

THAÍS CRISTINA SILVA

**CRUZAMENTOS DIRIGIDOS E CARACTERIZAÇÃO DE
HÍBRIDOS F₁ DE PLANTAS DE MACAÚBAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como partes das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586c
2019 Silva, Thais Cristina, 1990-
Cruzamentos dirigidos e caracterização de híbridos F1 de plantas
de macaúbas / Thais Cristina Silva. - Viçosa, MG, 2019.
xii, 88 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Macaúba - Melhoramento genético. 2. Fertilização de plantas.
3. Hibridação. 4. Diversidade genética. 5. Microssatélites (Genética).
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.8512

THAÍS CRISTINA SILVA

**CRUZAMENTOS DIRIGIDOS E CARACTERIZAÇÃO DE HÍBRIDOS F₁ DE
PLANTAS DE MACAÚBAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como partes das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

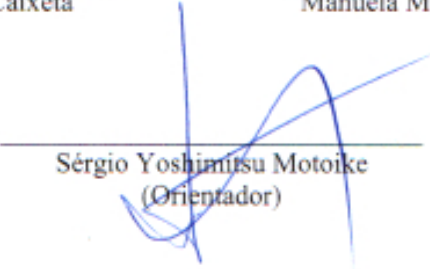
APROVADA: 18 de março de 2019.


Leonardo Duarte Pimentel


Kacilda Naomi Kuki


Evêrline Teixeira Caixeta


Manuela Maria Cavalcante Granja


Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Orientador)

“Tudo vem a mim com
facilidade, alegria e glória”

Mantra Barra de Access

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sobretudo, a Deus sempre presente em minha vida, iluminando-me e colocando-me no melhor caminho a seguir, mostrando que sempre é possível acreditar e ter esperança. Agradeço aos meus pais, irmãos e familiares pelo incentivo, amor e apoio em todas as etapas vividas. Em especial, pelo apoio na minha decisão em realizar doutorado mais distante de casa, e pela compreensão dos momentos em que não pude estar presente em uma fase sensível de nossas vidas durante este período.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade da realização do Doutorado. Agradeço a todos os professores que passaram por mim pelo compartilhamento de conhecimentos, em especial aos do Programa.

Gratidão, em especial, aos professores Edgard Picoli e Eveline Caixeta, a Naomi Kuki pela presença, ensinamentos e paciência nesta fase. Ao meu orientador, Sérgio Motoike, pela oportunidade, dedicação e paciência ao transmitir ensinamentos da área.

Agradeço aos amigos e colegas, fundamentais na minha vida, em me proporcionar alegria e segurança na caminhada. Principalmente a todos aqueles que tive a felicidade de conhecer em Viçosa. Aos colegas do Doutorado, aos do Remape e do GenMelhor, pela diversa ajuda no projeto, pelo bom convívio e por proporcionar crescimento profissional e pessoal.

Imensa gratidão aos funcionários de Araçonga e ao Emiliano, que foram essenciais para a realização dos experimentos, sempre dispostos a me ajudar e sem eles nada seria possível. Agradeço aos técnicos dos laboratórios e demais funcionários da UFV.

Agradeço a todos do Laboratório de Pós-Colheita e Cultura de Tecidos pelo apoio e disponibilização na realização do projeto. Aos do Laboratório de Anatomia Vegetal por dedicarem seu tempo a me ensinar e auxiliar nas análises. Os do Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal agradeço pela paciência em repassar o conhecimento e por tornar meus dias no laboratório mais leves e prazerosos.

Agradeço à CNPq, Capes e demais instituições de fomento, pela concessão de bolsa de estudo e financiamento em projetos de pesquisas.

BIOGRAFIA

Thaís Cristina Silva, filha de José Cirilo da Silva e Maria Dorinha da Silva, nasceu em 30 de abril de 1990, em Formiga - Minas Gerais (MG), Brasil. Coursou os ensinos básico e médio na Escola Estadual Rodolfo Almeida e Escola Estadual Doutor Abílio Machado, em Formiga - MG. Ingressou, em 2008, no curso de Agronomia na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG, graduando-se Bacharel em Agronomia em abril de 2013. No mesmo ano, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia na UFLA. Em 2015, ingressou no Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa - MG.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. Introdução geral	1
2. Revisão de literatura	3
3. Objetivo geral.....	12
4. Metodologia Geral	13
5. Referências bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 1	22
Caracterização de F₁ obtidos de hibridações entre plantas de macaúba de procedências distintas	22
1. Introdução	26
2. Material e Métodos	27
3. Resultados	30
4. Discussão	43
5. Conclusões	50
6. Referências Bibliográficas	51
CAPÍTULO 2	54
Cruzamentos dirigidos: compatibilidade entre macaúba de diferentes procedências	54
1. Introdução	58
2. Material e Métodos	60
3. Resultados	65
5. Conclusões	82
6. Referências Bibliográficas	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Espata floral, ráquias e flores de Macaúba. (A) Espata floral; (B) Flor masculina em antese; (C) Flor feminina e (D) Ráquias, com flores pistiladas na porção basal e estaminadas na porção restante; ráquila superior com flores masculinas em antese e inferior em pré-antese. (Fonte: Brito, 2013 e própria).....	5
Figura 2	Plantas de procedências da região Norte (A), e dos estados de São Paulo (B), de Minas Gerais (C) e de Mato Grosso do Sul (D).....	10
Figura 3	Iconográfico das etapas do estudo. (A) espata; (B) espata ensacada; (C) pólen; (D) espatas durante o processo das hibridações; (E) flores femininas em antese; (F) pagamento das flores; (G) frutos em estágio de maturação; (H) sementes em pré-germinação; (I) emissão do hipocótilo; (J) plúmula; (K) mudas de macaúba; (L) muda plantada no BAG Macaúba.....	14

CAPÍTULO 1

Figura 1	Cruzamentos entre os genitores e suas respectivas procedências.....	28
Figura 2	Bandas dos genitores femininos dos acessos BGP8-P4, BGP105-P1 e BGP50-P8, respectivamente, das procedências MG, MS e MG. Bandas dos genitores masculinos dos acessos BGP31, BGP36-P1, BGP27, BGP64-P9, BGP70-P7 e BGP74-P1 de procedências de MG e BGP115-P1, P2 e P3, de MS. Bandas dos indivíduos F ₁ – A1 ao A25; B26 ao B29; C30 – oriundos dos cruzamentos. Bandas obtidas da amplificação utilizando <i>primer</i> Aacu 45 e Aac 12.....	35
Figura 3	Bandas dos genitores de procedência de SP (BGP47 – plantas P1, P2 e P3) e indivíduos D31, D32 e D33. Bandas obtidas da amplificação utilizando <i>primer</i> Aacu 74, Aac04 e Aac12 mostrando que não houve autofecundação.....	36
Figura 4	Dendograma mostrando o agrupamento de híbridos F ₁ e os genitores dos cruzamentos entre plantas de macaúbas de procedências distintas, baseando em microssatélites SSR. Método de agrupamento de ligação média entre os grupos (UPGMA).....	37
Figura 5	Características observadas nos indivíduos F ₁ . (A) semente pré-germinada; (B) Coloração da plúmula; (C) surgimento das primeiras folhas; (D) diversidade do vigor das plantas F ₁ no mesmo estágio de desenvolvimento; (E) Escala 0 e 5 da presença e quantidade de espinhos...	38
Figura 6	Dendograma mostrando o agrupamento de 31 indivíduos provenientes de cruzamentos entre plantas de macaúbas de procedências distintas, baseando nos descritores morfoagronômicos. Método de agrupamento – ligação média entre os grupos (UPGMA).....	39
Figura 7	Esquema da relação entre agrupamentos com dados moleculares e morfológicos dos híbridos F ₁ e plantas de macaúba de diferentes procedências.....	76

CAPÍTULO 2

Figura 1	Processo da nova metodologia de hibridação desenvolvida no ano de 2017. (A) espata em circunferência máxima (observação de campo); (B)	63
----------	--	----

	espata com abertura longitudinal artificial; (C) cacho floral exposto com detalhe da flor feminina receptiva (coloração rosada do estigma) (D) detalhe da coloração rosada do estigma – viabilidade; (E) flor feminina; (F) flor masculina.....	
Figura 2	Temperatura média, precipitação acumulada e período de polinização das plantas de procedências de MG, SP, PA, NO e MS nos anos de 2015 a 2017.....	66
Figura 3	Valores, em média, do pegamento e produção de frutos e sementes provenientes de cruzamentos entre plantas de procedências distintas e polinização natural nos anos de 2015 a 2018.....	68
Figura 4	Caracterização histoquímica das flores femininas coletadas no dia da abertura artificial e natural das espatas de macaúba. (A) flor feminina de macaúba; (B) flor feminina seccionada na vertical e repartição da localização das diferentes regiões da flor; (C e D) região 1 da flor referente ao teste para carboidrato, (E e F) região 2 da flor referente ao teste para carboidrato; (G e H) região 1 da flor referente ao teste para fenólicos solúveis; (I e J) região 2 da flor referente ao teste para composto fenólico; (K e L) região 2 e 3 corado com azul de toluidina . As imagens (C, D, E e F), mostram resultado positivo para presença de carboidrato pelo reagente PAS, as setas indicam a diferença na estruturação do idioblasto e na precipitação de conteúdo entre abertura manual e natural. As imagens (G, H, I e J), mostram resultado positivo para presença de compostos fenólicos pelo reagente azul de toluidina, indicados pela seta preta. As imagens (K e L) mostram presença de ráfides em luz normal e polarizada, respectivamente.....	71
Figura 5	Análise multivariada usando componentes principais, com formação de dois grupos distintos mostrando variabilidade das sementes quanto ao tipo de cruzamento.....	73
Figura 6	Sementes provenientes de cruzamentos entre plantas de macaúba de procedências distintas com polinização em 2015 e 2016/2017, respectivamente. Escala: 0.75:15 cm.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características morfoagronômicas de plantas presentes no BAG Macaúba de procedências distintas.....	10
----------	---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Acessos e suas referentes procedências, utilizados como genitores nos cruzamentos entre plantas de macaúba para obtenção de F ₁	29
Tabela 2	Lista de primer SSR usados para amplificar locus de microssatélites de macaúba.....	30
Tabela 3	Certificação de cruzamento, autofecundação e identificação dos progenitores dos híbridos F ₁ de interesse para melhoramento genético da macaúba, utilizando marcadores SSR.....	32
Tabela 4	Certificação dos genitores masculinos por meio de teste de exclusão, baseado em <i>primers</i> SSR para certificação de cruzamentos entre plantas de macaúbas de procedências distintas.....	33
Tabela 5	Características de plúmula e espinho dos 31 híbridos F ₁ oriundos de cruzamentos entre plantas de macaúba de procedências distintas.....	38
Tabela 6	Contribuição relativa para as características quantitativas de plantas F ₁ nos diferentes grupos, baseado na distância euclidiana média.....	71
Tabela 7	Valores médios e caracterização de cada grupo quanto as características morfoagronômicas.....	41

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Acessos de diferentes famílias e suas referentes informações e procedências, utilizados nos cruzamentos entre plantas de macaúba em três anos consecutivos, 2015, 2016 e 2017, no BAG - Macaúba/UFV.....	61
Tabela 2	Descrição do esquema dos cruzamentos, autofecundação e polinização natural entre plantas de procedências diferentes.....	62
Tabela 3	Produção de flores femininas por cacho, referente ao ano de 2016, em plantas de macaúba de procedências de MG, PA e MS.....	67

RESUMO

SILVA, Thaís Cristina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2019. **Cruzamentos dirigidos e caracterização de híbridos F₁ entre plantas de macaúbas.** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientador: Cláudio Horst Bruckner.

A macaúba é uma palmeira nativa do Brasil, dispersa em todo território. Possui elevada produtividade e qualidade do óleo, o qual pode ser destinado à indústria alimentícia, farmo-cosmética e de biodiesel. Por estar em processo de domesticação, apresenta estudos ainda incipientes na área de melhoramento genético. A dispersão em condições edafoclimáticas contrastantes promoveu a formação de plantas com características diferenciadas dependendo dos locais de origens. Esta diversidade indica a existência de *pools* gênicos que podem ser explorados por meio de hibridações. Esta estratégia ocasiona combinações que favorecendo o melhoramento da espécie. Porém, até o presente, não há estudos sobre a compatibilidade de hibridações entre plantas de procedências distintas. Com tal enfoque, a caracterização de híbridos F₁ pode proporcionar a seleção orientada de gerações ou de genótipos superiores na fase de melhoramento. Assim, objetivou-se avaliar a compatibilidade de cruzamentos entre plantas fenotipicamente contrastantes e de procedências distintas, bem como, caracterizar os híbridos F₁. No Banco Ativo de Germoplasma de Macaúba, BAG - Macaúba/UFV, foram realizadas hibridações, durante 2015 a 2017, entre materiais de procedências dos estados MG, MS, SP, PA e da região NO; autofecundação e polinização aberta. Simultaneamente, foi realizada a caracterização de híbridos F₁ oriundos do primeiro ano de cruzamento. Dois tipos de metodologia de polinização foram efetuados: abertura manual e natural das espatas. Nos cruzamentos foram avaliados: relação das variáveis climáticas e época de polinizações artificiais, pegamento e produção (flores, frutos e sementes), anatomia de flores femininas de abertura artificial e natural das espatas e caracterização morfológica das sementes. Os dados referentes aos cruzamentos e sementes foram avaliados por meio de estatística descritiva, teste de média tukey e análise multivariada. Os híbridos F₁ foram avaliados por meio de marcadores moleculares microsatélites para a certificação de cruzamentos e estudo de diversidade genética. As características agromorfológicas, velocidade de surgimento da plúmula e da primeira folha, tamanho e quantidade de folhas e caracterização da plúmula e

espinho foram avaliadas na fase de semeadura à muda. As características moleculares e fenotípicas foram analisadas pelo método de agrupamento UPGMA. O período das polinizações das hibridações se sobrepôs na estação chuvosa em todos os anos com características intrínsecas a procedência das plantas. Os cruzamentos dirigidos entre plantas fenotipicamente contrastantes de procedências distintas indicaram sucesso na compatibilidade mediante a nova metodologia de polinização com abertura manual da espata. A abertura manual apresentou viável para polinização mediante receptividade e análises histoquímicas das flores femininas. As sementes apresentaram alta diversidade relacionada às características do genitor feminino. As plantas F₁ foram certificadas como sendo híbridos e conforme a diversidade genética, foram formados três grupos quanto as procedências dos genitores e os tipos de cruzamento. Os F₁ apresentaram alta variabilidade entre meio-irmão e germano sendo discriminados em sete grupos, as quais diferiram quanto ao desenvolvimento, presença e quantidade de espinhos e coloração da plúmula. Os híbridos A7, A18 e A12 descendentes do BGP105-P1/MS, destacaram-se para obtenção de variedades com pouco espinho e desenvolvimento normal. Os F₁ possuem variabilidade que pode ser explorada na fase de seleção para geração F₂ e na orientação de novos cruzamentos. Tais resultados favorecem a orientação de hibridações entre fenótipos contrastantes e a seleção de indivíduos para o melhoramento. Este trabalho se caracteriza como pioneiro e traz estudos preliminares, indicando a continuidade do mesmo para avaliações de parâmetros genéticos.

ABSTRACT

SILVA, Thaís Cristina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2019. **Directed crosses and characterization of F₁ hybrids between macauba plants.** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-adviser: Cláudio Horst Bruckner.

The macauba is a palm native to Brazil, dispersed throughout the territory. It has high productivity and oil quality, which can be destined to the food industry, farm-cosmetics and biodiesel. Being in the process of domestication, presents studies still incipient in the area of genetic improvement. The dispersion in contrasting edaphoclimatic conditions promoted the formation of plants with differentiated characteristics depending on the sites of origin. This diversity indicates the existence of gene *pools* that can be exploited by means of hybridizations. This strategy causes combinations that favor the improvement of the species. However, to date, there are no studies on the compatibility of hybridizations between plants of different origins. With such a focus, the characterization of F₁ hybrids can provide targeted selection of generations or superior genotypes in the breeding phase. The objective of this study was to evaluate the compatibility of crosses between phenotypically contrasting and distinct plants, as well as to characterize F₁ hybrids. In the germplasm bank of Macaúba, BAG - Macaúba / UFV, hybridization was carried out between 2015 and 2017, among materials from the states MG, MS, SP, PA and the NO region; self-pollination and open pollination. Simultaneously, the characterization of F₁ hybrids from the first crossing year was performed. Two types of pollination methodology were performed: manual and natural opening of spatula. The crosses were evaluated: climatic variables and time of artificial pollinations, glue and production (flowers, fruits and seeds), anatomy of female flowers with artificial and natural opening of spathes and morphological characterization of seeds. The data on the crosses and seeds were evaluated by means of descriptive statistics, tukey mean test and multivariate analysis. The F₁ hybrids were evaluated using microsatellite molecular markers for the certification of crosses and study of genetic diversity. The agromorphological characteristics, speed of appearance of the plumule and the first leaf, size and number of leaves and characterization of the plumule and thorn were evaluated in the sowing stage. The molecular and phenotypic characteristics were analyzed by the UPGMA clustering method. The period of the pollinations of the hybrids overlapped in the rainy season in all the years with intrinsic characteristics the origin of the plants. Crosses directed between

phenotypically contrasting plants of different provenances indicated success in the compatibility through the new pollination methodology with manual spatter opening. The manual opening presented viable for pollination through receptivity and histochemical analysis of female flowers. The seeds presented high diversity related to the characteristics of the female parent. F₁ plants were certified as hybrids and according to genetic diversity, three groups were formed regarding the provenance of the parents and the types of crossing. The F₁ presented a high variability between half-brother and germano being discriminated in seven groups, which differed as to the development, presence and quantity of spines and coloring of the plumule. The A7, A18 and A12 hybrids descended from BGP105-P1/MS, stood out for varieties with little spine and normal development. The F₁ have variability that can be explored in the selection phase for generation F₂ and in the orientation of new crossings. These results favor the orientation of hybridizations between contrasting phenotypes and the selection of individuals for breeding. This work is characterized as a pioneer and brings preliminary studies, indicating the continuity of the same for evaluations of genetic parameters.

1. Introdução geral

Este estudo relata os resultados de três anos consecutivos de hibridações de plantas de macaúba presentes no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Viçosa – BAG - Macaúba/UFV. Este trabalho constitui de pesquisas pioneiras, que inferem sobre a compatibilidade de cruzamentos, desenvolvimento de nova metodologia de polinização e estudos que subsidiarão a exploração da diversidade genética dos primeiros híbridos F₁ da espécie no programa de melhoramento de macaúba direcionado para obtenção de híbridos.

