

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO CARLOS ALBERTO REYES
MALDONADO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS**

GÉSSICA TAIS ZANETTI

**Aspectos reprodutivos e diversidade genética de pau-de-balsa (*Ochroma
pyramidale* Cav. ex Lam. Urb., Malvaceae)**

SINOP

MATO GROSSO - BRASIL

FEVEREIRO – 2020

GÉSSICA TAIS ZANETTI

Aspectos reprodutivos e diversidade genética de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale* Cav. ex Lam. Urb., Malvaceae)

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

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

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide

SINOP

MATO GROSSO - BRASIL

FEVEREIRO – 2020

Luiz Kenji Umeno Alencar CRB 1/2037

ZANETTI, GÉSSICA TAIS.

Z28a Aspectos Reprodutivos e Diversidade Genética de Pau-de-Balsa (*Ochroma Pyramidale* Cav. Ex Lam. Urb., Malvaceae) / GÉSSICA TAIS ZANETTI – Alta Floresta/Cáceres/Tangará da Serra, 2020.

89 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, 2020.

Aspectos reprodutivos e diversidade genética de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale* Cav. ex Lam. Urb., Malvaceae)

GÉSSICA TAIS ZANETTI

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020.

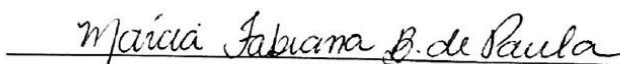
Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi
Orientadora - UNEMAT - Universidade do Estado de Mato Grosso



Profa. Dra. Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide
Coorientadora - Embrapa Agrossilvipastoril



Profa. Dra. Márcia Fabiana Barbosa de Paula
UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso



Dra. Joyce Mendes Andrade Pinto
Embrapa Agrossilvipastoril

Dedico esta dissertação a quem me estima. Àqueles que me consideram uma amiga, àqueles que me amam, àqueles que ocasionalmente pensam em mim, àqueles que me dão bons conselhos, àqueles que me dão forças para seguir em frente. A quem me apoia e me aceita como sou.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

Aos professores e à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas (PGMP) da Universidade do Estado de Mato Grosso “Carlos Alberto Reyes Maldonado” (UNEMAT).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio e concessão da bolsa de estudo.

Ao Fundo da Amazônia pelo financiamento da pesquisa.

A minha orientadora Ana Aparecida Bandini Rossi pela dedicação, paciência e incentivo na realização desta dissertação.

A minha coorientadora Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide pela compreensão, apoio e oportunidade de conduzir esta pesquisa.

Ao pesquisador Maurel Behling pela compreensão e paciência.

Às analistas Joyce e Ana do Laboratório de Fitoquímica e Biologia Molecular, pela paciência e por sempre estarem dispostas a ajudar.

À Prefeitura de Guarantã do Norte, aos funcionários do Viveiro Municipal, ao Julio Santin pela disponibilidade e auxílio nas atividades.

Ao laboratório GenBioMol, Kelli, Joameson, Auana e aos demais pelo auxílio nas atividades de pesquisa.

A minha mãe Odete e a meu pai Mário pela incansável tarefa de trabalhar para que seus filhos conquistem seus sonhos. É uma honra ser filha de vocês!

A toda minha família, irmãos Elisângela e Mário Jr, cunhados Maria Izabela e Glaucio, sobrinhas Elisa, Gretta, Rafaela e a meu afilhado Gustavo que está por vir, por me darem a força necessária para estar aqui.

Ao meu namorado Eduardo pelo apoio incondicional, dedicação e por se fazer presente mesmo diante da distância.

A minha colega Poliana pelo auxílio nas atividades, apoio e amizade.

Agradeço também a amizade de Beatriz, Denise, Dhielida, Okada, Rafael, Suellem, Bruce, Rayane, Cátia, Stephanie, Fernanda e Vera.

BIOGRAFIA

Géssica Tais Zanetti – Filha de Odete Maria Zanetti e Mário Zanetti, nasceu em 25 de agosto de 1994, na cidade de Faxinal dos Guedes, Santa Catarina. Em 2003 mudou-se com sua família para Campo Novo do Parecis, Mato Grosso, onde residem até hoje. Em 2018 formou-se em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul. Durante a graduação, em 2017, realizou seu estágio obrigatório na Embrapa Agrossivipastoril sob supervisão de Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide. Ingressou, em março de 2018, no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, na Universidade do Estado de Mato Grosso “Carlos Alberto Reyes Maldonado”, sob orientação de Ana Rossi Bandini Rossi e coorientação de Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide, concluindo seu trabalho de dissertação de Mestrado em fevereiro de 2020.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Classificação botânica e distribuição geográfica de <i>Ochroma pyramidale</i>	4
2.2 Caracterização, fenologia e biologia reprodutiva de <i>Ochroma pyramidale</i>	5
2.3 Utilização e importância econômica de <i>Ochroma pyramidale</i>	8
2.4 Estudos palinológicos	11
2.5 Índice meiótico	12
2.6 Viabilidade polínica.....	13
2.7 Diversidade genética de populações.....	14
2.8. Marcadores genéticos	16
2.9 Marcadores moleculares ISSR	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
4. CAPÍTULOS	31
4.1 CAPÍTULO 1	31
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ÍNDICE MEIÓTICO E VIABILIDADE POLÍNICA DE <i>Ochroma pyramidale</i> (Cav. ex Lam. Urb., Malvaceae).....	31
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Área de estudo e coleta do material vegetal	33
Diagnose morfológica	34
Morfologia do grão de pólen	34
Índice meiótico	37
Viabilidade polínica.....	38
Citoquímica dos grãos de pólen	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
4.2 CAPÍTULO 2	59
DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Ochroma pyramidale</i> (Cav. ex Lam. Urb., Malvaceae) CULTIVADO NO SUL DA REGIÃO AMAZÔNICA	59

INTRODUÇÃO.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	62
Área de estudo	62
Caracterização fenotípica	63
Coleta, extração e quantificação do DNA	64
Amplificação dos locos ISSR.....	64
Análise dos fragmentos amplificados.....	65
Porcentagem de Polimorfismo	65
Conteúdo de Informação Polimórfica	66
Índice de Jaccard	66
Análise de agrupamento e estrutura populacional.....	67
RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
CONCLUSÕES GERAIS	89

RESUMO

ZANETTI, GÉSSICA TAIS; M.Sc.; Universidade do Estado de Mato Grosso; fevereiro de 2020. Aspectos reprodutivos e diversidade genética de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale* Cav. ex Lam. Urb., Malvaceae). Orientadora: Ana Aparecida Bandini Rossi. Coorientadora: Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide.

O pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale* Cav. ex Lam. Urb) pertencente à família Malvaceae, é uma espécie arbórea, perene e nativa da América do Sul e Central. A espécie é muito utilizada na recuperação de áreas degradadas e sua exploração revelou-se como atividade produtiva de valor econômico para produção de madeira de baixa densidade. Porém, o conhecimento sobre os aspectos reprodutivos e a diversidade genética desta espécie é escasso. Diante disso, este estudo objetivou analisar aspectos da biologia reprodutiva e avaliar a diversidade genética de populações de *O. pyramidale* cultivadas no estado de Mato Grosso, Brasil. Para as análises relacionadas aos aspectos reprodutivos, foram coletados botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento nos municípios de Sinop, Itaúba e Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil, os quais foram utilizados para estudo da palinologia, índice meiótico, citoquímica e viabilidade polínica. Para a investigação da diversidade genética foram realizadas reações de PCR com 15 primers ISSRs, a partir do DNA extraído de folhas jovens de 60 indivíduos de *O. pyramidale*, coletadas em três populações no município de Guarantã do Norte, Mato Grosso. Os resultados demonstram que os polens de *O. pyramidale* são do tipo suboblato, triporados, muito grandes, possuem área polar grande e sexina com ornamentação reticulada. A espécie apresenta alta taxa de viabilidade polínica, índice meiótico regular e possui amido e lipídio como substâncias de reserva no pólen. Os primers ISSRs amplificaram um total de 111 locos, sendo 97,3% polimórficos. Os valores de dissimilaridade genética obtidos a partir do complemento do índice de Jaccard variaram de 0,17 a 0,79, não evidenciando indivíduos idênticos em termos genéticos. A diversidade genética de Nei (0,32) e de Shannon (0,48) para a espécie são indicativos de que há diversidade genética entre os 60 indivíduos estudados. A AMOVA revelou que 71% da variação genética total encontram-se dentro de populações enquanto 29% entre as populações avaliadas. Os marcadores moleculares ISSRs foram eficientes para análise da diversidade genética dos 60 indivíduos de *O. pyramidale*, sendo considerados fontes promissoras de recursos genéticos para seleção e uso em programas de melhoramento. O estudo possibilitou a ampliação dos conhecimentos sobre os aspectos reprodutivos e a diversidade genética de *O. pyramidale*, informações úteis tanto para conservação quanto para programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: Variabilidade genética; Índice meiótico; Viabilidade polínica.

ABSTRACT

ZANETTI, GÉSSICA TAIS; M.Sc.; Universidade do Estado de Mato Grosso; February, 2020. Reproductive Aspects and Genetic Diversity of Balsa Wood (*Ochroma pyramidale* Cav. ex Lam. Urb., Malvaceae). Adviser: Ana Aparecida Bandini Rossi. Counselor: Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide.

The balsa tree (*Ochroma pyramidale* Cav. ex Lam. Urb) belongs to the Malvaceae family, and is a perennial tree species which is native to South and Central America. The species is widely used in the recovery of degraded areas and its harvesting has proved to be a productive activity of economic value for the production of low density wood. However, knowledge regarding the reproductive aspects and genetic diversity of this species is scarce. Therefore, this study aimed to analyze aspects of reproductive biology and evaluate the genetic diversity of populations of *O. pyramidale* cultivated in the state of Mato Grosso, Brazil. For analyses related to reproductive aspects, flower buds at different stages of development were collected in the municipalities of Sinop, Itaúba and Alta Floresta, Mato Grosso, and were used to study palynology, meiotic behavior, cytochemistry and pollen viability. For the genetic diversity investigation, PCR reactions were performed with 15 ISSR primers, using DNA extracted from young leaves of 60 individuals of *O. pyramidale*, which were collected from three populations in the municipality of Guarantã do Norte, Mato Grosso. The results demonstrate that the pollens of *O. pyramidale* are of the suboblate type, triporate, large, have a large polar area and sexine with reticulated ornamentation. The species has a high percentage of viable pollen, regular meiotic index and has starch and lipid as storage substances in pollen. ISSR primers amplified a total of 111 loci, of which 97.3% were polymorphic. The values of genetic dissimilarity obtained from the complement of the Jaccard index ranged from 0.17 to 0.79, not showing identical individuals in genetic terms. The genetic diversity of Nei (0.32) and Shannon Index (0.48) for the species is indicative that there is genetic diversity among the 60 individuals studied. AMOVA revealed that 71% of the total genetic variation is found in populations while 29% among the evaluated populations. The ISSR molecular markers were efficient in analyzing the genetic diversity of the 60 individuals of *O. pyramidale*, and can be considered promising sources of genetic resources for selection and use in breeding programs. Furthermore, the study enabled the expansion of knowledge regarding the reproductive aspects and the genetic diversity of *O. pyramidale*, which is useful information both for conservation of this species, as well as for breeding programs.

Key words: Genetic variability; Meiotic behavior; Pollen viability.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Ochroma pyramidale*, conhecida popularmente como pau-de-balsa, pertence à família botânica Malvaceae. É uma árvore tropical amplamente distribuída, de ocorrência natural no México, Antilhas, Venezuela, ao longo da costa oeste da América do Sul até a Bolívia e na Amazônia Brasileira (Leão et al., 2008). No Brasil, a espécie é encontrada naturalmente nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Roraima (Carvalho, 2010).

A baixa densidade da madeira do pau-de-balsa, de 170 a 265 kg/m³ quando seca, permite aplicação em indústrias como a marinha, rodoviária e ferroviária, energia eólica, aeroespacial. É utilizada na construção de barcos e jangadas, na confecção de boias, aeromodelos e outros fins, como a fabricação de brinquedos, isolantes térmicos e em substituição à cortiça (Lorenzi, 2008; Carvalho; 2010; Midgley et al., 2010). No entanto, o principal mercado é o uso da madeira como material estruturante do núcleo das pás dos geradores eólicos (Stewart, 2011; 3A Composites, 2019).

O pau-de-balsa apresenta características potenciais para cultivo e produção de madeira no Brasil. De acordo com Reis e Filho (2011), a espécie tem sido cultivada no Brasil como atividade de valor econômico e, há alguns anos, vem ganhando importância no Estado de Mato Grosso. Segundo dados da Cooperativa dos Produtores de pau-de-balsa de Mato Grosso, a espécie possuía, em 2012, cerca de 7 mil hectares plantados.

Outra potencialidade do pau-de-balsa é a utilização em plantios para recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente devido ao seu rápido desenvolvimento e tolerância à alta radiação (Cunha et al., 2016; Gomes e Reis, 2018), pois para reestabelecer os ecossistemas degradados e facilitar a sucessão ecológica utiliza-se espécies pioneiras (Bizuti et al., 2016) e espécies arbóreas nativas (Lima Júnior et al., 2019).

Os estudos do sistema reprodutivo das espécies são essenciais para compreender a estrutura e diversidade das populações (Dick et al., 2008; Sebben et al., 2011). Segundo Kageyama et al. (2003), as informações de ecologia e genética de espécies arbóreas tropicais ainda são incipientes devido à alta diversidade e a complexidade de espécies.

O conhecimento do sistema reprodutivo das espécies fornece informações importantes para a conservação e melhoramento genético, por estar relacionado com o sucesso da perpetuação da espécie (Carrió et al., 2009; Mendes et al., 2013). Nas culturas em que o objetivo é a produção de sementes, como é o caso de *O. pyramidale*, o sucesso está proximamente ligado à disponibilidade e viabilidade de grãos de pólen nas plantas, visto que estudos de estabilidade meiótica e viabilidade dos polens permitem indicar o potencial de cruzamento da planta (Love, 1951; Diegues et al., 2015). Outro aspecto estudado em grãos de pólen é a morfologia como forma, tamanho, número de aberturas e ornamentação da exina que possuem valor taxonômico porque permanecem constantes dentro da mesma espécie, de acordo com Talledo et al. (2019).

Os estudos genéticos em populações de espécies arbóreas visam ao conhecimento dos níveis de variabilidade genética existente em uma determinada espécie. A caracterização molecular é uma maneira de detectar a variabilidade genética, pois permite, a partir de marcas genéticas ou polimorfismos, independente de interferências ambientais, inferir sobre o grau de diversidade entre indivíduos e dentro de populações (Sartoretto e Farias, 2010; Costa et al., 2011; Ju et al., 2018).

Os marcadores moleculares têm sido de grande importância para acessar a variabilidade genética dentro do *pool* gênico de espécies cultivadas, bem como na análise da diversidade (Salla et al., 2002; Ferreira et al., 2007; Franzon et al., 2010). Dentre os marcadores moleculares existentes, os ISSR revelam eficientemente polimorfismos em sequências de DNA (ácido desoxirribonucleico), apresentam alta reprodutibilidade, baixo custo, e não necessitam de conhecimento prévio do genoma da espécie (Zietkiewicz et al., 1994; Santos et al., 2011; Ng e Tan, 2015; Costa et al., 2015).

Entender as relações ecológicas e genéticas, segundo Kageyama et al. (2003), é de grande importância para a determinação de estratégias de conservação, melhoramento e manejo sustentável, com adequações às especificidades das espécies. Nesse sentido, o conhecimento das relações ecológicas e genéticas são essenciais para o estudo de estrutura genética de populações de *O. pyramidale*.

Esta dissertação estrutura-se em dois capítulos. O capítulo 1 objetiva a caracterização reprodutiva de *O. pyramidale* por meio do índice meiótico e viabilidade

polínica. O capítulo 2 tem como objetivo avaliar a diversidade genética entre indivíduos e populações de *O. pyramidale* através de marcadores moleculares ISSR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação botânica e distribuição geográfica de *Ochroma pyramidale*

Na década de 80, a ordem Malvales compreendia as famílias Malvaceae, Bombacaceae, Sterculiaceae e Tiliaceae (Dahlgren, 1980; Takhtajan, 1980). Entretanto, estudos morfológicos, anatômicos e químicos (Judd e Manchester, 1997) associados às análises filogenéticas baseadas em dados moleculares nos sistemas tradicionais de classificação mostraram que Malvaceae também compreende Bombacaceae, Sterculiaceae e Tiliaceae (Alverson et al. 1999; Bayer et al., 1999; Baum et al., 2004; Nyffeler et al., 2005).

O trabalho sistemático realizado nas duas últimas décadas marcou a atual circunscrição de Malvales. Estudos filogenéticos baseados em dados moleculares de Malvaceae *sl* permitiram o reconhecimento de nove subfamílias, a Bombacoideae inclui os remanescentes de Bombacaceae (Carvalho-Sobrinho et al., 2016; Lima et al., 2019; Hernández-Gutiérrez e Magallón, 2019).

A família botânica Malvaceae compreende cerca de 250 gêneros e 4200 espécies. Existem cerca de 73 gêneros e 783 espécies no Brasil, por esta razão está entre as dez principais famílias de angiospermas do país, presente em todas as regiões (Bayer e Kubitzki, 2003; Bovini et al., 2015; Zappi e BFG, 2015; Lima et al., 2019; The Plant List, 2019). Dentro da família Malvaceae e subfamília Bombacoideae, encontra-se o gênero *Ochroma* que apresenta uma única espécie registrada, *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam. Urb).

O nome científico do pau-de-balsa tem sido objeto de controvérsia. Desde 1788, quando o gênero *Ochroma* Swartz foi descrito com uma única espécie, *Ochroma lagopus* Sw., um total de 10 espécies foram descritas por Rowlee (1919) e Johnston (1928). Em 1944, Little resumiu a nomenclatura do pau-de-balsa do Equador utilizando *Ochroma lagopus* Swartz, baseando-se no fato de que seu material de herbário no Equador não é especificamente diferente das espécies das Índias Ocidentais (Aikman, 1955).

De acordo com o banco de dados ITIS (*Sistema de Informação Taxonômica Integrado*) e Tropicos® o nome científico aceito atualmente é o *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam. Urb.). Segundo o The Plant List, há o registro de 20 nomes científicos,

isto porque alguns pesquisadores utilizaram a nomenclatura de variedades como, por exemplo, *Ochroma pyramidale* var. *concolor* (Rowlee).

Em função de sua distribuição, possui como nomes comuns: pau-de-balsa, pau-de-jangada e algodoeiro. A espécie é amplamente distribuída na zona neotropical, incluindo as Antilhas, México, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, ao longo da costa oeste da América do Sul até a Bolívia e na Amazônia Brasileira (Figura 1A) (Aikman, 1955; Francis, 1991; Leão et al., 2008). *Ochroma pyramidale* ocorre em terras baixas e em vales entre montanhas, mas também pode ser encontrada até 2000m de altitude, segundo Leão et al. (2008). De acordo com Flora do Brasil (2020) e Carvalho (2010), no Brasil a espécie ocorre nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Roraima (Figura 1B).

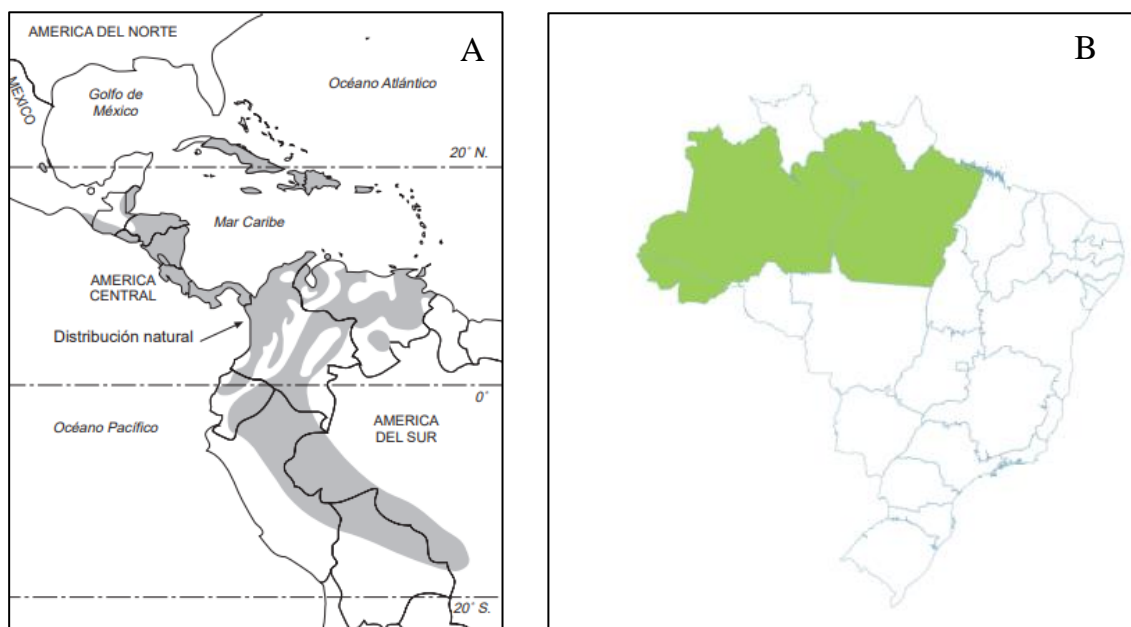


Figura 1. Distribuição geográfica de *Ochroma pyramidale*. A. A área sombreada representa a distribuição natural da espécie. Fonte: Francis, (1991). B. Presença confirmada da espécie no Brasil, estados do Pará, Amazonas e Acre. Fonte: Flora do Brasil 2020.

2.2 Caracterização, fenologia e biologia reprodutiva de *Ochroma pyramidale*

O pau-de-balsa é uma espécie arbórea lenhosa de grande porte, podendo atingir dimensões próximas a 30 m de altura e 120 cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido a 1,30 m do solo) na idade adulta. O tronco é reto, cilíndrico e o fuste pode atingir até 15 m de comprimento (Figura 2A) (Carvalho, 2010).

A casca é lisa e tem espessura de até 12 mm, possui coloração cinza-rosada com algumas cicatrizes lineares (Figura 2B) (Carvalho, 2010). O cerne é castanho-pálido ou avermelhado, o alborno é quase branco-palha, com manchas acinzentadas ou róseas (Figura 2C) (Carvalho, 2010).

As folhas são grandes, alternas, simples, sub-íntegras ou dentadas, de 3 a 5 lóbulos profundos, palmatinérveas, de 15 a 35 cm de comprimento por 15 a 40 cm de largura (Figura 2D) (Lorenzi, 2008; Carvalho, 2010).

Os botões florais nascem em pedúnculos largos e grossos, localizados nas extremidades dos ramos (Figura 2E) e desenvolvem-se em flores grandes, vistosas, bissexuadas e de coloração branca ou esbranquiçada, de sépalas unidas com indumento ferrugíneo, podendo ser solitárias ou terminais, com 10 a 20 cm de comprimento por 7 a 9 cm de diâmetro (Figura 2F) (Carvalho, 2010).

Os frutos são constituídos por cápsulas deiscentes alongadas e sublignificadas, com o comprimento em torno de 10 a 25 cm e largura de 2,5 a 5 cm, cada cápsula se abre em cinco valvas escuras e glabras (Figura 2G), sendo que após o amadurecimento liberam um tufo de lã/paina de coloração marrom/acobreada (Figura 2H) com grande quantidade de sementes (Figura 2I) (Carvalho, 2010).

O processo reprodutivo inicia-se entre três a cinco anos (Reis e Filho, 2011). De acordo com Carvalho (2010) a floração ocorre de abril a agosto, na estação mais seca e a frutificação de junho a outubro, na estação úmida. Nas condições edafoclimáticas do estado de Mato Grosso, o pau-de-balsa floresce de fevereiro a maio, enquanto que os frutos amadurecem de agosto a novembro (Weirich, 2008).

