tree (*Spondias mombin* L.) populations in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 31: 171-181, 2009.

SILVA, L. M. **Superação de dormência de diásporos de cajazeira (*Spondias mombin* L.)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. 82p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).

SILVA JUNIOR, J. F.; BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; ALVES, M. A.; MELO NETO, M. L. Collecting, *ex situ* conservation and characterization of “cajá-umbu” (*Spondias mombin* x *Spondias tuberosa*) germplasm in Pernambuco State, Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 51: 343–349, 2004.

SMYTHE, N. Relationships between fruiting seasons and seed dispersal methods in a neotropical forest. **The American Naturalist**, 104: 25-35, 1970.

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

SOUZA, F. X.; COSTA, J. T. A.; LIMA, R. N. Características morfológicas e fenológicas de clones de cajazeira cultivados na Chapara do Apódi, Ceará. **Revista Ciência Agrônômica**, 37: 208-215, 2006.

SUJII, P. S.; MARTINS, K.; WADT, L. H. O.; AZEVEDO, V. C. R.; SOLFERINI, V. N. Genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations from the Amazon at different spatial scales. **Conservation Genetics**, 16: 955-964, 2015.

TURNER, M. E.; STEPHENS, C.; ANDERSON, W. W. Homozygosity and patch structure in plant populations as a result of nearest-neighbor pollination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 79: 203-207, 1982.

VARELLA, T. L.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; SILVEIRA, G. F.; SOUZA, M. D. A.; CARVALHO, M. L. S. Effect of fragmentation on the natural genetic diversity of *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. populations. **Genetics and Molecular Research**, 15: gmr15048630, 2016.

VIEIRA, F. S. **Diversidade genética e estrutura populacional de populações naturais de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* B.)**. Alta Floresta, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2014. 78p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

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

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, 16: 97-159, 1931.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. **POPGENE: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31**. Edmonton: University of Alberta, 1999.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation of plants. **Tree**, 11: 413-418, 1996.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A caracterização morfológica da planta e do pólen auxiliarão na identificação da espécie e em estudos de outras áreas do conhecimento que necessitem de informações morfológicas.

S. mombin é uma espécie andromonóica, apresenta xenogamia obrigatória e alta estabilidade e regularidade meiótica expressa pela alta viabilidade polínica encontrada nos 2 (dois) métodos testados. Na avaliação da viabilidade polínica *in vitro* de *S. mombin* recomenda-se a utilização de meio de cultura líquido contendo 20% de sacarose e 50 mg mL⁻¹ ácido bórico com incubação de 24 a 36 horas em câmara B.O.D. com temperatura de 25 °C (± 2 °C) e no escuro.

O conhecimento adquirido sobre técnicas de avaliação de aspectos reprodutivos relacionados a fertilidade de *S. mombin* pode ser utilizado na implantação e manutenção de pomares comerciais e em futuros programas de melhoramento, principalmente para auxiliar na escolha de indivíduos adequados para a hibridação, seja ela inter ou intraespecífica.

As populações de *S. mombin* do estado de Mato Grosso apresentam diversidade genética que pode ser selecionada, coletada e propagada, auxiliando assim o processo de domesticação da espécie.

É necessário que as populações sejam conservadas *in situ* ou *ex situ* com a intensão de manter a variabilidade encontrada, visto que a perda de indivíduos diminui a diversidade da espécie.

As populações Alta Floresta (AF) e Cáceres (CC) são consideradas prioritárias para a conservação, por apresentarem a maior quantidade de alelos raros e exclusivos, mas a efetividade da conservação da espécie, será alcançada com a conservação de indivíduos dentro de cada população analisada, uma vez que a diversidade genética é maior a nível intrapopulacional.