A macaúba se destaca pela qualidade de seu óleo e pela produtividade que pode chegar a seis toneladas de óleo ha⁻¹ (Motoike et al., 2013; Navarro-Diaz et al., 2014). Ela tem potencial produtivo semelhante a mais produtiva oleífera do mundo, a palma de óleo (*Elaeis guineenses*). A macaúba produz dois tipos de óleo – o do mesocarpo e o da amêndoa, com alto teores de ácido oleico e ácido linoleico, respectivamente. A composição destes óleos se assemelha aos óleos de oliva, coco e palma de óleo (Belen-Camacho et al. 2005; Hernandez et al. 2007; Berton et al., 2014). Além disso, o processamento dos frutos da macaúba gera coprodutos de valor mercadológico podendo ser destinados para diversos fins em indústrias alimentícias, farmo-cosméticas e de biodiesel (Padilha et al., 2015).

Da família Aracaceae, a macaúba é uma palmeira originária da América Central e Sul. Sua rusticidade e plasticidade fenotípica a torna passível de ser cultivada em climas tropicais savânicos e subtropicais, preenchendo a lacuna agroecológica que limita o cultivo da palma de óleo nestas regiões, por esta última exigência. Além disso, a macaúba pode ser cultivada em áreas de pastagens degradadas e em consórcio com outras culturas.

No Brasil, as populações naturais de macaúba são mais abundantes nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. O centro de diversidade e origem se situa em Minas Gerais (Lanes et al, 2015). A dispersão desta palmeira em regiões com condições edafoclimáticas distintas, ocasionou variações morfológicas dentro da espécie. Parte desta diversidade está representada na coleção do Banco Ativo de Germoplasma de Macaúba (BAG- Macaúba/UFV) por famílias maternas provenientes de várias regiões brasileiras. Essa variabilidade resultou na formação de *pools* gênicos que podem ser explorados por meio de hibridações para avanços no programa de melhoramento genético da cultura. Entretanto, a macaúba é uma espécie

ainda em processo de domesticação com estudos incipientes na área de melhoramento, demandando estudos de hibridações assistidas mais direcionados à etapa *per se* do melhoramento, concomitantes com a caracterização de genótipos para seleção de plantas superiores. A hibridação entre genitores divergentes poderá proporcionar novas combinações genéticas resultando em indivíduos com variabilidade genética e com características desejáveis ao objetivo do programa.

O sucesso da compatibilidade de uma hibridação é indispensável, a compatibilidade contribui para manter e aumentar a diversidade (Zhang et al., 2009). No entanto, ela pode ser um desafio para programas de melhoramento que buscam a obtenção de novas variedades através de hibridações dirigidas. Caso haja compatibilidade, as plantas de macaúba de diferentes procedências podem subsidiar à formação inicial de combinações híbridas desejáveis, contribuindo para a consolidação da cultura. Neste contexto é necessário o estudo da compatibilidade de cruzamentos entre plantas de macaúba de procedências distintas e características morfológicas contrastantes.

Além disso, é desejável a confirmação da hibridação dos genitores e a análise da diversidade genética por meio de marcadores moleculares. O uso de marcadores para estes fins é uma metodologia confiável e rápida por meio de informações precisas ao nível de DNA (Ferrão et al., 2015). Os marcadores moleculares são importantes para o melhoramento genético auxiliando em estudos de diversidade, mapeamento genético, confirmação e direcionamento de cruzamentos (Missio et al., 2011). O conhecimento da diversidade genética e a caracterização de híbridos permitem observar os genótipos mais contrastantes e promissores para as características desejáveis e pode prever combinações híbridas de maior heterozigose e efeito heterótico (Carvalho et al., 2003; Cruz e Carneiro, 2003; Reif et al., 2005). A caracterização fenotípica de híbridos oriundos de fenótipos contrastantes é essencial para impulsionar a fase de seleção do programa de melhoramento, auxiliando na variabilidade genética e na seleção orientada da espécie. Porém, também são incipientes estudos relacionados a diversidade genética e caracterização de híbridos de macaúba em gerações de cruzamentos.

Este trabalho objetivou avaliar: a compatibilidade de cruzamentos divergentes, de plantas de macaúba de procedência distintas, presentes no BAG - Macaúba/UFV; e a caracterização molecular de híbridos da geração F₁ oriundos de genitores de diferentes procedências.

2. Revisão de literatura

Potencial agro-ecomômico

A macaúba é uma palmeira oleaginosa e nativa de maior dispersão no território nacional, ocupando uma área de 11,6 milhões de hectares (Melo, 2012; Plath et al., 2016). As populações nativas se encontram principalmente nas região sudeste e centro-oeste, nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (Ratter et al., 2003). Esta planta possui grande importância socioeconômica e ecológica, pela exploração por pequenos produtores e por adaptar em condições edafoclimáticas adversas devido sua rusticidade e plasticidade fenotípica (Motoike & Kuki, 2009; Abreu et al., 2011). A macaúba tem potencial para se inserir em habitats distintos e com possibilidade de inserção em áreas agrícolas sem causar mudanças no uso da terra (Manfio et al., 2010; Laviola et al., 2011; Lanes et al., 2015).

Esta palmeira se destaca com estimativa de produção de até seis toneladas de óleo ha⁻¹ (Motoike et al., 2013; Navarro-Diaz et al., 2014). A macaúba se assemelha a maior cultura oleífera do mundo, a palma de óleo (*Elaeis guineenses*), devido seu potencial produtivo (Roscoe et al., 2007; Pires et al., 2013). Entretanto, a palma de óleo possui áreas limitantes de cultivo, devido a sua exigência climática à altas precipitações, se restringindo a áreas tropicais úmidas (Cardoso et al., 2017). Em contrapartida, a macaúba é passível de ser cultivada em climas tropicais savânicos e subtropicais, podendo preencher a lacuna das áreas de cultivo da palma de óleo nestas regiões.

Os principais produtos da macaúba são dois tipos diferentes de óleos, o extraído do mesocarpo (polpa) e o da semente (amêndoa), com potencial uso nas indústrias alimentícias, oleoquímicas e de biodiesel (Teixeira, 2005; Lorenzi, 2006). Estes óleos possuem composição distinta, com potencial para chegar ao consumidor final de maneiras diferentes, *in natura* ou com agregação do produto (Cardoso et al., 2018). A principal característica do óleo da polpa é o alto teor de ácido oleico, sendo similar ao azeite de oliva (Berton et al., 2014). Este óleo possui coloração amarelada, apresenta maior estabilidade oxidativa e operabilidade a baixas temperaturas (Silva et al., 1986; Berton, 2013). Já o do óleo da amêndoa, predomina o ácido linoleico, sendo similar a composição do óleo de coco e da palma de óleo, que além de atender

a demanda da indústria alimentícia, tem emprego principalmente no setor de fármaco-cosméticos (Belen-Camacho et al., 2005; Hernandez et al., 2007). Este óleo possui coloração claro e é rico em ácidos graxos saturados de cadeia curta e possui principalmente o ácido láurico em sua composição (Bora e Rocha, 2004; Beltrão e Oliveira, 2007; Coimbra e Jorge, 2012; Berton, 2013).

Além disso, os resíduos sólidos do fruto podem gerar subprodutos de valor mercadológico (Padilha et al., 2015). O endocarpo pode ser utilizado como carvão em caldeiras ou até para a produção de carvão ativado (Rios et al., 2015). A biomassa pode ser utilizada tanto na produção de etanol de segunda geração, como cadeia produtiva de bioquerosene para a aviação (Gonçalves et al., 2013; Lanes et al., 2014;). A torta, assim como os resíduos da extração do óleo da polpa e da amêndoa, tem alto teor de proteína, o que permite ser utilizado para a alimentação de animais (Trentini et al., 2016). As tortas fibro-protéicas do mesocarpo e endosperma podem ser destinadas a nutrição humana ou animal (Vieira et al., 2012).

A maior parte da exploração da espécie ainda depende de atividades extrativistas (Cardoso et al., 2017). Entretanto, o cultivo comercial da macaúba está em ascensão. Atualmente, no Brasil existem três importantes iniciativas de plantio, a empresa Entaban Brasil, com produção de frutos de macaúba em uma área de 600 ha, a empresa Solea Brasil, com estimativa de plantio em uma área de 5000 ha nos próximos cinco anos e a empresa alemã Inocas que atualmente está plantando 2000 ha de macaúba no estado de Minas Gerais, por meio de um projeto financiado pelo Banco Interamericano Banco de Desenvolvimento (Colombo et al., 2018).

Aspectos gerais

A macaúba é pertencente à família Areaceae e habita áreas subtropicais e tropicais da América Latina, em regiões entre temperaturas entre 15° a 35° C, 1500 a 2000 mm de precipitações, e altitudes de 150 a 1000m (Motta et al., 2002; Manfio et al., 2012; Cardoso et al., 2017). A planta possui um estipe que pode atingir até 15 m de altura, coberto por espinhos com cerca de 10 cm de comprimento, e pecíolos que permanecem aderidos por longo período (Brito, 2013). Sua principal característica é a presença de espinhos longos e pontiagudos na região dos nós (Lorenzi, 2006). As folhas são pinadas com comprimento variando de 0,75 a 2 metros, apresentando folíolos de cada lado e pode conter numerosos acúleos (Arboles, 2005; Brito, 2013).

A floração ocorre na estação chuvosa em populações naturais da região sudeste (Brito, 2013). Sua inflorescência é em espádices de tons amarelados, pendentes, variando de 80 a 130 cm de comprimento e protegidas por uma espata revestida de acúleos (Brito, 2013). As inflorescências possuem flores pequenas, monoicas, onde as flores masculinas distribuem-se na parte distal e as femininas na parte proximal da inflorescência no cacho (Figura 1).



Figura 1. Espata floral, ráquulas e flores de Macaúba. (A) Espata floral; (B) Flor masculina em antese; (C) Flor feminina e (D) Ráquulas, com flores pistiladas na porção basal e estaminadas na porção restante; ráquila superior com flores masculinas em antese e inferior em pré-antese. (Fonte: Brito, 2013 e própria).

As inflorescências apresentam protoginia. Em relação a viabilidade, as flores pistiladas apresentam se receptivas desde o momento de abertura da espata com permanência de 15 horas, em plantas de procedências de Minas Gerais (Brito, 2013). A polinização ocorre principalmente por besouros, com o vento desempenhando um papel secundário. Os principais polinizadores pertencem ao grupo de *Curculionidae*, *Nitidulidae* e *Escarabaeidae* (Montoya, 2015).

O sistema reprodutivo desta espécie é classificado como predominantemente alógamo, com baixas taxas de autofecundação ($s^{\wedge} < 20\%$) (Lanes et al., 2016). Entretanto, alguns pesquisadores classificam como uma espécie de sistema misto

com níveis intermediários de autofecundação ($20 < s^{\wedge} < 80\%$) (Scariot et al., 1991; Nucci et al., 2008; Abreu et al., 2012).

Os frutos são drupas globosas, com epicarpo liso, de coloração marrom-amarelada. O mesocarpo é uma polpa fibrosa de coloração amarelada, mucilagínosa, rica em glicérides, comestível. O endocarpo é rígido, de coloração escura, em sua parte interna pode conter de uma a três sementes oleaginosas, comestíveis e recoberta por uma fina camada de tegumento (Scariot et al., 1991). Entretanto, estudos revelam que existem variabilidade nas proporções e composição dos constituintes dos frutos, isto é, exocarpo, mesocarpo, endocarpo e amêndoa.

Pesquisadores tem relatado abortamento prematuro de frutos, de modo aleatório, em cachos de plantas de macaúba, reduzindo a produtividade. Porém, esse abortamento ainda não possui uma causa definida até o momento. O abortamento prematuro dos frutos de macaúba pode ser atribuído a baixa disponibilidade ou deficiência dos polinizadores ou ser uma causa possível de carga mutacional excessiva (Husband & Schemske, 1996; Wilcock & Neiland, 2002). A presença da depressão endogâmica em macaúba também pode ser considerada uma das causas para acontecimento do abortamento (Simiqueli et al., 2018).

Taxonômia

A grande variação fenotípica, especialmente as características morfológicas, entre plantas de diferentes procedências, demonstra uma provável influência da interação genótipo x ambiente. Porém, esta mesma diversidade fenotípica é responsável pela conflituosa identidade taxonômica da macaúba, a qual corrobora com Lima et al. (2018), que relata não haver consenso sobre a taxonomia adotada. Nos respeitadas institutos botânicos ainda falta uma identidade taxonômica definitiva para a macaúba, para esclarecer se os fenótipos da macaúba brasileira são ecótipos, subespécies ou espécies diferentes da *Acrocomia*.

Os pesquisadores Henderson et al. (1995), adotado neste estudo, reconhecem a existência de duas espécies do gênero *Acrocomia*, a *A. aculeata* (com mais de 150 sinónimas) e a *A. hanseleri*. Bailey (1941) reconheceu 25 espécies; Lodd. ex Mart. (1834), 37 nomes sinonimizados e *A. hassleri* (Barb. Rodr.); W.J. Hahn (1991) quatro sinonimizadas nomes; e Lorenzi et al. (2010) descreveu seis espécies

ocorrendo no Brasil: *A. aculeata*, *A. emensis*, *A. glaucescens* Lorenzi, *A. hassleri*, *A. intumescens* Drude e *A. totai* Mart (Lima et al. 2018).

Apesar dos conflitos sobre a nomenclatura, Lorenzi et al. (2010) considerou três espécies para fins comerciais: *A. aculeata*, *A. intumescens* e *A. totai*. As três espécies não ocorrem na mesma região e apresentam características diferentes. As populações nativas de *A. aculeata*, apresentam elevado teor de óleo, ocorre nas regiões sudeste e central de Brasil. *A. intumescens* é uma espécie típica do norte e nordeste brasileiro e *A. totai* ocorre em outros estados da região central do Brasil e no Paraguai (Silva, 2007).

Banco de germoplasma e de melhoramento genético da Macaúba -UFV

O Banco Ativo de Germoplasma de Macaúba (BAG - Macaúba/UFV), Registro nº 084 -2013/CGEN/MMA, da Rede Macaúba de Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa (REMAPE/UFV), foi implantado, em 2009, na Estação Experimental do município de Araponga-MG e nas dependências do Setor de Fruticultura - UFV localizada em Viçosa-MG. O município de Araponga está situado a 20°04'01" de latitude Sul e 42°31'15" de latitude Oeste, a uma altitude média de 918 metros (Castro Neto & Silveira, 1981). O clima da região é do tipo Cwb, subtropical de altitude, com inverno seco e verão ameno e chuvosos (mesotérmico), segundo a classificação de Köppen.

O BAG – Macaúba ocupa uma área total de aproximadamente 4 hectares, sendo composto por seis glebas, que se diferenciam por ano de plantio. No inventário 2017/2018, contabilizou-se 304 acessos genéticos, totalizando 1255 plantas. A coleção é constituída por famílias maternas provenientes de várias regiões brasileiras. O conjunto de acessos possui uma ampla variabilidade fenotípica, e é um recurso para suporte do início do melhoramento genético (Manfio, 2010; Manfio et al., 2012). O BAG – Macaúba se destaca como o maior banco de germoplasma de recursos fitogenéticos de macaúba registrado no mundo (Coser, 2016).

O banco proporcionou a concretização de diversos estudos, gerando informações importantes nos tópicos, a citar:

- Brito (2009): biologia reprodutiva e conservação de pólen em população nativa para subsídio do programa genético;

- Manfio (2010): variabilidade genética de caracteres fenotípicos, estimação da diversidade genética e repetibilidade da avaliação de matrizes de macaúba;
- Montoya (2013): caracterização do desenvolvimento e o padrão temporal do acúmulo de reservas do fruto de macaúba.
- Granja (2014): avaliação de progênies de matrizes de *A. aculeata* de polinização aberta quanto a indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos;
- Lanes (2014): estrutura populacional, níveis de variabilidade genética, análise dos parâmetros do sistema de cruzamento e níveis de depressão por endogamia em caracteres vegetativos de famílias maternas de *A. aculeata* conservados *ex situ*, utilizando marcadores microssatélites;
- Rueda (2014): diversidade e parâmetros genéticos por meio da variabilidade morfológica entre progênies de macaúba baseada em caracteres quantitativos;
- Fekadu (2015): uso de amplificação cruzada de marcadores SSR como uma alternativa de baixo custo para estabelecer os marcadores SSR, e estudo da diversidade genética nas coleções *ex situ* de germoplasma da *A. aculeata* coletadas de diferentes procedências no Brasil;
- Nascimento (2015): avaliação dos efeitos da variação da umidade e temperatura em grãos de pólen armazenados e adaptação de metodologia de polinização controlada, através do uso de diferentes doses de pólen e do agente dispersor (talco);
- Coser (2016): caracterização dos acessos afim de selecionar acessos potencias que reúnam características a serem agregadas ao ideótipo final correspondente às necessidades do produtor e as demandas dos mercados potenciais para a espécie;
- Costa (2016): parâmetros genéticos dos caracteres físicos dos frutos, teor e produção de óleo, inferindo sobre a diversidade genética, realizando o agrupamento e seleção dos acessos de macaúba;
- Simiqueli (2016): depressão endogâmica em caracteres vegetativos e produtivos, correlações, valores e parâmetros genéticos e populacionais e o efeito da estruturação em populações na acurácia da avaliação genética;
- Pires (2017): diversidade morfofisiológica, anatômica e genética entre populações de macaúba procedentes de diferentes biomas;

- Nascimento (2018): estabelecimento de um protocolo, para obtenção de clones, de calogênese *in vitro* a partir de folíolos imaturos de plantas adultas de macaúba.

Variação fenotípica de plantas de macaúba no BAG - Macaúba/UFV

A macaúba, presente em todo território nacional, tem maior densidade de população nos estados de São Paulo (SP), Mato Grosso do Sul (MS) e Minas Gerais (MG). A região sudeste é considerada um centro de origem e diversidade da espécie (Lanes et al., 2015).

Essa dispersão em regiões com condições edafoclimáticas por vezes contrastantes, ocasionou variações morfológicas dentro da espécie (Figura 2). Um estudo de diversidade realizado por Rueda (2014), mostra que esta dispersão foi suficiente para formação de grupos com características que se diferem quanto a origem geográfica. Segundo este estudo em plantas de SP e MG, presentes no Banco ativo de Germoplasma - BAG - Macaúba/UFV, as características que abrangem a arquitetura e densidade da copa, presença de espinhos na ráquis, altura do ápice até base da planta e o índice de área foliar, são marcantes e importantes para demonstrar a estabilidade das características fenotípicas frente as condições de cada região.