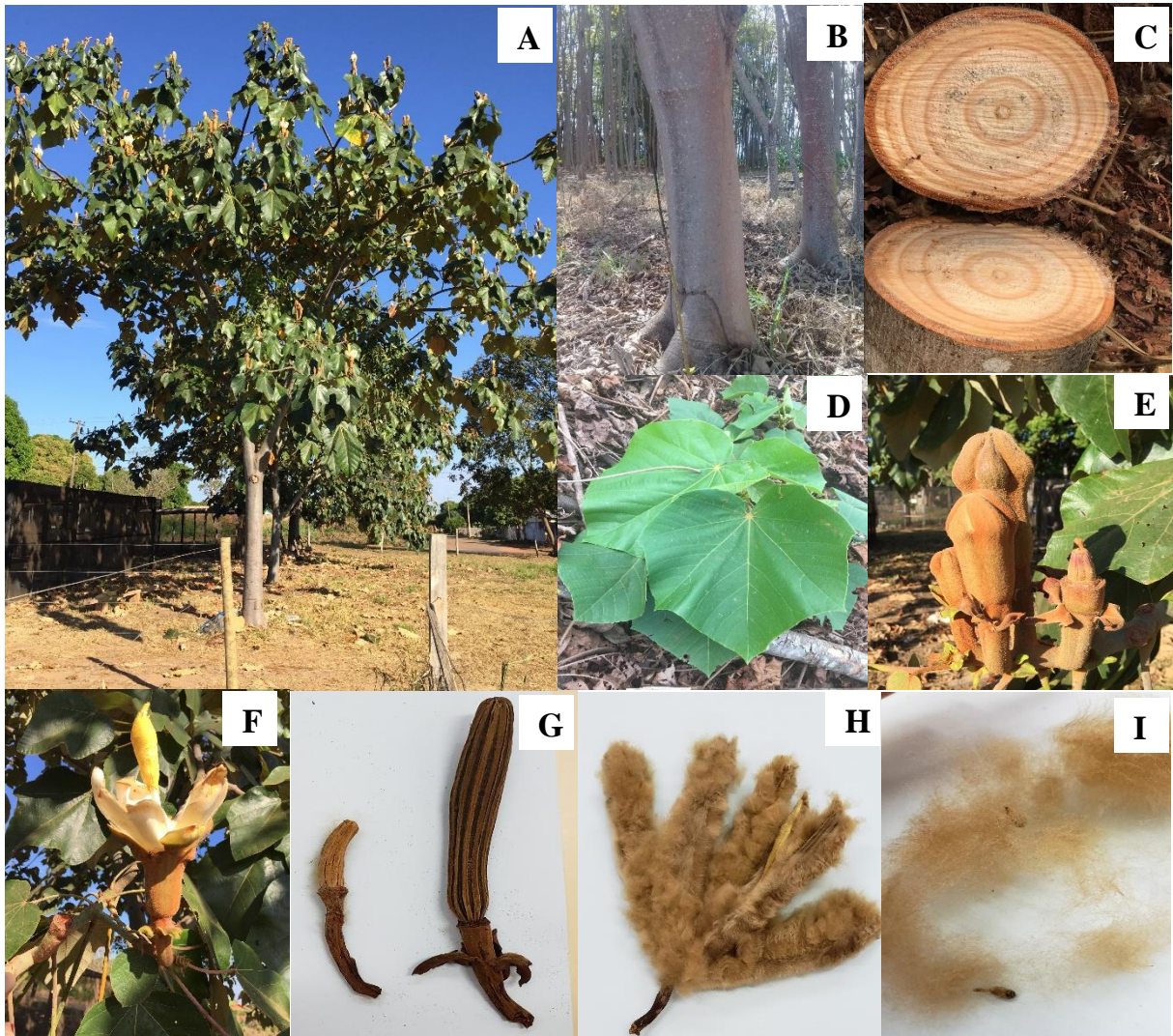


Figura 2. Características morfológicas gerais de *Ochroma pyramidale*. A) Porte arbóreo. B) Detalhe do tronco e da casca. C) Cerne e alburno. D) Folha. E) Botões florais. F) Flores. G) Frutos. H) Frutos após liberação do tufo de lã. I) Sementes. Fonte: a autora.

O. pyramidale possui flores hermafroditas que produzem cerca de 10 a 15 microlitros de néctar por flor e exibem características típicas de polinização por mamíferos, como quatis (Mora et al., 1999) mas, principalmente por morcegos (Reis e Filho, 2011), sendo que também são visitadas por abelhas que coletam o néctar para produção de mel (Mora et al., 1999; Weirich, 2008). A grande mortalidade de abelhas em flores de *O. pyramidale* deve-se, provavelmente, à asfixia, conforme estudos de Brighenti e Brighenti (2010), visto que as características morfológicas das flores facilitam o acúmulo de água e néctar e não foram encontradas substâncias tóxicas nas flores de pau-de-balsa.

As sementes são amplamente disseminadas pelo vento, graças a sua aderência à pluma (Carvalho, 2010). Apesar desta facilidade na dispersão, as sementes de pau-de-balsa apresentam dormência que dificulta e retarda a germinação, prejudicando a produção uniforme de mudas (Netto, 1994; Dalberto e Braga, 2013; Santos et al., 2016). Neste contexto, a propagação *in vitro* é uma opção para produção de mudas de *O. pyramidale*, de acordo com Morante-Alarcón et al. (2017).

Contribuições de pesquisas relacionadas a caracterização de *O. pyramidale* envolvem os sistemas de cultivo, avaliações morfológicas das árvores e da madeira, técnicas de armazenamento, superação de dormência e testes de germinação das sementes (Alvino e Rayol, 2007; Mendes et al., 2010; González et al., 2010; Vleut et al., 2013; Borrega e Gibson, 2015; Bao et al., 2016; Gomes e Reis, 2018; Canãdas-López et al., 2019).

2.3 Utilização e importância econômica de *Ochroma pyramidale*

Atualmente, com o aumento da demanda por madeira no mundo, é necessário buscar novas espécies para plantios comerciais e aumentar a produtividade de madeira sem expandir deliberadamente as áreas de plantios. O setor de floresta plantada é caracterizado principalmente pelos plantios florestais de rápido crescimento, sendo que, em 2018, a área total de árvores plantadas no Brasil totalizou 7,83 milhões de hectares, estável em relação ao ano anterior. Os plantios de eucalipto ocupam 5,7 milhões de hectares desse total, as áreas com pinus somam 1,6 milhão de hectares, e outras espécies como seringueira, acácia, teca e paricá, representam cerca de 590 mil hectares (Ibá, 2019).

A utilização de espécies vegetais arbóreas, nativas e pioneiras está consolidada na literatura como possível estratégia para reestabelecer os ecossistemas degradados e facilitar a sucessão ecológica (Rodrigues et al., 2009; Bizuti et al., 2016; Lima Júnior et al., 2019), visto que o plantio de espécies florestais de interesse madeireiro contribuem para diminuir a pressão sobre a floresta amazônica, proporcionam o desenvolvimento sustentável na região e geram benefícios ecológicos (Machado et al., 2018). As espécies arbóreas pioneiras apresentam eficiência sobre as demais espécies florestais, no uso de recursos primários, tais como luz, água e nutrientes, sobressaindo-se nos estágios

iniciais (Silva et al., 2011; Nogueira et al., 2018). Enquanto que espécies nativas têm uma maior probabilidade de êxito, quanto mais próximas estiverem as condições de plantio das condições naturais, conforme Kageyama e Castro (1989) apud Tonini et al. (2008).

O. pyramidale apresenta características potenciais para cultivo e produção de madeira no Brasil, visto que é uma espécie nativa, pioneira e de rápido crescimento. A espécie tem demonstrado potencial em plantios para recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente, assim como em monocultivo, consórcios florestais e agroflorestais, devido ao seu rápido desenvolvimento e tolerância à alta radiação (Marenco et al., 2001; Costa, S. et al., 2012; Santos et al., 2014; Cunha et al., 2016; Gomes e Reis, 2018; Rachmat, 2019).

A madeira do pau-de-balsa possui baixa densidade devido ao seu rápido crescimento, tornando-se a madeira mais leve disponível para comércio. As grandes variações de densidade da madeira do pau-de-balsa derivam predominantemente das fibras, que são células prismáticas longas, com paredes relativamente espessas capazes de fornecer suporte mecânico à árvore. Essas células diminuem no comprimento da borda e aumentam na espessura da parede à medida que a densidade aumenta (Borrega et al., 2015; Borrega e Gibson, 2015). A madeira do pau-de-balsa possui densidade entre 170 e 265 kg/m³ quando seca, o alburno é claro e o cerne marrom-claro (Lorenzi, 2008; Carvalho, 2010).

A baixa densidade da madeira do pau-de-balsa permite aplicação em indústrias comerciais como marinha, rodoviária e ferroviária, energia eólica, aeroespacial, defesa, na construção de barcos e jangadas, confecção de boias, aeromodelos e outros fins, como a fabricação de brinquedos, isolantes térmicos e em substituição à cortiça (Lorenzi, 2008; Carvalho; 2010; Midgley et al., 2010). Além disso, Weirich, (2008) afirma que as fibras longas são próprias para a fabricação de papel e celulose, produzindo celulose de alta qualidade com grau de rendimento de 45% a 50%.

A fabricação de geradores eólicos é um dos grandes consumidores da madeira de pau-de-balsa no Brasil e no mundo. A 3A Composites possui e gerencia por meio de suas empresas florestais Plantabal S.A. e 3A Composites PNG Ltda, 13 mil hectares de plantações de pau-de-balsa com certificação FSC® no Equador e Papua Nova Guiné

(3A Composites, 2019). A empresa desenvolveu um tipo de compensado de alta tecnologia utilizando colagem adesiva e madeira de pau-de-balsa como material estruturante do núcleo das pás dos geradores eólicos, tecnologia denominada Baltek® (Stewart, 2011). Nesta tecnologia utilizam-se estruturas de madeira em formato sanduíche que resultam em um produto final leve e resistente com densidade aproximada de 156 kg/m^3 (3A Composites, 2019).

A maior demanda por madeira de pau-de-balsa está no exterior e os principais países importadores são os Estados Unidos, Dinamarca, Espanha, China, Alemanha e França. Os Estados Unidos é o importador de maior destaque, absorvendo mais de 90% da produção do Equador, segundo Midgley et al. (2010). O Equador é tradicionalmente o maior produtor de madeira de pau-de-balsa do mundo, abastecendo 89% dos mercados globais, seguido pela Papua Nova Guiné, com 8% (Kotlarewskie et al., 2016). Apesar de o pau-de-balsa apresentar potencial socioeconômico e ecológico para o Equador, este potencial não é totalmente conhecido ou explorado, segundo Canãdas-López et al., (2019).

Atualmente, a indústria do pau-de-balsa está enfrentando diversos entraves. Os principais desafios enfrentados estão relacionados à falta de demanda devido ao excesso da oferta mundial de madeira de pau-de-balsa, competição com o polímero sintético, falta de desenvolvimento e diversificação de produtos (Jekin et al., 2018; Kotlarewski et al., 2019). Outro entrave para a indústria do pau-de-balsa é a qualidade genética do germoplasma disponível para a espécie, reconhecida como um problema há cerca de 20 anos quando consideradas as principais características silviculturais, como altura de fuste, diâmetro na altura do peito e a densidade da madeira. Esta última é segregada em três grupos: baixa $80 \leq 120 \text{ kg/m}^3$; média $120 \leq 180 \text{ kg/m}^3$; e alta $180 \leq 220 \text{ kg/m}^3$ (Midgley et al., 2010).

No estado de Mato Grosso, a área reflorestada com pau-de-balsa aumentou significativamente dos anos 2000 a 2010 devido ao incentivo ao cultivo da espécie. Segundo dados da Cooperativa dos Produtores de pau-de-Balsa a espécie possuía, em 2012, cerca de 7 mil hectares plantados (COPROMAB-MT, 2012; Arefloresta, 2015).

No Mato Grosso o uso do pau-de balsa na integração pecuária-floresta é uma alternativa para a diversificação do solo degradado com a morte súbita das pastagens.

Os produtores rurais da região encontraram na integração pecuária-floresta uma fonte de renda na qual ,ao final do período de criação dos animais, as árvores de pau-de-balsa, que possuem crescimento rápido, estão no ponto de corte para venda (Santos et al., 2016). O cultivo de pau-de-balsa, segundo Weirich (2008) se dá por sua precocidade, pois o corte pode ser realizado entre três a seis anos, tornando-se uma atividade rentável a pequenos e médios produtores.

Devido à ausência de materiais genéticos melhorados de pau-de-balsa, os plantios comerciais no Estado do Mato Grosso são realizados com sementes oriundas de florestas nativas de distribuição natural da espécie. Dessa forma, os plantios se caracterizam pela elevada variabilidade genética (Weirich et al., 2008; Behling et al., 2019), e heterogeneidade na altura de fuste, diâmetro do tronco e densidade da madeira, o que gerou grande descontentamento da indústria e silvicultores.

Jenkin et al. (2018) avaliando árvores de pau-de-balsa na Papua Nova Guiné, relataram a necessidade de uma estratégia silvicultural para reduzir bifurcações, aumentar a qualidade do caule e o diâmetro na altura do peito. Neste sentido, a principal demanda da pesquisa atualmente é através do melhoramento genético obter plantios homogêneos e produtivos.

2.4 Estudos palinológicos

A invenção do microscópio simples por J. Janssen e Z. Janssen em 1590, e do primeiro microscópio composto desenvolvido por Hooke em 1665, foram contribuições importantes para o estudo da morfologia do pólen (Halbritter et al., 2018). O gametófito masculino (grão de pólen) das plantas com flores é uma estrutura microscópica contida em sacos polínicos e que completa seu desenvolvimento inicial no tecido esporófito da antera (Barth, 1964; Mascarenhas, 1990).

O estudo e a caracterização de grãos de pólen são essenciais para o melhoramento genético, filogenia, paleobotânica e, principalmente a taxonomia (Nunes et al., 2012). A técnica de acetólise de Erdtman é amplamente utilizada em estudos paleopalinológicos e palinotaxonômicos, visto que a aplicação da técnica facilita a degradação da intina e do protoplasma do pólen, permanecendo apenas a parede externa

da esporopolenina (exina), o que facilita a observação dos detalhes de sua estrutura e escultura (Gutiérrez e Mosquera, 2016).

Os grãos de pólen, segundo Cutler et al. (2011), são fáceis de serem identificados em nível de gênero e algumas vezes de espécie. Em certas famílias, existe grande variabilidade na morfologia dos grãos de pólen. As características morfológicas dos grãos de pólen como forma, tamanho, número de aberturas e ornamentação da exina, são consideradas de valor taxonômico porque permanecem constantes dentro da mesma espécie (Blackmore, 2007; Talledo et al., 2019).

Informações a respeito da morfologia polínica de *O. pyramidale* não foram encontradas, apenas um estudo realizado por Carreira et al. (1995) com espécie sinônima *O. lagopus* Sw. revelou polens muito grandes, isopolares, de simetria radial, formato suboblato, âmbito circular, três aberturas do tipo poro e exina amplamente reticulada.

Outra possível caracterização dos grãos de pólen é a determinação de substâncias de reserva, como amido e lipídio, através de coloração citoquímica. Dados citoquímicos, que evidenciem a presença de componentes de reserva específicos em grãos de pólen, são importantes para o entendimento de aspectos ecológicos relacionados principalmente aos mecanismos de polinização (Dettke e Santos, 2011; Oliveira e Pierre, 2018).

2.5 Índice meiótico

A fertilidade das plantas depende da regularidade meiótica, que pode ocorrer durante a formação dos grãos de pólen (Pereira et al., 2017). O índice meiótico é resultado do estudo dos produtos pós-meióticos, observando-se a formação de tétrades normais, tríades, díades ou mônades que estão diretamente relacionadas à regularidade na meiose (Oliveira e Pierre, 2018). Nesse sentido, Love (1951) estabeleceu que plantas com índices meióticos abaixo de 90% apresentam instabilidade meiótica.

A estabilidade meiótica e a produção de gametas viáveis são aspectos diretamente associados à reprodução e manutenção das plantas das espécies (Oliveira e Pierre, 2018). A utilização de corantes como o carmim acético (Radford et al., 1974) é uma técnica de coloração citoplasmática devido a afinidade deste corante com o material

genético presente no citoplasma, sendo largamente empregado em citogenética vegetal (Pagliarini e Pozzobon, 2004).

A presença de anormalidades como políades, tríades, díades e mônades são geralmente atribuídas ao emparelhamento irregular de cromossomos na segregação, formação de fuso ou citocinese que podem resultar na divisão meiótica anormal e, geralmente grãos de pólen inviáveis, tendo como consequência, a infertilidade da planta (Pagliarini, 2000; Wang et al., 2010; e Zhang et al., 2017). Kaur e Singhal (2019) afirmam que as anormalidades meióticas levam a variações morfológicas e genéticas que causam não apenas a evolução, mas também barreiras reprodutivas intraespecíficas.

2.6 Viabilidade polínica

O estudo da viabilidade polínica é uma das formas para obtenção de informações acerca da biologia reprodutiva das espécies vegetais. É um método que evidencia o potencial masculino de reprodução da espécie e pode ser útil em estudos taxonômicos, ecológicos, genéticos e palinológicos (Frescura et al., 2012).

A identificação de indivíduos mais estáveis mediante análise citológica permite, segundo Santos et al. (2019), a seleção e planejamento de coleta de sementes para geração de mudas e implantação de novas populações. Assim, o estudo da viabilidade polínica pode ser um fator de seleção de genótipos para programas de melhoramento, conforme Cabral et al. (2013) e Diegues et al. (2015).

A análise da viabilidade de grãos de pólen através da coloração diferencial permite realizar uma estimativa da fertilidade de amostras de grãos de pólen (Pinto-Maglio e Pierozzi, 2015). Os métodos colorimétricos utilizam corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes nos grãos de pólen maduros (Pagliarini e Pozzobon, 2004). Estes métodos são utilizados para determinar componentes celulares e a integridade do grão de pólen (Munhoz et al., 2008).

Não há na literatura um teste de viabilidade universal que utilize apenas um corante específico, desta forma, é necessário testar mais de um tipo de corante, visando encontrar o mais adequado para cada espécie (Hister e Tedesco, 2016). Os corantes mais utilizados para estimar a viabilidade dos polens, atualmente, são o carmim acético e o reativo de Alexander. O carmim acético, de acordo com Munhoz et al. (2008) apresenta

coloração avermelhada para os polens viáveis, devido à reação do corante com o material genético existente no citoplasma, enquanto que os grãos de pólen inviáveis são aqueles que não apresentaram coloração no citoplasma.

O reativo de Alexander (Alexander, 1980) é mais específico, principalmente para plantas com grãos de pólen de parede grossa e ou com muitas ornamentações devido à quantidade de ácido láctico na formulação (Pinto-Maglio e Pierozzi, 2015). De acordo com Alexander (1980), é possível diferenciar os grãos de pólen não abortados, pois possuem citoplasma colorido de rosa e parede celular de coloração verde, dos abortados que possuem apenas a coloração verde. Os grãos de pólen abortados não possuem núcleo e apenas a celulose contida na parede apresentará coloração (Munhoz et al., 2008). O reativo de Alexander facilita a distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis, como relatado por estudos em diferentes espécies (Santos et al., 2015; Hister e Tedesco, 2016; Arenas-de-Souza et al., 2016; Braga et al., 2018; Santos et al., 2019).

2.7 Diversidade genética de populações

A diversidade genética é a multiplicidade de frequências alélicas presentes em um grupo de indivíduos a qual, junto com o ambiente, fornece a natureza do fenótipo e é base fundamental em programas de melhoramento genético (Santana et al., 2011). Para Xie et al. (2010) a diversidade genética é útil na caracterização de indivíduos, acessos e cultivares na determinação de duplicações na coleta de germoplasma e na escolha de genótipos parentais em programas de melhoramento. Além disso, os estudos relacionados à genética populacional são essenciais para definir estratégias de conservação de espécies, de acordo com Fajardo et al. (2017).

A variabilidade genética é o meio pelo qual as espécies se mantêm ao longo do tempo, permitindo a sua adaptação evolutiva em decorrência das mudanças ambientais (Lima et al., 2015). Estudos de diversidade e estrutura genética em espécies arbustivas e arbóreas são frequentemente relatados na literatura (Costa et al., 2015; Borges et al., 2016; Chimello et al., 2017), o que reforça a necessidade desse tipo de estudo para *O. pyramidale*.

De acordo com Midgley et al. (2010) considerando a complexidade taxonômica e variação morfológica dentro de *O. pyramidale*, é altamente provável que exista

variação genética considerável em caracteres-chave como crescimento, forma, densidade da madeira, comprimento dos internós e resistência a pragas e a doenças. Essas variações oferecem oportunidades consideráveis para seleção e implantação de germoplasma aprimorado. Além disso, *O. pyramidale* pode apresentar altos níveis de variabilidade genética nas populações, visto que, segundo Nybom (2004), alta variabilidade genética é encontrada em espécies como hábito perene, com ocorrência de fecundação cruzada e que possuam ampla distribuição geográfica.

Para o estudo da diversidade, dentro da população ou entre acessos, podem-se adotar técnicas de agrupamento ou de projeção de medidas de dissimilaridade (Cruz et al., 2011). Os coeficientes de similaridade e dissimilaridade mais utilizados em trabalhos de diversidade genética têm sido o de coincidência simples (Sneath e Sokal, 1973 apud Cruz et al., 2011), o de Jaccard (1908) e o de Nei e Li (1979). Com destaque para o índice de Jaccard, com interpretação facilitada por representar a razão entre o número de coincidências e o número total de bandas, excluindo a coincidência negativa (Meyer et al., 2004).

Com base nos índices, é estabelecida uma matriz de dissimilaridade ou de distância entre os acessos, a qual vai servir para as análises de agrupamento e de dispersão dos acessos. As análises de agrupamento normalmente são baseadas em métodos hierárquicos, os quais podem utilizar diferentes critérios de agrupamento: vizinho mais próximo, vizinho mais distante e baseado na média das distância (Faleiro, 2011). O uso de mais de um método de agrupamento evita inferências errôneas devido às diferenças na classificação, otimização e ordenação dos grupos (Silva et al., 2012).

A existência de variação genética é um fator fundamental para que ocorra a adaptação, evolução e sobrevivência de espécies arbóreas. O fluxo gênico é um processo de transferência e troca de material genético entre grupos de organismos. Nas espécies arbóreas ocorre principalmente por dispersão de pólen e sementes, e é um importante fator evolutivo que afeta a variação genética e a diferenciação nas árvores (Krutovsky et al., 2012).

2.8. Marcadores genéticos

O desenvolvimento de novas tecnologias no campo da biologia molecular, especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), permitiu a popularização de métodos moleculares em diversas áreas do conhecimento biológico (Cruz et al., 2011). Atualmente, existem muitas ferramentas moleculares para análise da variação genética de indivíduos e populações e uma grande variedade de marcadores moleculares disponíveis para espécies vegetais (Souza et al., 2016).

Os marcadores moleculares podem ser definidos como marcadores genéticos e são divididos em três categorias principais: baseados em hibridização (isoenzimáticos), baseados em PCR e baseados em sequenciamento (Faleiro, 2011; Turchetto-Zolet et al., 2017). Os RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) são fragmentos de DNA obtidos com o uso de enzimas de restrição, separados por eletroforese e visualizados por meio de hibridizações com sondas de sequências homólogas marcadas com radioatividade ou fluorescência (Faleiro, 2011).

Os marcadores moleculares são sequências de DNA herdadas geneticamente e que podem ser utilizados como ferramenta para detectar polimorfismos no DNA e, assim, auxiliarem na diferenciação de indivíduos (Alves-Pereira et al., 2015). Dentre os marcadores baseados em PCR, destacam-se: RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), ISSR (*Inter-simple sequence repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Conforme Ferreira e Grattapaglia (1998), Faleiro (2007) e Faleiro (2011), os RAPD são fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando primers curtos, geralmente dez nucleotídeos, de sequência aleatória. Os ISSR são fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb amplificados via PCR usando um único primer (16-20 pb) construído a partir de sequência de microssatélites. Os marcadores microssatélites ou SSR são sequências do DNA muito curtas (2 a 5 pb) repetidas em tandem (lado a lado), cuja detecção é feita pela PCR, utilizando primers específicos. Os AFLP são fragmentos de DNA (80 a 500 pb) obtidos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, seguida da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR.

A técnica SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) é um tipo de marcador molecular do DNA utilizado para identificar mutações e polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo, necessitando de informações de sequenciamento do DNA para o desenho de primers e sondas específicas.

Os polimorfismos detectados em estudos genéticos vegetais são de particular importância para a manutenção da variabilidade das espécies, bem como sua sobrevivência frente as pressões ambientais (Cruz et al., 2011). Muitas são as vantagens dos marcadores moleculares, Faleiro, (2011) cita a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, e a possibilidade de detecção dos polimorfismos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta.

2.9 Marcadores moleculares ISSR

A utilização de marcadores moleculares de DNA, como o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), torna-se uma ferramenta para estudos genéticos com espécies vegetais. As regiões ISSR constituem-se sequências de 100 a 3.000 pares de bases contidas no genoma, localizadas entre sequências microssatélites que podem ser acessadas a partir de marcadores ISSR (Zietkiewicz et al., 1994). O ISSR é uma técnica baseada em SSR (*Simple Sequence Repeats*) em que a amplificação é realizada com um único primer consistindo de várias repetições (motivo de SSR) geralmente ancorado com 2 a 4 nucleotídeos arbitrários (Turchetto-Zolet et al., 2017).

Os marcadores ISSR possuem natureza dominante (não diferindo os *loci* em homozigose dos em heterozigose), boa reprodutibilidade, revelam elevado grau de polimorfismo, baixo custo e não exigem conhecimento prévio do genoma da espécie-alvo (Faleiro, 2011; Santana et al., 2011; Ng e Tan, 2015). Turchetto-Zolet et al., (2017) afirmam que em relação ao RAPD, os ISSR possuem maior reprodutibilidade pelo fato de consistirem em primers mais longos para amplificação por PCR, os protocolos utilizam temperaturas de anelamento mais altas na PCR e nos dois primers praticamente nenhum conhecimento prévio da sequência alvo é necessária permitindo a aplicação em espécies não-modelos (Zietkiewicz et al., 1994).

A utilização dos marcadores genéticos do tipo ISSR em estudos populacionais de espécies arbóreas tem demonstrado tratar-se de uma ferramenta com alto poder de discriminação (Ramalho et al., 2016; Rocha et al., 2017; Chimello et al., 2017; Freire et al., 2019). Além disso, os marcadores ISSR permitem uma boa quantificação da variabilidade intra e interespecíficas, da estimativa da variabilidade genética em espécies selvagens e cultivadas, entre e dentro de populações, e análise da diversidade genética para a caracterização de acessos e cultivares de várias espécies (Costa, J. et al., 2012; Dantas et al., 2012; Uysal et al., 2010; Chagas et al., 2015; Soares et al., 2016).

O estudo da diversidade genética em *O. pyramidale*, por meio de características fenotípicas, demandaria longo período de tempo, por se tratar de uma espécie perene, e estudos de diversidade genética através de marcadores moleculares são incipientes para a espécie. Assim, o uso de marcadores moleculares ISSR na avaliação da diversidade genética se faz importante para caracterizar indivíduos de maneira precoce e em menor espaço de tempo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 3A Composites – Fabricante de materiais compósitos. <https://www.3accorematerials.com/en/products/baltek-balsa/baltek-vbc-balsa-veneer> <Site principal: <http://www.3acomposites.com/>>. Acesso em: 15, janeiro, 2020.
- AIKMAN, J. M. The Ecology of Balsa (*Ochroma lagopus* Swartz) in Ecuador. **Proceedings of the Iowa Academy of Science**. 62(1): 245-252, 1955.
- ALEXANDER, M. P. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**. 1:13-8, 1980.
- ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B. A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D. A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. **American Journal of Botany**. 86(10):1774-1486, 1999.
- ALVES-PEREIRA, A.; VIANA, J. P.; ZUCCHI, M. I. Caracterização Genética por Marcadores Moleculares. In: VEIGA, R. F. de A.; QUEIRÓZ, M. A. de. (ed). **Recursos Fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil**. Viçosa: UFV, 2015. p.198-203.
- ALVINO, F. de O.; RAYOL, B. P. Efeito de Diferentes Substratos na Germinação de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. (Bombacaceae). **Ciência Florestal**. 17(1):71-75, 2007.
- AREFLORESTA. **Marcos regulatórios de florestas plantadas**. Cuiabá: Arefloresta, 2015. (Seminário PDFS-MT 2015).
- ARENAS-DE-SOUZA, M. D.; ROSSI, A. A. B; VARELLA, T. L.; SILVEIRA, G. F. D.; SOUZA, S. A. M. Stigmatic receptivity and pollen viability of *Theobroma subincanum* Mart.: fruit species from the amazon region. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 38(4), 2016.
- BAO, F; ROCHA, M DA; OLIVEIRA, MT DE; BAMBIL, D E LUZ, PB. Superação de dormência e estabelecimento de plântulas normais e anormais para produção de mudas de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. **Iheringia, Série Botânica**. 71(3):269-276, 2016.
- BARTH, O. M. **Glossário palinológico: Parte complementar ao catálogo sistemático dos pólen das plantas arbóreas do Brasil Meridional**. Rio de Janeiro: Instituto Osvaldo Cruz. 1964. 45p.
- BAUM, D. A.; SMITH, S. D. W.; YEN, A.; ALVERSON, W. S.; NYFFELER, R.; WHITLOCK, B. A.; OLDFHAM, R. L. Phylogenetic relationship of Malvaceae (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae sensu lato) as inferred from plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**. 91(11):1863-1871, 2004.

BAYER, C.; FAY, M. F.; DE BRUIJIN, A. Y.; SAVOLAINEN, V.; MORTON, C. M.; KUBITZKI, K.; ALVERSON, W. S.; CHASE, M. W. Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* DNA sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 129 (4):267-303, 1999.

BAYER, C.; KUBITZKI, K. Malvaceae. In: Kubitzki K., Bayer C. (eds) Flowering Plants - Dicotyledons. The families and genera of vascular plants. Malvales, Capparales and non-betalain Caryophyllales. **Springer**. 5:225-311, 2003.

BEHLING, M.; SANTIN, J.; FARIA, J. B.; CAMARGO, D.; ALIBERTI, P. R.; PAIXÃO, F. L. M.; LANGE, A. Crescimento de pau-de-balsa sob diferentes níveis de adubação e espaçamento, em Guarantã do Norte, MT. In: FARIAS NETO, A. L. de. (ed). **Embrapa Agrossilvipastoril: primeiras contribuições para o desenvolvimento de uma agropecuária sustentável**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 442-453.

BIZUTI, D. T. G.; TANIWAKI, R. H.; SILVA, R. J.; COSTA, C. O. R. da; RONCON, T. J.; VIANI, R. A. G.; BRANCALION, P. H. S. Influência da composição de espécies florestais no microclima de sub-bosque de plantios jovens de restauração. **Scientia Forestalis**. 44(112):971-978, 2016.

BLACKMORE, S. Pollen and spores: microscopic keys to understanding the earth's biodiversity. **Plant Systematics and Evolution**. 263: 3-12, 2007.

BORGES, R.C.; SANTOS, F.M.G.; MAIA, M.C.C.; LIMA, P.S.C.; VALENTE, S.E.S. Investigating genetic diversity in sapucaia using inter simple sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**. 15(3), 2016.

BORREGA, M., AHVENAINEN, P., SERIMAA, R.; GIBSON, L. J. Composition and structure of balsa (*Ochroma pyramidale*) wood. **Wood Science and Technology**. 49, 403–420, 2015.

BORREGA, M.; GIBSON, L. J. Mechanics of balsa (*Ochroma pyramidale*) wood. **Mechanics of Materials**. 84:75-90, 2015.

BOVINI, M. G.; ESTEVES, G.; DUARTE, M. C.; TAKEUCHI, C.; KUNTZ, J. Malvaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB156>>. Acesso em: 16, dezembro, 2019.

BRAGA, C. dos S.; ZANETTI, G. T.; LIMA, J. dos S.; OLIVEIRA, C. A. DA C.; KARSBURG, I. V. Comportamento meiótico e viabilidade polínica de *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) por meio de testes colorimétricos. **Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer**. 5(9):478- 486, 2018.

BRIGHENTI, D. M.; BRIGHENTI, C. R. G. Bees (Hymenoptera: Apidae) present in the flowers of the balsa wood *Ochroma lagopus* Swartz. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. 32(4):343-348, 2010.

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 calorimétricos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. 9(17):2780-2788, 2013.

CAÑADAS-LÓPEZ, A.; RADE-LOOR, D.; SIEGMUND-SCHULTZE, M.; MOREIRA-MUÑOZ, G.; VARGAS-HERNÁNDEZ, J. J.; WEHENKEL, C. Growth and Yield Models for Balsa Wood Plantations in the Coastal Lowlands of Ecuador **Florestas**. 10 (9), 2019.

CARREIRA, L. M. M; RAPOSO, R. DE C.; LOBATO, E. S. P. **Morfologia polínica de plantas cultivadas no parque do Museu Goeldi**. VII - Família Bombacaceae. Museu Paraense Emílio Goeldi, sér. Bot. 11(2), 1995.

CARRIÓ, E.; JIMÉNEZ, J. F.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, P.; GÜEMES, J. Reproductive biology and conservation implications of three endangered snapdragon species (*Antirrhinum*, Plantaginaceae). **Biological conservation**. 142(4):1854-63, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas. Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v.4, 644p.

CARVALHO-SOBRINHO, J. G.; ALVERSON, W. S.; ALCANTARA, S.; QUEIROZ, L. P.; MOTA, A. C.; BAUM, D. A. Revisiting the phylogeny of Bombacoideae (Malvaceae): Novel relationships, morphologically cohesive clades, and a new tribal classification based on multilocus phylogenetic analyses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 101:56-74, 2016.

CHAGAS, K. P. T.; SOUSA, R. F.; FARJADO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. 10(1):147-152, 2015.

CHIMELLO, A.M.; JESUS, J. G.; TEODORO, P. E.; ROSSI, A. A. R.; ARAÚJO, K. L.; MAROSTEGA, T. N.; NEVES, L.G.; BARELLI, M.A.A. Morphological descriptors and ISSR molecular markers in the evaluation of genetic variability of *Tectona grandis* genotypes. **Genetic and Molecular Research**. 16 (2), 2017.

COPROMAB-MT, Cooperativa de Produtores de Pau-de-Balsa de Mato Grosso. **Pau-de-balsa: aptidões e desafios**. 2012. Disponível em <www.embrapa.br>

COSTA, D. F. da; VIEIRA, F. de A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. das. Diversidade Genética e Seleção de Iniciadores ISSRs em uma População Natural de

Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (APOCYNACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 37(4):970-976, 2015.

COSTA, J. L.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding Applied Biotechnology** 12:253-260, 2012.

COSTA, S. G.; MORATO, E. F.; SALIMON, C. I. Densidade de bambu e estrutura populacional de duas espécies arbóreas pioneiras em florestas secundárias de diferentes idades em um remanescente florestal, Acre. **Scientia Forestalis**. 40(95):363-374, 2012.

COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S.; S, A. R. F.; SILVA JÚNIOR, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 46(5):499-508, 2011.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1ª edição. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011. 620p.

CUNHA, H. F. V.; GONÇALVES, J. F. de C.; SANTOS JUNIOR, U. M.; FERREIRA, M. J.; PEIXOTO, P. H. P. Biomassa, trocas gasosas e aspectos nutricionais de plantas jovens de pau de balsa (*Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lamb.) Urb.) submetidas à fertilização fosfatada em ambientes contrastantes de irradiância. **Scientia Forestalis**. 44(109):215-230, 2016.

CUTLER, D. F.; BOTHA, T.; STEVENSON, D. W. **Anatomia vegetal - uma abordagem aplicada**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 288p.

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

DAHLGREN, R. M. T. A revised system of classification of angiosperms. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 80(2):91-124, 1980.

DALBERTO, D. S.; BRAGA, L. F. Estresse osmótico e putrescina na germinação de sementes de *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam) Urb (Malvaceae). **Científica**. 41(2):99-110, 2013.

DANTAS, A. C. A.; NUNES, G. H. S.; ARAÚJO, I. S.; ALBUQUERQUE, L. B. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 34(1):183-189, 2012.

DETTKE, G. A.; SANTOS, R. P. dos. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. 9(1):48-74, 2011.

DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plant Biology**. 1(1), 20-33, 2008.

DIEGUES, I. P.; DAMASCENO, P.C. JR.; RIBEIRO, N. V. S; REIS, M. V. M.; ABOUD, A. C. S. Comportamento meiótico e viabilidade polínica na espécie *Jatropha curcas* L. **Semina: Ciências Agrárias**. 36(1): 141-150, 2015.

FAJARDO, C.G.; VIEIRA, F.A.; FELIX, L. P.; MOLINA, W.F. Negligence in the Atlantic forest, northern Brazil: a case study of an endangered orchid. **Biodiversity and Conservation**. 26(5):1047–1063, 2017.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FALEIRO, F. G. Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de. (ed.) **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 31-52.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.377-420.

FLORA DO BRASIL. Malvaceae. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23583>>. Acesso em: 06, janeiro, 2020.

FRANCIS, J. K. *Ochroma pyramidale* Cav. **Balsa**. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1991, 6p.

FRANZON, R. C.; CASTRO, C. M.; RASEIRA, M. D. C. B. Variabilidade genética em populações de pitangueira oriundas de autopolinização e polinização livre, acessada por AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 32(1), 240-250, 2010.

FREIRE, A. DA S. M.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. DAS; PINHEIRO, L. G.; LUCAS, F. M. F.; VIEIRA, F. DE A. Genetic diversity in forest populations from conservation units in the Atlantic Rainforest in northeast Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. 14(2), e5640, 2019.

FRESCURA, V. D. S.; LAUGHINGHOUSE, I. V.; DAIL, H.; DOROW, T. S. D. C.; TEDESCO, S. B. Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different staining methods. **Biocell**. 36(3):143-145, 2012.

GOMES, I. B.; REIS, C. A. da S. Uso de Substratos Orgânicos no Crescimento Inicial de Pau-de-Balsa *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. **Revista Tree Dimensional, ProFloresta**. 3(5):35-42, 2018.

GONZÁLEZ, B.O.; MOLINA, X.C.; NAVARRETE, E.T.; FONSECA, C.S.; SIMBA, L. Caracterización Del Cultivo De Balsa (*Ochroma Pyramidale*) En La Provincia De Los Ríos - Ecuador. **Ciencia y Tecnología**. 3(2): 7-11, 2010.

GUTIÉRREZ, K. G.; MOSQUERA, H. R. M. Estandarización de la Acetólisis de Erdtman (1969) para el Análisis Palinológico de Muestras Fecales de Murciélagos Polinizadores (*Phyllostomidae: Glossophaginae – Lonchophyllinae*). **Revista Tumbaga**. 1(11):49-81, 2016.

HALBRITTER, H.; ULRICH, S.; GRÍMSSON, F.; WEBER, M.; ZETTER, R.; HESSE, M.; BUCHNER, R.; SVOJTKA, M.; FROSCH-RADIVO, A. **Illustrated pollen terminology**. 2ª ed. Springer. 2018. 487p.

HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, R.; MAGALLÓN, S. The timing of Malvales evolution: Incorporating its extensive fossil record to inform about lineage diversification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 140, 2019.

HISTER, C. A. L.; TEDESCO, S. B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 18(1):135-141, 2016.

IBA – Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Anual 2019**. São Paulo, 2019. 80p. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>>. Acesso em 20, janeiro, 2020.

JENKIN, B.; MINIMULU, J.; KANOWSKI, E.P. Improving the smallholder balsa value chain in East New Britain Province, Papua New Guinea. **Australian Forestry**. 82(1):23-31, 2018.

JU, M. M.; FU, Y.; ZHAO, G. F.; HE, C. Z.; LI, Z. H.; TIAN, B. Effects of the Tanaka Line on the genetic structure of *Bombax ceiba* (Malvaceae) in dry-hot valley areas of southwest China. **Ecology and evolution**. 8(7): 3599-3608, 2018.

JUDD, W. S.; MANCHESTER, S. R. Circumscription of Malvaceae (Malvales) as determined by a preliminary cladistic analysis of morphological, anatomical, palynological, and chemical characters. **Brittonia**. 49(3):384-405, 1997.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**. 64: 93-107, 2003.

KAGEYAMA, P.Y.; CASTRO, C.F.A. Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas. IPEF, v.41/42, p.83-93, 1989.

KAUR, D.; SINGHAL, V. K. Meiotic abnormalities affect genetic constitution and pollen viability in dicots from Indian cold deserts. **BMC Plant Biology**. 19(10), 2019.

KOTLAREWSKI, N. J.; BELLEVILLE, B.; GUSAMO, B. K.; OZARSKA, B. Mechanical properties of Papua New Guinea balsa wood. **European Journal of Wood and Wood Products**. 74(1): 83-89, 2016.

KOTLAREWSKI, N. J.; DERIKVANDA, M.; LEE, M.; NOLAN, G.; HAGUE, J. R. B. Bifenthrin treatment for balsa: Susceptibility of Papua New Guinea-grown *Ochroma pyramidale* to attack by *Coptotermes acinaciformis* (Blattodea: Rhinotermitidae) in an Australian context. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 137:153-157, 2019.

KRUTOVSKY, K. V.; BURCZYK, J.; CHYBICKI, I.; FINKELDEY, R.; PYHÄJÄRVI, T.; ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J. Gene Flow, Spatial Structure, Local Adaptation, and Assisted Migration in Trees. In: SCHNELL, R. J.; PRIYADARSHAN, P.M. (eds.), **Genomics of Tree Crops**. Springer. p.71-116, 2012.

LEÃO, N. V. M.; FREITAS, A. D. D. de; CARRERA, R. H. A. **Pau-de-balsa *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lamb.) Urban**. Embrapa Amazônia Oriental, Manaus: INPA. Informativo técnico Rede de Sementes da Amazônia, 19. 2008, 2p.

LIMA JÚNIOR, P. H. de; FERREIRA, W. C.; DIAS, D. P.; CORRÊA, R. S.; SILVA, D. F. P. da. Crescimento Inicial de Espécies Arbóreas Nativas em Diferentes Espaçamentos em Área Degradada. **Global Science and Technology**. 12(1):183-196, 2019.

LIMA, J. B.; BOVINI, M.G.; CONCEIÇÃO, A. de S. Bombacoideae, Byttnerioideae, Grewioideae and Helicterioideae (Malvaceae *s.l.*) in the Raso da Catarina Ecoregion, Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**. 19(3), 2019.

LIMA, R. A. de; LOPES, M. T. G.; BENTES, J. L. da S.; VALENTE, G. S. F.; PEREIRA, J. O.; MUNIZ, G. I. B. de Diversidade e Estrutura Genética de *Senna reticulata*. **Floresta**. 45(3):507 - 514, 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v.1. 384 p.

- LOVE, R. M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**. 43: 72-76, 1951.
- MACHADO, M. R.; CAMARA, R.; SAMPAIO, P. de T. B.; FERRAZ, J. B. S.; PEREIRA, M. G. Silvicultural performance of five forest species in the central Brazilian Amazon. **Acta Amazonica**. 48(1):10-17, 2018.
- MARENCO, R. A.; GONÇALVES, J. F. C.; VIEIRA, G. Photosynthesis and leaf nutrients contents in *Ochroma pyramidale* (Bombacaceae). **Photosynthetica**. 39(4):539-543, 2001.
- MASCARENHAS, J. P. Gene activity during pollen development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 41: 317-338, 1990.
- MENDES M. L.; SOBRINHO, S. De P.; LUZ, P.B. da; BARELLI, M. A. A.; NEVES, L. G. Influência do substrato e do nível de umidade sobre a germinação de sementes de pau-de-balsa. **Revista Caatinga, Mossoró**. 23(4):155-160, 2010.
- MENDES, A. D. R.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S. Estudo do sistema de reprodução da fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 15(4):605-608, 2013.
- MEYER, A.S.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. P.; SOUZA JR, C. L. de. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**. 27(1):83-91, 2004.
- MIDGLEY, S.; BLYTH, M.; HOWCROFT, N. MIDGLEY, D.; BROWN, A. **Balsa: biology, production and economics in Papua New Guinea**. Australian Government: Aciar technical reports 73. Canberra, 2010.
- MORA, J. M.; MENDEZ, V. V.; GOMEZ, L. D. White-nosed coati *Nasua narica* (Carnivora: Procyonidae) as a potential pollinator of *Ochroma pyramidale* (Bombacaceae). **Revista Tropical Biology**. 47(4):719-721, 1999.
- MORANTE-ALARCÓN, V. E.; ROJAS-IDROGO, C.; DELGADO-PAREDES, G. E. *In Vitro* Plant Propagation and Partial Organogenesis in Palo de Balsa [*Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam.) Urban.]. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**. 7(2), 2017.
- MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P. da; MEISSNER-FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Brazilian Journal of Botany**. 31(2), 209-214, 2008.
- NETTO, D. A. M. Germinação de sementes de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale* (C.a.v.) Urb. -Bombacaceae). **Revista Brasileira de Sementes**. 16(2):159-162, 1994.

NG, W. L.; TAN, S.G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Are We Doing It Right? **ASM Science Journal**. 9(1):30-39, 2015.

NOGUEIRA, W. L. P.; FERREIRA, M. J.; MARTINS, N. O. de A. Estádio inicial da regeneração natural de espécies arbóreas em área alterada no Estado do Amazonas. **Pesquisa Florestal Brasileira**. 38, 2018.

NUNES, R. DE C.; BUSTAMANTE, F. DE O.; TECHIO, V. H.; MITTELMANN, A. Morphology and pollen viability of *Lolium multiflorum* Lam. **Ciência e Agrotecnologia**. 36(2):180-188, 2012.

NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**. 13, 1143-1155, 2004.

NYFFELER, R.; BAYER, C.; ALVERSON, W. S.; YEN, A.; WHITLOCK, B. A.; CHASE, M. W.; BAUM, D. A. Phylogenetic analysis of the Malvadendrina clade (Malvaceae *s.l.*) based on plastid DNA sequences. **Organisms Diversity & Evolution**. 5:109-123, 2005.

OLIVEIRA, L. B. P DE; PIERRE, P. N. O. Índice meiótico e palinologia de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC-Myrtaceae). **Revista de Ciências Agroveterinárias**. 17(4), 2018.

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 de germoplasma. In: CURSO DE CITOGENÉTICA APLICADA A RECURSOS VEGETAIS, 2, 2004, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 2004.

PEREIRA, T. N. S.; GERONIMO, I. G. D. 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(3):273-279, 2017.

PINTO-MAGLIO, C. A. F.; PIEROZZI, N. I. Caracterização citogenética. In: VEIGA, R. F. de A.; QUEIRÓZ, M. A. de. (ed). **Recursos Fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil**. Viçosa: UFV, 2015. p.204-213.

RACHMAT, H. H.; SUBIAKTO, A.; SUSILOWATI, A. Genetic resources of fast-growing tree for rehabilitating upland area of deteriorated Saguling catchment, West Java, Indonesia. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**. 20(2), 442-447, 2019.

RAMALHO, A. B.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; ZORTÉA, K. É. M.; TIAGO, A. V.; MARTINS, K. C. Diversidade genética entre genótipos de *Bertolletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Floresta**. 46(2):207-214, 2016.

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

REIS, C. A. F.; FILHO, E. P. **Estado de arte de plantios com espécies florestais de interesse para Mato Grosso**. Colombo. Embrapa Florestas, 2011, 63p. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/39917/1/Doc215.pdf>

ROCHA, V. D.; TIAGO, P. V.; TIAGO, A. V.; PEDRI, E. C. M.; CARDOSO, E. S.; ROSSI, A. A. R. Genetic diversity among *Hymenaea courbaril* L. genotypes naturally occurring in the north of Mato Grosso State, Brazil. **Genetic and Molecular Research**. 16(3), 2017.

RODRIGUES, R. R.; LIMA, R. A. F.; GANDOLFI, S.; NAVE, A. G. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**. 142(6):1242-1251, 2009.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 24(1):15-22, 2002.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J. DE; SOARES FILHO, W. DOS S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. DE C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 33(3), 868-876, 2011.

SANTOS, D. G. de J.; DEUNER, C.; MENEGHELLO, G. E.; ALMEIDA, A. P. F. DE; XAVIER, F. da M. Superação de dormência em sementes de pau de balsa (*Ochroma pyramidale*). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. 11(3):18-22, 2016.

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S. ISSR Markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**. 49(7-8):540-554, 2011.

SANTOS, T. A. dos; TIAGO, A. V.; FERREIRA, E. L.; RODRIGUES, A. S.; ROSSI, A. A. B. Índice Meiótico e Viabilidade Polínica de *Hymenaea courbaril* L., no Município de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. 16(29):1890-1900, 2019.

SANTOS, T. A. dos; TIAGO, P. V.; SCHMITT, K. F. M.; MARTINS, K. C.; ROSSI, A. A. B. Viabilidade polínica em *Bertolletia excelsa* bonpl. (Lecythidaceae) baseada

em diferentes testes colorimétricos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. 11(22): 3136-3144, 2015.

SANTOS, U. F.; XIMENES, F. S.; LUZ, P. B.; SEABRA JR, S.; PAIVA, S. Níveis de sombreamento na produção de mudas de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale*). **Bioscience Journal**. 30(1):129-136, 2014.

SARTORETTO, L. M.; FARIAS, P. C. M. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. **Unoesc & Ciências – Área das Ciências Exatas e da Terra**. 1(2): 155-162, 2010.

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

SILVA, A. V. C. da; SANTOS, A. R. F. dos; LÉDO, A. da S.; FEITOSA, R. B.; ALMEIDA, C. S.; SILVA, G. M. da; RANGEL, M. S. A. Moringa Genetic Diversity From Germplasm Bank Using Rapd Markers. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**. 15:31-39, 2012.

SILVA, C. E. M.; GONÇALVES, J. F. C.; ALVES, E. G. Photosynthetic traits and water use of tree species growing on abandoned pasture in different periods of precipitation in Amazonia. **Photosynthetica**. 49 (2):246-252, 2011.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOARES, A. N. R.; VITÓRIA, M. F.; NASCIMENTO, A. L. S.; LEDO, A. S.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A.V.C. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. **Genetic and Molecular Research**. 15(3), 2016.

SOUZA, U. J. B. DE; TELLES, M. P. DE C.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Tendências da literatura científica sobre genética de populações de plantas do Cerrado. **Hoehnea**. 43(3): 461-477, 2016.

STEWART, R. Sandwich composites excel at cost-effective, lightweight structures. **Reinforced Plastics**. 55(4):27-31, 2011.

TAKHTAJAN, A. L. Outline of the classification of the flowering plants (Magnoliophyta). **The Botanical Review**. 46(3):225-359, 1980.

TALLEDO, B. G.; ZAMBRANO, A. B.; CRUZATTY, L. G.; GAVILANES, F. Z. Morphology, viability, and longevity of pollen of National Type and Trinitarian (CCN-

51) clones of cocoa (*Theobroma cacao* L.) on the Coast of Ecuador. **Brazilian Journal of Botany**. 42:441–448, 2019.

THE PLANT LIST - A working list of all plant species. *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. Publication in International Plant Names Index (IPNI). Disponível em: <<https://www.ipni.org/n/171458-2>>. Acesso em: 06, janeiro, 2020.

TONINI, H.; OLIVEIRA JUNIOR, M. M. C. de; SCHWENGBER, D. Crescimento de Espécies Nativas da Amazônia Submetidas do Plantio no Estado de Roraima. **Ciência Florestal**. 18(2):151-158, 2008.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; ZANELLA, C. M. Marcadores genéticos baseados em DNA In: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p.12-20.

UYSAL, H.; YONG-BI, F.; KURT, O.; PETERSON, G. W.; DIEDERICHSEN, A. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 57(7):1109-1119, 2010.

VLEUT, I.; LEVY-TACHER, S. I.; BOER, W. F. de; GALINDO-GONZÁLEZ, J.; Ramírez-Marcial, N. Can a fast-growing early-successional tree (*Ochroma pyramidale*, Malvaceae) accelerate forest succession? **Journal of Tropical Ecology**. 29(2):173-180, 2013.

WANG J.; KANG X. Y.; ZHU Q. Variation in pollen formation and its cytological mechanism in an allotriploid white poplar. **Tree Genet Genomes**. 6:281–290, 2010.

WEIRICH, N. E. **Diretrizes técnicas para o cultivo do pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale*) no Estado de Mato Grosso**. Cuiabá: SEDER-MT, 2008. 22p. Disponível:< <http://www.ruralcentro.com.br/analises/2085/diretrizes-tecnicas-para-o-cultivo-de-pau-de-balsa-no-estado-de-mato-grosso>>. Acesso em: 10, dezembro, 2019.

XIE, W.G.; ZHANG, X. Q.; CAI, G. W.; LIU, W.; PENG, Y. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). **Biochemical Systematics and Ecology**. 38(4):740-749, 2010.

ZAPPI, D. C.; BFG - THE BRAZIL FLORA GROUP. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**. 66(4): 1085-1113, 2015.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**. 20:176-183, 1994.