Estudos que comprovam alta diversidade genética no BAG - Macaúba/UFV foram base para realizar observações quanto as variações fenotípicas das plantas do banco. Características morfoagronômicas contrastantes foram notadas em plantas de procedências dos estados de MG, MS e SP e das regiões geográficas NE e NO (Tabela 1). Tais observações corroboraram para o direcionamento do programa de melhoramento genético com foco na obtenção de híbridos.

Aspectos sobre hibridação e caracterização de híbridos

O sucesso de um programa de pré-melhoramento depende do conhecimento da quantidade de variação nas espécies de interesse (Cruz et al., 2011). Estudos de avaliação da variabilidade e herdabilidade existente entre os acessos do BAG - Macaúba/UFV, realizados por Costa (2016), demonstrou a presença de diversidade genética em relação ao caráter produção de óleo, aplicável à seleção de genitores elites. Adicionalmente, Domiciano et al. (2015) identificaram a existência de *pools*

gênicos entre os genótipos da coleção da Embrapa Cerrados em relação as coleções da UFV e Epamig. Estas informações geram respaldo para explorar as hibridações controladas.



Figura 2. Plantas de procedências da região Norte (A) e dos estados de São Paulo (B), de Minas Gerais (C) e de Mato Grosso do Sul (D).

Tabela 1. Características morfoagronômicas de plantas presentes no BAG Macaúba de procedências distintas.

Características morfoagronômicas	Procedências				
	Minas Gerais (MG)	Mato Grosso do Sul (MS)	Norte (NO)	Pará (PA)	São Paulo (SP)
Altura	+++	+	++++	+++	++++
Densidade da copa	++++	+	+++	++++	++
Pecíolo remanescentes aderidos ao estipe	+++	-	++	++	+
Espinhos	++++	+	+++	+++	+
Tamanho das espatas	++++	++	++	+++	+
Tamanho dos frutos	+++	+	++++	++++	++

Fonte: Adaptado das referências Rueda (2014) e Lanes (2015) e de observações de campo no BAG – Macaúba.

O conhecimento da diversidade genética entre um grupo de genitores pode prever combinações híbridas de maior heterozigose e efeito heterótico (Carvalho et al., 2003; Reif et al., 2005). A hibridação entre grupos divergentes de genitores quanto características morfológicas apresentam uma maior chance de sucesso para identificar progênies e cruzamentos com potencial para obter populações segregantes (Oliveira et al., 2007; Nascimento et al., 2014). Diante da extensa divergência de características morfológicas e de produção de óleo entre os acessos do BAG - Macaúba/UFV, o cruzamento entre plantas de procedências distintas é factível para início da etapa de obtenção de híbridos (Oliveira et al., 2007).

A obtenção de plantas com características agronomicamente desejáveis, em programas de melhoramento genético, baseia-se em hibridações direcionadas e seleção de genótipos (Techio et al., 2006). A hibridação ocorre pela fusão de células reprodutivas geneticamente diferentes, gerando híbridos heterozigóticos para um ou mais locos (Borém, 2013). A polinização direcionada pode proporcionar frutos maiores e de qualidade, estabilidade na produção, mantendo a variabilidade genética. Essa estratégia contribui para a resistência às mudanças ambientais (Classen et al., 2014).

Para sucesso de uma hibridação, é necessário conhecimento prévio da biologia floral, viabilidade do pólen, presença de polinizadores e sobre o sistema reprodutivo. A fase reprodutiva é a mais susceptível, podendo ser afetada por fatores externos abiótico e biótico (Fisch, 2000; Losada et al., 2014). Um exemplo é a temperatura, que pode retardar o crescimento do tubo polínico, se forem baixas, ou desidratar a superfície do estigma, se forem altas, interferindo na receptividade e germinação do grão do pólen (Moreira, 2008; Crassweller, 2015). Barreiras de pré-fertilização, como interação pólen-estigma, influência no sucesso reprodutivo, assim como, as pós-fertilização, como a morte do embrião devido à degeneração do endosperma, e a esterilidade total ou parcial das plantas híbridas. (Pereira et al., 2010; Freitas, 2014).

As hibridações podem ser inviáveis também devido à presença de autoincompatibilidade (AI) que é muito frequente em plantas alógamas. A AI é um mecanismo que impede que plantas produtoras de gametas masculinos e femininos funcionais produzam sementes quando polinizadas (Bruckner et al., 2005). A autoincompatibilidade pode ser devida a diferenças nas estruturas florais:

heteromórficos ou homomórficos, e pelo controle genético do grão de pólen pelo gene S: gametofítico ou esporofítico (Bruckner et al., 2005).

O sucesso e compatibilidade de um cruzamento geram híbridos que são importantes em um programa de melhoramento, para etapas de seleção, avaliação e recomendação. A caracterização dos híbridos obtidos permite identificar genótipos promissores, passíveis de integrar os programas de melhoramento genético ou de serem recomendadas aos produtores para cultivo (Silva et al., 1999). A fase de caracterização determina a diferenciação, a utilidade, estrutura e variabilidade genética, descrevendo assim, atributos qualitativos e quantitativos que vão distinguir os materiais e relacioná-los em grupos. Os caracteres avaliados podem ser quantitativos ou qualitativos, essa divisão se dá mediante a característica ser controlada por muitos ou poucos genes (Silva, 2005). Diferentes níveis de caracterização são possíveis entre eles: morfoagronômica, bioquímica e molecular (Gonçalves, 2013). A divergência genética permite observar os acessos mais contrastantes para as características desejáveis e até mesmo duplicatas (Cruz e Carneiro, 2003).

3. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a compatibilidade de cruzamentos divergentes, de plantas de macaúba de procedência distintas, presentes no BAG - Macaúba/UFV da Rede Macaúba de Pesquisa da UFV. Adicionalmente, caracterizar a diversidade dos híbridos F₁ oriundos destes cruzamentos.

Os objetivos específicos encontram-se distribuídos em dois capítulos, a seguir:

a) Capítulo 1: Caracterização de híbridos F₁ obtidos de cruzamentos dirigidos entre plantas de macaúba

Este estudo visou responder os questionamentos: (1) os cruzamentos entre plantas de procedências geográficas distintas proporcionam aumento na variabilidade genética da espécie?; (2) a variabilidade destes híbridos F₁, na fase juvenil, gera grupos de características morfológicas diferentes com aspectos agronômicos desejáveis? Foram realizadas avaliações por meio de marcadores moleculares e dos caracteres

agromorfológicos em plântulas em desenvolvimento até o sexto mês da fase de muda. As informações deste capítulo inferem sobre a possível presença de *pools* gênicos no banco de germoplasma dos genitores. A variabilidade existente determinou classes com características que podem ser indicados para fase de seleção no melhoramento genético da espécie.

b) Capítulo 2: Cruzamentos dirigidos: compatibilidade entre macaúba de diferentes procedências

Este capítulo teve como objetivo responder as seguintes questões: (1) o cruzamento entre plantas fenotipicamente contrastantes e de procedências distintas é viável para produção de híbridos de macaúba?; (2) a metodologia de polinização influencia no pegamento de frutos?; (3) existem diferenças anatômicas entre as flores femininas no momento da abertura manual e natural da espata?? Para tanto, foram realizadas autofecundações e hibridações direcionadas. Flores femininas foram coletadas no momento da abertura manual e natural da espata na polinização. Foram disponibilizadas informações, decorrentes de três anos consecutivos, sobre os cruzamentos dirigidos e a metodologia de polinização.

4. Metodologia Geral

O experimento foi realizado no BAG - Macaúba/UFV com hibridações entre os anos de 2015 a 2017, conforme metodologia geral em esquema na Figura 3. Os cruzamentos dirigidos foram entre genitores de acessos de procedências distintas. A escolha dos genitores foi embasada, conforme observação de campo, nos fenótipos contrastantes, quanto às características agrônômicas desejáveis, incluindo presença e quantidade de espinho, altura, produção de frutos, produtividade de óleo, e quanto as regiões de procedências.

Nos procedimentos de hibridações, a coleta do pólen foi feita somente quando um terço das flores masculinas estavam em antese. O pólen coletado foi armazenado em placas de Petri na geladeira até o momento das polinizações. O teste de viabilidade do pólen foi realizado utilizando a técnica de coloração com tetrazólio 1%. O processo de polinização manual foi efetuado no momento em que a flor feminina se encontrava viável, o qual corresponde ao dia de abertura da espata

(Brito, 2019). Utilizou-se proporção (ou mistura) de 0,6g pólen com 3g de talco, descrita por Nascimento (2015), para polinização dos cachos. Tanto para coleta de pólen quanto para hibridação, as espatas encontravam-se previamente isoladas em sacos de organzas (Figura 3). Após a polinização manual foi mantido por alguns dias as espatas isoladas nos sacos de organzas.

O acompanhamento do desenvolvimento dos frutos ocorreu até o período de colheita de frutos maduros.

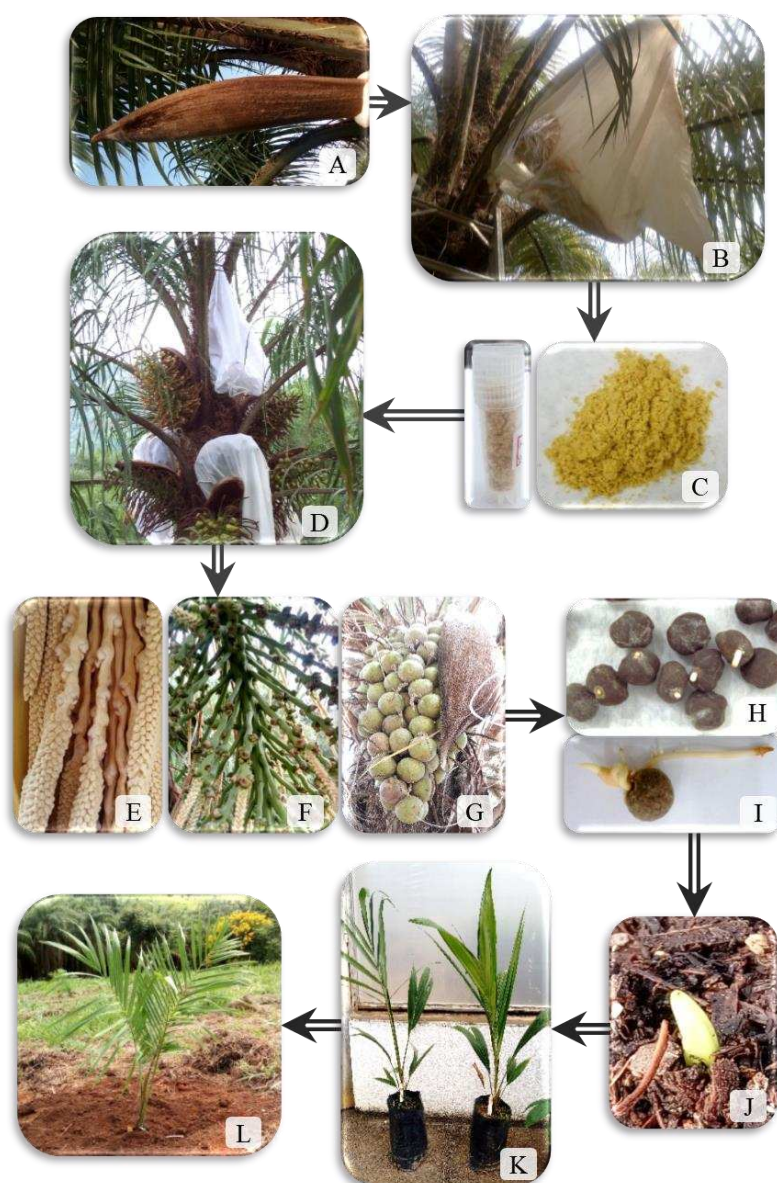


Figura 3. Iconográfico das etapas do estudo. (a) espata; (b) espata ensacada; (c) pólen; (d) espatas durante o processo das hibridações; (e) flores femininas em antese; (f) pagamento das flores; (g) frutos em estágio de maturação; (h) sementes em pré-germinação; (i) emissão do hipocótilo; (j) plúmula; (k) mudas de macaúba; (l) muda plantada no BAG Macaúba. 2018.

5. Referências bibliográficas

- ABREU, A.G.; PRIOLLI, R.H.G.; AZEVEDO-FILHO, J.A.; NUCCI, S.M.; ZUCCHI, M.I.; COELHO, R.M.; COLOMBO, C.A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Genetic Molecular Biology**, 35:119–121. 2012.
- ALMEIDA, S.P. **Cerrado: Espécies vegetais uteis**. 1. Ed. Planaltina, DF: EMBRAPAC, P. 464. 1988.
- ARBOLES del area del canal de Panamá *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. 2005.
- BAILEY, L. H. *Acrocomia*—preliminary paper. **Gentes Herbarum**, 4(12), 421–476. 1941.
- BELÉN-CAMACHO, D. R., LÓPEZ, I., GARCÍA, D., GONZÁLEZ, M., MORENOÁLVAREZ, M. J., & MEDINA, C. Physicochemical evaluation of seed and seed oil of corozo (*Acrocomia aculeata* Jacq.) **Grasas Aceites**, 56(4), 311–316. 2005.
- BELTRÃO, N.E.M., OLIVEIRA, M.I. Oleaginosas Potenciais do Nordeste para a produção de Biodiesel. **Documentos 177**. Campina Grande PB: Embrapa, 54 p. 2007.
- BERTON, L.H.C. Avaliação de populações naturais, estimativas de parâmetros genéticos e seleção de genótipos elite de macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Tese** – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas – SP, 154p. 2013.
- BERTON, L.H.C.; FILHO, J.A.A.; B, SIQUEIRA, W.J.; COLOMBO, C.A.. Seed germination and estimates of genetic parameters of promising macaw palm (*Acrocomia aculeata*) progenies for biofuel production. **Industrial Crops and Products**, 51, 258–266. 2013.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: ed. UFV, 523p. 2013.
- BRITO, A. C. Biologia reprodutiva de macaúba: floração, polinizadores, frutificação e conservação de pólen. **Tese**. Viçosa MG. 2013.
- BRUCKNER, C.H.; SUASSUNA, T.M.F.; REGO, M.M.; NUNES, E.S. Autoincompatibilidade do maracujá implicações no melhoramento genético. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, Planaltina, 315 - 338, 2005.
- BORA, P. S., & ROCHA, R. V. M. Macaíba palm: fatty and amino acids composition of fruits Macaíba. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, 4(3) , 158–162. 2004.
- CARDOSO, A.; LAVIOLA, B.G.; SANTOS, G.S.; SOUSA, H.U.; OLIVEIRA, H.B.; VERAS, L.C.; CIANNELLA, R.; FAVAROA, S.P. Opportunities and

challenges for sustainable production of *A. aculeata* through agroforestry systems. **Industrial Crops & Products**. 107: 573–580. 2017.

CARVALHO, L. P. de; LANZA, M. A.; FALLIERI, J.; SANTOS, J.W. dos. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1149-1155, 2003.

CASTRO NETO, P.; SILVEIRA, S. V. Precipitação provável para Lavras, Região Sul de Minas Gerais, baseada na função de distribuição de probabilidade gama: 1 período mensais. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 5, n. 2, p. 144-151, jul./dez. 1981.

CICONINI G, FAVARO SP, ROSCOE R, MIRANDA CHB, TAPETI CF, MIYAHIRA MAM, BEARARI L, GALVANI F, BORSATO AV, COLNAGO LA, NAKA MH. Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Industrial Crops & Products**. 45:208–214. 2013.

CLASSEN, A.; PETERS, M.K.; FERGER, S.W.; HELBIG-BONITZ, M.; SCHMACK, J.M.; MAASSEN, G.; SCHLEUNING, M.; KALKO, E.K.V.; BOHNING-GAESE, K.; STEFFAN-DEWENTER, I. Complementary ecosystem services provided by pest predators and pollinators increase quantity and quality of coffee yields. *Proceedings The Royal Society publishing*, v.281, 2014.

COIMBRA, M.C., JORGE, N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 679–684. 2012.

COLOMBO, C.A.; BERTON, L.H.C.; DIAZ, B.G.; FERRARI, R.A. Macauba: a promising tropical palm for the production of vegetable oil. **OCL**. 25(1), D108. 2018.

COSER, S.M. Breeding *Acrocomia aculeata* for vegetative, phenological, reproductive and productive traits. **Tese**. Viçosa MG. 2016.

COSTA, A.M. Parâmetros genéticos, diversidade genética e seleção dos acessos de macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Dissertação**. Viçosa MG. 2016.

CRASSWELLER, R. **Pollination requirements for various fruits and nuts**. Disponível em: Acesso: 02 de julho de 2015.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, v.2, 585p. 2003.

CRUZ, C.D., FERREIRA, F.M., PESSONI, L.A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, p.622. 2011.

DOMICIANO, G. P.; ALVES, A. A.; LAVIOLA, B. G.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. Parâmetros genéticos e diversidade em progênies de Macaúba com base em

características morfológicas e fisiológicas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.45, n.9, p.1599-1605, set, 2015.

FEKADU, G.M. Cross-species amplification of microsatellite markers and genetic diversity in the macaw palm (*Acrocomia aculeata*). **Tese**. Viçosa MG. 2015.

FISCH, S.T.V.; JUNIOR, L.R.N.; MANTOVANI, W. Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. Na mata atlântica (Reserva ecológica do Trabiju, Pindamonhangaba – sp). **Revista Biociência**, v.6, n.2, p.31-37, 2000.

FREITAS, I.L. DE J., DO AMARAL JUNIOR, A.T., VIANA, A.P., PENA, G.F., DA SILVA CABRAL, P., VITTORAZZI, C., CONCEIÇÃO SILVA, T.R. Ganho genético avaliado com índices de seleção e com REML/Blup em milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 48, 1464-1471. 2014.

GONÇALVES DB, BATISTA AF, RODRIGUES MQ, NOGUEIRA KM, SANTOS VL. Ethanol production from macaúba (*Acrocomia aculeata*) presscake hemicellulosic 25 hydrolysate by *Candida boidinii* UFMG14. **Bioresource Technology** 146:261– 266. 2013.

GRANJA, M.M.C. Obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas *in vitro* a partir de embriões zigóticos em famílias de *Acrocomia aculeata*. **Tese**. Viçosa MG. 2014.

HERNÁNDEZ, B.C.R., HERNÁNDEZ, J., VERDUSCO, J.E.G.A., FRIER, J.P., MARTÍNEZ, M.A.G. Importância agroecológica del coyol (*Acrocomia mexicana* Karw, ex Mart.). **Est Soc** 21: 97–113. 2013.