ZHANG, X.; CAO, Q.; ZHOU, P.; JIA, G. Meiotic chromosome behavior of the male-fertile allotriploid lily cultivar ‘Cocossa’. **Plant Cell Reports**. 36(10):1641–1653, 2017.

4. CAPÍTULOS

4.1 CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ÍNDICE MEIÓTICO E VIABILIDADE POLÍNICA DE *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam. Urb., Malvaceae)

INTRODUÇÃO

A espécie *Ochroma pyramidale* Cav. ex Lam. Urb. (sinônimo *Ochroma lagopus*) pertence à família Malvaceae e é conhecida popularmente como pau-de-balsa. É uma árvore neotropical amplamente distribuída, encontrada na Índia Ocidental e em toda a América Tropical, ocorrendo naturalmente no sul do México, América Central, Antilhas e América do Sul (Morante-Alarcón et al., 2017). No Brasil, a espécie está distribuída nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Roraima (Carvalho, 2010).

O Equador é tradicionalmente o maior produtor de madeira de pau-de-balsa do mundo, abastecendo 89% do mercado global (Kotlarewskie et al., 2016). No Brasil os cultivos ainda são incipientes. No estado de Mato Grosso houve incentivo ao cultivo para silvicultura e um aumento significativo ocorreu entre os anos 2000 a 2010. De acordo com a Cooperativa dos Produtores de Pau-de-Balsa, a espécie possuía em 2012 cerca de 7 mil hectares plantados.

Os plantios comerciais de pau-de-balsa, tanto no Brasil como no Equador, são realizados com sementes oriundas de florestas nativas na ampla área de distribuição natural da espécie, o que preserva uma amostra importante da diversidade genética natural. Porém, segundo Behling et al. (2019) e Zambrano et al. (2019) a grande variabilidade genética dos plantios pode gerar heterogeneidade de características silviculturais importantes como, por exemplo, altura de fuste e densidade da madeira.

De acordo com Maués e Oliveira (2010), o conhecimento dos processos reprodutivos de espécies arbóreas tropicais pode fornecer informações importantes para garantir a reprodução e manutenção da diversidade genética das espécies nas áreas manejadas como por exemplo nos cultivos da espécie *O. pyramidale*.

A viabilidade do pólen é considerada uma medida da fertilidade masculina. Altas taxas de viabilidade polínica refletem em meiose e índice meiótico regulares, indicando a potencialidade dos genótipos e influenciando diretamente no sucesso da fertilização, segundo Cabral et al. (2013) e Zambrano et al. (2019).

A fertilidade das plantas depende da regularidade meiótica que pode ocorrer durante a formação dos grãos de pólen (Pereira et al., 2017). O índice meiótico é resultado do estudo dos produtos pós-meióticos, observando-se a formação de tétrades normais, tríades, díades ou mônades que estão diretamente relacionadas à regularidade na meiose, logo, o índice meiótico é um dado complementar à análise meiótica, sendo, portanto, um indicador de regularidade na meiose (Oliveira e Pierre, 2018).

O estudo e a caracterização de grãos de pólen são essenciais para diferentes áreas, principalmente taxonomia, melhoramento genético, filogenia e paleobotânica (Nunes et al., 2012). As características morfológicas dos grãos de pólen como forma, tamanho, número de aberturas e ornamentação da exina, são consideradas de valor taxonômico porque permanecem constantes dentro da mesma espécie (Blackmore, 2007; Talledo et al., 2019). Informações a respeito da morfologia polínica de *O. pyramidale* não foram encontradas, apenas um estudo realizado por Carreira et al. (1995) com a espécie sinônima *O. lagopus Sw* cultivada no Parque do Museu Goeldi, Pará, Brasil.

As análises citoquímicas dos grãos de pólen são muito utilizadas para avaliar a presença de substâncias de reserva. Dados citoquímicos que evidenciem a presença de componentes de reserva específicos em grãos de pólen são importantes para o entendimento de aspectos ecológicos relacionados principalmente aos mecanismos de polinização (Dettke e Santos, 2011; Oliveira e Pierre, 2018).

Estudos acerca da biologia do pólen de *O. pyramidale* como, por exemplo, germinação, viabilidade e armazenamento, ainda são incipientes, como já foi afirmado por Zambrano et al. (2019). Diante disso e considerando a importância econômica e ecológica da espécie, este trabalho objetivou avaliar aspectos morfológicos e reprodutivos de *O. pyramidale*, a fim de gerar conhecimentos para planejamento de programas de melhoramento genético e conservação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e coleta do material vegetal

As coletas do material vegetal de *O. pyramidale*, flores e botões florais em vários estágios de desenvolvimento (Figura 1) foram realizadas em seis indivíduos, três em Sinop (SP01, SP02 e SP03), dois em Itaúba (IT04 e IT05) e um em Alta Floresta (AF06), municípios localizados no norte do estado de Mato Grosso (Figura 2).

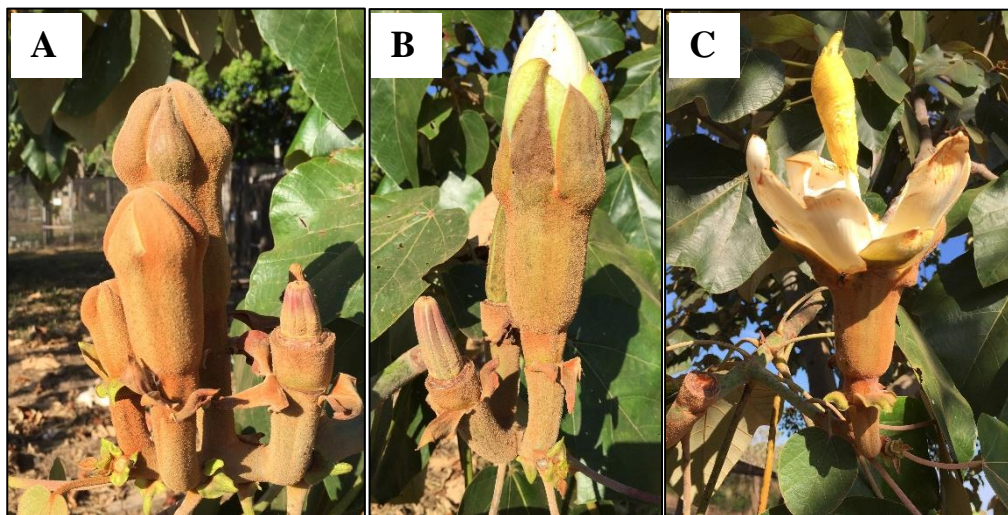


Figura 1. Botões florais de *Ochroma pyramidale* em diferentes fases de desenvolvimento (A-B); flor de *Ochroma pyramidale* em antese (C).

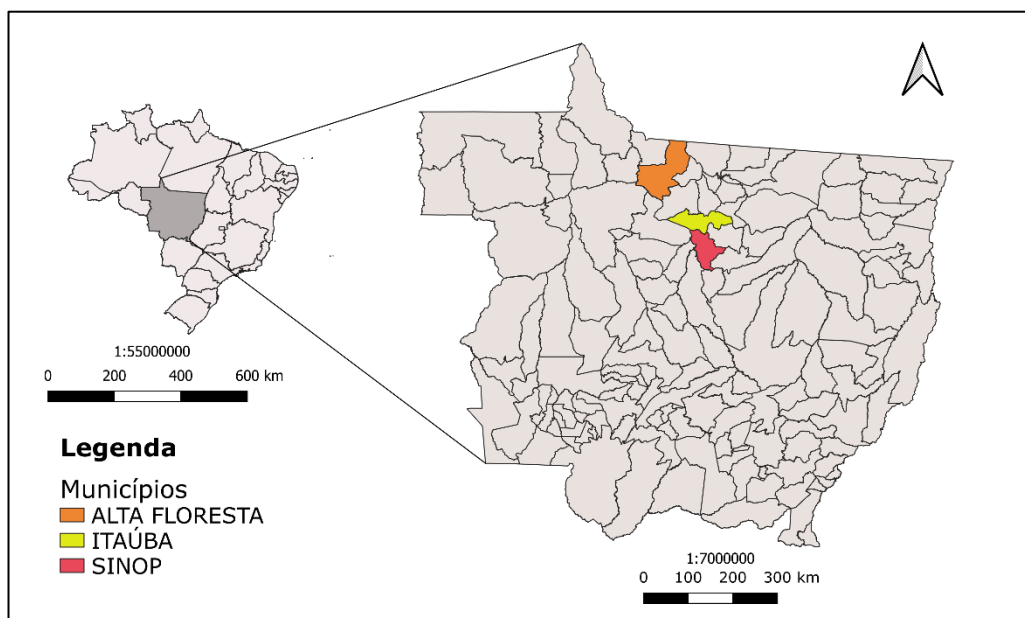


Figura 2. Localização geográfica dos municípios de Alta Floresta, Itaúba e Sinop, Mato Grosso, onde foram coletados os materiais vegetais de *Ochroma pyramidale*.

Os materiais vegetais coletados 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 a 4°C até a utilização para avaliação dos produtos pós-meióticos, da morfologia do grão de pólen e viabilidade polínica. As análises foram conduzidas no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular (GenBioMol) da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Alta Floresta, Mato Grosso, durante o mês de fevereiro de 2019.

Diagnose morfológica

Para descrição da morfologia de *O. pyramidale* realizou-se a coleta de folhas, botões florais, flores, frutos e sementes de três indivíduos localizados em Sinop, MT. O material foi levado ao CNMT (Herbário Centro-Norte-Mato-Grosso) da Universidade Federal de Mato Grosso, para montagem das exsicatas e posterior descrição. O material foi depositado sob o número de tombo: 9214. A ilustração botânica foi realizada no Herbário VIC, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Morfologia do grão de pólen

Para análise da morfologia polínica utilizou-se o método de acetólise proposto por Erdtman (1943). As anteras dos botões em pré-antese foram mantidas em microtubos de 1,5 mL, contendo 1 mL de ácido acético, por 20 minutos. Após este período, o material foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto, durante 5 minutos. Posteriormente foi descartado o sobrenadante, ficando no microtubo somente os polens que formaram um *pellet*. Posteriormente, acrescentou-se ao microtubo, sobre o *pellet*, 1 mL da solução acetólica na proporção 9:1 (anidrido acético: ácido sulfúrico), para promover a hidrólise ácida nos grãos de pólen e remover o conteúdo celular, facilitando a visualização e reconhecimento da morfologia do pólen.

Em seguida, os microtubos permaneceram em banho-maria por 10 minutos, a 100 ± 2 °C. O material foi centrifugado a 3.000 rpm, durante 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, sendo acrescentado ao microtubo 1 mL de água destilada e 100 µL de álcool etílico absoluto, o material foi novamente centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Acrescentou-se 1 mL de água destilada e glicerina na proporção de 3:1 deixando em suspensão por duas horas. Após este período, foram confeccionadas lâminas contendo duas gotas da amostra glicerinada para observação em

microscópio óptico na magnitude de 40x. Os polens foram fotografados utilizando câmera digital (Biocam) acoplada ao microscópio, com auxílio do sistema de captura de imagens TsView 7 e posteriormente analisados e mensurados utilizando-se o programa Anati Quanti 2® UFV (Aguiar et al., 2007).

As mensurações dos grãos de pólen foram realizadas em fotos tiradas no mesmo dia do preparo das lâminas, evitando possível dilatação (Salgado-Labouriau, 1973), visto que os grãos de pólen tendem a aumentar o tamanho depois de submetidos ao processo de acetólise (Faegri e Deuse, 1960). Além disso, evita-se o intumescimento e alterações no tamanho dos polens. Essas alterações ocorrem devido à 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 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. Foram mensurados o diâmetro polar (eixo polar) e equatorial em vista equatorial (Figura 3A) (grão de pólen perpendicular à vista polar), o diâmetro equatorial em vista polar (grão de pólen com a área polar voltada para o observador) (Figura 3B), a espessura das camadas da exina (sexina e nexina) e os diâmetros da abertura do pólen.

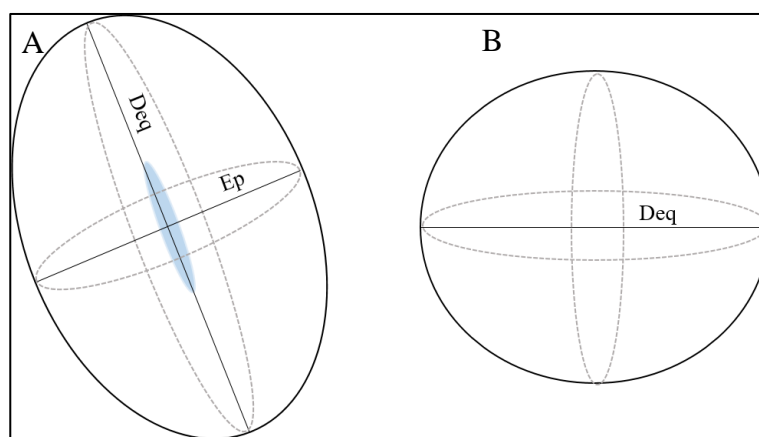


Figura 3. Ilustração esquemática dos parâmetros medidos para caracterização dos grãos de pólen. A. Vista equatorial. B. Vista polar. Deq: diâmetro equatorial. Ep: eixo polar (diâmetro polar) em vista equatorial. A região sombreada corresponde à abertura do tipo poro.

A forma das aberturas foi determinada de acordo com a relação entre os dois diâmetros da mesma, de acordo com Erdtman (1952). As aberturas dos grãos de pólen

são classificadas como poro quando a relação entre os dois diâmetros for inferior a 2. Por outro lado, aberturas do tipo colpo são aberturas alongadas cuja relação entre os dois diâmetros for superior a 2 e quando a abertura for a fusão das duas formas é classificado como colporo.

A classificação do tamanho dos grãos de polens foi baseada no comprimento do maior eixo (Barth, 1964): 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).

Para classificar os grãos de pólen de acordo com sua forma e simetria foi utilizada a relação entre o eixo polar e o eixo equatorial (P/E) em vista equatorial, segundo classificação de Erdtman (1952) demonstrado por Barth (1964), descrita na Tabela 1.

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

P/E	Denominação	
<0,50	Peroblato	
0,50-0,75	Oblato	
0,75-0,88	Suboblato	Subesferoidal
0,88-1,00	Oblato esferoidal	
1,00-1,14	Prolato esferoidal	
1,14-1,33	Subprolato	
1,33-2,00	Prolato	
>2,00	Perprolato	

Os polens também foram classificados quanto ao Índice de Área Polar (IAP) proposto por Barth e Melhem (1988), dado pela relação entre as extremidades de duas aberturas adjacentes e a maior largura do grão de pólen em vista polar (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação dos grãos de pólen em relação ao Índice de Área Polar (IAP), descrita por Barth e Melhem (1988)

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)

As descrições polínicas e as terminologias adotadas foram baseadas nos glossários de Barth (1964) e de Barth e Melhem (1988). Para cada uma das mensurações polínicas foi estimada a média, desvio padrão da média, coeficiente de variação e intervalo de confiança.

Índice meiótico

A estimativa do índice meiótico (IM) foi realizada para os seis indivíduos de *O. pyramidale*. O preparo das lâminas consistiu-se na maceração de anteras provenientes de botões florais jovens, com auxílio do bastão de vidro, sob a lâmina de microscopia, e posteriormente coloração com carmim acético 2% (Radford et al., 1974). Foram contabilizados 2400 produtos pós-meióticos, sendo preparadas oito lâminas e analisadas 300 células por lâmina/indivíduo. Tétrades com quatro células de mesmo tamanho foram consideradas normais e qualquer desvio (mônade, díade, tríade e políade) foi considerado como anormal. Para estimar o índice meiótico (IM) utilizou-se a expressão proposta por Love (1951) (1):

$$IM = \frac{\text{Número de produtos pós-meióticos normais}}{\text{Número total de produtos pós-meióticos anormais e normais}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

IM = [(número total de tétrades normais/número total de mônades + díades + tríades + tétrades + políades)] x 100.

Os dados para índice meiótico foram submetidos à estatística descritiva: média, desvio padrão da média, coeficiente de variação, com auxílio do programa Genes (Cruz, 2013). Os dados também foram submetidos a análise de variância usando o modelo

linear generalizado com distribuição binomial, com auxílio do programa R (R COR TEAM, 2016).

Viabilidade polínica

A viabilidade polínica foi estimada para os seis indivíduos através de testes colorimétricos utilizando dois corantes: carmim acético 2% (Radford et al., 1974) e solução tripla de Alexander (Alexander, 1969).

No preparo das lâminas, as anteras foram separadas e levemente maceradas sob a lâmina de microscopia, junto a uma gota do corante (carmim acético 2% ou reativo de Alexander), aproximadamente 50µL, com auxílio de um bastão de vidro. Para cada corante foram preparadas 8 lâminas por indivíduo, totalizando 2.400 polens contabilizados por corante/indivíduo, pelo método de varredura, utilizando microscópio binocular em magnitude de 400x.

O carmim acético apresenta coloração avermelhada para os polens viáveis, pois o corante tem afinidade com o material genético no citoplasma (Pagliarini e Pozzobon, 2004). Já os grãos de pólen inviáveis são aqueles que não apresentaram coloração no citoplasma. O reativo de Alexander apresenta coloração diferencial dos polens viáveis e inviáveis devido à utilização simultânea de dois corantes, o verde malaquita e a fucsina ácida, os quais apresentam dupla coloração. Segundo Alexander (1980), o verde malaquita tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado de violeta pela fucsina ácida, considerado pólen viável. Dessa maneira, os grãos de pólen abortados coram-se de verde, por não apresentarem protoplasma.

A viabilidade polínica foi estimada por meio da porcentagem de grãos de pólen viáveis obtidos pela equação (2):

$$Viabilidade\ do\ pólen\ (\%) = \frac{Número\ de\ grãos\ viáveis}{Número\ de\ grãos\ contados} \times 100 \quad (2)$$

Os dados para viabilidade polínica foram submetidos à análise de variância através do modelo linear generalizado indicado para dados com distribuição binomial, utilizando o teste do qui-quadrado com auxílio do programa R (R CORE TEAM, 2016).

Citoquímica dos grãos de pólen

A fim de constatar a presença de substâncias de reserva nos grãos de pólen, técnicas citoquímicas foram utilizadas de acordo com o protocolo de Baker e Baker (1979). Anteras de botões em pré-antese foram maceradas para a confecção das lâminas com os corantes Lugol (Baker e Baker, 1979) para constatar a presença de amido e Sudan IV (Dafni, 1992) para a presença de lipídios.

Para o Lugol foram considerados grãos de pólen amido positivos, aqueles que apresentaram coloração marrom/amarela, e grãos de pólen amido negativos, aqueles que não apresentaram coloração no citoplasma (Baker e Baker, 1979). A coloração dos polens viáveis é possível devido a uma reação química que acontece entre o iodo e moléculas de amido (Pagliarini e Pozzobon, 2004). Em relação ao Sudan IV foram considerados lipídio positivos os grãos de pólen corados em vermelho e lipídio negativos os que não apresentaram coloração (Dafni, 1992).

Foram preparadas 8 lâminas por corante, contabilizando 300 grãos de pólen/lâmina, totalizando 2.400 polens contabilizados por corante. Para cada corante foi estimada a porcentagem de grãos de pólen corados, ou seja, aqueles que se apresentaram positivos para presença de amido e lipídio, e assim, definir a substância de reserva do pólen.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diagnose morfológica

A diagnose morfológica de *O. pyramidale* foi realizada para auxiliar no estudo dos aspectos reprodutivos, principalmente dos grãos de pólen da espécie. Os detalhes da morfologia de *O. pyramidale* podem ser observados na ilustração botânica (Figura 4).

As árvores de *O. pyramidale* possuem folhas grandes, simples, inteiras, 3-5-lobadas, palminérvias, ovais ou quase redondas de 15 a 35 cm de comprimento por 15 a 40 cm de largura, base cordada, esverdeadas, pecíolos longos (Figura 4A) (Little e Dixon, 1983; Lorenzi, 2008; Carvalho, 2010).

Os botões florais nascem em pedúnculos largos e grossos, localizados nas extremidades dos ramos e desenvolvem-se em flores grandes, vistosas, bissexuadas, as pétalas são alvas, carnosas de coloração branca ou esbranquiçada; cálice robusto, 5-lobado, as sépalas unidas com indumento ferrugíneo, podendo ser solitárias ou terminais, de 10 a 20 cm de comprimento por 7 a 9 cm de diâmetro (Figura 4B) (Carvalho, 2010).

De acordo com Flora do Brasil 2020, a *O. pyramidale* apresenta estames totalmente unidos em um tubo estaminal originando anteras anfractuosas de coloração amarela (Figura 4C-D e 5A). *Ochroma lagopus* possui 5 grandes estames, cujos filamentos se torcem em espiral para formar uma coluna que circunda o gineceu e, na superfície dos estames, encontram-se as numerosas anteras com dobras e lóbulos septados transversalmente (Rao et al., 1954; Little e Dixon, 1983).

A espécie possui ovário 5-locular com óvulos numerosos (Figura 4G-H). Os frutos são cápsulas loculicidas, oblongoides, com 5 valvas, sublenhosas, acinzentados. Os frutos quando abertos liberam uma pluma característica da espécie (Figura 4I). Entre esta pluma estão as pequenas e numerosas sementes (Figura 4J), que são amplamente disseminadas pelo vento, graças a sua aderência à pluma (Carvalho, 2010).

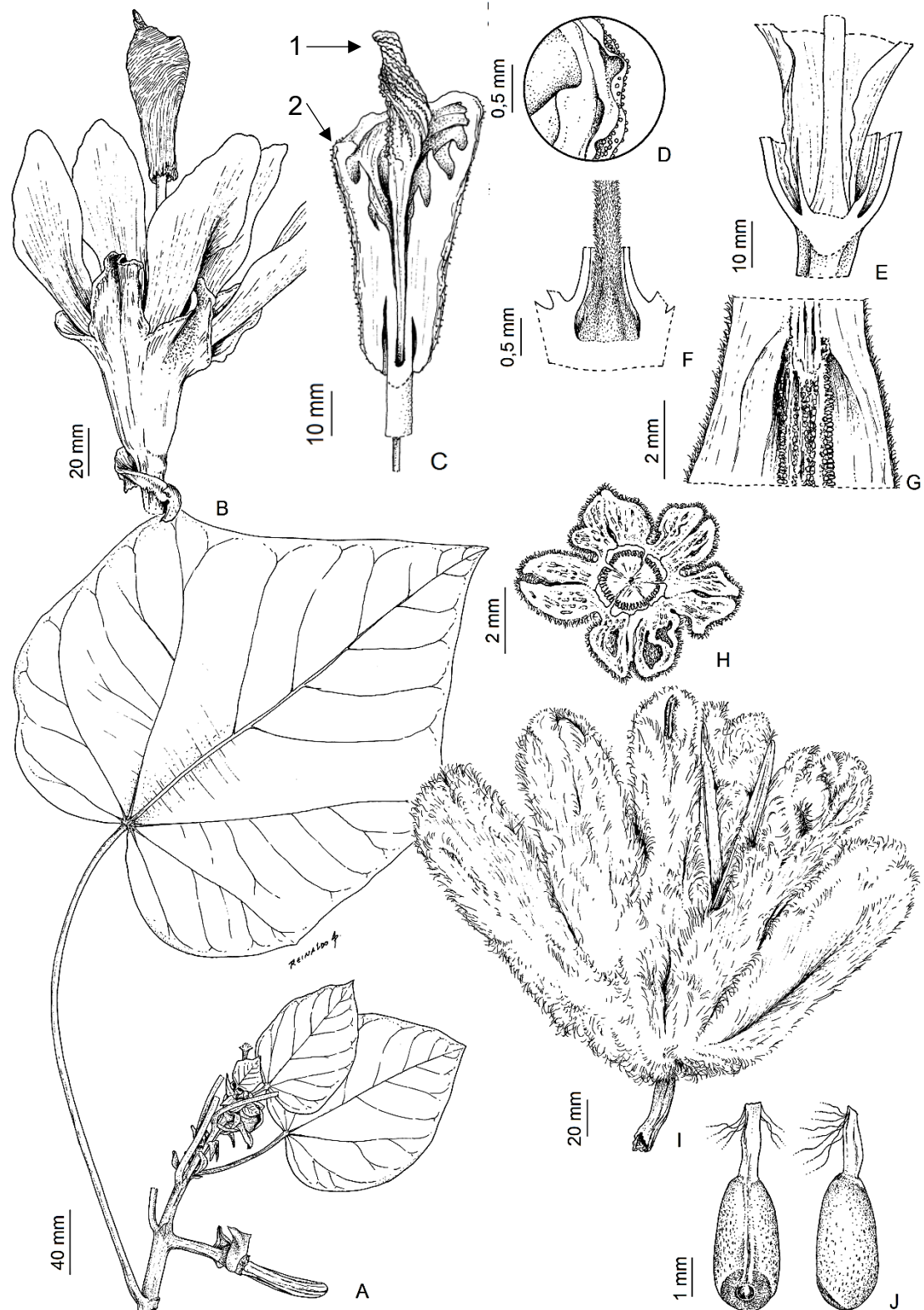


Figura 4. Ilustração botânica de *Ochroma pyramidale*. A. Hábito; B. Flor; C. Corte longitudinal mostrando estigma (1) e anteras (2); D. Detalhe da margem das anteras com pólen; E. Corte longitudinal da base da flor; F. Detalhe do ovário; G. Corte longitudinal da seção do ovário; H. Corte transversal do ovário; I. Fruto aberto; J. Semente em duas vistas.

Morfologia do grão de pólen

Os grãos de pólen de *O. pyramidale* estão presentes em anteras anfractuadas de coloração amarela localizadas em cinco estames, totalmente unidos em um tubo estaminal, que se torcem em espiral e circundam o gineceu (Figura 5).