HENDERSON, A., GALEANO, G., BERNAL, G. Field Guide to Palm of the Americas. **New Jersey**: Princepton University, p.166-167. 1995.

HUSBAND, B., SCHEMSKE, D. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. **Evolution** 50: 50–74. 1996.

LANES, E. C. M. Variabilidade molecular e sistema de reprodução de macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Tese**. Viçosa, MG, 2014.

LANES, E.C.M, VIANA, J.M.S, PAES, G.P., PAULA, M.F.B, MAIA, C., CAIXETA, E.T., MIRANDA, G.V. Population structure and genetic diversity of maize inbreds derived from tropical hybrids. **Genetics and Molecular Research** 13:7365–7376. 2014.

LANES, E.C.M., MOTOIKE, S.Y., KUKI, K.N., NICK, C., FREITAS, R.D. Molecular characterization and population structure of the macaw palm, *Acrocomia aculeata* (Arecaceae), ex situ germplasm collection using microsatellites markers. **Journal of. Heredity**. 1, 1-11. 2015.

LANES, E.C.M., MOTOIKE, S.Y., KUKI, K.N., RESENDE, M.D.V., CAIXETA, E.T. Mating system and genetic composition of the macaw palm (*Acrocomia*

aculeata): implications for breeding and genetic conservation programs. **Journal of Heredity**. 107, 527–536. 2016.

LAVIOLA, B.G.; ALVES, A.A. Matérias primas oleaginosas para biorrefinarias. In: VAZ Jr, S. (Org.). Biorrefinarias: cenários e perspectivas. Brasília: **Embrapa Agroenergia**, p.29-34. 2011.

LIMA, N.E.; CARVALHO, A.A.; MEEROW, A.W., MANFRINI, M.H. A review of the palm genus *Acrocomia*: Neotropical green gold. **Organisms Diversity & Evolution**. 18:151–161. 2018.

LORENZI, G. M. A. C.. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. – *Arecaceae*: bases para o desenvolvimento sustentável. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná. 2006.

LORENZI, H., NOBLICK, L., KAHN, F., FERREIRA, A. Flora Brasileira: *Arecaceae* (Palmeiras). **Instituto Plantarum**, Nova Odessa. 2010.

LOSADA, J.M; HERRERO, M. Glycoprotein composition along the pistil of *Malus x domestica* and the modulation of pollen tube growth. **BMC Plant Biology**, v.14, n.1, p.1-14, 2014.

MANFIO, C. E. Análise genética no melhoramento da Macaúba. **Tese**. Viçosa, MG, 2010.

MANFIO, C. E.; MOTOIKE, S. Y.; SANTOS, C. E. M.; PIMENTEL, L. D.; QUEIROZ, V.; SATO, A. Y. Repetibilidade em características biométricas do fruto de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.1, p.70-76, jan, 2011.

MANFIO, C. E.; MOTOIKE, S. Y.; RESENDE, M. D. V.; SANTOS, C. E. M.; SATO, A. Y. Avaliação de progênies de *A. aculeata* na fase juvenil e estimativas de parâmetros genéticos e diversidade genética. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 32:63-68, 2012.

MELO, P.G. Produção e caracterização de biodiesel obtidos a partir da oleaginosa macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Dissertação** – UFU, Uberlândia – MG, 80 p. 2012.

MONTOYA, S. G.; MOTOIKE, S. Y.; KUKI, K. N.; OLIVEIRA, C. M.; HONORIO, I. C. G. Registro da presença e danos causados por coleópteros em macaúba. **Pesquisa Florestal Brasileira** (Online), v. 35, p. 159-162, 2015.

MORCOTE-RIOS, G.; BERNAL, R. Remains of palms (*Palmae*) at archaeological sites in the New World: a review. **The Botanical Review**, 67: 309-350. 2001.

MOREIRA, P.Q. Polinização e vingamento de ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.) avaliação da colocação sequencial de colmeias e de um bioestimulante. **Dissertação**. Lisboa, 69f. 2008.

MOTTA, P.E.F., CURI, N., OLIVEIRA-FILHO, A.T., GOMES, J.B.V. Ocorrência da Macaúba em Minas Gerais: Relação com Atributos Climáticos, Pedológicos e Vegetacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37:1023-1031. 2002.

MOTOIKE, S.; KUKI, K. The potential of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) as source of biodiesel in Brazil. **International Review of Chemical Engineering** 1: 632-635. 2009.

MOTOIKE, S.Y., CARVALHO, M.C., PIMENTEL, L.D., KUKI, K.N., PAES, J.M.V., DIAS, H.C.T., SATO, A.Y. A cultura da macaúba: implantação e manejo de cultivos racionais. **Editora UFV**, Viçosa-MG 61 p. 2013.

NASCIMENTO, H.R. Viabilidade polínica e polinização controlada em macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Dissertação**. Viçosa MG. 2015.

NASCIMENTO, W. M. O. do; GURGEL, F. de L.; BHERING, L. L.; RIBEIRO, O. D. Pré-melhoramento do camucamuzeiro: estudo de parâmetros genéticos e dissimilaridade. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n.4, p. 538-543, 2014.

NAVARRO-DIAZ, H.J., GONZALEZ, S.L., IRIGARAY, B., VIEITEZ, I., JACHMANIAN, I., HENSE, H., OLIVEIRA, J.V. Macauba oil as an alternative feedstock for biodiesel: characterization and ester conversion by the supercritical method. **J. Supercrit. Fluids Amst.** 93, 130–137. 2014.

NUCCI, S.M., AZEVEDO-FILHO, J.A., COLOMBO, C.A., PRIOLLI, R.H.G., COELHO, R.M., MATA, T.L., ZUCCHI, M.I. Development and characterization of microsatellites markers from the macaw. **Molecular Ecology**. 8:224–226. 2008.

PADILHA, J.H.D.; RIBAS, L.L.F.; AMANO, E.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq. (Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. **Acta Botanica brasilica**. Pg. 516-523. 2015.

PIRES, T.P. Diversidade genética, fisiológica e anatômica em populações de macaúba provenientes de diferentes biomas. **Tese**. Viçosa MG. 2017.

PIRES, T.P., SOUZA, E.S., KUKI, K.N., MOTOIKE, S.Y. Ecophysiological traits of the macaw palm: A contribution towards the domestication of a novel crop. **Industrial Crops and Products** 44:200-210. 2013.

PLATH, M.; MOSER, C.; BAILIS, R.; BRANDT, P.; HIRSCH, H.; KLEIN, A. M.; WALMSLEY, D.; WEHRDEN, H. A novel bioenergy feedstock in Latin America? Cultivation potential of *Acrocomia aculeata* under current and future climate conditions. **Biomass and Bioenergy**, 91: 186-195. 2016.

RAMOS, S. R. R.; QUEIROZ, M. A. Caracterização morfológica: experiência do BAG de Cucurbitáceas da Embrapa Semi-Árido, com acessos de abóbora e moranga. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 9-12, 1999.

RATTER, J. A., BRIDGEWATER, S., & RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, 60, 57-109.2003.

RIOS, R. D. F.; FONSECA, R. M.; CREN, E. C.; ANDRADE, M. H. C. Adsorção de fenol no carvão ativado produzido a partir do endocarpo do fruto da macaúba. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, **Engineering Proceedings**, 1: 8524-8531. 2015.

REIF, J.C.; HAMRIT, S.; SCHIPPRACK, M.H.W.; BOHN, H.P.M.M.; MELCHINGER, A.E. Genetic structure and diversity of European flint maize populations determined with SSR analyses of individuals and bulks. **Theoretical and Applied Genetic**, 111: 906–913. 2005.

Relatório de atividade da instituição pública nacional de pesquisa fiel depositária de amostra de componente do patrimônio genético - Palmeira macaúba (BAG – Macaúba). V **Relatório Anual**. Credencial nº084/2013 SECEX/CGEN. Universidade Federal de Viçosa. 2018.

ROSCOE, R., RICHETTI, A., MARANHO, E., 2007. Análise de viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul. **RPA**. 1, 48-59. 2007.

RUEDA, R.A.P. Avaliação de germoplasma para melhoramento e a conservação da macaúba. **Tese**. Viçosa, MG, 2014.

SCARIOT, A.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. **Biotropica**, p. 168-173, 1991.

SILVA, H. T. Descritores mínimos indicados para caracterizar cultivares/ variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 32p., 2005.

SILVA, J.C. **Macaúba: Fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial**. UFV, Viçosa, MG 63 p. 2007.

SILVA, J.C., BARRICHELO, L.E.G., BRITO, J.O. Endocarpos de babaçu e macaúba comparados a madeira de *Eucalyptus grandis* para a produção de carvão vegetal. **IPEF**. 34:31–34. 1986.

SILVA, S.O.; CARVALHO, P.C.L.; SHEPHERD, K.; ALVES, E.J.; OLIVEIRA, C.A.P.; CARVALHO, J. A. B. S. **Catálogo de germoplasma de bananeira (*Musa spp.*)**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 152 p. (Documentos, 90). 1999.

SIMIQUÉLI, G.F.; RESENDE, M.D.V.; MOTOIKE, S.Y.; HENRIQUES, E. Inbreeding depression as a cause of fruit abortion in structured populations of macaw palm (*Acrocomia aculeata*): Implications for breeding programs. **Industrial Crops & Products** 112. 652–659. 2018.

TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C.; PEDROZO, C.A.; PEREIRA, A.V. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Revista Acta Scientia Biologica**, v.28, n.1, p.7-12, 2006.

TEIXEIRA, L.C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe agropecuário**, v.26, p.18-27, 2005.

TRENTINI, C.P., OLIVEIRA, D.M., ZANETTE, C.M., DA SILVA, C. Low-pressure solvent extraction of oil from macauba (*Acrocomia aculeata*) pulp: characterization of oil and defatted meal. **Ciência Rural** 46, 725–731. 2016.

VIEIRA, S.S., MAGRIOTS, Z.M., SANTOS, N.A.V., CARDOSO, M.G., SACZK, A.A. Macauba palm (*Acrocomia aculeata*) cake from biodiesel processing: An efficient and low cost substrate for the adsorption of dyes. **Chemical Engineering Journal** 183:152–16. 2012.

WILCOCK, C., NEILAND, R. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. **Trends in Plant Science** 7:270–277. 2002.

CAPÍTULO 1

Caracterização de F₁ obtidos de hibridações entre plantas de macaúba de procedências distintas

Resumo - A macaúba se distingui com características fenotípicas dependendo de sua procedência, sugerindo a existência de *pools* gênicos. Essa diversidade pode ser explorada por meio de hibridações para obtenção de híbridos F₁ com variabilidade e características desejáveis ao melhoramento da espécie. A caracterização de híbridos é essencial em programas de melhoramento genético para etapa de seleção e orientação de novos cruzamentos. A macaúba, em processo de domesticação, está em início da fase de hibridações no programa de melhoramento genético no Banco Ativo de Germoplasma, BAG-Macaúba/UFV. A caracterização, usando dados morfológicos e moleculares de progênies provenientes de populações naturais e de híbridos F₁ são incipientes para essa espécie. No entanto, essas informações impulsionam a importância desta pesquisa na área de melhoramento genético. Com intuito de fornecer subsídio ao programa, foi realizada a caracterização dos híbridos de macaúba oriundos de plantas de procedências distintas. Este estudo pioneiro objetivou caracterizar híbridos (F₁), por meio de marcadores moleculares e caracteres morfoagronômicos, obtidos de cruzamentos entre genótipos de procedências de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo, presentes no BAG - Macaúba/UFV. A certificação de cruzamento, identificação do genitor masculino e análise da diversidade genética foram realizados com base em marcadores microsatélites SSR, mediante análise da genotipagem, do teste de exclusão do genitor masculino e do dendograma gerado através de método de agrupamento UPGMA. Os F₁ foram submetidos as avaliações de: velocidade de surgimento da plúmula e da primeira folha, tamanho e quantidade de folhas, caracterização da plúmula e espinho, na fase de plântula à muda. As médias para as características avaliadas foram submetidas a técnica exploratória multivariada de agrupamento, utilizando o método UGPMA. Observou-se que todos os F₁ são provenientes de hibridações. A análise com base em dados moleculares agrupou os híbridos e os genitores quanto as procedências e os tipos de cruzamento. Em relação as características morfoagronômicas, os F₁ apresentaram alta variabilidade e foram discriminados em sete classes, que se diferiram quanto ao desenvolvimento, coloração da plúmula, presença e quantidade de espinhos. Houve diversidade genética nos híbridos F₁, entre meio irmãos e

germanos. As progênies A12, A7 e A18 dos BGP105-P1/MS e BGP27/MG se destacaram com potencial para serem selecionadas para novas gerações com desenvolvimento normal e baixa presença de espinhos. Tais resultados favorecem a seleção de indivíduos e orientação de hibridações para o programa de melhoramento da espécie. Este trabalho se caracteriza como estudo preliminar, sendo essencial a continuidade do mesmo e aumento da população efetiva para avaliações de parâmetros genéticos.

Palavras-chaves: cruzamento, diversidade, marcadores moleculares.

Characterization of F₁ obtained from hybrid among macaw plants of different procedures

Abstract – The macaw was distinguished with phenotypic ones depending on its origin, suggesting a existence of gene *pools*. This diversity can be exploited to generate vibrations for the choice of F₁ with variability and desirable characteristics for breeding of the species. The characterization of hybrids is essential in better genetic programs for the first stage and the orientation of new crosses. The macaw, in process of domestication, is at the beginning of the hybridization phase in the breeding program at the Germoplasma Bank, BAG-Macaúba/UFV. The characterization, using morphological and molecular data of progenies from natural and hybrid F₁ populations are incipient for this species. However, this information is driven by research in the area of breeding. In order to provide subsidies to the program, a characterization of the macaw's hybrids from plants of different origins was carried out. The objective of this study was to characterize the F₁ hybrids, through their molecular and morphogronomic characteristics, obtained from genetic crosses from. Crossbreeding certification, male parent identification and genetic diversity analysis were performed based on SSR derived microsatellites, through analysis of genotyping, exclusion of the male genitor and the dendogram using the UPGMA clustering method. The F₁ were evaluated with: growth of plain and first leaf, size and number of leaves, characterization of plumule and thorn, in the seedlings phase. The means for the units were submitted to the exploratory multivariate grouping technique, using the UGPMA method. It has been observed that all F₁ are from hybridizations. Data analysis was developed and shared with the parents as to the provenances and the types of crossing. Regarding the morphoagronomic characteristics, the F₁ were highly varied and were discriminated in seven classes, which differed in relation to development, staining of the presence, presence and quantity of spines. There are genetic diversity an F₁ hybrids, between half brothers and germans. The A12, A7 and A18 are progenies of BGP105-P1/MS and BGP27/MG were highlighted as potential for new generations with normal development and low presence of spines. These results favor the selection of individuals and hybridization guidelines for the species breeding program. This work presents as a preliminary study, being essential the continuity of the same and increase of the population for evaluations of genetic parameters.

Key-words: variability, crossing, molecular markers.

1. Introdução

A palmeira oleaginosa macaúba se assemelha a espécie oleífera mais produtiva, a palma de óleo (*Elais guinensis*), devido seu potencial em produtividade e qualidade de óleo (Motoike and Kuki; 2009; Pires et al, 2012; MAPA, 2015). A palmeira macaúba possui importância pelo potencial produtivo de óleo, exploração por pequenos produtores e pela característica de se adaptar a condições edafoclimáticas adversas (Motoike & Kuki, 2009; Abreu et al., 2011). Essas características fazem da macaúba uma alternativa de produção de óleo em regiões de clima subtropical e/ou savânico, atendendo assim a demanda nestas regiões. Estima-se que a produção da macaúba possa atingir até seis toneladas de óleo ha⁻¹ (Motoike et al., 2013; Navarro-Diaz et al., 2014). O óleo do fruto da macaúba tem duas origens distintas: o do mesocarpo, com alto teor de ácido oleico, e o da amêndoa, onde predomina o ácido linoleico (Berton et al., 2014; Lorenzi, 2006; Teixeira, 2005). Ambos com emprego nos setores alimentícios, fármaco-cosméticos e de biodiesel (Belen-Camacho et al. 2005; Hernandez et al. 2007).

A macaúba é uma palmeira nativa de maior dispersão no território nacional, ocupando uma área de 11,6 milhões de hectares (Plath *et al.*, 2016; Melo, 2012). As populações nativas se encontram principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (Ratter et al., 2003). Esta ampla dispersão da macaúba, povoando regiões com condições edafoclimáticas por vezes contrastantes, ocasionou variações morfológicas dentro da espécie (Ciconini et al., 2013). Esta diversidade morfológica está representada na coleção do Banco Ativo de Germoplasma de Macaúba (BAG - Macaúba/UFV) da Universidade Federal de Viçosa por famílias maternas provenientes de várias regiões brasileiras e foi comprovada pelo estudo de Rueda (2014).

Em processo de domesticação, a instalação e a manutenção da diversidade no BAG - Macaúba/UFV foi a primeira etapa para dar suporte ao programa de melhoramento e de conservação genética da palmeira (Lanes, 2014). Até o momento, foram obtidos avanços substanciais na caracterização fenotípica (fases juvenil e reprodutiva) dos acessos, no entanto o programa de melhoramento da macaúba ainda carece de estudos referentes a obtenção e a caracterização de híbridos. Estudos de avaliação da variabilidade e herdabilidade existente entre os acessos do BAG - Macaúba/UFV, demonstrou a presença de diversidade genética em relação ao caráter

produção de óleo, aplicável à seleção de genitores elites (Costa et al., 2018). Por meio de cruzamentos direcionados de genitores contrastantes é possível aprimorar as características agronomicamente desejáveis para o manejo da cultura e obtenção de híbridos de macaúba com alta produtividade.

Nos processos de hibridação é desejável a certificação de cruzamento e autofecundação por meio de marcadores moleculares. O uso dos marcadores para estes fins é uma metodologia confiável e rápida, por meio de informações precisas ao nível de DNA (Ferrão et al., 2015). Esta técnica permite a confirmação dos genitores dos supostos híbridos e autofecundações em estágios iniciais de desenvolvimento, assim como apontar a existência de genitores masculinos não identificados (Faleiro et al., 2003, Grattapaglia et al., 2004). Além disso, os marcadores moleculares são de grande utilidade para o melhoramento genético, pois auxiliam em diversos estudos, como na diversidade genética e direcionamento de cruzamentos (Missio et al., 2011). O conhecimento da diversidade genética permite observar os genótipos mais contrastantes e promissores para as características desejáveis e pode prever combinações híbridas de maior heterozigose e efeito heterótico (Carvalho et al., 2003; Cruz e Carneiro, 2003; Reif et al., 2005). A caracterização fenotípica de híbridos oriundos de genótipos contrastantes é essencial para impulsionar a fase de seleção do programa de melhoramento, auxiliando na variabilidade genética e na seleção orientada da espécie.