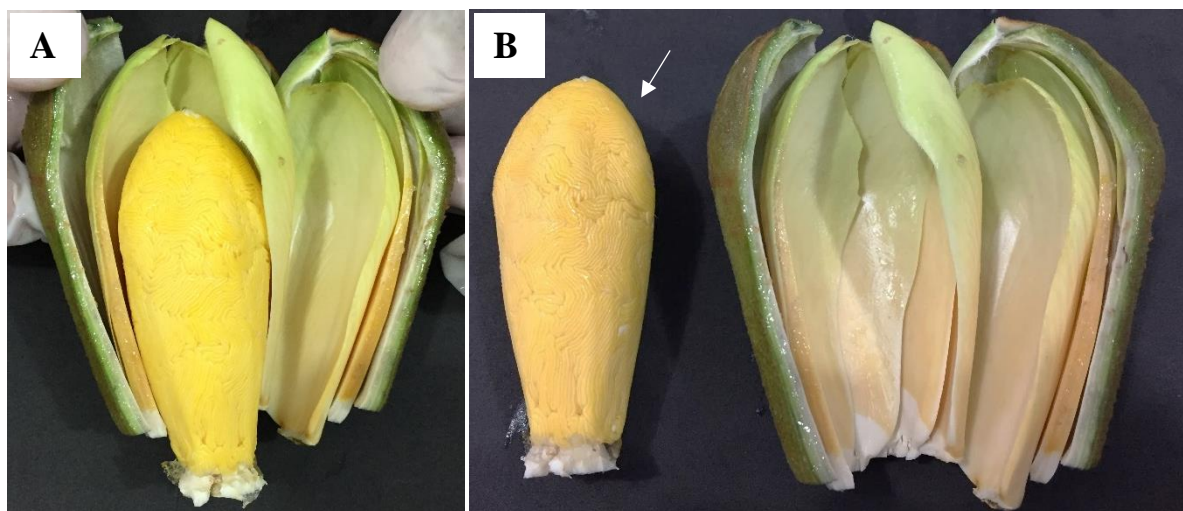


Figura 5. Botão floral de *Ochroma pyramidale*. A. Corte longitudinal do botão floral de onde o tubo estaminal foi retirado. B. Anteras de coloração amarela, onde os estames estão totalmente unidos (indicado pela seta) cobrindo o estigma.

Os polens de *O. pyramidale* são 3-porados (Figura 6A), apresentando 188,5 a 225,89 μm de diâmetro equatorial e 157,9 a 183,2 μm de eixo polar (Tabela 3). Segundo Barth (1964), os polens de *O. pyramidale* são considerados gigantes, pois a medida do eixo maior foi acima de 200 μm . As mensurações para eixo polar, eixo equatorial, relação entre medidas dos eixos polar e equatorial, nexina e sexina foram superiores às apresentadas por Carreira et al. (1995) em espécie sinônima *Ochroma lagopus* Sw.

A abertura do grão de pólen, determinada de acordo com a relação entre os dois diâmetros da mesma, foi inferior a 2, classificando-a como poro, de acordo com Erdtman, (1952) (Figura 6B). O índice de área polar revela que a área polar é grande, sendo assim, conforme classificação de Barth e Melhem (1988), as aberturas dos polens são consideradas curtas (Tabela 3). Gibbs e Ferguson (1987) afirmam que *O. pyramidale* possui os poros de baixo-relevo, com tamanho de 8-10 μm .

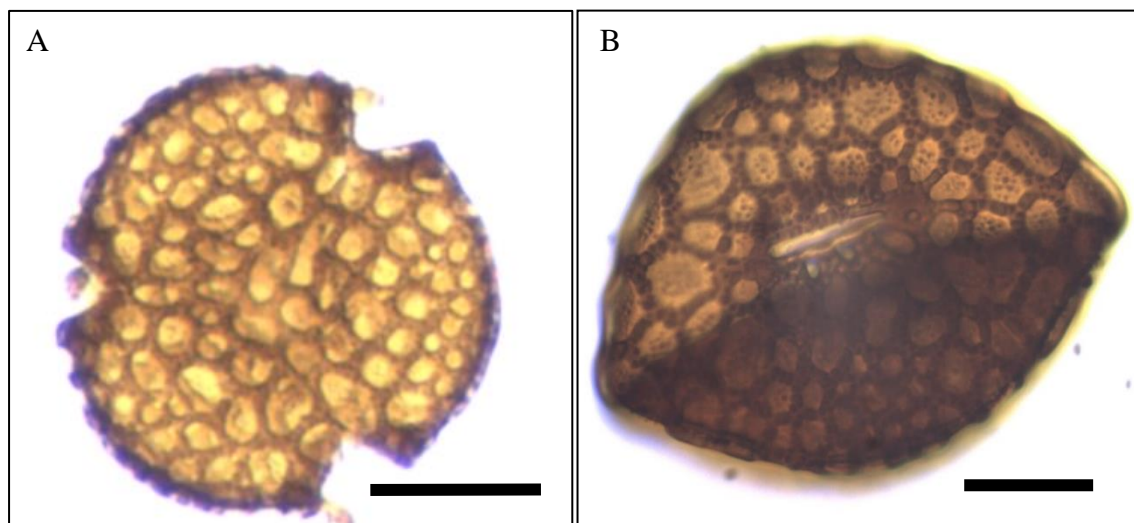


Figura 6. Morfologia polínica de *Ochroma pyramidale*. A. Detalhe na ornamentação reticulada da exina (vista polar). B. Detalhe na abertura do pólen (vista equatorial). Barra=50 µm.

O grão de pólen de *O. pyramidale* possui formato suboblato e simetria radial/isopolar, segundo classificação de Erdtman (1952). Estes resultados corroboram com Carreira et al. (1995) e com as descrições dos polens da família Bombacaceae de Salgado-Laboriau (1973).

Tabela 3. Medidas dos polens de *Ochroma pyramidale* submetidos ao método de acetólise

Medida	Mín-Máx (µm)	$\bar{x} \pm s_x$ (µm)	IC 95% (µm)	CV (%)
Diâmetro equatorial (VE)	188,51-225,79	207,33±9,16	203,26-210,54	4,42
Eixo Polar (VE)	157,98-183,2	168,31±7,68	171,39-164,30	4,56
Diâmetro equatorial (VP)	224,75-179,45	194,77±11,82	189,52-199,5	6,06
Nexina	2,17-4,74	3,40±0,65	3,11-3,06	19,27
Sexina	3,5-6,47	4,65±0,72	4,33-4,94	15,57
Exina	5,67-11,21	8,06±1,24	7,50-8,55	15,40
P/E	0,75-0,91	0,81±0,04	0,79-0,83	5,91
IAP	0,56-0,71	0,66±0,03	0,65-0,67	4,58

\bar{x} = média; s_x : desvio padrão da média; IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade; CV(%): coeficiente de variação; VE: vista equatorial; VP: vista polar; P/E: razão entre eixo polar e diâmetro equatorial; IAP: índice de área polar.

A exina dos polens tem espessura média de 8,06 μm e apresenta em sua maioria sexina (4,65 μm) (Tabela 3). A ornamentação da superfície da exina é do tipo reticulada apresentando lumens poligonais (Figura 6A), em conformidade com estudos de Carreira et al. (1995) e Gutiérrez e Mosquera (2016). A exina é a característica morfológica do pólen essencial para identificação e separação de espécies (Salgado-Labouriau, 1973; Blackmore et al., 2007; Taiz et al., 2017).

De acordo com Taiz et al. (2017), espécies de plantas polinizadas por insetos, aves e mamíferos tendem a ter padrões de exina altamente ornamentada, consistindo em espinhos, ganchos ou projeções filamentosas pegajosas. A polinização de *O. pyramidale*, segundo Reis e Filho (2011), é realizada principalmente por morcegos, fato que explica a ornamentação reticulada da exina encontrada em seus grãos de pólen.

A técnica de acetólise de Erdtman (1943) permitiu a visualização da morfologia polínica de *O. pyramidale*. Gutiérrez e Mosquera (2016) relataram a eficiência e rapidez do método de acetólise de Erdtman para visualização dos grãos de pólen de *O. pyramidale* provenientes de amostras fecais de morcegos polinívoros.

Zambrano et al. (2019) afirmam que o conhecimento sobre a biologia do pólen de *O. pyramidale* é fundamental para o planejamento de cruzamentos controlados em programas de conservação e melhoramento genético. Estes resultados são importantes para auxiliar em estudos palinológicos da espécie, pois possibilitam a identificação taxonômica.

Índice meiótico

Os produtos pós-meióticos identificados em cada indivíduo encontram-se na Tabela 4. As análises evidenciam que a maioria dos meiócitos, cerca de 97,7%, encontram-se em estágio de tétrade (Figura 7A), indicando que o nível de irregularidade meiótica para a espécie é baixo. A anormalidade encontrada com maior frequência consistiu em tríades (1,75%) (Figura 7B e Tabela 4).

Os produtos pós-meióticos foram encontrados nos botões florais de comprimento entre 38,05-50,46 mm.

Tabela 4. Produtos pós-meióticos e índice meiótico observados em seis indivíduos de *Ochroma pyramidale*

Indivíduo	Tétrades	Mônades	Díades	Triádes	Poliádes	IM (%)
SP01	2382	0	0	18	0	99,25 (0,84)
SP02	2381	2	6	10	1	99,21 (0,53)
SP03	2360	7	16	17	0	98,33 (0,87)
IT04	2358	15	11	16	0	98,21 (1,33)
IT05	2386	0	0	14	0	99,42 (0,49)
AF06	2206	0	15	178	1	91,92 (3,68)
Total	14073	24	48	253	2	-
Média	2345,5	4	8	42,16	0,33	97,72
CV (%)				1,74		

CV (%): coeficiente de variação. IM: índice meiótico. Entre parênteses: desvios em torno da média.

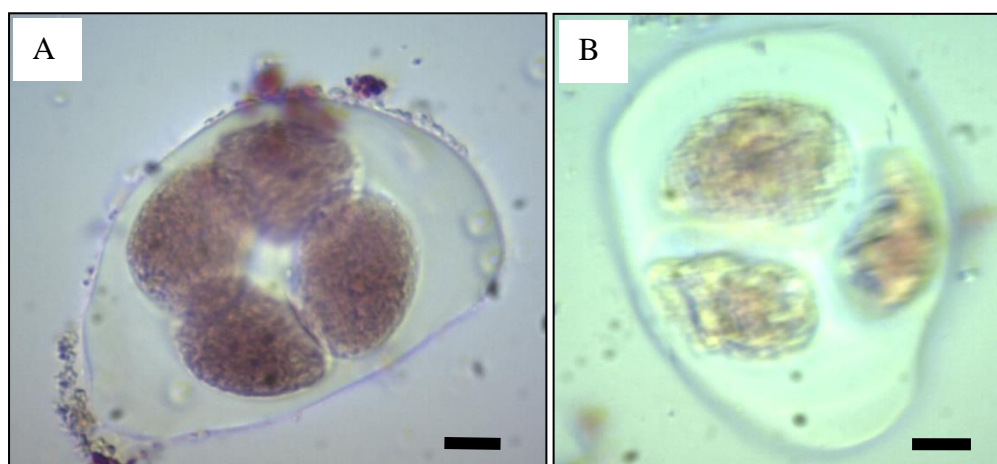


Figura 7. Produtos pós-meióticos observados em *Ochroma pyramidale*. A. Tétrade normal. B. Triáde. Barra = 20 μ m.

Os seis indivíduos de *O. pyramidale* analisados apresentaram altos índices meióticos (> 91%). A Figura 8 demonstra a média e a variação em torno da média para o índice meiótico de cada indivíduo. O indivíduo AF06 apresentou menor média em relação aos demais (91,92%) e também apresentou maior variação em torno da média, desvio padrão de 3,68. Os demais indivíduos apresentaram média próxima a 100% e baixa variação, ou seja, o desvio padrão variou de 0,49 a 1,33.

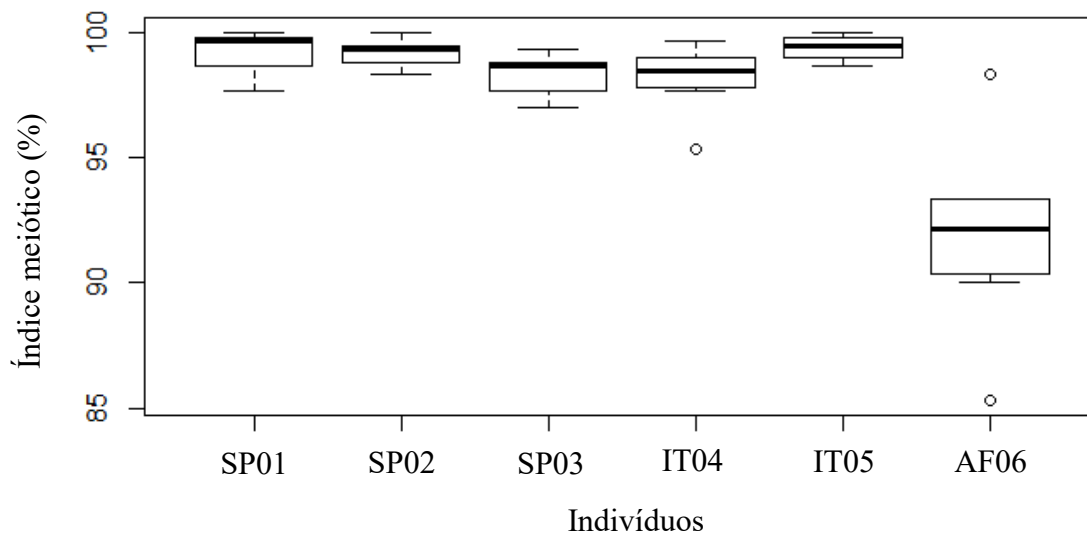


Figura 8. Percentual médio e desvio padrão do índice meiótico encontrados para cada indivíduo de *Ochroma pyramidale*.

A formação de tétrades normais nos grãos de pólen de *O. pyramidale* demonstra alta estabilidade meiótica da espécie, visto que apresentou IM médio de 97,72%. De acordo com Love, (1951) plantas com IM superior a 90% possuem alta estabilidade meiótica, o qual resulta na formação de tétrades.

Neste estudo produtos pós-meióticos anormais como políades, tríades, díades e mônades foram encontrados, porém em baixa proporção. De acordo com Wang et al. (2010) e Zhang et al., (2017), estas anormalidades são geralmente atribuídas ao emparelhamento irregular de cromossomos na segregação, formação de fuso ou citocinese que podem resultar na divisão meiótica anormal. Essas anormalidades meióticas levam a variações morfológicas e genéticas que causam não apenas a evolução, mas também barreiras reprodutivas intraespecíficas (Kaur e Singhal, 2019), como a produção de plantas atípicas, macho-estéreis ou incapazes de formar grãos de pólen, podendo prejudicar a obtenção dos padrões mínimos exigidos para a produção de sementes assim como afetar a polinização (Pozzobon et al., 2011).

Viabilidade polínica

Os testes colorimétricos utilizados (reativo de Alexander e carmim acético 2%) para a avaliação da viabilidade polínica de *O. pyramidale* foram eficientes em distinguir os polens viáveis dos inviáveis, conforme demonstrado na Figura 9. Para o reativo de

Alexander, os polens viáveis possuíam protoplasma e parede celular íntegras com coloração violeta do protoplasma e contorno verde da parede celular. Os grãos de pólen inviáveis e que, portanto, não possuíam protoplasma, apresentaram tonalidade totalmente esverdeada (Figura 9A). Para o corante carmim acético 2%, os polens viáveis também possuíam protoplasma e parede celular íntegras com coloração vermelha do protoplasma, enquanto que os polens inviáveis não apresentavam coloração (Figura 9B).

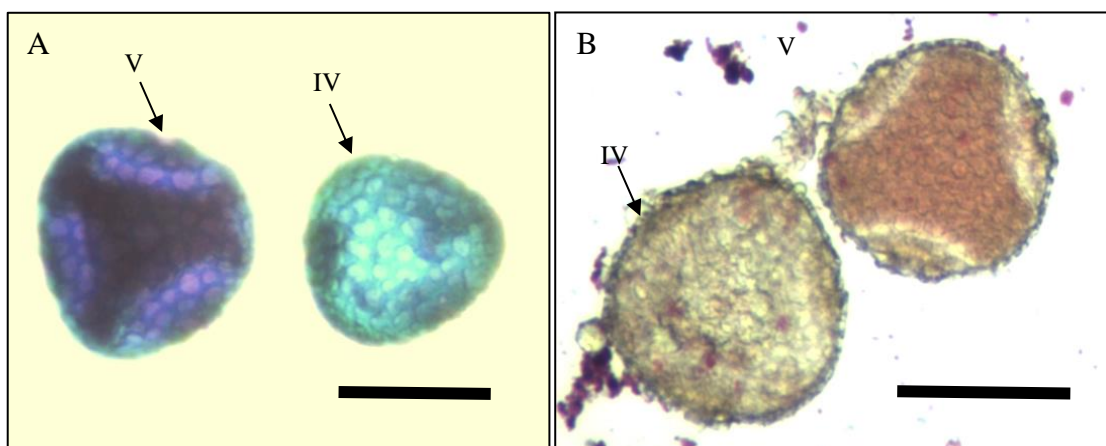


Figura 9. Polens de *Ochroma pyramidale*. A. Coloração com reativo de Alexander. B. Coloração com carmim acético 2%. Pólen viável (V) e inviável (IV). Barra=100 µm.

A análise de variância mediante os dados de viabilidade polínica de *O. pyramidale* por meio de testes colorimétricos encontra-se na Tabela 5. Foi verificada a diferença estatística a nível de 1% de probabilidade entre os corantes utilizados para a estimativa da viabilidade polínica e significância a 5% de probabilidade entre os indivíduos estudados. A análise de variância também demonstrou que não há interação significativa entre os corantes e indivíduos estudados.

Tabela 5. Resumo da análise de variância para a viabilidade polínica de *Ochroma pyramidale* obtida por meio de testes colorimétricos

Fonte de Variação	GL	QM
Corantes	1	58,1*
Indivíduos	5	390,7**
Corantes x Indivíduos	5	67,4 ^{ns}
Média		96,95%

GL: Grau de liberdade. QM: Quadrado médio para a variável viabilidade polínica. ^{ns}, *, **: não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%.

As médias de viabilidade polínica de cada indivíduo mediante coloração com carmim acético 2% e o reativo de Alexander encontram-se na Tabela 6. As análises realizadas com o corante carmim acético revelam que 96,16% dos grãos de pólen avaliados encontravam-se viáveis. Do mesmo modo, o teste colorimétrico com Alexander mostrou uma viabilidade polínica de 97,72% (Tabela 6).

O indivíduo IT04 apresentou a menor média de polens viáveis, porém, todos os indivíduos apresentaram médias superiores a 92,71%, indicando alta porcentagem de polens viáveis (Tabela 6). Em estudo realizado com *Eugenia involucrata* (cerejeira-do-mato), Oliveira e Pierre (2018) encontraram viabilidade polínica superior a 95% em todos os testes colorimétricos (carmim acético 2% e reativo de Alexander). Altas porcentagens de grãos de pólen viáveis, superiores a 95% foram encontradas em *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Brasil), em coloração com o reativo de Alexander e carmim acético 2% (Santos et al., 2015).

Tabela 6. Percentual de polens viáveis de *Ochroma pyramidale* quando submetidos a coloração com carmim acético e reativo de Alexander

Indivíduo	Viabilidade polínica (%)	
	Carmim acético 2%	Reativo de Alexander
SP01	98,54 (0,90)	98,83 (1,08)
SP02	94,92 (4,43)	98,38 (0,70)
SP03	94,04 (3,10)	97,92 (0,83)
IT04	92,71 (5,54)	93,54 (3,20)
IT05	97,33 (0,83)	99,04 (0,54)
AF06	99,42 (0,33)	98,58 (0,41)
Média (%)	96,16	97,72
CV (%)	4,78	2,7

CV: coeficiente de variação. Entre parênteses: desvios em torno da média.

Para Diegues et al. (2015), por meio da estimativa da viabilidade polínica, é possível obter correlações com irregularidades meióticas, gerando informações que possam auxiliar na seleção do material genético e fazer inferências sobre a eficiência dos cruzamentos. A alta viabilidade polínica encontrada nos indivíduos de *O. pyramidale* está de acordo com o alto valor de índice meiótico observado, demonstrando

que a espécie possui estabilidade e regularidade meiótica, o que sugere padrão reprodutivo normal. Estes resultados estão de acordo com estudo de Zambrano et al. (2019) que estimaram a viabilidade polínica de *O. pyramidale* através da técnica de germinação *in vitro* e concluíram que a espécie apresenta alta taxa de viabilidade polínica, uma vez que em nenhum dos indivíduos foi observada a prevalência de grãos de pólen estéreis/inviáveis.

Na figura 10 estão representados os percentuais médios da viabilidade polínica e o desvio padrão em torno da média por indivíduo de *O. pyramidale* para os dois corantes utilizados. Os desvios em torno da média variaram de 0,33 a 5,54 para o corante carmim acético 2% e de 0,70 a 3,20 para o reativo de Alexander (Tabela 6). Os maiores desvios para a viabilidade dos polens com o corante carmim acético 2% foram encontrados nos indivíduos SP02, SP03 e IT04, enquanto que para a viabilidade estimada através do reativo de Alexander, o maior desvio foi encontrado para o indivíduo IT04.

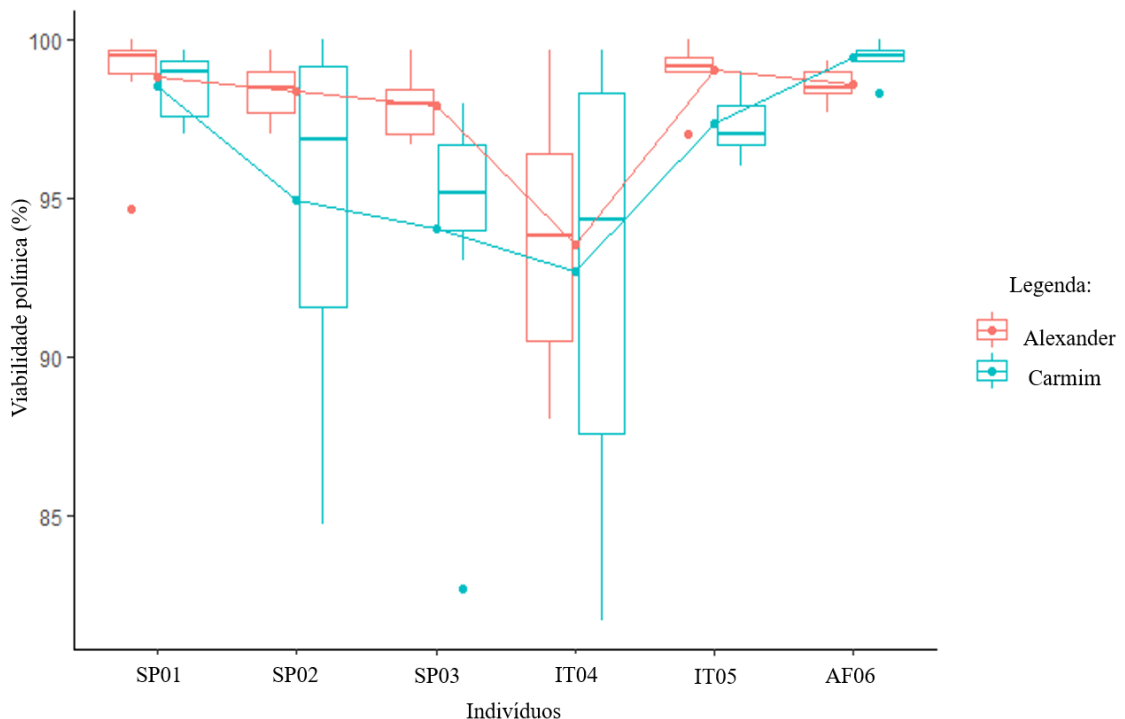


Figura 10. Percentual médio e desvio padrão da viabilidade polínica de cada indivíduo de *Ochroma pyramidale*, por meio de teste colorimétrico com carmim acético 2% e reativo de Alexander.

A utilização do reativo de Alexander para coloração dos polens revelou maior porcentagem de viabilidade polínica e menor coeficiente de variação (CV), em comparação com a coloração com carmin acético, o que demonstra boa precisão experimental (Figura 11).

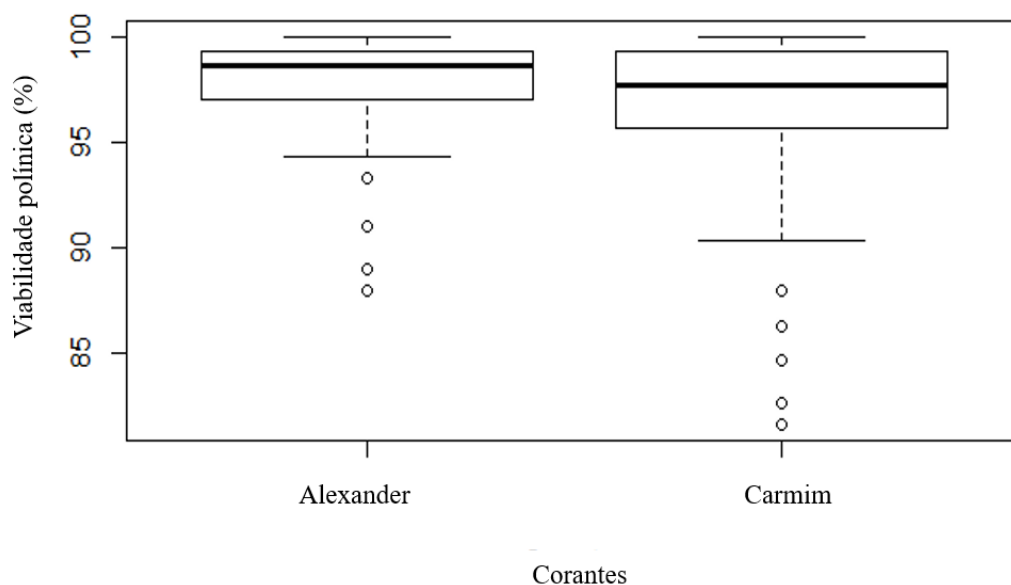


Figura 11. Percentual médio e desvio padrão da viabilidade polínica de *Ochroma pyramidale* utilizando os corantes carmin acético 2% e reativo de Alexander.

Outros autores também relataram alto percentual de viabilidade polínica em diferentes espécies utilizando o reativo de Alexander (Santos et al., 2015; Hister e Tedesco, 2016; Arenas-de-Souza et al., 2016; Braga et al., 2018; Santos et al., 2019). Isto se deve, basicamente, porque o reativo de Alexander facilita a distinção entre grãos de polens viáveis e inviáveis. Os grãos de pólen abortados não possuem o núcleo e apenas a celulose contida na parede apresentará coloração (Munhoz et al., 2008). Em vista disso, sugere-se a sua utilização para estimar a viabilidade polínica de *O. pyramidale*, em trabalho rotineiro no laboratório, pois além de eficaz é uma técnica rápida e de fácil visualização.

Neste estudo, observou-se alta regularidade meiótica através da estimativa do IM e alta viabilidade polínica dos grãos de pólen de *O. pyramidale*. Estes resultados corroboram com Lima et al. (2016) que afirmam que a regularidade na meiose gera como resultado um alto percentual de tétrades normais e consequentemente alta viabilidade polínica.

Citoquímica dos grãos de pólen

Os corantes Lugol e Sudan IV foram eficientes em detectar as substâncias de reserva, amido e lipídio, respectivamente, em grãos de pólen de *O. pyramidale*. Foram encontrados em média 98,63% dos polens de coloração marrom/amarela através do corante Lugol, o que revela amido como substância de reserva (Figura 12A). Enquanto que para o corante Sudan IV foram encontrados 98,57% de grãos de pólen com coloração avermelhada, indicando que os polens também possuem lipídios como substâncias de reserva (Figura 12B).

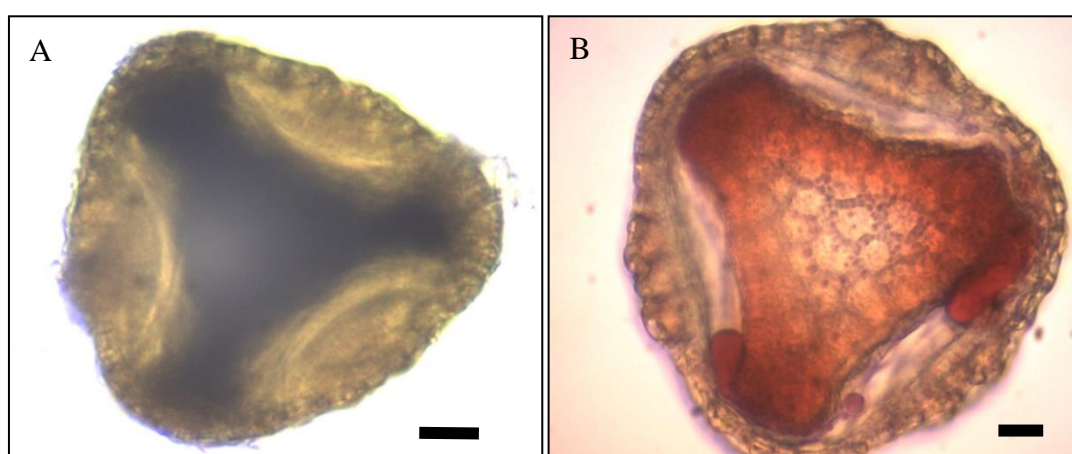


Figura 12. Grãos de pólen de *Ochroma pyramidale* submetidos a diferentes métodos de coloração para análise da composição química. A. Grão de pólen amido-positivo (coloração marrom/amarela). B. Grão de pólen lipídio-positivo (coloração avermelhada). Barra= 20 μ m.

Alguns autores relataram a importância das substâncias de reserva nos grãos de pólen. Pacini et al. (2006) relatam que a presença de amido, como substância de reserva, auxilia na manutenção da viabilidade do grão de pólen, visto que o amido pode ser convertido em glicose, frutose, sacarose e pectinas que aumentam a sua resistência em ambientes hostis, bem como auxiliam na germinação do tubo polínico, o que pode ter contribuído para a alta viabilidade encontrada neste estudo. Os lipídios promovem melhor aderência dos grãos às anteras e ao estigma, possuindo função de proteção contra desidratação e radiação UV, conforme Pacini e Hesse (2005), o que também pode influenciar positivamente na viabilidade do grão de pólen.

Alguns autores afirmam que o tipo de substância de reserva está ligado às estratégias ecológicas das espécies, como a relação com os tipos de polinizadores

(Dettke e Santos, 2011; Oliveira e Pierre, 2018). A presença de amido e lipídio nos grãos de pólen de *O. pyramidale* pode estar relacionada à polinização de suas flores. Reis e Filho (2011) afirmam que *O. pyramidale* possui flores polinizadas principalmente por morcegos que estão à procura de néctar. Os lipídios podem fornecer uma recompensa comestível para os polinizadores, de acordo com Pacini e Hesse (2005) e, além disso, as visitas florais por morcegos podem ocorrer associadas ao consumo de pólen, recurso rico em nutrientes como aminoácidos, polissacarídeos, lipídios, vitaminas e proteínas (Mancina e Gerardo-Herrera, 2010; Buzato et al., 2012; Teixeira et al., 2014).

As substâncias de reserva, amido e lipídio, encontradas nos grãos de pólen de *O. pyramidale* neste estudo corroboram com os estudos compilados de Willmer, (2011) em espécies de pinus e carvalho, onde apontam que além de amido (0%-22%) e lipídio (1%-18%), os polens podem ter constituição proteica (2,5%-61%), vitaminas (<1%), água (5%-50%) e outros componentes essenciais de células vivas em geral.

CONCLUSÕES

O. pyramidale possui estames totalmente unidos em um tubo estaminal originando anteras anfractuosas de coloração amarela que produzem polens de formato suboblato, três aberturas do tipo poro e exina com ornamentação reticulada. A análise citoquímica indicou amido e lipídio como principais substâncias de reserva nos grãos de pólen da espécie.

A regularidade meiótica e a produção de gametas viáveis encontradas nos indivíduos de *O. pyramidale* são aspectos diretamente associados à reprodução e manutenção da espécie. Todos os indivíduos avaliados por meio de análise citológica apresentaram estabilidade na produção de gametas e, portanto, podem ser utilizados para produção de sementes.

Os dados gerados no presente estudo poderão ser úteis para auxiliar na identificação taxonômica e em estudos relacionados à ecologia e polinização da espécie, visto que a mesma possui ampla distribuição e problemas taxonômicos são frequentemente relatados. Além disso, tais dados poderão fornecer informações auxiliares em futuros programas de melhoramento genético e em trabalhos que envolvam diferentes estratégias de conservação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, T. V.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A.; FERREIRA, R. S. Anati Quanti: Software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta Daninha**. 25:649-659, 2007.
- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain technology**. 44(3):117-122, 1969.
- ALEXANDER, M. P. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**. 1:13-8, 1980.
- ARENAS-DE-SOUZA, M. D.; ROSSI, A. A. B; VARELLA, T. L.; SILVEIRA, G. F. D.; SOUZA, S. A. M. Stigmatic receptivity and pollen viability of *Theobroma subincanum* Mart.: fruit species from the amazon region. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 38(4), 2016.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**. 66:591-600, 1979.
- BARTH, O. M. **Glossário palinológico: Parte complementar ao catálogo sistemático dos pólenes das plantas arbóreas do Brasil Meridional**. Rio de Janeiro: Instituto Osvaldo Cruz. 1964. 45p.
- BARTH, O. M.; MELHEM, T. S. **Glossário Ilustrado de Palinologia**. Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas. 1988, 75p.
- BEHLING, M.; SANTIN, J.; FARIA, J. B.; CAMARGO, D.; ALIBERTI, P. R.; PAIXÃO, F. L. M.; LANGE, A. Crescimento de pau-de-balsa sob diferentes níveis de adubação e espaçamento, em Guarantã do Norte, MT. In: FARIAS NETO, A. L. de. (ed). **Embrapa Agrossilvipastoril: primeiras contribuições para o desenvolvimento de uma agropecuária sustentável**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 442-453.
- BLACKMORE, S. Pollen and spores: microscopic keys to understanding the earth's biodiversity. **Plant Systematics and Evolution**. 263: 3-12, 2007.
- BRAGA, C. DOS S.; ZANETTI, G. T.; LIMA, J. DOS S.; OLIVEIRA, C. A. DA C.; KARSBURG, I. V. Comportamento meiótico e viabilidade polínica de *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) por meio de testes colorimétricos. **Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer**. 5(9):478- 486, 2018.
- BUZATO, S.; GIANNINI T. C.; MACHADO, I. C.; SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Polinizadores vertebrados: uma visão geral para as espécies brasileiras. p. 119-141. In:

FONSECA, V.L.I.; SARAIVA, A.M.; CANHOS, D.A.L. (eds.) **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo, Edusp, 2012, 488p.

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 calorimétricos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. 9(17):2780-2788, 2013.

CARREIRA, L. M. M; RAPOSO, R. DE C.; LOBATO, E. S. P. **Morfologia polínica de plantas cultivadas no parque do Museu Goeldi**. VII - Família Bombacaceae. Museu Paraense Emílio Goeldi, sér. Bot. 11(2), 1995.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas. Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v.4, 644p.

COPROMAB-MT, Cooperativa de Produtores de Pau-de-Balsa de Mato Grosso. **Pau-de-balsa: aptidões e desafios**. 2012. Disponível em <www.embrapa.br>

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.

DETTKE, G. A.; SANTOS, R. P. dos. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. 9(1):48-74, 2011.

DIEGUES, I. P.; DAMASCENO, P.C. JR.; RIBEIRO, N. V. S; REIS, M. V. M.; ABOUD, A. C. S. Comportamento meiótico e viabilidade polínica na espécie *Jatropha curcas* L. **Semina: Ciências Agrárias**. 36(1): 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.

FAEGRI, K.; DEUSE, P. Size variation in pollen grains with diferente treatment. **Pollen et Spores**. 2:293-298, 1960.

FLORA DO BRASIL. Malvaceae. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23583>>. Acesso em: 06, janeiro, 2020.

GIBBS, P. E.; FERGUSON, I. K. Correlations between pollen exine sculpturing and angiosperm self-incompatibility systems - a reply. **Plant Systematics and Evolution**. 157:143-159, 1987.

GUTIÉRREZ, K. G.; MOSQUERA, H. R. M. Estandarización de la Acetólisis de Erdtman (1969) para el Análisis Palinológico de Muestras Fecales de Murciélagos Polinizadores (*Phyllostomidae: Glossophaginae – Lonchophyllinae*). **Revista Tumbaga**. 1(11):49-81, 2016.

HISTER, C. A. L.; TEDESCO, S. B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 18(1):135-141, 2016.

KAUR, D.; SINGHAL, V. K. Meiotic abnormalities affect genetic constitution and pollen viability in dicots from Indian cold deserts. **BMC Plant Biology**. 19(10), 2019.

KOTLAREWSKI, N. J.; BELLEVILLE, B.; GUSAMO, B. K.; OZARSKA, B. Mechanical properties of Papua New Guinea balsa wood. **European Journal of Wood and Wood Products**. 74(1): 83-89, 2016.

LIMA, D. C.; G. T.; DOS REIS, G. B.; TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; ABREU, A. F.B.A. Implications of mitotic and meiotic irregularities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetics and Molecular Research**. 15(2), 2016.

LITTLE JR, E. L.; DIXON, R. G. **Árboles comunes de la Provincia de Esmeraldas: Ecuador**. 2ª. ed. Roma, Italia: Peace corps- Information Collection and Exchange, 1983 (reimpressão de 1969). 532p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v.1. 384 p.

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

MANCINA, C. A.; GERARDO-HERRERA, L. M. Disparate feeding strategies used by syntopic Antillean nectarivorous bats to obtain dietary protein. **Journal of Mammalogy**. 91:960-966, 2010.

MAUÉS, M. M.; OLIVEIRA, P. E. A. M. de. Consequências da Fragmentação do Habitat da Ecologia Reprodutiva de Espécies Arbóreas de Florestas Tropicais, com ênfase na Amazônia. **Oecologia Australis**. 14(1): 238-250, 2010.

MORANTE-ALARCÓN, V. E.; ROJAS-IDROGO, C.; DELGADO-PAREDES, G. E. *In vitro* plant propagation and partial organogenesis in palo de balsa [*Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urban.]. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**. 7(2):73-82, 2017.

MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P. da; MEISSNER-FILHO, P.E.; BARTH, O.M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Brazilian Journal of Botany**. 31(2), 209-214, 2008.

NUNES, R. DE C.; BUSTAMANTE, F. DE O.; TECHIO, V. H.; MITTELMANN, A. Morphology and pollen viability of *Lolium multiflorum* Lam. **Ciência e Agrotecnologia**. 36(2):180-188, 2012.

OLIVEIRA, L. B. P DE; PIERRE, P. N. O. Índice meiótico e palinologia de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC-Myrtaceae). **Revista de Ciências Agroveterinárias**. 17(4), 2018.

PACINI, E.; GUARNIERI, M.; NEPI, M. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. **Protoplasma**. 228:73-77, 2006.

PACINI, E.; HESSE, M. Pollenkitt – its composition and functions. **Flora**. 200:399-415, 2005.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: CURSO DE CITOGENÉTICA APLICADA A RECURSOS VEGETAIS, 2, 2004, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 2004.

PEREIRA, T. N. S.; GERONIMO, I. G. D. 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(3):273-279, 2017.

POZZOBON M. T.; SOUZA, K. R. R. de; CARVALHO, S. I. C. de; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura Brasileira**. 29: 212-216, 2011.

R CORE TEAM. **R. A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016. <https://www.r-project.org/>

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

RAO, C. V. A contribution to the embryology of Bombacaceae. In: **Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B**. Springer India, 1954. p. 51-75.

REIS, C. A. F.; FILHO, E. P. **Estado de arte de plantios com espécies florestais de interesse para Mato Grosso**. Colombo. Embrapa Florestas, 2011.

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

SANTOS, G. C. L dos; PEDRI, E. C. M. DE; RODRIGUES, A. S.; PENA, G. F.; ROSSI, A. A. B. Aspectos reprodutivos do milho híbrido simples 2B810 PW (DOW) (*Zea mays* L.) cultivado em Alta Floresta, Mato Grosso. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. 16(29):292-301, 2019.

SANTOS, T. A. dos; TIAGO, P. V.; SCHMITT, K. F. M.; MARTINS, K. C.; ROSSI, A. A. B. Viabilidade polínica em *Bertholletia excelsa* bonpl. (Lecythidaceae) baseada em diferentes testes colorimétricos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. 11(22): 3136-3144, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888p.

TALLEDO, B. G.; ZAMBRANO, A. B.; CRUZATTY, L. G.; GAVILANES, F. Z. Morphology, viability, and longevity of pollen of National Type and Trinitarian (CCN-51) clones of cocoa (*Theobroma cacao* L.) on the Coast of Ecuador. **Brazilian Journal of Botany**. 42:441–448, 2019.

TEIXEIRA, S. DE P.; MARINHO, C. R.; PAULINO, J. V. A Flor: aspectos morfofuncionais e evolutivos p. 45-70. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. **Biologia da polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 1ª ed., 2014, 532p.

WANG J.; KANG X. Y.; ZHU Q. Variation in pollen formation and its cytological mechanism in an allotriploid white poplar. **Tree Genet Genomes**. 6:281–290, 2010.

WILLMER, P. **Pollination and floral ecology**. New Jersey, UK, Princeton University Press, 2011. 778pp.

ZAMBRANO, I. J.; CRUZATTY, L. C. G.; OLAYA, J. C.; TORRES, R. V.; CANDO, M. G. Condiciones óptimas para almacenamiento del polen de *Ochroma pyramidale*. **Bosque (Valdivia)**. 40(2), 227-233, 2019.

ZHANG, X.; CAO, Q.; ZHOU, P.; JIA, G. Meiotic chromosome behavior of the male-fertile allotriploid lily cultivar ‘Cocossa’. **Plant Cell Reports**. 36(10):1641–1653, 2017.

4.2 CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam. Urb., Malvaceae) CULTIVADO NO SUL DA REGIÃO AMAZÔNICA

INTRODUÇÃO

O pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale* Cav. ex Lam. Urb.) é uma espécie florestal de ampla distribuição, abrangendo a Amazônia brasileira, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, incluindo Antilhas e México (Aikman, 1955; Francis, 1991; Leão et al., 2008; Carvalho, 2010). A importância econômica da espécie está relacionada à característica da madeira de cor clara e baixa densidade, ideal para a fabricação de compensados (Midgley et al., 2010).

O pau-de-balsa apresenta também importância ecológica, podendo ser utilizado em plantios para recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente, em consórcios florestais e agroflorestais, devido ao rápido crescimento e tolerância à radiação (Costa et al., 2012; Santos et al., 2014; Cunha et al., 2016; Gomes e Reis, 2018). De acordo com Reis e Filho (2011), a espécie tem sido cultivada no Brasil como atividade de valor econômico e, há alguns anos, vem ganhando importância no estado de Mato Grosso.

Os plantios comerciais de pau-de-balsa, no estado de Mato Grosso, se caracterizam pela elevada variabilidade genética, devido ao uso de sementes oriundas da ampla área de distribuição natural da espécie (Weirich et al., 2008; Behling et al., 2019), o que gera a heterogeneidade fenotípica das árvores e grande descontentamento dos silvicultores. O sucesso de um programa de melhoramento florestal depende da variabilidade genética que permite a manipulação e seleção de genótipos superiores, seleção de procedências e seleção individual dentro das populações-base combinando características desejáveis e mantendo a variabilidade genética (Golle et al., 2009; Paludzyszyn Filho e Santos, 2011; Silva et al., 2018; Miranda et al., 2019). A diferença de uma população em processo de melhoramento para uma população comercial é exatamente o grau de variabilidade que cada uma apresenta. No caso da população comercial, quanto menor a variabilidade, maior será a uniformidade do plantio,

facilitando a colheita da madeira e gerando produto final de qualidade (Souza et al., 2010).

Espécies florestais com ampla distribuição geográfica natural apresentam, de maneira geral, alta variabilidade genética distribuída entre e dentro das populações conforme Hamrick, (2004) e Nybom, (2004). Grupos de indivíduos da mesma espécie, quando estabelecidos em diferentes regiões, com características ambientais próprias, tendem a diferenciar-se geneticamente em forma de populações (Biernaski et al., 2012). O conhecimento da variabilidade genética das populações é de grande valia para programas de conservação e melhoramento genético das espécies.

Uma das formas de detectar a variabilidade genética é a caracterização molecular que permite, a partir de marcas genéticas ou polimorfismos, inferir sobre o grau de diversidade entre e dentro de populações (Sartoretto e Farias, 2010; Costa et al., 2011; Ju et al., 2018). Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) são ferramentas importantes para a análise da diversidade genética entre e dentro de populações de espécies selvagens e cultivadas (Uysal et al., 2010; Souza et al., 2016). Estes marcadores são eficientes por apresentar alta reprodutibilidade, possuem baixo custo e não necessitam de conhecimento prévio do genoma da espécie em estudo (Santos et al., 2011; Ng e Tan, 2015; Costa et al., 2015).

Estudos de diversidade genética em árvores tropicais revelam a eficiência dos marcadores moleculares ISSR em detectar polimorfismos, tais como *Hymenaea courbaril* L (Jatobá) (Rocha et al., 2017), *Protium heptaphyllum* (Almecegueira) (Freire et al., 2019), *Tectona grandis* (Teca) (Chimello et al., 2017), *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Brasil) (Ramalho et al., 2016).

Estudos que relatam a diversidade genética e a estrutura populacional de *O. pyramidale* ainda não estão disponíveis na literatura. Essas pesquisas são importantes, pois, de acordo com Costa et al. (2015) e Rocha et al. (2017), o conhecimento da diversidade genética de espécies nativas auxilia na identificação de árvores matrizes com maior variabilidade genética que podem fornecer sementes para programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

Apesar das potencialidades do pau-de-balsa, não há disponibilidade de material geneticamente melhorado e selecionado para as condições ambientais de Mato Grosso.

Neste sentido, o presente estudo objetivou caracterizar a diversidade genética de três populações de *O. pyramidale*, estabelecidas em área de floresta plantada no sul da região Amazônica, Guarantã do Norte, MT, por meio de marcadores moleculares ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A área de estudo localiza-se no município de Guarantã do Norte, Mato Grosso, que possui clima do tipo tropical chuvoso conforme classificação de Köppen, com nítida estação seca de 4 a 6 meses, temperaturas médias de 25 °C, altitude média de 345 m e média anual de precipitação de 2.000 mm (Souza et al, 2013).

A amostragem de *Ochroma pyramidale* foi realizada em três populações cultivadas em área experimental mantida pela Embrapa Agrossilvipastoril, onde foram escolhidas 20 árvores e enumeradas sequencialmente, população Páscoa: 1 a 20; população Cavanis: 21 a 40 e população Aliança: 41 a 60. As populações estão distanciadas geograficamente: Páscoa - Cavanis (4,5km); Páscoa – Aliança (10km); Cavanis e Aliança (8,5km) (Figura 1).

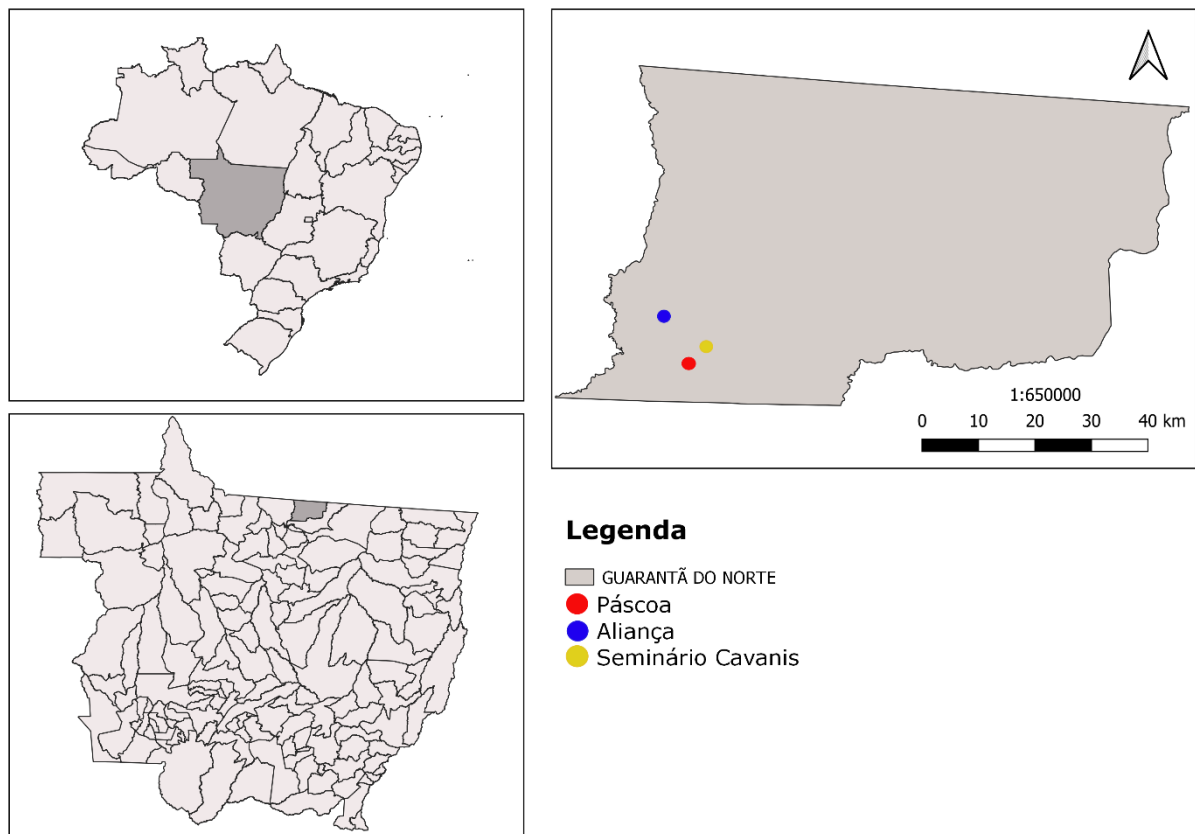


Figura 1. Localização geográfica das populações de *Ochroma pyramidale* em Guarantã do Norte, Mato Grosso, Brasil.

As áreas de estudo apresentaram início das atividades agropecuárias na década de 80 com a remoção da vegetação nativa e instalação de pastagem para manejo de bovinos de corte. Em 2003 foi semeada soja com devida correção e adubação do solo. Em 2004 retornou-se a pecuária com pastagem *Brachiaria brizantha* cv para produção de leite que se manteve por 6 anos. Em 2011 foi instalado um experimento com objetivo de avaliar o efeito da adubação em diferentes espaçamentos sobre o crescimento e produção das árvores de pau-de-balsa.

Nas localidades designadas Páscoa e Seminário Cavanis o experimento foi instalado utilizando-se mudas de pau-de-balsa do viveiro da empresa Compensados São Francisco, Guarantã do Norte, MT. As sementes para a produção dessas mudas foram coletadas em plantios do norte do estado de Mato Grosso, domínio fitogeográfico da amazônia brasileira, região de distribuição natural de pau-de-balsa. Na população designada Aliança as sementes foram coletadas em plantios do Equador e as mudas cultivadas pelo viveiro Flora Sinop em Sinop, MT. Na composição das populações as sementes foram adquiridas sem critério de seleção de matrizes, não havendo informações sobre a quantidade de matrizes e a base genética das mesmas.