A obtenção de híbridos provenientes de cruzamentos entre acessos elites e de procedências distintas é essencial para impulsionar o programa de melhoramento da macaúba. Isto proporcionará aumento da variabilidade nas gerações de híbridos, resultando na caracterização e na seleção orientada do programa. Porém, ainda são incipientes estudos relacionados a diversidade genética e caracterização de híbridos de macaúba.

Neste contexto, este estudo pioneiro teve como intuito avaliar e caracterizar híbridos F₁ obtidos de cruzamentos dirigidos entre plantas de macaúba de diversas procedências, por meio de marcadores moleculares e caracteres morfoagronômicas na fase juvenil.

2. Material e Métodos

2.1 Hibridações entre acessos de Macaúba

No BAG foram realizados cruzamentos direcionados conforme metodologia geral (vide Metodologia geral - Figura 3).

Os cruzamentos realizados foram entre: (1) acessos BGP8-P4 e BGP105-P1 como genitores femininos, e os acessos BGP27, BGP31, BGP36-P1, BGP64-P9, BGP70-P7 e BGP74-P1, possíveis genitores masculinos; (2) BGP50-P8, genitor feminino e BGP115, plantas P1, P2 e P3, como possíveis genitor masculino; (3) BGP47, plantas P1, P2 e P3, possíveis autofecundações (Figura 1 e Tabela 1). As sementes, potenciais F₁, oriundas dos cruzamentos-ensaios, foram germinadas de acordo com o protocolo estabelecido por Motoike et al. (2007). As sementes pré-germinadas, foram semeadas em tubetes com substrato comercial e mantidas em casa de vegetação com controle de umidade e temperatura até o transplântio das mudas.

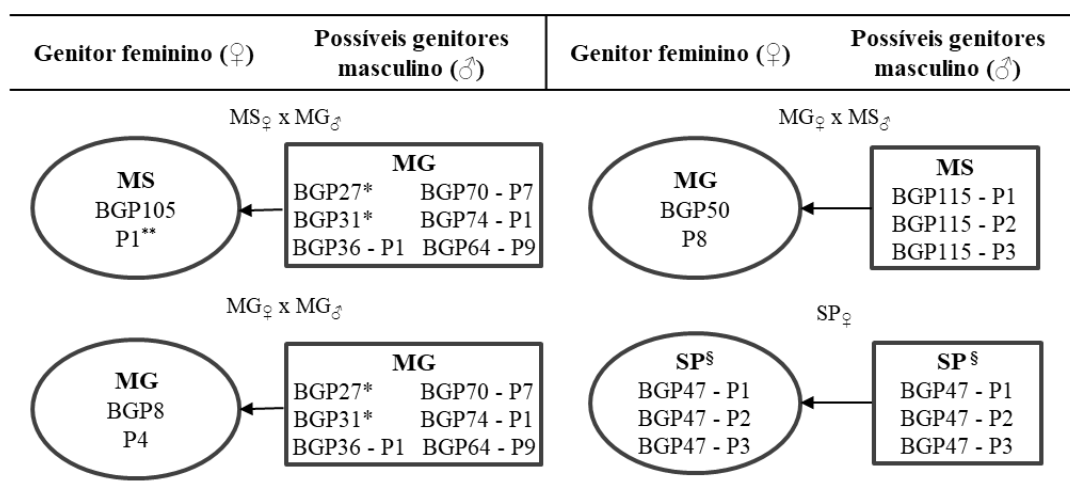


Figura 1. Cruzamentos entre os genitores e suas respectivas procedências.

*Acessos situados em área de bordadura no BAG - Macaúba/UFV. **Número da planta referente ao acesso BGP. § Sementes provenientes de possíveis autofecundações.

2.2 Extração de DNA e análise de microssatélites SSR para certificação dos cruzamentos

Para a certificação de cruzamento e identificação do genitor masculino, foi extraído o DNA de cada potencial híbrido F₁ e dos genitores potenciais. Amostras foliares foram coletadas, acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal do Departamento de Fitotecnia da UFV. Posteriormente, o DNA genômico foi extraído com brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), conforme protocolo modificado por Lanes et al. (2013), quantificados pelo espectrofotômetro (260 e 280 nm)

utilizando o equipamento Multiskan e diluídas para concentração de 10ng ml⁻¹.

Tabela 1. Acessos e suas referentes procedências, utilizados como genitores nos cruzamentos entre plantas de macaúba para obtenção de F₁.

Genitores*	Origem	Latitude	Longitude
BGP8	Minas Gerais (MG)	S 20°38'57''	W 44°18'5''
BGP27	Minas Gerais (MG)	S 19°56'28''	W 45°41'34''
BGP31	Minas Gerais (MG)	S 18°19'48''	W 45°6'28''
BGP36	Minas Gerais (MG)	ND**	ND**
BGP47	São Paulo (SP)	S 22°29'13''	W 50°46'20''
BGP50	Minas Gerais (MG)	S 19°10'7''	W 45°29'25''
BGP64	Minas Gerais (MG)	S 19°31'15''	W 46°31'45''
BGP70	Minas Gerais (MG)	S 21°8'54''	W 44°14'31''
BGP74	Minas Gerais (MG)	S 17°57'39''	W 45°42'11''
BGP105	Mato Grosso do Sul (MS)	S 21°28'42''	W 55° 61'03''
BGP115	Mato Grosso do Sul (MS)	S 20°53'05''	W 55°51'50''

*Acessos BGP do BAG - Macaúba/UFV. **Sem identificação das coordenadas geográficas.

As amostras foram amplificadas utilizando o método PCR (reação em cadeia de polimerase) em termociclador com marcadores moleculares microsátélites (SSR) (Tabela 2). O volume final de cada reação foi de 20 µl, contendo 60 ng de DNA genômico, tampão de reação 1x, 1mM de MgCl₂, 0,1mM de cada dNTPs, 10uM de cada primer (*forward* e *reverse*) e 1U de Taq DNA polimerase. O termociclador foi programado para desnaturação de 94°C por 5 min; 10 ciclos de *touchdown* de 94°C por 40 seg, 56°C por 40 seg (diminuindo 0,3 °C em cada ciclo) e 72°C por 0,40 min; 30 ciclos de desnaturação de 94°C por 40 seg, temperatura de anelamento do *primer* específico (Tabela 2) por 40 seg e 72°C por 40 seg; e extensão final de 72°C por 15 min. Posteriormente, o material foi desnaturado em solução de azul de bromofenol e separado por eletroforese vertical em gel desnaturante de poli(acrilamida) (6,0%, w/v) e corado em solução de prata.

Os marcadores moleculares microsátélites foram analisados quanto à presença de bandas geradas pelos diferentes *primers*. Os dados moleculares foram submetidos ao teste de exclusão de genitores masculinos, e agrupados em dendograma por meio da análise de agrupamento utilizando o método da ligação média entre os grupos - UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), com base na distância euclidiana média, ambos utilizando-se o software Genes.

Tabela 2. Lista de primer SSR usados para amplificar locus de microssatélites de macaúba.

Locus*	Foward and Reserve Primer Sequência (5'-3')	Pares de bases	T_m (°C)**
Aacu12 (3)	F: GAATGTGCGTGCTCAAAATG R: AATGCCAAGTGACCAAGTCC	190–202	54
Aacu26 (4)	F: ACTTGCAGCCCCATATTCAG R: CAGGAACAGAGGCAAGTTC	273–316	54
Aacu45 (7)	F: CAGACTACCAGGCTTCCAGC R: TCATCATCGCAGCTTGACTC	260–284	54
Aacu74 (8)	F: TACTGTTGTGCCAAGTCCCA R: GAGCACAAGGGGGATATCAA	278–313	55
Aac04 (9)	F: GCATTGTCATCTGCAACCAC R: GCAGGGGCCATAAGTCATAA	258–306	55
Aac12 (10)	F: GCTCTGTAATCTCGGCTTCCT R: TCCAGTTCAAGCTCTCTCAGC	229–247	54

*Primer utilizados com bases em estudos realizados, em macaúba, por Lanés (2014) e Fekadu (2015). **Temperatura média ideal para cada primer.

2.3. Avaliações morfoagronômicas

Da fase de plântula à muda de macaúba foi monitorado o intervalo de dias do plantio à emergência da plúmula, bem como sua coloração, e a emissão da primeira folha. Após 60 dias do plantio, as mudas foram transplantadas para sacos de polietileno (seis litros) com substrato e adubação conforme Pimentel et al. (2016) e mantidas em casa de vegetação. A avaliação do desenvolvimento das plantas foi realizada mensalmente por seis meses, por meio de medições do número e tamanho de folhas por plantas, e avaliação da característica morfológica quanto ao local de presença e quantidade de espinhos. Os dados referentes à quantidade de espinhos foram ajustados em uma escala de 0 a 5, que correspondem a: 0 – ausência; 1 – pouco; 2 – pouco à moderado; 3 – moderado; 4 - moderado a muito; 5 – muito (indivíduo com maior quantidade de espinhos em comparação aos demais).

Após o final da coleta de dados estes foram tabulados e submetidos à análise de variância pelo teste F, comparadas pelo teste de médias, ao nível de 5% de probabilidade e análise de agrupamento utilizando o método da ligação média entre os grupos - UPGMA, com base na distância euclidiana média, utilizando-se o software Genes.

3. Resultados

Por meio dos marcadores moleculares, as progênies foram consideradas híbridos e identificado o genitor masculino dos cruzamentos realizados. Os híbridos F₁ apresentaram variabilidade com base em dados moleculares e morfoagronômicos na fase juvenil. Os indivíduos se caracterizaram em grupos distintos quanto a diversidade. Tais resultados indicam diversidade ocasionada por meio de hibridações.

Os grupos de cruzamentos com genitores femininos: (1) MS / BGP105-P1 tiveram 25 híbridos e foi usado a nomenclatura A1 a A25 para estes descendentes; (2) MG / BGP50-P8 tiveram quatro plantas e nomenclatura B26 a B29; (3) MG / BGP8-P4, um descendente nomeado C30; (4) SP / BGP47, apresentaram três plantas e nomenclatura D31 a D33.

3.1 Certificação de cruzamento e identificação dos genitores masculinos mediante genotipagem e teste de exclusão

Diante do teste de certificação de cruzamentos, as genotipagens das progênies que apresentaram as marcas dos genitores feminino e masculino foram consideradas híbridos. Os indivíduos com ausência das marcas dos possíveis genitores masculinos foram considerados híbridos com inserção de alelos de outra população (Tabela 3).

Os indivíduos referentes aos cruzamentos entre as procedências MG e MS são frutos de hibridações, como observa-se nas bandas das amplificações dos *primers* Aacu45 e Aac 12, exemplificados na Figura 2. A identificação dos genitores das progênies foi mediante a genotipagem, complementada pelo teste de exclusão de genitores, apresentada na Tabela 3 e 4.

Conforme Tabela 3, os indivíduos A1, A3, A4, A6, A7, A10, A13, A14, A17, A18 e A25 são irmãos completos descendentes da hibridação entre BGP105-P1 e BGP27; e o A19 descendente do BGP105-P1 e BGP74-P1. O teste de exclusão ressalta a não exclusão dos genitores: BGP27 para os genótipos 33 e 34 pelos *primers* Aac04 e Aac12 para tais indivíduos; e o acesso BGP74-P1 para os genótipos 24 e 44 pelo *primers* Aac 12 (Tabela 4). Os indivíduos B26 e D30 são provenientes dos genitores femininos BGP50-P8 e BGP8-P4, e dos genitores masculinos BGP27 e BGP115 – P2, respectivamente (Tabela 3). De acordo com o teste de exclusão, o D30 e BGP27 possui as mesmas bandas de amplificações de todos os *primer* em questão;

e confirma a não eliminação do BGP115-P2 para o genótipo com alelos 34 referentes ao *primer* Aac04.

Tabela 3. Certificação de cruzamento, autofecundação e identificação dos progenitores dos híbridos F₁ de interesse para melhoramento genético da macaúba, utilizando marcadores SSR.

Procedência	Genitores		Indivíduos F ₁	Certificação dos cruzamentos	
	Feminino	Procedência Masculino			
MS	BGP105 P1	MG	BGP27	A1	X
		-	*	A2	X
		MG	BGP27	A3	X
		MG	BGP27	A4	X
		-	*	A5	X
		MG	BGP27	A6	X
		MG	BGP27	A7	X
		-	*	A8	X
		-	*	A9	X
		MG	BGP27	A10	X
		-	*	A11	X
		-	*	A12	X
		MG	BGP27	A13	X
		MG	BGP27	A14	X
		-	*	A15	X
		-	*	A16	X
		MG	BGP27	A17	X
		MG	BGP27	A18	X
		MG	BGP74 -P1	A19	X
		-	*	A20	X
		-	*	A21	X
		-	*	A22	X
		-	*	A23	X
		-	*	A24	X
		-	*	A25	X
MG	BGP50 P8	MS	BGP115-P2	B26	X
		-	*	B27 ¹	X§
		-	*	B28	X
		-	*	B29	X
MG	BGP8-P4	MG	BGP27	C30	X
SP	BGP47-P1 BGP47-P3 §	-	*	D31	X
		-	*	D32	X
		-	*	D33 ¹	X§

* Possui alelos de genitores masculinos não identificados. §Possui alelos de genitores não identificados. ¹ Indivíduos B27 e D33 foram retirados das amostras por não identificação de nenhum genitor.

Tabela 4. Certificação dos genitores masculinos por meio de teste de exclusão, baseado em *primers* SSR para certificação de cruzamentos entre plantas de macaúbas de procedências distintas.

F ₁	Procedência/Genótipo		Primer SSR	Loco		Genótipo		Exclusão	X ²	Prob.
	Feminino	Masculino		♀	♂	Esperado	Observado			
C30	MG / BGP8P4	MG / BGP36P1	Aacu12	12	12	11 12 22	14	*		
			Aacu26	66	66	66	66			
			Aacu45	24	34	23 24 34 44	22	*		
			Aacu74	44	14	14 44	44		1	0.32ns
			Aac04	24	23	22 23 24 34	24		3	0.39ns
		Aac12	44	44	44	44				
		MG / BGP31	Aacu12	12	44	14 24	14		1	0.32ns
			Aacu26	66	55	56	66	*		
			Aacu45	24	44	24 44	22	*		
			Aacu74	44	24	24 44	44		1	0.32ns
			Aac04	24	34	23 24 34 44	24		3	0.39ns
		Aac12	44	44	44	44				
		MG / BGP64P9	Aacu12	12	46	14 16 24 26	14		3	0.39ns
			Aacu26	66	26	26 66	66		1	0.32ns
			Aacu45	24	33	23 34	22	*		
			Aacu74	44	24	24 44	44		1	0.32ns
			Aac04	24	33	23 34	24	*		
		Aac12	44	44	44	44				
		MG / BGP70P7	Aacu12	12	14	11 12 14 24	14		3	0.39ns
			Aacu26	66	66	66	66			
Aacu45	24		22	22 24	22		1	0.32ns		
Aacu74	44		14	14 44	44		1	0.32ns		
Aac04	24		44	24 44	24		1	0.32ns		
Aac12	44	33	34	44	*					
MG / BGP27	Aacu12	12	46	14 16 24 26	14		3	0.39ns		
	Aacu26	66	26	26 66	66		1	0.32ns		
	Aacu45	24	12	12 14 22 24	22		3	0.39ns		
	Aacu74	44	44	44	44					
	Aac04	24	34	23 24 34 44	24		3	0.39ns		
Aac12	44	44	44	44						
MG / BGP74P1	Aacu12	12	44	14 24	14		1	0.32ns		
	Aacu26	66	22	26	66	*				
	Aacu45	24	22	22 24	22		1	0.32ns		
	Aacu74	44	44	44	44					
	Aac04	24	33	23 34	24	*				
Aac12	44	44	44	44						
A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23 A24 A25	MG / BGP105P1	MG / BGP36P1	Aacu12	34	12	13 14 23 24	22 23 24 26 34 35 45 56	*		
			Aacu26	34	66	36 46	23 36 44 46	*		
			Aacu45	33	34	33 34	23 33 44	*		
			Aacu74	44	14	14 44	14 44	*	1.81	0.18ns
			Aac04	33	23	23 33	33 34	*		
		Aac12	24	44	24 44	24 44		0.33	0.56ns	
		MG / BGP31	Aacu12	34	44	34 44	22 23 24 26 34 35 45 56	*		
			Aacu26	34	55	35 45	23 36 44 46	*		
			Aacu45	33	44	34	23 33 44	*		
			Aacu74	44	24	24 44	14 44	*		
			Aac04	33	34	33 34	33 34		19.59	0.0**
		Aac12	24	44	24 44	24 44		0.33	0.56ns	
		MG / BGP64P9	Aacu12	34	46	34 36 44 46	22 23 24 26 34 35 45 56	*		
			Aacu26	34	26	23 24 36 46	23 36 44 46	*		
			Aacu45	33	33	33	23 33 44	*		
			Aacu74	44	24	24 44	14 44	*		
			Aac04	33	33	33	33 34	*		
		Aac12	24	44	24 44	24 44		0.33	0.56ns	
		MG / BGP70P7	Aacu12	34	14	13 14 34 44	22 23 24 26 34 35 45 56	*		
			Aacu26	34	66	36 46	23 36 44 46	*		
			Aacu45	33	22	23	23 33 44	*		
			Aacu74	44	14	14 44	14 44	*	1.81	0.18ns
			Aac04	33	44	34	33 34	*		
		Aac12	24	33	23 34	24 44	*			
		MG / BGP27	Aacu12	34	46	34 36 44 46	22 23 24 26 34 35 45 56	*		
Aacu26	34		26	23 24 36 46	23 36 44 46	*				
Aacu45	33		12	13 23	23 33 44	*				
Aacu74	44		44	44	14 44	*				
Aac04	33		34	33 34	33 34		19.59	0.0**		
Aac12	24	44	24 44	24 44		0.33	0.56ns			
MG / BGP74P1	Aacu12	34	44	34 44	22 23 24 26 34 35 45 56	*				
	Aacu26	34	22	23 24	23 36 44 46	*				
	Aacu45	33	22	23	23 33 44	*				
	Aacu74	44	44	44	14 44	*				
	Aac04	33	33	33	33 34	*				

			Aac12	24	44	24	44	24	44		0.33	0.56ns	
			Aacu12	55	24	25	45	25	57	68	*		
			Aacu26	23	13	12	13	23	33	12	22	23	
		MS /	Aacu45	22	55	25		25	35		*		
		BGP115P1	Aacu74	14	22	12	24	12	22	34	*		
			Aac04	34	44	34	44	34			5	0.03*	
			Aac12	33	11	13		11			*		
B26			Aacu12	55	25	25	55	25	57	68	*		
B27	MG /	MS /	Aacu26	23	23	22	23	33	12	22	23	*	
B28	BGP50P8	BGP115P2	Aacu45	22	55	25		25	35		*		
B29			Aacu74	14	33	13	34	12	22	34	*		
			Aac04	34	34	33	34	44	34		5	0.08ns	
			Aac12	33	11	13		11			*		
			Aacu12	55	16	15	56	25	57	68	*		
			Aacu26	23	23	22	23	33	12	22	23	*	
		MS /	Aacu45	22	33	23		25	35		*		
		BGP115P3	Aacu74	14	45	14	15	44	45	12	22	34	
			Aac04	34	13	13	14	33	34	34		15	0.0**
			Aac12	33	11	13		11			*		

*Exclusão do acesso como genitor masculino dos indivíduos F₁.