Caracterização fenotípica

Nas árvores amostradas para o estudo de diversidade genética foram também tomadas medidas de importância econômica, que são a altura comercial (Hc) e o diâmetro na altura do peito (DAP). A altura comercial (Hc) foi definida como a medida entre a superfície do solo e a base da trifurcação do tronco principal da árvore, estimada em metros utilizando hipsômetro digital (Vertex®). Para a circunferência do caule foi utilizado como ponto de avaliação a altura de 1,3 m da superfície do solo, primeiramente foi mensurada, em centímetros, a circunferência na altura do peito (CAP), utilizando fita métrica, para posteriormente obter o DAP através da fórmula (1):

$$DAP = \frac{CAP}{\pi} (1)$$

Coleta, extração e quantificação do DNA

Foram coletadas 5 folhas jovens de cada indivíduo para extração de DNA. O material foliar foi conservado em sílica gel, acondicionado em sacos plásticos e, armazenado em freezer - 20°C até o momento da extração do DNA.

O DNA foi extraído do tecido foliar com base no protocolo de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) proposto por Doyle e Doyle (1987) com modificações para a espécie descritas por Zanetti et al. (2019a). As modificações consistiram em utilizar o CTAB na concentração de 4% e realizar a maceração automatizada através do equipamento TissueLyser II, QIAGEN. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica e Biologia Molecular da Embrapa Agrossilvipastoril, situado em Sinop, Mato Grosso.

Para avaliar a qualidade e integridade do DNA extraído foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1%, a 60V e, corado com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). Os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Já a concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria, em nanogramas, utilizando Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). As amostras foram diluídas até atingirem a concentração de 10 ng/μL.

Amplificação dos locos ISSR

Inicialmente foram realizados testes de amplificação de *O. pyramidale* com 24 primers ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC). Com base na intensidade, polimorfismo e repetitividade das bandas foram selecionados 15 primers para o estudo da diversidade genética dos 60 indivíduos.

As reações de amplificação (PCR) foram realizadas em termociclador Thermal Cycler, modelo T100, em um total de 35 ciclos. As etapas de amplificação foram as seguintes: 4 min a 94°C (desnaturação inicial); 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação); 35 segundos na temperatura de anelamento de cada primer; 2 min a 72°C (elongação) e 7 min a 72°C (extensão final). A temperatura de anelamento variou de acordo com o *primer* utilizado (Tabela 1). Cada reação de 15 μL de PCR continha 1x tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 0,25 μM de cada

dNTP, 0,3 µM de cada primer, 0,05 U de Taq DNA Polimerase e água Mili-Q® para completar o volume final.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, com tampão de corrida TAE 0,5X, em cuba horizontal modelo A6 (Thermo Scientific®) sob voltagem constante de 60 V por aproximadamente seis horas.

A confirmação da amplificação dos produtos da PCR foi realizada a partir da aplicação das reações em gel de agarose 1,5%, a 60V, corado com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). Os géis foram visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

Análise dos fragmentos amplificados

A partir da análise dos géis fotodocumentados, uma matriz binária (0/1) foi elaborada, considerando presença (1) e ausência (0) dos fragmentos amplificados. Os dados foram obtidos pela avaliação visual das bandas nos 60 indivíduos estudados. Um *locus* foi considerado polimórfico se uma banda consistente estivesse presente em um ou mais indivíduos da população, mas não em todos. Como o marcador ISSR é dominante, assumiu-se que cada banda representa o fenótipo em um loco bi-alélico (Williams et al., 1990; Gomes et al., 2011).

Análises descritivas dos dados incluindo número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de polimorfismo (%P) e Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) também foram realizadas. Posteriormente, os dados da matriz de presença/ausência foram submetidos a análises populacionais por meio de softwares estatísticos.

Porcentagem de Polimorfismo

A partir da matriz binária foi calculada a porcentagem de polimorfismo obtida com cada primer utilizado, por meio da equação 2:

$$P = \frac{nbp}{ntb} \times 100 \quad (2)$$

Onde P corresponde à porcentagem de polimorfismo; nbp ao número de bandas polimórficas; e ntb ao número total de bandas.

Conteúdo de Informação Polimórfica

O PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) ou informatividade de cada primer foi calculado conforme a seguinte equação 3, proposta por Anderson et al. (1993):

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2 \quad (3)$$

Onde P_{ij} é a frequência do alelo "j" no marcador "i" (a soma se estende por todos os alelos). O cálculo foi baseado no número de alelos detectados por marcador para um determinado loco e a frequência relativa de cada alelo no conjunto dos 60 indivíduos analisados. O valor do PIC varia de "0", para perfis monomórficos, até "1", para perfis altamente polimórficos.

Diversidade genética

A partir da análise da matriz binária de presença e ausência, foram estimados o número de alelos observados (N_a), número de alelos efetivos (N_e), número de locos polimórficos (NLP), porcentagem de polimorfismo para cada uma das populações, bem como para a espécie *O. pyramidale*. As diversidades genéticas das populações estudadas, assim como para a espécie *O. Pyramidale*, foram estimadas pelo índice de diversidade genética de Nei (H_e) (Nei, 1978) e o índice de diversidade de Shannon (I) (Lewontin, 1972), utilizando o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 2000).

Índice de Jaccard

A comparação genética entre os pares de indivíduos foi estimada por meio do índice de dissimilaridade baseado na complementaridade do coeficiente de Jaccard (equação 4), utilizando-se o programa Genes (Cruz et al., 2013). Esse coeficiente consiste na comparação do número de presenças de bandas iguais e o número total de bandas amplificadas, excluindo o número de ausências conjuntas (Meyer et al, 2004).

$$D_{ij} = 1 - S_{ij} \quad (4)$$

Onde:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que ‘a’ equivale ao número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos; ‘b’ ao número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i; ‘c’ ao número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j.

Análise de agrupamento e estrutura populacional

A matriz gerada pelo coeficiente aritmético do Índice de Jaccard foi utilizada na análise de agrupamento dos 60 indivíduos avaliados por meio de três métodos hierárquicos: *Unweighted Pair-Group Method Average* (UPGMA), Vizinho mais Próximo ou Ligação Simples (SL) e WARD. Para cada método foi estimado o coeficiente de correlação cofenética (CCC), estresse e distorção, e a partir desses dados selecionou-se o método de agrupamento mais consistente no ajuste entre a matriz de distância e o dendrograma. O ponto de corte para o dendrograma obtido foi estabelecido pelo método proposto por Mojena (1977), cuja fórmula é descrita como $P_c = m + kdp$, com valor de $k = 1,25$.

No método UPGMA os indivíduos são agrupados aos pares, utilizando-se médias aritméticas da dissimilaridade. O dendrograma prioriza os genótipos com maior similaridade, e as distâncias entre um indivíduo em grupo formado pelos indivíduos i e j são calculadas pela equação 5:

$$d(ij)_k = \frac{\text{média}\{dik+djk\}=(dik+djk)}{2} \quad (5)$$

Onde, $d(ij)_k$ = distância média entre o grupo ij e o indivíduo k; dik = distância entre os indivíduos i e k; djk = distância entre os indivíduos j e k.

A matriz gerada também foi utilizada para o agrupamento dos indivíduos pelo método de otimização de Tocher. Todas as análises descritas acima foram realizadas com auxílio do programa Genes (Cruz, 2013).

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, com auxílio do programa GenAIEx (Peakall e Smouse, 2012).

O programa “Structure” (Pritchard et al., 2000), baseado em estatística bayesiana foi utilizado para inferir o número de grupos ou *clusters* (K) nos quais os indivíduos estão estruturados. O número de grupos estabelecidos foi de $K = 1$ à $K = 6$ e, a definição do K mais provável foi realizada segundo os critérios propostos por Evanno et al. (2005). Para cada valor de K foram realizadas 20 corridas com 200.000 interações iniciais (“burn-ins”) e 500.000 simulações de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC). As análises foram realizadas usando o software STRUCTURE HARVESTER (Earl e Vonholdt, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os iniciadores ISSR utilizados apresentaram um padrão de amplificação com bandas nítidas e bem definidas. Como exemplo destaca-se o perfil eletroforético de 15 indivíduos de *O. pyramidale* com o primer UBC 810 na Figura 2.

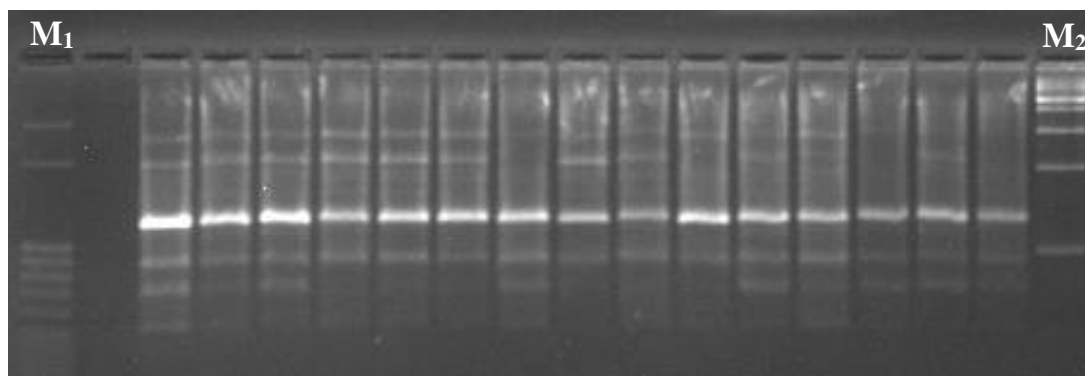


Figura 2. Perfil eletroforético das reações de PCR de 15 indivíduos de *Ochroma pyramidale* utilizando o primer UBC 810. M₁ = marcador de 100 pb e M₂ = marcador de 1 Kb.

Os 15 primers de ISSR utilizados, amplificaram 111 fragmentos dos quais 108 foram polimórficos. A quantidade de fragmentos polimórficos variou de 3 (DICA5'CR1) a 12 (UBC 811), com média de 7,2 bandas por primer. Os iniciadores utilizados revelaram um total de 97,3% de polimorfismo. Com exceção dos primers UBC 835 e UBC 866, todos os primers revelaram 100% de polimorfismo. Os valores para o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) variaram de 0,35 à 0,87 com média de 0,70 (Tabela 1).

Para Botstein et al. (1980) o valor do PIC varia de 0 a 0,25 para marcadores que são considerados pouco informativos, de 0,25 a 0,5 para marcadores moderadamente informativos e acima de 0,5 para marcadores que apresentam alto conteúdo informativo, sendo desejáveis os locos com muitos alelos e PIC próximo a 1. Estes valores auxiliam na classificação dos primers conforme a eficiência na detecção do polimorfismo, servindo de parâmetro para a seleção dos primers (Costa et al., 2015). Assim, no presente estudo, pode-se considerar que a eficiência dos primers em indicar polimorfismo entre dois indivíduos é alta.

Tabela 1. Iniciadores utilizados, temperatura de anelamento (TA°C) número total de bandas amplificadas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de polimorfismo (%P) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para três populações de *Ochroma pyramidale*

Primer	TA (°C)	NTB	NBP	%P	PIC
UBC 808 - DiAG3'C	48.8	9	9	100	0,72
UBC 809 - DiAG3'G	48.2	6	6	100	0,67
UBC 810 - DiGA3'T	42.9	8	8	100	0,71
UBC 811 - DiGA3'C	43.8	12	12	100	0,60
UBC 817 - DiCA3'A	50.3	8	8	100	0,85
UBC 825 - DiAC3'T	51.4	6	6	100	0,77
UBC 828 - DiTG3'A	51.3	9	9	100	0,87
UBC 835- DiAG3'YC	50.2	7	5	71,42	0,63
UBC 842 - DiGA3'YG	48.8	8	8	100	0,81
UBC 861 - TriACC	60.6	4	4	100	0,62
UBC 866 - TriCTC	55.7	7	6	85,71	0,84
UBC 889 - DiAC5'DBD	50.1	8	8	100	0,82
UBC 890 - DiGT5'VHV	52.2	8	8	100	0,78
DiCA5'CR	58.8	3	3	100	0,50
DiGA5'CR	50.2	8	8	100	0,35
Total		111	108	97,30	-
Média		7,4	7,2	-	0,70

UBC: University of British Columbia. *Y = (C ou T); R = (A ou G); V = (A, C ou G); H = (A, C ou T); N = (A, G, C ou T); D = (A, G ou T) e B = (C, G ou T).

A alta porcentagem de polimorfismo encontrada neste estudo (97,3%) pode ser comparada com estudos realizados em outras espécies arbóreas tropicais de mesma família e subfamília de *O. pyramidale*, Bombacoideae-Malvaceae. Said et al (2013) estudando a diversidade genética entre *Bombax ceiba*, *Ceiba pentandra* e *Ceiba speciosa*, através de iniciadores RAPD, encontraram 88,41% de locos polimórficos. Em estudos com variedades da espécie *Durio zibethinus* Siew et al. (2018) relataram alto polimorfismo (91,73%) dos vinte primers ISSR utilizados.

O índice de diversidade genética de Nei (He) para a espécie *O. pyramidale*, foi de 0,32, com número de alelos observados (Na) de 1,97, e os alelos efetivos (Ne) de 1,54. O índice de Shannon (I) atingiu o valor de 0,48 e a porcentagem de polimorfismo foi de 97,3% (Tabela 2). Os maiores valores para He e I foram encontrados na população Cavanis (0,26 e 0,40, respectivamente). Esta população também apresentou os maiores valores de Na (1,85), Ne (1,43) e %P (85,59%).

A porcentagem de polimorfismo (%P) para cada população foi menor do que a estimada para a espécie, pois houve redução no número de locos polimórficos (NLP) (Tabela 2), sugerindo a existência de alelos exclusivos no material genético dos indivíduos que podem estar associados às diferentes origens das sementes que compõem cada uma das populações, Páscoa e Cavanis provenientes da amazônia brasileira e Aliança originária do Equador.

A presença de alelos exclusivos nas populações é considerada um indicativo de fluxo gênico restrito, o que pode levar a um aumento da divergência genética e indica certa diferenciação entre as populações (Seoane et al., 2000; Kageyama et al., 2003). A presença de alelos exclusivos é um indicativo de diversidade genética a ser explorada (Alves et al., 2013), exemplificando a alta diversidade genética encontrada para as populações de *O. pyramidale*.

Tabela 2. Número de indivíduos (N) e parâmetros genéticos para as três populações de *Ochroma pyramidale*

População	N	Na	Ne	NLP	%P	He	I
Páscoa	20	1,78 (0,41)	1,41 (0,36)	87	78,38	0,24 (0,18)	0,37 (0,25)
Cavanis	20	1,85 (0,35)	1,43 (0,33)	95	85,59	0,26 (0,16)	0,40 (0,22)
Aliança	20	1,81 (0,38)	1,43 (0,38)	91	81,98	0,25 (0,18)	0,38 (0,25)
Espécie	60	1,97 (0,16)	1,54 (0,32)	108	97,30	0,32 (0,15)	0,48 (0,19)

N: Número de indivíduos; Na: Número de alelos observados; Ne: Número de alelos efetivos.; NLP: Número de locos polimórficos; %P: Porcentagem de polimorfismo; He:

Diversidade gênica de Nei (1978); I: Índice de diversidade gênica de Shannon. Os números entre parênteses representam o desvio-padrão.

Os valores encontrados para He e I são indicativos de que há uma diversidade genética considerável para as populações e para a espécie *O. pyramidale*, o que contribui para a formação de novas combinações genéticas. De acordo com afirmações de Costa et al. (2015), quando se trata de uma espécie alógama, é esperada alta diversidade genética entre os indivíduos amostrados. Resultados similares foram observados para outras espécies arbóreas, Souza et al. (2018) constataram alta diversidade em *Plathymenia reticulata* Benth. (Mangaba) fundamentada nos valores do He (0,38) e I (0,55). Ju et al. (2018) avaliando 17 populações de *Bombax ceiba* (Bombacoideae-Malvaceae) encontraram altos índices de diversidade genética, He de 0,23 a 0,47 e I de 0,39 a 0,78.

Nei (1978) cita que a medida G_{st} é denominada de coeficiente de diversidade relativa entre grupos, varia entre 0 e 1 e expressa a proporção da diversidade total explicada por diferenças entre os grupos. No presente estudo o valor para G_{st} de 0,20 releva que 20% da variação genética total reside entre as populações de *O. pyramidale*. Enquanto que a diferenciação intrapopulacional estimada em 0,80 revela maior diversidade genética dentro das populações.

Os valores de dissimilaridade genética entre os indivíduos de *O. pyramidale* variaram de 0,17 a 0,79, não evidenciando indivíduos idênticos em termos genéticos. A menor distância genética foi entre os indivíduos 50 e 51 e a maior distância genética entre os indivíduos 40 e 57.

Comparado às outras espécies, pouco se sabe sobre a variabilidade genética de *O. pyramidale*. Souza et al. (2018) avaliaram a variabilidade genética de *Plathymenia reticulata* Benth. (Mangaba) e identificaram valores de dissimilaridade entre 0,17 e 0,65. Borges et al. (2016) estudaram a diversidade genética entre acessos de *Lecythis pisonis* Cambess. (Sapucaia) e encontraram valores de dissimilaridade de 0,28 a 0,82, indicando alta variabilidade genética entre os acessos.

O método de agrupamento UPGMA foi selecionado dentre os três métodos testados para a representação gráfica das distâncias genéticas, conforme indicado por

Cruz et al. (2011), por apresentar maior coeficiente de correlação cofenética (CCC), menor distorção e estresse (Tabela 3). Rohlf e Fisher (1968) sugerem que a correlação cofenética acima de 0,80 é suficiente para revelar o ajuste entre as distâncias obtidas na matriz pela dissimilaridade do complemento de Jaccard e a matriz cofenética com consequente consistência na análise de agrupamentos.

Tabela 3. Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC), distorção e estresse dos métodos de agrupamento: UPGMA, Vizinheiro mais próximo (SL) e Ward

Método de agrupamento	CCC	Distorção (%)	Estresse (%)
UPGMA	0,85**	0,86	9,3
SL	0,80**	39,15	23,91
WARD	0,73**	-	-

O agrupamento obtido pelo método UPGMA, a partir da matriz de dissimilaridade, utilizando ponto de corte de 80,6% (0,5203) estabelecido pelo procedimento de Mojena (1977), revelou a formação de nove grupos (Figura 3).

O grupo IV (GIV) foi o mais representativo composto por vinte dos sessenta indivíduos avaliados, todos pertencentes à população Páscoa constituída de sementes originárias da região amazônica brasileira. O grupo I (GI) foi composto por quinze indivíduos da população Aliança, provenientes de plantios do Equador, neste grupo foram alocados os dois indivíduos mais similares (50 e 51). No grupo II (GII) há 3 indivíduos alocados (42, 43 e 45) que também pertencem à população Aliança, e provavelmente são os indivíduos mais dissimilares dentro desta população.

Os grupos V (GV) e VI (GVI) estão representados por 9 indivíduos cada, os dois grupos compõem a população Cavanis, com sementes provenientes da amazônia brasileira. Os grupos III (GIII), VII (GVII), VIII (GVIII) e IX (GIX) alocaram apenas um indivíduo, 41, 37, 36 e 52, respectivamente (Figura 3).

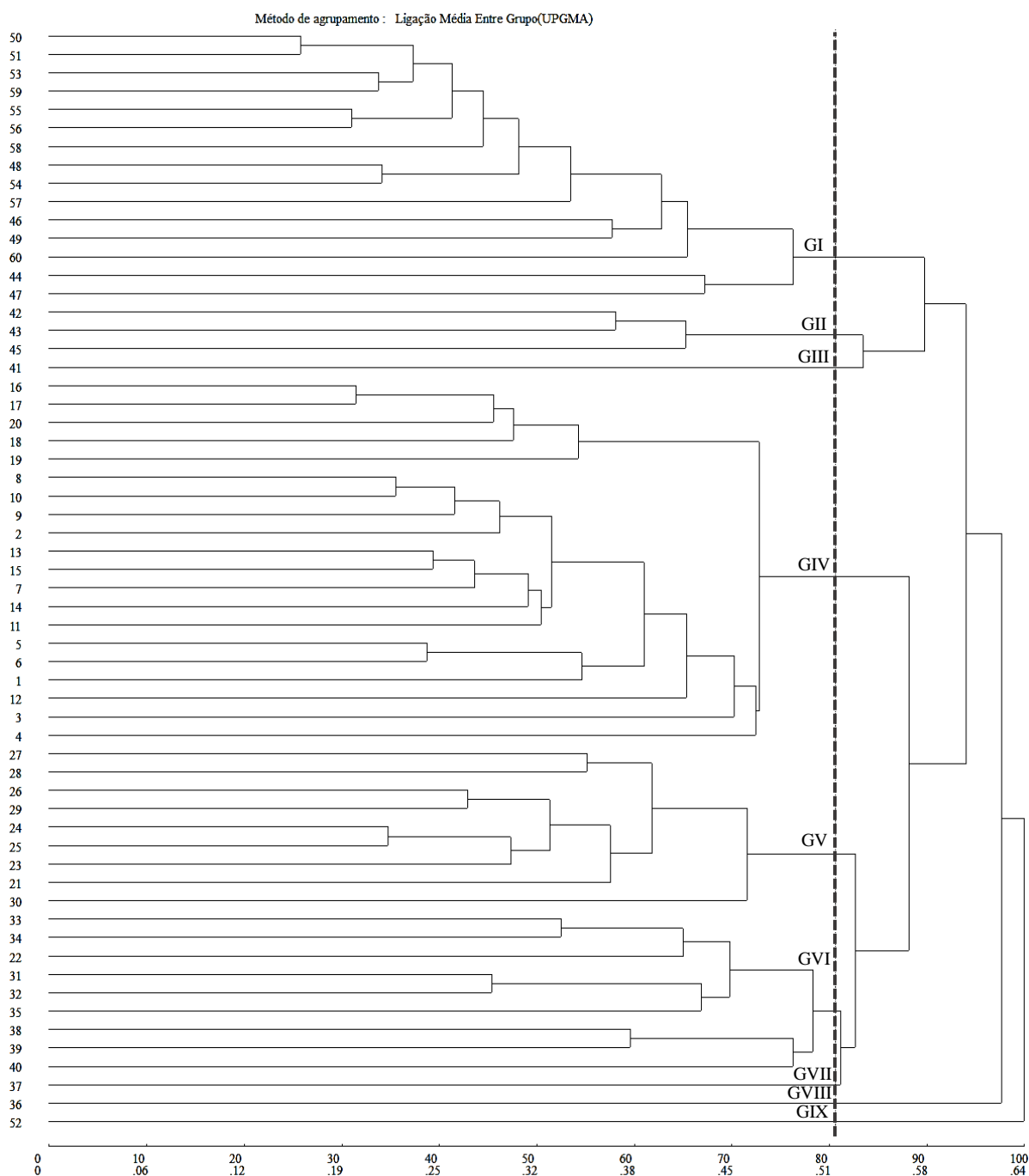


Figura 3. Dendrograma obtido pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Average*) gerado a partir do complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade, em 60 indivíduos de *Ochroma pyramidale* com base em marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Na tabela 4 estão descritas as características fenotípicas mensuradas para os indivíduos de *O. pyramidale*. Em média, as árvores apresentaram 7,3 m de altura comercial (Hc), variando de 3,6 m até 12,7 m. A média para o diâmetro na altura do peito (DAP) foi de 21,95 cm, com uma grande variação entre o mínimo (16,01 cm) e o

máximo (40,11 cm), o que sugere elevada variabilidade entre os indivíduos de *O. pyramidale*.

Para fins de melhoramento, o DAP da espécie deve variar entre 15 e 40 cm; e a Hc deve ser múltipla de 1,8 e 2,4 m, isso se deve ao tamanho do torno para processamento de madeira e as dimensões das peças de compensado, a fim de aumentar a eficiência no processamento da madeira. Quanto ao DAP, todas as árvores encontram-se no padrão desejado, com destaque para os indivíduos 48 e 52 que possuem os maiores valores para DAP. Em relação à altura comercial, as árvores que possuem valores iguais ou superiores à média somada ao desvio padrão, permitem a obtenção de pelo menos cinco toras de 1,8 m; ou três de 2,4 m; ou ainda duas toras de 2,4 m e duas de 1,8 m, como mencionado por Zanetti et al. (2019b).

Tabela 4. Caracterização fenotípica dos 60 indivíduos (I) de *Ochroma pyramidale* quanto ao DAP (diâmetro na altura do peito) e a Hc (altura comercial)

I	DAP	Hc	I	DAP	Hc	I	DAP	Hc
1	27.06	7.50	21	17.83	5.90	41	17.83	4.10
2	22.28	7.80	22	18.46	7.00	42	22.44	4.50
3	21.65	11.30	23	24.92	10.90	43	16.01	3.60
4	22.60	8.50	24	21.39	4.50	44	19.35	7.80
5	24.83	8.60	25	24.51	8.20	45	16.04	11.50
6	29.60	6.70	26	18.84	7.40	46	19.10	11.00
7	22.28	5.10	27	22.28	6.70	47	19.13	7.10
8	20.05	5.80	28	20.50	10.10	48	40.11	5.40
9	26.10	4.80	29	19.77	9.30	49	22.50	4.30
10	20.21	4.60	30	17.22	12.70	50	22.47	4.70
11	25.78	4.60	31	16.62	8.10	51	22.57	4.80
12	22.92	6.70	32	17.54	6.90	52	39.15	10.60
13	22.92	6.40	33	17.00	8.10	53	25.62	4.40
14	20.37	5.80	34	23.27	11.60	54	25.46	5.90
15	21.65	7.50	35	17.51	9.70	55	19.19	10.40
16	20.05	7.20	36	18.84	8.80	56	22.57	4.30
17	20.37	10.10	37	17.89	8.60	57	25.78	4.00
18	20.05	6.00	38	16.27	8.00	58	20.37	6.90
19	19.48	5.30	39	20.34	6.90	59	25.78	8.30
20	28.97	10.90	40	19.77	9.70	60	25.46	4.30
Média geral DAP					21.95 (4.62)			
Média geral Hc					7.30 (2.36)			

Entre parênteses: desvio-padrão.

Na tabela 5 estão descritas as médias para DAP e Hc dos grupos formados pelo método UPGMA. Os grupos I e IV possuem os maiores valores para DAP, enquanto que os grupos V e VI possuem os maiores valores para Hc. Em relação aos indivíduos que compõem grupos únicos no agrupamento UPGMA, o 41 apresenta valores baixos para diâmetro do caule e altura comercial, não sendo, portanto, uma matriz interessante para implementação florestal, enquanto que os indivíduos 36 e 37, apesar de baixos diâmetros de caule, apresentam considerável altura comercial e podem ser utilizados em programas de melhoramento. O indivíduo 52 possui maior DAP e significativa Hc, podendo apresentar alelos favoráveis para as características de importância econômica em plantios que visem à produção de madeira, crescimento do diâmetro do caule e altura comercial, sendo indicado para uso em programas de melhoramento genético.

Tabela 5. Médias para DAP (diâmetro na altura do peito) e Hc (altura comercial) dos grupos formados pelo método UPGMA.

Grupo	Indivíduos	DAP médio (cm)	Hc média (m)
I	50, 51, 53, 59, 55, 56, 58, 48, 54, 57, 46, 49, 60, 44, 47	23.70 (5.25)	6.24 (2.28)
II	42, 43, 45	18.16 (3.70)	6.53 (4.32)
III	41	17.83	4.10
IV	16, 17, 20, 18, 19, 8, 10, 9, 2, 13, 15, 7, 14, 11, 5, 6, 1, 12, 3, 4	22.96 (3.09)	7.06 (2.01)
V	27, 28, 26, 29, 24, 25, 23, 21, 30	20.29 (2.42)	8.10 (2.59)
VI	33, 34, 22, 31, 32, 35, 38, 39, 40	18.53 (2.25)	8.44 (1.60)
VII	37	17.89	8.60
VIII	36	18.84	8.80
IX	52	39.15	10.60

Entre parênteses: desvio-padrão.

A análise de agrupamento gerado pelo método de Tocher propiciou a formação de sete grupos distintos (Tabela 6). O grupo II foi o mais representativo, composto por vinte e oito indivíduos dos sessenta avaliados. O grupo I é composto por dezesseis

indivíduos, o grupo III é composto por dez e o IV por apenas três indivíduos. Os demais grupos (V, VI e VII) foram constituídos por apenas um indivíduo cada, 41, 36, e 52, respectivamente.

No método de Tocher, de acordo com Vasconcelos et al. (2007), a partir da matriz de dissimilaridade, identifica-se o par de acessos mais similar (50 e 51), estes indivíduos formam o grupo inicial. Em seguida, avalia-se a possibilidade de inclusão de novos acessos, de forma que a distância média dos acessos dentro do grupo seja menor que as distâncias médias entre os grupos (Cruz et al., 2011). Assim, o grupo I é formado pelos indivíduos 50, 51, incluindo indivíduos que também pertencem à população Aliança, com origem de plantios do Equador, e o indivíduo 14. No Grupo II, estão agrupados indivíduos pertencentes às populações Páscoa e Cavanis, provenientes de plantios da região amazônica brasileira. O grupo III é formado por indivíduos da população Cavanis. O grupo IV é formado pelos indivíduos 42, 43 e 45 e que provavelmente possuem maior distância genética dos outros indivíduos da população Aliança. Nos grupos V, VI e VII (41, 36 e 52) estão os indivíduos mais dissimilares.

Tabela 6. Agrupamento pelo método de Tocher, baseado na matriz de dissimilaridade de Jaccard a partir da análise molecular dos 60 indivíduos de *Ochroma pyramidale* por meio de marcadores ISSR

Grupo	Indivíduos	% de indivíduos
I	50, 51, 59, 53, 55, 56, 54, 58, 48, 57, 49, 60, 46, 47, 44, 14	26,66
II	16, 17, 20, 18, 19, 15, 11, 10, 13, 7, 2, 8, 9, 1, 5, 6, 12, 4, 3, 29, 26, 28, 25, 24, 21, 23, 27, 30	46,67
III	31, 32, 34, 33, 35, 22, 38, 39, 40, 37	16,66
IV	42, 43, 45	5
V	41	1,67
VI	36	1,67
VII	52	1,67
Total	60	100%

O método de Tocher, de acordo com Elias et al. (2007), tem como princípio manter a homogeneidade dentro dos grupos e a heterogeneidade entre os grupos. Os grupos V, VI e VII que são formados por apenas um indivíduo cada, 41, 36 e 52, respectivamente. No método UPGMA, os mesmos indivíduos mantiveram-se em grupos únicos. A concordância entre esses dois métodos sugere que estes sejam os indivíduos mais dissimilares do total analisado, podendo ser indicados para futuros trabalhos que visem a conservação dos recursos genéticos intraespecíficos e em programas de melhoramento.

A análise de variância molecular demonstrou que houve diferenciação genética significativa ($p < 0,001$) entre as populações e que o maior componente de variação encontra-se dentro das populações (71%) (Tabela 7). Alguns trabalhos realizados com espécies arbóreas tropicais também afirmam que a maior variabilidade genética ocorre em nível intrapopulacional (Nybom, 2004; Silva et al., 2016; Borges et al., 2016; Souza et al., 2018). Foi encontrada alta diferenciação genética entre as populações ($F_{ST} = 0,29$), pois segundo Wright (1978), o F_{ST} acima de 0,25 indica diferenciação genética muito alta. Estes resultados sugerem que há variabilidade a ser explorada entre e dentro das populações de *O. pyramidale*.

A alta diferenciação genética encontrada para as populações de *O. pyramidale* neste estudo, corrobora com os estudos de Sun et al. (2006), onde as pesquisas com marcadores RAPD e ISSR têm comprovado que espécies com fecundação cruzada comumente são caracterizadas por baixos níveis de diversidade entre populações e alta diferenciação dentro de populações. Kageyama et al. (2003) e Souza et al. (2004) afirmam que, geralmente, em espécies arbóreas são observados baixos níveis de diversidade genética entre populações devido às suas características como ciclo de vida, alta densidade populacional, predomínio de cruzamentos, mecanismos de dispersão de pólen e sementes. Enquanto, Hamrick, (2004) afirma que as árvores florestais diferem de outras espécies de plantas em sua capacidade de manter altos níveis de diversidade genética dentro das populações. Isso ocorre, em parte, devido ao fluxo gênico, dispersão do fluxo efetivo de pólen (Kremer et al., 2012; Koskela et al., 2014).

Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) das populações de *Ochroma pyramidale*

Fonte de variação	GL	SQ	CV	VT (%)	F _{ST}	P
Entre populações	2	285,600	6,360	29	0,29	0,001
Dentro das populações	57	888,650	15,590	71		
Total	59	1174,250	21,951	100		

GL: Grau de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; CV: Componente de variância; VT (%): Variância total; F_{st}: Índice de fixação; P: probabilidade de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso.

A variabilidade genética entre e dentro de populações de *O. pyramidale*, se deve, possivelmente, por ser uma espécie perene com alto potencial de cruzamento devido ao fluxo de pólen através da polinização entomófila realizada, principalmente, por morcegos, mas também por quatis e abelhas. Além disso, a alta diversidade encontrada pode estar associada ao fato de que a ausência de materiais genéticos melhorados de pau-de-balsa, leva os silvicultores a utilizar sementes coletadas de populações naturais, resultando em grande heterogeneidade fenotípica e mantendo alta variabilidade genética da espécie.

A análise bayesiana realizada no programa Structure para determinar a estrutura genética das populações de *O. pyramidale*, de acordo com o método ΔK descrito por Evanno et al. (2005) indicou a formação de dois grupos (K=2) (Figura 4). O grupo I (vermelho) reuniu a maioria dos indivíduos, sendo que correspondem às populações Páscoa e Cavanis, provenientes de plantios da região amazônica brasileira, o grupo II (verde) reuniu em grande parte os indivíduos provenientes de plantios do Equador.

Observa-se que, embora tenham sido discriminados dois grupos, alguns indivíduos possuem relação com ambos os grupos. Diferente dos resultados do agrupamento UPGMA (Figura 3) e do método de Tocher (Tabela 4) que indicaram um número maior de grupos.

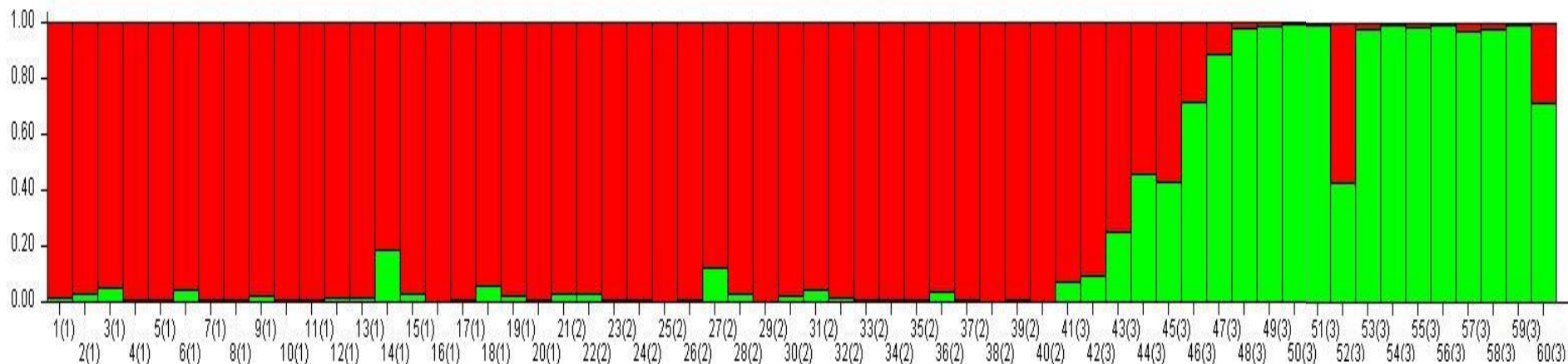


Figura 4. Análise da estrutura genética de 60 indivíduos de *Ochroma pyramidale*, assumindo $K = 2$ (grupos) de acordo com o programa “Structure”. As linhas verticais no eixo x representam os indivíduos e os segmentos coloridos no eixo y demonstram o coeficiente de associação de cada indivíduo atribuído a cada um dos inferidos K .

A existência de variabilidade genética dentro de uma espécie torna possível a seleção de materiais genéticos com potencial adaptativo diante das adversidades ambientais (Ohashi et al., 2010; Borges et al., 2016). A manutenção da diversidade genética é importante para obter ganhos genéticos a longo prazo, sendo que para *O. pyramidale* há uma carência de informações sobre diversos aspectos e o estudo da variabilidade existente é de grande importância para o planejamento de futuros programas de melhoramento e de estratégias para conservação genética da espécie.

CONCLUSÕES

Os marcadores ISSR são eficientes para estudo de diversidade genética populacional de *O. pyramidale*.

Os indivíduos analisados revelaram potencial para serem utilizados como matrizes para coleta de sementes, pois conservam diversidade genética fundamentada nos valores de diversidade de Nei e índice de Shannon.

As populações apresentaram alta diversidade genética, sendo que o maior componente de variação genética encontra-se dentro das populações de *O. pyramidale*.

Os valores de distância genética encontrados entre os indivíduos sugerem ampla base genética. A formação de grupos distintos pelo método UPGMA, otimização de Tocher e análise Bayesiana demonstra que as árvores são pouco relacionadas, portanto, apresentam potencial para seleção de materiais genéticos promissores tanto para programas de melhoramento como em estratégias de conservação genética para a espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKMAN, J. M. The Ecology of Balsa (*Ochroma lagopus* Swartz) in Ecuador. **Proceedings of the Iowa Academy of Science**. 62(1): 245-252, 1955.
- ALVES, R. M.; SILVA, C. R. de S.; SILVA, M. S. da C.; SILVA, D. C. de S.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 35(3), 818-828, 2013.
- ANDERSON, J. A.; CHURCHILL, G. A.; AUTRIQUE, J. E.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**. 36: 181-186, 1993.
- BEHLING, M.; SANTIN, J.; FARIA, J. B.; CAMARGO, D.; ALIBERTI, P. R.; PAIXÃO, F. L. M.; LANGE, A. Crescimento de pau-de-balsa sob diferentes níveis de adubação e espaçamento, em Guarantã do Norte, MT. In: FARIAS NETO, A. L. de. (ed). **Embrapa Agrossilvipastoril: primeiras contribuições para o desenvolvimento de uma agropecuária sustentável**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 442-453.
- BIERNASKI, F. A.; HIGA, A. R.; SILVA, L. D. Variabilidade genética para caracteres juvenis de progênes de *Cedrela fissilis* Vell.: subsídio para definição de zonas de coleta e uso de sementes. **Revista Árvore**. 36(1):49-58, 2012.
- BORGES, R.C.; SANTOS, F.M.G.; MAIA, M.C.C.; LIMA, P.S.C.; VALENTE, S.E.S. Investigating genetic diversity in sapucaia using inter simple sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**. 15(3), 2016.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., AND DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**. 32(3):314-331, 1980.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas. Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v.4, 644p.
- CHIMELLO, A.M.; JESUS, J. G.; TEODORO, P. E.; ROSSI, A. A. R.; ARAÚJO, K. L.; MAROSTEGA, T. N.; NEVES, L.G.; BARELLI, M.A.A. Morphological descriptors and ISSR molecular markers in the evaluation of genetic variability of *Tectona grandis* genotypes. **Genetic and Molecular Research**. 16 (2), 2017.
- COSTA, D. F. da; VIEIRA, F. de A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. das. Diversidade Genética e Seleção de Iniciadores ISSR em uma População Natural de Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (APOCYNACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 37(4): 970-976, 2015.

COSTA, S. G.; MORATO, E. F.; SALIMON, C. I. Densidade de bambu e estrutura populacional de duas espécies arbóreas pioneiras em florestas secundárias de diferentes idades em um remanescente florestal, Acre. **Scientia Forestalis**. 40(95):363-374, 2012.

COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S.; S, A. R. F.; SILVA JÚNIOR, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 46(5):499-508, 2011.

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

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1ª edição. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011. 620p.

CUNHA, H. F. V.; GONÇALVES, J. F. de C.; SANTOS JUNIOR, U. M.; FERREIRA, M. J.; PEIXOTO, P. H. P. Biomassa, trocas gasosas e aspectos nutricionais de plantas jovens de pau de balsa (*Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lamb.) Urb.) submetidas à fertilização fosfatada em ambientes contrastantes de irradiância. **Scientia Forestalis**. 44(109):215-230, 2016.

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

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**. 4(2):359–361, 2012.

ELIAS, H. T.; VIDIGAL, M. C. G.; GONELA, A.; VOGT, G. A. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão preto em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 42:1443-1449, 2007.

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.

FRANCIS, J. K. *Ochroma pyramidale* Cav. **Balsa**. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1991, 6p.

FREIRE, A. da S. M.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. DAS; PINHEIRO, L. G.; LUCAS, F. M. F.; VIEIRA, F. DE A. Genetic diversity in forest populations from conservation units in the Atlantic Rainforest in northeast Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. 14(2), e5640, 2019.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; BEVILACQUA, C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**. 39 (5), 2009.

GOMES, I. B.; REIS, C. A. da S. Uso de Substratos Orgânicos no Crescimento Inicial de Pau-de-Balsa *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. **Revista Tree Dimensional, ProFloresta**. 3(5):35-42, 2018.

GOMES, L. R. P.; LOPES, M. T. G.; BENTES, J. L. S.; BARROS, W. S.; NETO, P. Q. C.; CONTIM, L. A. S. Genetic diversity in natural populations of Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. 11(3):216 - 223, 2011.

HAMRICK, J. L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**. 197(1-3):323-335, 2004.

JU, M. M.; FU, Y.; ZHAO, G. F.; HE, C. Z.; LI, Z. H.; TIAN, B. Effects of the Tanaka Line on the genetic structure of *Bombax ceiba* (Malvaceae) in dry-hot valley areas of southwest China. **Ecology and evolution**. 8(7): 3599-3608, 2018.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**. 64: 93-107, 2003.

KOSKELA, J.; LEFÈVRE, F.; SCHUELER, S.; KRAIGHER, H.; OLRICK D. C.; HUBERT, J.; LONGAUER, R.; BOZZANO, M.; YRJANÄ, L.; ALIZOTI, P.; ROTACH, P.; VIETTO, L.; BORDÁCS, S.; MYKING, T.; EYSTEINSSON, T.; SOUVANNAVONG, O.; FADY, B.; CUYPER, B. de; HEINZE, B.; VON WUHLISCH, G.; DUCOUSSO, A.; DITLEVSEN, B. Translating conservation genetics into management: Pan-European minimum requirements for dynamic conservation units of forest tree genetic diversity. **Biological Conservation**. 157: 39-49, 2013.

KREMER, A.; RONCE, O.; ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; GUILLAUME, F.; BOHRER, G.; NATHAN, R.; FREIO, J. R.; GOMULKIEWICZ, R.; KLEIN, E. K.; RITLAND, K.; KUPARINEN, A.; GERBER, S.; SCHUELER, S. Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. **Ecology Letters**. 15:378 – 392, 2012.

LEÃO, N. V. M.; FREITAS, A. D. D. de; CARRERA, R. H. A. **Pau-de-balsa *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lamb.) Urban**. Embrapa Amazônia Oriental, Manaus: INPA. Informativo técnico Rede de Sementes da Amazônia, 19. 2008, 2p.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**. 6:381-398, 1972.

MEYER, A.S.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. P.; SOUZA JR, C. L. de. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**. 27(1):83-91, 2004.

MIDGLEY, S.; BLYTH, M.; HOWCROFT, N. MIDGLEY, D.; BROWN, A. **Balsa: biology, production and economics in Papua New Guinea**. Australian Government: Aciar technical reports 73. Canberra, 2010.

MIRANDA, A. C.; SILVA; P. H. M. da; MORAES; M. L.T.; LEE, D. J; SEBBENN, A. M. Investigating the origin and genetic diversity of improved *Eucalyptus grandis* populations in Brazil. **Forest Ecology and Management**. 448:130-138, 2019.

MOJENA R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**. 20:359-363, 1977.

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

NG, W. L.; TAN, S.G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Are We Doing It Right? **ASM Science Journal**. 9(1):30-39, 2015.

NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**. 13, 1143-1155, 2004.

OHASHI, S. T.; YARED, J. A. G.; FARIAS NETO, J. T. de. Variabilidade entre procedências de paricá *Schizolobium parahyba* var *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby plantadas no município de Colares - Pará. **Acta Amazônica**. 40(1):81-88, 2010.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos. **Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas**. Colombo: Embrapa Florestas-Documents (INFOTECA-E), 2011. 68p.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**. 28:2537-2539, 2012.

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

RAMALHO, A. B.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; ZORTÉA, K. É. M.; TIAGO, A. V.; MARTINS, K. C. Diversidade genética entre genótipos de *Bertolletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Floresta**. 46(2):207-214, 2016.

REIS, C. A. F.; FILHO, E. P. **Estado de arte de plantios com espécies florestais de interesse para Mato Grosso**. Colombo. Embrapa Florestas, 2011.

ROCHA, V. D.; TIAGO, P. V.; TIAGO, A. V.; PEDRI, E. C. M.; CARDOSO, E. S.; ROSSI, A. A. R. Genetic diversity among *Hymenaea courbaril* L. genotypes naturally

occurring in the north of Mato Grosso State, Brazil. **Genetic and Molecular Research**. 16(3), 2017.

ROHLF, F.J.; FISHER, D. R. Tests for Hierarchical Structure in Random Data Sets. **Systematic Biology**. 17(4):407-412, 1968.

SAID, W. M.; EHSAN, N. O. M.; KHALIFA, N. S. Comparative study of three species of Malvatheca (Bombacoideae and Malvoideae (Malvaceae sensu lato) using Morphological, Anatomical and RAPD-PCR analyses. **Advances in Environmental Biology**. 7(2): 415-426, 2013.

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S. ISSR Markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**. 49(7-8):540–554, 2011.

SANTOS, U. F.; XIMENES, F. S.; LUZ, P. B.; SEABRA JR, S.; PAIVA, S. Níveis de sombreamento na produção de mudas de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale*). **Bioscience Journal**. 30(1):129-136, 2014.

SARTORETTO, L. M.; FARIAS, P. C. M. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. **Unoesc & Ciências – Área das Ciências Exatas e da Terra**. 1(2): 155-162, 2010.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y. ; SEBEN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**. 57:123-139, 2000.

SIEW, G. Y.; NG, W. L.; SALLEH, M. F.; TAN, S. W.; KY, H.; A, N. B. M.; TAN, S. G.; YEAP, S. K. Assessment of the Genetic Variation of Malaysian Durian Varieties using Inter-Simple Sequence Repeat Markers and Chloroplast DNA Sequences. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**. 41(1): 321-332, 2018.

SILVA, B. M. da; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. de F. E.; ARAUJO, V. A. A. C. de; ROSSI, F. S.; OLIVEIRA, L. O. de; CLARINDO, W. R. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**. 46(1), 108-113, 2016.

SILVA, P.H.M.; BRUNE, A.; PUPIN, S.; MORAES, M.L.T.; SEBBENN, A.M.; PAULA, R.C. de. Maintenance of genetic diversity in *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake populations with restriction of the number of trees per Family. **Silvae Genetica**. 67:34-40, 2018.

SOUZA, A. P. de; MOTAL. L. ZAMADEI, T.; MARTIM, C. C.; ALMEIDA, F.T. de; PAULINO, J. Classificação climática e balanço hídrico climatológico no estado de Mato Grosso. **Nativa**. 01(01):34-43, 2013.

SOUZA, L. C. de; JÚNIOR, A. L. da; MIRANDA, F. D. de; SOUZA, M. C. de; KUNZ, S. H.; PEREIRA, A. G. Validação do marcador molecular ISSR para detecção de diversidade genética em *Plathymenia reticulata* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. 13(1), e5491, 2018.

SOUZA, L. M. F. I. de; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**. (65):70-79, 2004.

SOUZA, U. J. B. de; TELLES, M. P. de C.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Tendências da literatura científica sobre genética de populações de plantas do Cerrado. **Hoehnea**. 43(3): 461-477, 2016.

SOUZA, H. G. de; DORIA, K. M. A. B. VAN S.; BASSETO, M. A.; ROSA, D. D.; FURTADO, E. L.; MARINO, C. L. Diversidade genética em populações-núcleo de *Eucalyptus grandis*. **Acta Scientiarum**. Agronomy. 32(4):621-625, 2010.

SUN, K.; CHEN, W.; MA, R.; CHEN, X.; LI, A.; GE, S. Genetic variation in *Hippophanerosses ssp. sinensis* (Elaeagnaceae) revealed by RAPD markers. **Biochemical Genetics**. (44):186-197, 2006.

UYSSAL H.; YONG-BI F.; KURT O.; PETERSON G.W.; DIEDERICHSEN, A.; KUSTERS, P. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 57: 1109- 1119, 2010.

VASCONCELOS, E. S. de; CRUZ, C. D.; BHERING, L. L.; FERREIRA, A. Estratégias de amostragem e estabelecimento de coleções nucleares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 42(4):507-514, 2007.

WEIRICH, N. E. **Diretrizes técnicas para o cultivo do pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale*) no Estado de Mato Grosso**. Cuiabá: SEDER-MT, 2008. 22p. Disponível:< <http://www.ruralcentro.com.br/analises/2085/diretrizes-tecnicas-para-o-cultivo-de-pau-de-balsa-no-estado-de-mato-grosso>>. Acesso em: 10, dezembro, 2019.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. 18:6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Variability within and among natural populations. University of Chicago press, 1984, v.4, 530p.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J.; YE, Z.; XIYAN, J. M.; YANG, R.; BOYLE, T. J. **POPGENE version 1.32**: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta, 2000.

ZANETTI, G. T.; FIGUEREDO, P.; ANDRADE, J.; HOOGERHEIDE, E. S. S. Protocolo para Extração de DNA Genômico de *Ochroma pyramidale*. **Journal of Agronomic Sciences**. 8(1):73-84, 2019 (a).

ZANETTI, G. T.; FIGUEREDO, P. E.; SANTIN, J. C; BENDAHAN, A. B.; ROSSI, A. A. B.; BEHLING, M.; HOOGERHEIDE, E. S. S. Seleção de *Ochroma pyramidale* visando propagação vegetativa. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, Águas de Lindóia, SP, 2019 (b). **Pesquisa e inovação para o desenvolvimento da sociedade**. p. 289.

CONCLUSÕES GERAIS

A caracterização morfológica do pólen de *O. pyramidale* poderá auxiliar na identificação da espécie e em estudos de outras áreas do conhecimento que necessitem de informações morfológicas.

O. pyramidale apresenta alta estabilidade e regularidade meiótica expressa pela viabilidade polínica e índice meiótico e possui amido e lipídio como substâncias de reserva no pólen.

O conhecimento adquirido sobre os aspectos reprodutivos relacionados à fertilidade de *O. pyramidale* pode ser útil na implantação e manutenção de viveiros para produção de mudas em futuros programas de melhoramento, principalmente para auxiliar na escolha de indivíduos adequados para a hibridação.

As populações de *O. pyramidale* do estado de Mato Grosso apresentam elevada diversidade genética a nível intrapopulacional e podem ser utilizadas em programas de conservação e melhoramento genético da espécie.