Indivíduos F₁ meios irmãos também foram obtidos: A2, A5, A8, A9, A11, A12, A15, A16 e A20 a A24 oriundos do cruzamento entre BGP115 e genitor masculino com alelo de outra população; e B28 e B29 também oriundo de cruzamento com genitor masculino com alelo de outra população e BGP50-P8. Diante do teste de exclusão, os possíveis genitores masculinos dos indivíduos F₁ provenientes da planta genitora BGP50-P8, foram excluídos da paternidade por pelo menos um primer para a maioria dos genótipos.

Na análise molecular observou-se que nas plantas de SP autopolinizadas não geraram indivíduos provenientes de autofecundação como se esperava, e sim produtos de cruzamento com outros indivíduos (Figura 3 e Tabela 3). Os indivíduos D31 e D32 apresentaram as marcas dos genitores femininos do acesso BGP47 – planta P1 e P3 - em todos os *primers*. Porém, a genotipagem utilizando os *primers* Aacu 26, Aacu 74, Aac 12 confirmaram alelos provenientes de outros genitores masculinos (Figura 3).

O indivíduo D33 não apresentou bandas do genitor feminino BGP47, utilizando o *primer* Aac04, indicando ser proveniente de cruzamento de outros genitores do BAG. O mesmo ocorreu com o B27 proveniente de outra hibridação sem identificação de ambos genitores (Tabela 3). Contudo, os indivíduos B27 e D33 foram retirados das amostras por não identificação de nenhum genitor.

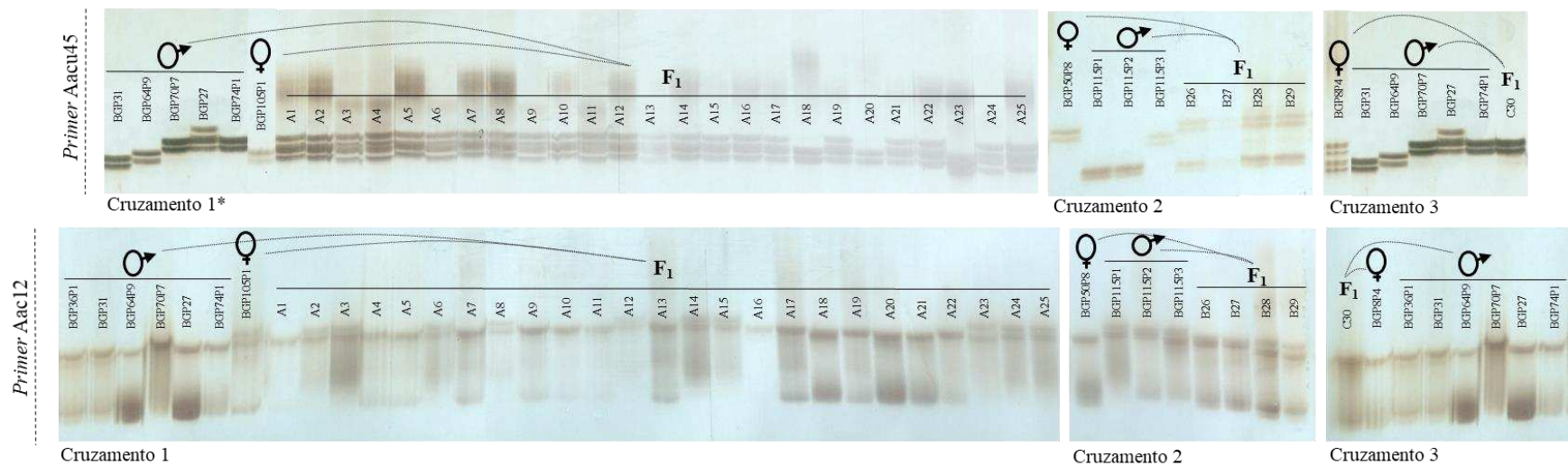


Figura 2. Bandas dos genitores femininos dos acessos BGP8-P4, BGP105-P1 e BGP50-P8, respectivamente, das procedências MG, MS e MG. Bandas dos genitores masculinos dos acessos BGP31, BGP36-P1, BGP27, BGP64-P9, BGP70-P7 e BGP74-P1 de procedências de MG e BGP115-P1, P2 e P3, de MS. Bandas dos indivíduos F₁ – A1 ao A25; B26 ao B29; C30 – oriundos dos cruzamentos. Bandas obtidas da amplificação utilizando *primer* Aacu 45 e Aac 12.

*Cruzamentos 1: genitor feminino BGP105-P1, possíveis genitores masculinos BGP31, BGP36-P1, BGP27, BGP64-P9, BGP70-P7 e BGP74-P1 e seus F₁, A1 a A25. Cruzamento 2: genitor feminino BGP50-P8, possíveis genitores masculinos BGP115P1, BGP115-P2 e BGP115-P3, e seus F₁, B26 a B29. Cruzamento 3: genitor feminino BGP8P4, possíveis genitores masculinos BGP31, BGP36-P1, BGP27, BGP64-P9, BGP70-P7 e BGP74-P1, e seu F₁, C30.

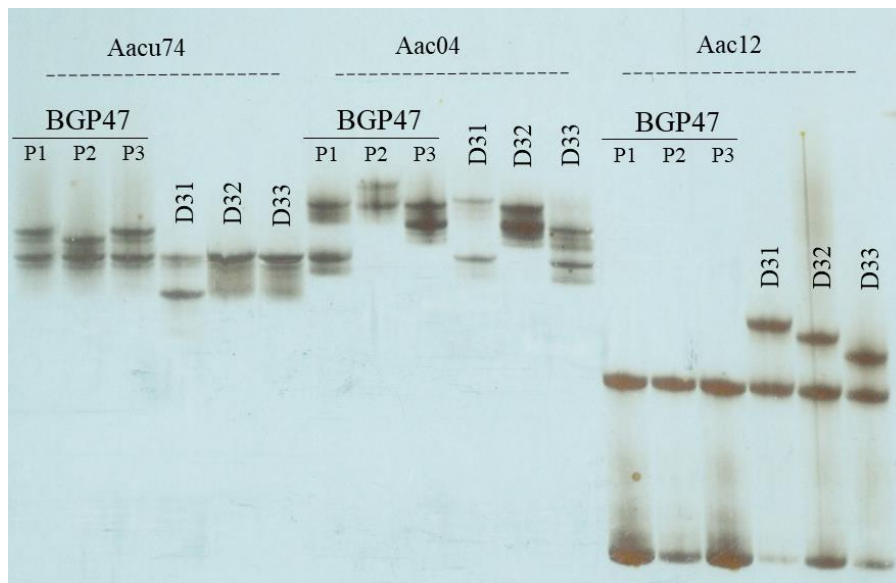


Figura 3. Bandas dos genitores de procedência de SP (BGP47 – plantas P1, P2 e P3) e indivíduos D31, D32 e D33. Bandas obtidas da amplificação utilizando *primer* Aacu 74, Aac04 e Aac12 mostrando que não houve autofecundação.

3.2 Caracterização com base em dados moleculares

A genotipagem dos indivíduos, híbridos F_1 e os genitores, demonstrou variabilidade genética entre eles. Em análise em conjunto de todos os indivíduos, foram identificados oito alelos diferentes decorrentes de seis *primer* SSR. Devido à esta diversidade genética dos genitores e dos híbridos F_1 houve a formação de três agrupamentos (Figura 4).

Os grupos se distinguiram de acordo com o tipo de cruzamento e a procedência dos genitores. Conforme Figura 4, os grupos se caracterizam por:

Grupo 1: constituído por híbridos dos cruzamentos entre $MG_{\text{♀}} \times MS_{\text{♂}}$. Este grupo caracteriza-se por indivíduos relacionado à procedência de MS do genitor masculino.

Grupo 2: constituído por híbridos dos cruzamentos $MS_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$ e $MG_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$. Este grupo caracteriza-se por indivíduos relacionado à procedência de MG do genitor masculino.

Grupo 3: composto pelos híbridos oriundos dos genitores de SP. Este grupo se caracteriza por indivíduos relacionados à procedência de SP.

As plantas de MS e MG possuem algumas características fenotípicas contrastantes. A caracterização destes grupos demonstrou que os híbridos do grupo 1

e 2 se assemelham aos genitores masculinos, ao contrário do grupo 3 que se assemelham ao genitor feminino.

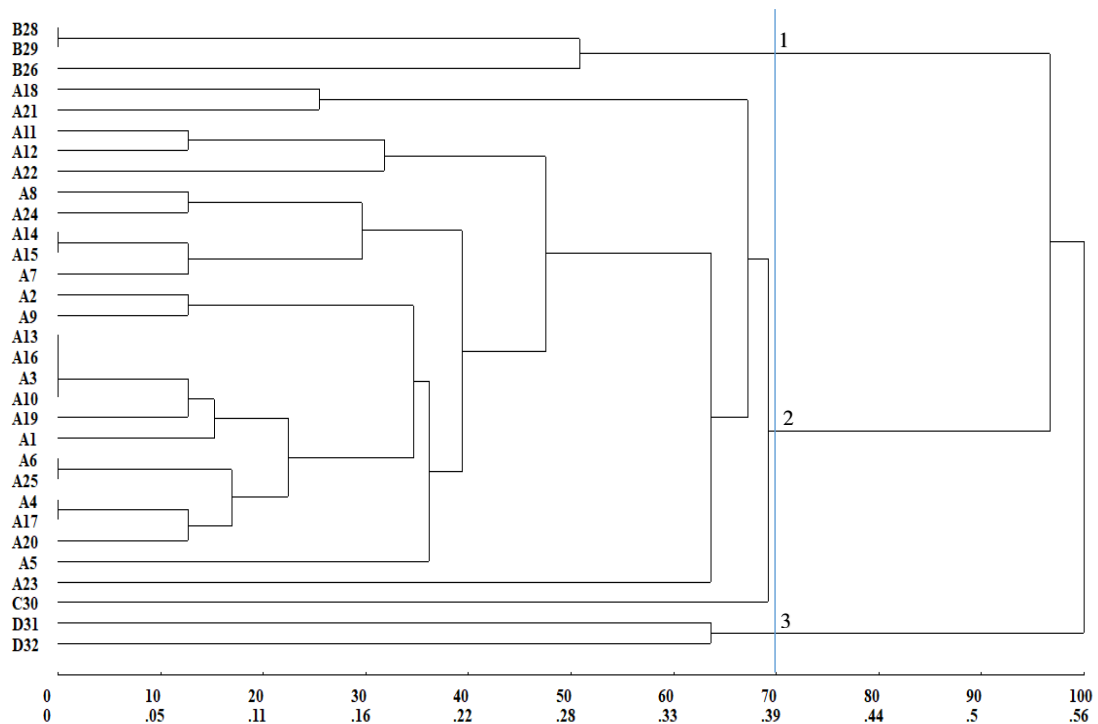


Figura 4. Dendrograma mostrando o agrupamento de híbridos F_1 e os genitores dos cruzamentos entre plantas de macaúbas de procedências distintas, baseado em microssatélites SSR. Método de agrupamento de ligação média entre os grupos (UPGMA).

3.3 Caracterização morfoagronômica com base em dados fenotípicos

Os indivíduos F_1 apresentaram variação quanto às características de coloração da plúmula (Figura 5B). A cor roxa da plúmula foi notada em 48% dos indivíduos, independente da origem do genitor (Tabela 5), exceto nas plântulas com genitores provenientes de SP, que apresentaram somente plúmula verde. A presença de espinhos variou quanto a localização e quantidade (Figura 5E). Os espinhos foram presentes nos pecíolos, nas folhas e em toda a planta, respectivamente, em 6%, 23%, 68% dos indivíduos e 3% destes com ausência da característica (Tabela 5). A maioria dos indivíduos apresentaram as escalas 2 e 3 de espinhos (39% e 29%). Também foi observada variação no ritmo de crescimento do plantio à emissão da primeira folha e no desenvolvimento nos indivíduos. Houve uma alta variabilidade nos F_1 quanto às características associadas aos espinhos e crescimento vegetal (Figura 5D e E).

Tabela 5. Características de plúmula e espinho dos 33 híbridos F₁ oriundos de cruzamentos entre plantas de macaúba de procedências distintas.

Características	Indivíduos F ₁				Total	
	MS _♀ x MG _♂ ¹	MG _♀ x MS _♂	MG _♀ x MG _♂	SP _♀	%	n ^o
Plúmula	Mesclada	3	1	0	0	12 4
	Roxa	14	2	0	0	48 16
	Verde	8	0	1	2	33 11
Espinhos	Folha	7	0	0	0	23 7
	Pecíolo	2	0	0	0	6 2
	Ambos	15	3	1	2	68 21
	Ausência	1	0	0	0	3 1
	0	1	0	0	0	3 1
	1	4	0	0	0	13 4
	Escala	2	12	0	0	39 12
3	7	1	0	1	29 9	
4	1	1	0	1	10 3	
5	0	1	1	0	6 2	

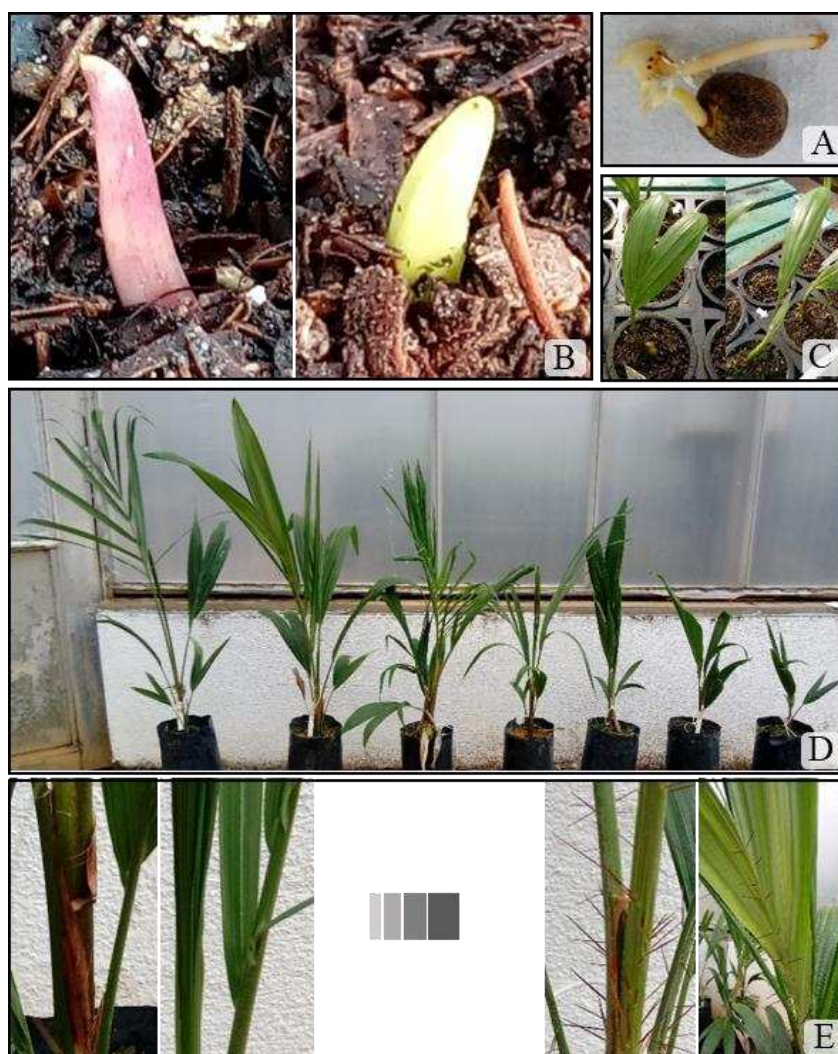


Figura 5. Características observadas nos indivíduos F₁. (A) semente pré-germinada; (B) Coloração da plúmula; (C) surgimento das primeiras folhas; (D) diversidade do vigor das plantas F₁ no mesmo estágio de desenvolvimento; (E) Escala 0 e 5 da presença e quantidade de espinhos.

Os híbridos foram distinguidos, utilizando o método UPGMA, em sete agrupamentos quanto às características qualitativas e quantitativas (morfoagronômicas), devido à variabilidade existente no desenvolvimento (Figura 6).

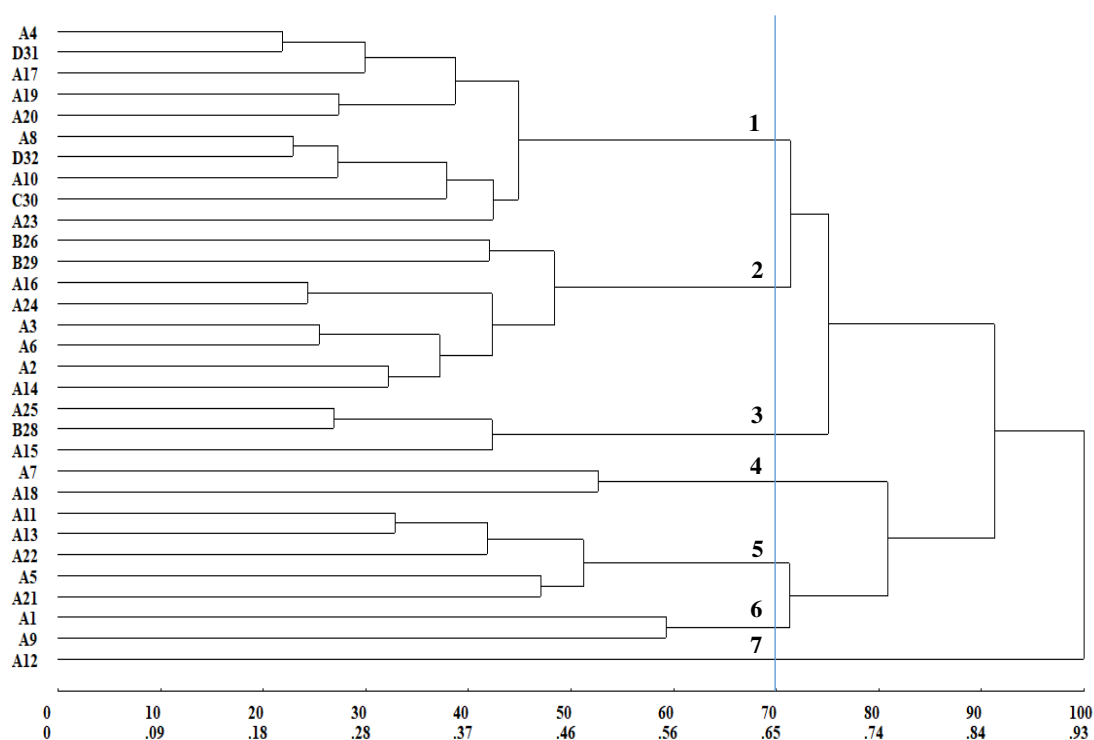


Figura 6. Dendrograma mostrando o agrupamento de 31 indivíduos provenientes de cruzamentos entre plantas de macaúbas de procedências distintas, baseado nos caracteres morfoagronômicos. Método de agrupamento – ligação média entre os grupos (UPGMA).

A partir de dados fenotípicos das características morfoagronômica avaliadas foi realizada a caracterização dos híbridos (Tabela 7). No geral, a disposição dos indivíduos nos grupos não se distinguiu por um cruzamento ou procedência específica, ao contrário da caracterização do agrupamento com base molecular. Portanto, não se definiu uma melhor combinação de regiões de plantas de macaúbas para obtenção de características morfoagronômicas desejáveis. Isso porque a macaúba é uma espécie alógama ainda pouco melhorada possuindo uma base genética ampla, o que gera alta variabilidade e segregação nos descendentes de um mesmo cruzamento. Com isso, pode-se observar que os indivíduos F₁ meios irmãos com genitor feminino BGP115, ficaram dispostos entre todos os grupos. Assim como os irmão completos descendentes da hibridação entre BGP105 e BGP27 apresentaram variabilidade, a qual distinguiu os entre todos os grupos, exceto o 7 (Figura 6).

A caracterização morfoagronômica de cada grupo está representada na Tabela 7, sendo:

Grupo 1: formado pelos híbridos A4, A8, A10, A17, A19, A20, A23, C30, D31 e D32, oriundos dos cruzamentos $MS_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$, $MG_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$ e $SP_{\text{♀}}$. O intervalo entre o plantio e a emissão da primeira folha foi o menor entre os grupos (30 dias). Os indivíduos responderam bem ao desenvolvimento e produção de folhas. A plúmula se caracterizou pela coloração esverdeada e presença de espinhos tanto na folha quanto no pecíolo. O grupo possui desenvolvimento precoce com moderada presença de espinho.

Grupo 2: formado pelos híbridos A2, A3, A6, A14, A16, A24, A26 e B29 dos cruzamentos recíprocos $MS_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$, $MG_{\text{♀}} \times MS_{\text{♂}}$. Tais indivíduos apresentaram surgimento da plúmula aos treze dias após o plantio. Somente após 22 dias ocorreu o surgimento da primeira folha, sendo o terceiro grupo mais tardio neste quesito. O desenvolvimento vegetal foi lento no primeiro mês, entretanto se destacou com maiores tamanhos e produção de folhas no fim da avaliação. Os indivíduos apresentaram plúmula roxa e espinhos em toda a planta. Este se caracteriza com desenvolvimento normal e moderada presença de espinhos.

Grupo 3: constituídos pelo A15, A25 e B28 provenientes dos cruzamentos recíprocos $MS_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$, $MG_{\text{♀}} \times MS_{\text{♂}}$. O tempo de emissão da plúmula ocorreu lentamente (24 dias), com desenvolvimento mais acelerado até a emissão da folha (15 dias). O intervalo do plantio à emissão da primeira folha foi o segundo maior. O mesmo ritmo lento continuou no decorrer do desenvolvimento, com a medição de altura e número de folha sendo possível aos 60 dias após plantio. A plúmula se caracterizou por coloração mesclada entre roxa e verde. Os indivíduos apresentaram espinhos em todas as partes da muda. Conclui-se um grupo com desenvolvimento inicial tardio com moderada presença de espinho.

Grupo 4: formado pelo A7 e A18 oriundos do $MS_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$, sendo caracterizando como intermediário em relação aos dias de intervalo de emissão do plantio à primeira folha. Os indivíduos apresentaram desenvolvimento de folhas intermediário comparado aos demais. Os indivíduos apresentaram cor roxa da plúmula, se destacando com espinhos evidentes somente no pecíolo. Com essas características, constitui-se um grupo com desenvolvimento normal e baixa presença de espinhos no pecíolo.

Tabela 7. Valores médios e caracterização de cada grupo quanto as características morfoagronômicas.

Características morfoagronômicas		Grupos							
		1	2	3	4	5	6	7	
		MS _♀ x MG _♂ MG _♀ x MG _♂ SP _♀	MS _♀ x MG _♂ MG _♀ x MS _♂	MS _♀ x MG _♂ MG _♀ x MS _♂	MS _♀ x MG _♂	MS _♀ x MG _♂	MS _♀ x MG _♂	MS _♀ x MG _♂	
Intervalo de emissão (dias)	plântio à plúmula	13 [§] ±9,6 ^{§§}	13 ±10,1	24 ±14	20 ±11	16 ±12,6	14 ±5	5	
	plúmula à primeira folha	17 ±7,4	22 ±8,9	15 ±11	15 ±9,5	22 ±8,3	16,5 ±7,5	35	
	plântio à primeira folha	30 ±4,6	35 ±3,9	39 ±3,4	35 ±1,5	37 ±5,9	31 ±2,5	40	
Folhas	Tamanho (cm)	30 dias	2 ±1,5	1,0 ±1,7	0 ±0	2 ±1,5	2 ±2	1 ±1,2	0
		60 dias	7,2 ±3,3	8,7 ±3,3	5,1 ±0,8	6,8 ±4,7	6,7 ±3,4	10 ±0,7	3,7
		90 dias	9,7 ±2,6	11,2 ±2,4	12,7 ±1,9	14,5 ±1,5	12 ±1,1	11,8 ±0,2	5,5
		120 dias	13,9 ±3,8	13,7 ±2,5	13,3 ±1,6	16 ±0,5	14 ±1,6	14,3 ±1,2	6
		150 dias	18,9 ±5,2	19,2 ±2,2	16,5 ±3,2	17,7 ±0,25	18,6 ±2,5	16,5 ±1	6,5
	Quantidade	30 dias	1 ±0,5	1 ±0,5	0 ±0	1 ±0,5	1 ±0,8	1 ±0,5	0
		60 dias	2 ±0,5	2 ±0,5	2 ±0,5	2 ±0	2 ±0,5	2 ±0	1
		90 dias	3 ±0,7	2 ±0,9	2 ±0,5	2 ±0	2 ±0,5	3 ±1	1
		120 dias	5 ±0,6	5 ±1,1	4 ±0,5	4 ±2	5 ±1,2	4 ±0	2
		150 dias	7 ±0,9	7 ±1,1	6 ±0,5	6 ±1,5	7 ±1,4	7 ±0,5	5
Espinho	Quantidade	3 ±1,2	3 ±1,0	3 ±0,6	1 ±0	3 ±0,8	2 ±0	0	
	Local	Tudo	Tudo	Tudo	Pecíolo	Folha	Folha	Ausente	
Coloração da plúmula		Verde	Roxa	Mesclada	Roxa	Roxa	Verde - Mesclada	Roxa	
Características gerais*		Desenvolvimento precoce; moderada presença de espinho.	Desenvolvimento normal; moderada presença de espinho.	Desenvolvimento inicial tardio, moderada presença de espinho.	Desenvolvimento normal; baixa presença de espinho nos pecíolos.	Desenvolvimento normal com moderada de espinho nas folhas.	Desenvolvimento inicial precoce; moderada a baixa presença de espinhos nas folhas.	Desenvolvimento tardio; ausência de espinhos.	

§ e §§: média, e, desvio padrão, das características dentro do cluster. *Indivíduos F₁ provenientes dos respectivos cruzamentos.

Grupo 5: constituído dos híbridos A5, A11, A13, A21 e A22 do cruzamento MS♀ x MG♂. A emissão da plúmula à primeira folha se caracterizou como o segundo com maior intervalo de dias. O crescimento vegetal foi intermediário e a coloração da plúmula arroxeadada. Se destacou pela presença de espinhos evidentes somente nas folhas. Caracteriza-se por desenvolvimento normal e moderada presença de espinhos nas folhas.

Grupo 6: formado pelo A1 e A9, descendentes do cruzamento MS♀ x MG♂. O intervalo de dias do plantio a emissão da primeira folha foi o segundo menor. Entretanto, o desenvolvimento da folha ocorreu de forma lenta, porém com produção de folhas normal. A plúmula apresentou coloração variando de esverdeada à mesclada. Os espinhos foram exclusivos nas folhas. Dessa forma, esse grupo apresentou desenvolvimento inicial precoce; moderada a baixa presença de espinhos nas folhas.

Grupo 7: constituído de um indivíduo referente ao cruzamento MG♂ x MS♀, o A12. A emissão da folha se caracterizou como a mais demorada, com maior intervalo de dias entre o plantio e a emissão da folha. O desenvolvimento da planta ocorreu lentamente, apresentando os menores tamanhos e produção de folhas. A plúmula apresentou coloração roxa e planta ausência de espinhos. Caracteriza-se um grupo com desenvolvimento tardio e ausência de espinho.

Em resumo, o grupo 1 e 6 apresentaram progênies com desenvolvimento mais precoce; os grupos 2, 4 e 5 apresentaram desenvolvimento normal; o grupo 3 com plantas com desenvolvimento um pouco mais tardio; e o grupo 7 se destacando com o desenvolvimento mais lento, ou seja, o mais tardio. Em relação, a quantidade de espinhos, os grupos 1, 2, 3 e 5 apresentaram híbridos com moderada presença de espinhos; o grupo 6 e 4 apresentaram moderada a baixa presença de espinhos. Os grupos 5 e 6 apresentaram espinhos exclusivos nas folhas, e o grupo 4 nos pecíolos. O grupo 7 apresentou ausência de espinhos.

Os genótipos dos grupos 4 e 7 se destacaram com características desejáveis a um ideótipo de macaúba, apesar de ainda se encontrarem em fase juvenil. O grupo 4 constituído pelos irmãos completos A7 e A18 oriundos do cruzamento entre BGP105-P1 e BGP27 apresentaram desenvolvimento normal e baixa presença de espinhos somente nos pecíolos. O grupo 7, constituído pelo genótipo A12 descendente do genitor feminino BGP105-P1 se destacou pela ausência de espinhos.

3.4 Caracterização com base em dados moleculares e morfoagronômicos

No grupo 1, da análise molecular, foi observada, em comum, a característica de moderada presença de espinhos por toda a planta nos genótipos B26, B28 e B29, descendentes do BGP50-P8. Já no grupo 2, da análise molecular, os genótipos, oriundos dos $MS_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$ e $MG_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$, tiveram variação quanto as características de desenvolvimento, coloração da plúmula, quantidade e presença de espinhos, apresentando expressiva variabilidade fenotípica entre estes indivíduos, em decorrência da base genética ampla e o centro de diversidade da macaúba se encontrar em MG. O grupo 3 da análise molecular apresentou genótipos D31 e D32 com coloração da plúmula esverdeada, moderada presença de espinhos e desenvolvimento precoce nas características agromorfológicas.

4. Discussão

O processo de desenvolvimento de híbridos é uma abordagem recente do Banco de Germoplasma – BAG Macaúba/UFV, sendo um passo crucial no melhoramento da espécie para fins agronômicos. Como um dos estudos pioneiros na área, a obtenção e caracterização de híbridos F_1 são o início da fase de hibridação para seleção de indivíduos no melhoramento da espécie. As hibridações entre diferentes acessos do banco geraram híbridos F_1 com diversidade genética. As procedências dos genitores agruparam os indivíduos quanto à genotipagem. Entretanto, os descendentes F_1 foram distinguidos em sete grupos quanto a caracterização agromorfológica, sem influência das procedências dos genitores, devido a variabilidade entre eles e a base genética ampla existente na macaúba.

Certificação de cruzamentos e as procedências dos genitores das hibridações na influência do agrupamento dos híbridos F_1

Dentro dos programas de melhoramento, a confirmação de autofecundação e hibridação, mediante análise molecular, é essencial para o sucesso e continuação dos trabalhos (Pereira et al., 2010). A análise de confirmação não constatou nenhum indivíduo proveniente de autofecundação. Estudos realizados por Lanes et al. (2016) indicaram variações de autoincompatibilidade na macaúba, variando conforme o seu

habitat como forma de estratégia de sobrevivência; e além disso, aponta que menores obtenções de descendentes por autopolinização podem também ser atribuídos à presença de depressão endogâmica, a qual pode estar ligada ao abortamento precoce de frutos em decorrência da carga mutacional excessiva, como também a disponibilidade de polinizadores (Husband & Schemske, 1996; Wilcock & Neiland, 2002, Lanes, 2014).

A confirmação das hibridações certificou que todos os descendentes dos cruzamentos realizados são híbridos F₁ e permitiu a identificação dos seus genitores. A identificação dos genitores das descendências se torna essencial para continuidade correta do objetivo da fase de seleção, e alertando para a presença de alelos de outras populações no momento de alguma polinização. Como se observou na identificação dos genitores, alguns indivíduos foram provenientes de genitores masculinos não identificados (Tabela 3). Tais resultados podem ter sido observado por uma possível contaminação de pólen no momento da coleta ou pela presença de polinizadores nas espadas antes do ensacamento para a polinização.

A genotipagem realizada distinguiu três grupos, que se caracterizam com indivíduos relacionados à procedência de MS, SP e MG. Nestas procedências são encontradas plantas com fenótipos contrastantes. As plantas de MS, SP e MG variam quanto as características como tamanho da planta e frutos, densidade de copa, presença de pecíolos remanescentes aderidos ao estipe, quantidade de espinhos, teor de óleo na polpa e semente, entre outras. No BAG-Macaúba/UFV, pesquisadores encontraram variações contrastantes entre plantas de macaúba de procedências de MG e SP quanto as características morfológicas e no teor de óleo (Rueda, 2014; Costa et al.,2018).

Diante da análise molecular, os indivíduos B26, B28 e B29 do grupo 1, apresentaram, em comum, a presença moderada de espinhos e o genitor masculino de procedência de MS. As plantas de MS possuem menores quantidades de espinhos e possuem diversidade genética distante das plantas de MG. Os híbridos oriundos dos cruzamentos MS_♀ x MG_♂ e MG_♀ x MG_♂ constituem o grupo 2 da genotipagem, e apresentaram variação quanto as características morfoagronômicas avaliadas, apresentando expressiva variabilidade fenotípica, tendo em comum o genitor masculino de procedência de MG. Em MG localiza-se o centro de diversidade da macaúba (Lanes, 2014). A variabilidade fenotípica deste grupo pode ser em decorrência da base genética ampla de plantas desta região. Os indivíduos D31 e D32

do grupo 3 possuem em comum os genitores femininos de procedência de SP e estão dispostos no mesmo grupo da caracterização morfoagronômicas. As plantas de SP apresentam características intermediárias das plantas de procedência de MS e MG. Pesquisadores relataram que plantas de SP possuem níveis de genoma misto das *Acrocomia aculeata* e *A. totai*, aceitando a existência destas, como duas espécies de macaúba (Abreu et al. 2012, Lanes et al., 2015).

No entanto, neste presente estudo, a caracterização morfoagronômicas dos híbridos não se distinguiram por influência da procedência do genitor, exceto pela descendência da procedência de SP (BGP47) presente somente no grupo 1. Conforme verificado na geração F₁ dos irmãos germanos – hibridação entre BGP105 e BGP27 - apresentaram segregação quanto as características e foram dispostos em grupos distintos. As progênes sem identificação paterna do acesso BGP105-P1/MS ficaram dispostas entre seis grupos com características diferentes: 1(23%), 2 (23%), 3(8%), 4 (31%), 6 (8%) e 8 (8%). A presença de variabilidade genética em características fenotípicas dentro de progênes de irmãos completos também foi relatada na palmeira Palma de Óleo, tipo Dura (Cedillo et al., 2008). Ferreira et al. (2012) também encontrou variação molecular existente dentro de progênes em estudos de diversidade genética na palma de óleo.

As plantas alógamas por serem de polinizações abertas, possuem maiores taxas de locos heterozigóticos, o que pode influenciar em descendentes com genótipos segregantes. A heterozigosidade pode ser considerada como um indicativo da existência de variabilidade genética para espécies alógamas (Ferreira et al., 2012). Uma maior variabilidade é observada dentro de populações ou procedências em plantas alógamas de populações naturais ou de germoplasma (Ferreira et al., 2012). A maioria das populações de plantas nativas não melhoradas, como a macaúba, possui base genética ampla gerando variabilidade entre descendentes. Isso explica a presença de híbridos F₁ de um mesmo cruzamento serem agrupamentos em grupos distintos quanto as características fenotípicas. O mesmo foi verificado por Berton (2013), entre progênes na fase juvenil da macaúba, que apresentaram variabilidade genética dos caracteres vegetativos avaliadas com formação de oito classes, pelo teste Scott-Knott. Uma hipótese é que a presença de pólen proveniente de outra família/acesso não identificado nas hibridações pode ter interferido na distinção dos grupos quanto às características agromorfológicas dos híbridos provenientes de regiões distintas.

Apesar da mistura de pólen de seis plantas de macaúba, como genitores masculinos, na hibridação entre MS_♀ x MG_♂ nota-se que apenas dois destes genitores tiveram descendentes. Dos 25 indivíduos do genitor feminino BGP105-P1/MS, 44% foi proveniente do genitor masculino BGP27, e 4% do BGP74-P1, ambos de MG. Em outro estudo com macaúba, a correlação de paternidade indicou alta proporção de descendentes de um mesmo parental materno e paterno, sugerindo que a polinização cruzada não é aleatória (Lanes et al., 2015). Isso pode ter ocorrido pela preferência ou competição entre a interação pólen-estigma ou embriões dos genitores, e pode depender de vários mecanismos, como: competição entre microgametófitos por acesso a óvulos, por meio de diferentes velocidades de crescimento do tubo polínico ou diferentes habilidades para fertilizar óvulos (Marshall e Folsom, 1991); a escolha do genitor paterno entre parceiros (Mazer, 1987); complementação entre os genótipos materno e paterno que determina o resultado genótipo de cada embrião (Waser et al., 1987); efeito endogâmico afetando a taxa de crescimento de tubo polínico, viabilidade e quantidade de pólen produzido (Lanes, 2014). A capacidade de produzir sementes e adquirir recursos por cada semente faz com que ocorra combinações com maior sucesso de obtenção de sementes entre diferentes plantas doadoras de pólen (Banuelos et al., 2003).

Distinção de sete classes ocasionadas pela variabilidade nas características morfoagronômicas dos híbridos F₁, em fase vegetativa inicial, no programa de melhoramento da macaúba

A existência de variância genética dentro de progênes indica a capacidade de preservação de variabilidade genética, que pode ser explorada no melhoramento por seleção (Ferreira et al., 2012). Neste estudo, constatou-se justamente que a variância genética se manteve nos indivíduos de geração F₁ resultantes de cruzamentos entre acessos de origem geográfica distinta. Ao total foram contabilizadas sete grupos de híbridos F₁ quanto a caracterização fenotípica.

Na fase de desenvolvimento, de plântula à muda, observou-se características vegetativas e morfológicas distintas. A distinção destes fenótipos ocasionou o agrupamento de características morfoagronômicas semelhantes nos indivíduos. Os indivíduos se distinguiram em grupos quanto a coloração da plúmula, sendo 57% dos grupos com coloração roxa, 14% com coloração verde, e o restante mesclada. Os

grupos com plúmula verde foram os únicos a apresentarem indivíduos de procedências de SP (D31 e D32). Porém, nos demais casos, a coloração variou inclusive entre irmão germanos do cruzamento entre procedência de MS e MG. A princípio, a plúmula não indicou ser uma característica morfológica relacionada a alguma característica de crescimento vegetal ou de espinhos. Porém, necessita de avaliação de maior número de indivíduos para avaliar este quesito e verificar se a cor verde da plúmula prevalece em indivíduos de procedências de SP. Uma maior amostragem em plantas, como a macaúba com ampla diversidade genética, pode revelar genótipos contrastantes para características morfológicas, fisiológicas e/ou relação entre elas na macaúba, como também sugere Domiciano et al. (2015).

Semelhante a característica de plúmula, os indivíduos também foram caracterizados em grupos, com presença e quantidade de espinho semelhantes. Os grupos se distinguiram em indivíduos com presença em toda a planta (1, 2 e 3), exclusivos em folhas (5 e 6) ou pecíolos (4) ou ausência de espinhos (7). A quantidade de espinhos foi crescente dos grupos 7<4<6<1-2-3-5. De forma parecida ocorreu ao desenvolvimento vegetal, de forma crescente dos grupos 7<3<6<4<5<1<3. Observando esta relação das últimas características, sobressai que indivíduos com menores quantidades de espinhos apresentaram menor crescimento foliar e maior lentidão para emissão de folhas, como no caso do grupo 7. Isto pode indicar alguma relação entre estas características ou mesmo a ocorrência de depressão endogâmica. Berton (2013) corrobora na associação de porte baixo e menor quantidade de espinhos e maior produção de óleo em genótipos de polinização aberta de macaúba de procedências de MG e SP. Em estudos de progênes de macaúba, observou-se que as características morfológicas eram relacionadas entre si, com possibilidade de realizar seleção indireta para elas, como exemplo a altura que se correlaciona com o comprimento ou largura de ráquis de macaúba (Domiciano et al., 2015).

Os grupos se destacaram em relação ao ritmo de desenvolvimento. Os híbridos das classes 2, 4 e 5 apresentaram desenvolvimento normal a moderado. As classes 3 e 7 apresentaram um desenvolvimento mais tardio. Ao contrário, das classes 1 e 6 com desenvolvimento mais rápido, ou seja, precoce. Como os genótipos F₁ foram avaliados somente em período juvenil é necessário o acompanhamento e avaliação do desenvolvimento até fase de produção, devido ao conhecimento escasso da planta de macaúba. A partir desta caracterização pode-se selecionar um padrão de

desenvolvimento desejável para criação de novas gerações com linhas de pesquisas diferentes. A necessidade de desenvolvimento de variedades precoces, normais e tardias é comum para todas as culturas. Muitos programas de melhoramento buscam estas características, pois o lançamento de cultivares com estes padrões pode ser importante, como exemplo para escalonamento de produção. Essa diversidade genética presente, tem grande importância para o manejo e uso do germoplasma nos programas de melhoramento genético (Sobral et al., 2012). Estudos de progênies de polinização aberta de macaúba de procedência de SP e MG relataram variabilidade e níveis moderados a altos de ganhos genéticos relativos as características vegetativas das plântulas e sugerem a possibilidade de seleção em viveiros para obtenção de plantas (Berton et al., 2013).

A partir dos contrastes dos grupos, a geração F_1 tem variabilidade que pode ser usada para seleção para nova geração F_2 . Os genótipos pertencentes aos grupos 4 e 7 se destacam para sequência do programa de melhoramento da macaúba com objetivo de obtenção de híbrido com características desejáveis. Um ideótipo de macaúba apresentaria as características de porte baixo, copa frondosa, pouco ou ausência de espinhos, sobreposição de produção, entre outros (Berton, 2013). O híbrido F_1 , A12 (grupo 7), progênie do BGP105-P1, pode ser selecionado para novas gerações para desenvolvimento de variedades com pouco espinho. Os F_1 , A7 e A18 (grupo 4), progênies do cruzamento entre BGP105-P1 e BGP27 são os que mais representa as características de um ideótipo; se destacam com desenvolvimento normal, baixa presença de espinhos e procedências contrastantes para explorar a variabilidade.

A variabilidade morfoagronômica favorece um programa de melhoramento por se ampliar as opções de escolha de genótipos que tenham características agrônômicas desejáveis. A geração F_1 dos híbridos de macaúba apresentou alta variabilidade fenotípica na fase juvenil, podendo se manter as características no decorrer do desenvolvimento até fase reprodutiva. Além disso, algumas destas características na fase juvenil pode predizer características da planta adulta, o que permite a seleção precoce no melhoramento. A seleção precoce é uma alternativa para avaliar os caracteres em idades prévias e fazer a predição dos caracteres de interesse, de modo a antecipar as etapas de seleção e recombinação (Rezende et al., 1994). Dessa forma, a viabilidade de aplicação da seleção precoce em programas de melhoramento de espécies perenes tornaria esses programas mais eficientes em

termos de tempo e custos para condução dos testes genéticos (Massaro, 2010). Assim, a eficiência ou não da seleção precoce está intimamente relacionada à existência ou não de correlação genética entre os caracteres na idade juvenil e adulta (Falconer, 1987). A avaliação progênie de macaúbas de populações naturais de GO e MG, relata a correlação entre características morfológicas e fisiológicas, a exemplo da altura e o comprimento de ráquis (Domiciano et al., 2015). Ainda, relatam que as correlações entre as características morfológicas se mantiverem durante o desenvolvimento da macaúba, indicam a possibilidade de seleção indireta para programa de melhoramento da espécie.

Porém, a avaliação e a caracterização de plantas de macaúba da fase de plântula a juvenil possuem pesquisas escassas. Poucos relatos incluem a avaliação da fase juvenil da macaúba para correlação das características desejáveis em plantas adultas para auxílio de programas de melhoramento. O que torna relevante a caracterização na fase de muda dos híbridos F_1 obtidos nesta pesquisa para preencher esta lacuna. Os estudos das características da fase de muda podem favorecer a seleção precoce para gerações, levando o encurtando da duração de obtenção de cultivares. Em avaliação de testes de progênie de populações naturais de macaúba, constatou elevados ganhos relativos para os caracteres vegetativos na fase juvenil: quantidade de espinho (82,30), altura da planta (53,3), diâmetro do caule (47,5), e o número de folhas (26,5%) (Berton et al., 2013). A continuação da avaliação dos híbridos em fase juvenil e novas obtenções de híbridos é favorável para avaliar características de alta herdabilidade e pode ser útil ao programa.

Pela escassez de informações, este trabalho de caracterização de híbridos F_1 traz informações preliminares a área. A diversidade genética e caracterização morfoagronômicas na formação de agrupamentos dos indivíduos abre um leque de opções e favorece a continuidade para seleção destes indivíduos para a geração F_2 e no auxílio da orientação de novos cruzamentos.

Considerações sobre a caracterização por meio de marcadores moleculares e caracteres morfoagronômicas

Apesar de na caracterização molecular, os indivíduos agruparem quanto a região de procedência, os híbridos F_1 ainda apresentaram grande variabilidade fenotípicas entre eles. Essa variabilidade das características agromorfológicas

encontradas nos híbridos ocasionou a formação de grupos que não se diferiram quanto as procedências dos genitores nas hibridações, nem quanto a cruzamentos recíprocos. Como a macaúba é uma espécie alógama e ainda em domesticação, ela apresenta base genética ampla, o que gera variabilidade entre e dentre famílias.

5. Conclusões

A certificação de cruzamentos constatou a obtenção de híbridos F_1 . A genotipagem constatou diversidade genética entre eles, agrupando-os quanto à proximidade genética em relação ao tipo de cruzamento e as procedências dos genitores. A caracterização morfoagronômica dos primeiros híbridos F_1 os classificou em sete classes distintas, gerando variabilidade que pode ser aproveitada tanto para fase de seleção para geração F_2 quanto para orientação de novos cruzamentos dirigidos. Tais resultados mostraram que cruzamentos entre genótipos contrastantes de macaúba podem ser explorados para linhas de pesquisas no melhoramento da espécie com auxílio de marcadores moleculares.

Os indivíduos A7 e A18 oriundos do cruzamento entre BGP105-P1/MS e BGP27/MG (grupo 4) e o indivíduo A12 descendente do genitor feminino BGP105-P1/MS, se destacaram com potencial para serem selecionadas para novas gerações, com características ideais para um ideótipo de macaúba, com desenvolvimento normal e baixa presença de espinhos; e para o desenvolvimento de variedades com pouco espinho, respectivamente.

6. Referências Bibliográficas

- ABREU, A.G.; PRIOLLI, R.H.G.; AZEVEDO-FILHO, J.A.; NUCCI, S.M.; ZUCCHI, M.I.; COELHO, R.M.; COLOMBO, C.A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Genet Mol Biol.** 35:119–121. 2012.
- BANUELOS, M.J.; OBESO, J.R.. Maternal provisioning, sibling rivalry and seed mass variability in the dioecious shrub *Rhamnus alpinus*. **Evolutionary Ecology** 17: 19–31, 2003.
- BELÉN-CAMACHO, D. R., LÓPEZ, I., GARCÍA, D., GONZÁLEZ, M., MORENOÁLVAREZ, M. J., & MEDINA, C. Physicochemical evaluation of seed and seed oil of corozo (*Acrocomia aculeata* Jacq.) **Grasas Aceites**, 56(4), 311–316. 2005.
- BERTON, L.H.C. Avaliação de populações naturais, estimativas de parâmetros genéticos e seleção de genótipos elite de macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Tese**. Campinas – SP, 154p. 2013.
- BERTON, L.H.C.; FILHO, J.A.A.; B, SIQUEIRA, W.J.; COLOMBO, C.A. Seed germination and estimates of genetic parameters of promising macaw palm (*Acrocomia aculeata*) progenies for biofuel production. **Industrial Crops and Products**, 51, 258–266. 2014.
- CEDILLO, D.S.O.; Ferreira, F.M.; Barros, W.B.; Cruz, C.D.; Dias, L.A. dos S. Rocha, R. Selection among and within and combined selection in oil palm families derived from Dura x Dura. **Ciência Rural**, v.38, p.65-71, 2008.
- COSTA, A.M.; MOTOIKE, S.Y.; CORREA, T.R.; SILVA, T.C.; COSER, S.M.; RESENDE, D.V.; TEOFILLO, R.F. Genetic parameters and selection of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) accessions: an alternative crop for biofuels. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 18: 259-266, 2018.
- DOMICIANO, G.P.; ALVES, A.A.; LAVIOLA, B.G; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S. Parâmetros genéticos e diversidade em progênies de Macaúba com base em características morfológicas e fisiológicas. **Ciência Rural**, v.45, n.9, set, 2015.
- FALCONER, D.S. **Introdução a genética quantitativa**. Viçosa, MG: UFV, 279p. (3ªed). 1989.
- FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R., KARIA, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. (**Comunicado Técnico, 92**). Planaltina: Embrapa Cerrados, 6p. 2003.
- FEKADU, G.M. Cross-species amplification of microsatellite markers and genetic diversity in the macaw palm (*Acrocomia aculeata*). **Tese**. Viçosa MG. 2015.

FERRÃO, L. F. V.; CAIXETA, E. T.; PENA, G.; et al. New EST–SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. **Molecular Breeding**, v. 35, n. 1, p. 31, 2015.

FERREIRA, C.B.B; LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; CUNHA, R.N.V; DJAIR ALVES MOREIRA, D.A.; BARROS, W.S.; MATIELLO, R.R. Diversidade genética molecular de progênies de dendezeiro. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.47, n.3, p.378-384, mar. 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; RIBEIRO, V. J.; REZENDE, G. D. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for Eucalyptus. **Theoretical and Applied Genetics** , v. 109, n. 1, p. 192-199, 2004.

HERNÁNDEZ, B.C.R., HERNÁNDEZ, J., VERDUSCO, J.E.G.A., FRIER, J.P., MARTÍNEZ, M.A.G. Importância agroecológica del coyol (*Acrocomia mexicana* Karw, ex Mart.). **Est Soc** 21: 97–113. 2013.

LANES, E.C.M., NICK, C., KUKI, K.N., FREITAS, R.D., MOTOIKE, S.Y. Genomic DNA isolation of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) from leaf and stipe tissue samples for PCR analysis. **Genetics and Molecular Research** 12: 3905-3911. 2013.

LANES, E. C. M. Variabilidade molecular e sistema de reprodução de macaúba (*Acrocomia aculeata*) / **Tese**. Viçosa, MG, 2014.

LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. – *Arecaceae*: bases para o desenvolvimento sustentável. **Tese**. Paraná. 2006.

MARSHALL, D.L., FOLSOM, M.W. (1991) Mate choice in plants: an anatomical to population perspective. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22, 37–63.

MASSARO, R. A. M.; BONINE, C. A. V.; SCARPINATI, E. A.; PAULA, R. C. Viabilidade de aplicação da seleção precoce em testes clonais de Eucalyptus spp. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 4. p. 597- 609, out./dez.2010.

MAZER, S.J. Maternal investment and male reproductive success in angiosperms: parent– offspring conflict or sexual selection? **Biol. J. Linn. Soc.** 30, 115–133. 1987.

MELO, P.G. Produção e caracterização de biodieséis obtidos a partir da oleaginosa macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Dissertação**. Uberlândia – MG, 80 p. 2012.

MISSIO, R. F.; CAIXETA, E. T.; RIBEIRO, A. P.; et al. **Diversidade Genética de cafeeiro por meio de marcadores**. EST-SSR. 2011.

MOTOIKE, S.Y., LOPES, F.A., OLIVEIRA, M.A.R., CARVALHO, M., AS JUNIOR, A.Q. Processo de germinação e produção de sementes de pré-germinadas de palmeiras do gênero *Acrocomia*. **Patente**. 2007.

MOTOIKE, S.; KUKI, K. The potential of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) as source of biodiesel in Brazil. **International Review of Chemical Engineering** 1: 632-635. 2009.

PEREIRA, R.B.; SILVA, G.O.; PINHEIRO, J.B.; CARVALHO, A.D.F.; VIEIRA, J.V. Herdabilidade e resposta à seleção para peso de raízes e tolerância a queima-das-folhas em populações de cenoura. Brasília, DF: Embrapa (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Hortaliças**; 81), ISSN 1677-2229, 17p., 2010

PIMENTEL, L. D.; BRUCNER, C. H.; MARTINEZ, H. E. P.; TEIXEIRA, C. M.; MOTOIKE, S. Y.; NETO, J. C. P. Recomendação de adubação e calagem para o cultivo da macaúba: 1ª aproximação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG: EPAMIG, v. 32, n. 265, p. 20-30, 2011.

PLATH, M.; MOSER, C.; BAILIS, R.; BRANDT, P.; HIRSCH, H.; KLEIN, A. M.; WALMSLEY, D.; WEHRDEN, H. A novel bioenergy feedstock in Latin America? Cultivation potential of *Acrocomia aculeata* under current and future climate conditions. **Biomass and Bioenergy**, 91: 186-195. 2016.

RATTER, J. A., BRIDGEWATER, S., & RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, 60, 57-109.2003.

RESENDE, M.D.V. Seleção precoce no melhoramento genético florestal. Palestra apresentada no **WORKSHOP: Métodos de Seleção**. 1994.

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems**. 2n ed. London: Chapman; Hall. 529 p. 1990.

RUEDA, R.A.P. Avaliação de germoplasma para melhoramento e a conservação da macaúba. **Tese**. Viçosa, MG, 2014.

SOBRAL, K.M.B., RAMOS, S.R.R., GONÇALVES, L.S.A., AMARAL JÚNIOR, A.T., ARAGÃO, W.M. Variabilidade genética entre acessos de coqueiro-anão utilizando técnicas de análise multivariada. **Magistra**. 24, 348- 359. 2012.

TEIXEIRA, L.C. Produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, n. 229, p: 79-86. 2005.

WASER, N.M., PRICE, M.V., MONTALVO, A.M. AND GRAY, R.N. Female mate choice in a perennial herbaceous wildflower, *Delphinium nelsoni*. **Trends Plant Sci.** 1, 29–33. 1987.

CAPÍTULO 2

Cruzamentos dirigidos: compatibilidade entre macaúba de diferentes procedências

Resumo - A macaúba se destaca como alternativa sustentável para os setores alimentícios, oleoquímicos e de biocombustíveis, devido sua produtividade, qualidade do óleo e a adaptabilidade climática. Esta palmeira se encontra em processo de domesticação cujo estudos ainda são incipientes na área de melhoramento genético. Do gênero *Acrocomia*, ela se distingue em plantas com características marcantes dependendo da sua procedência geográfica. Esta diversidade indica a existência de *pools* gênicos distintos que podem ser explorados por meio de hibridações. Por outro lado, é frequentemente observado abortamento na fase inicial do desenvolvimento dos frutos interferindo no sucesso das hibridações. Fez-se necessário aprimorar o conhecimento sobre a compatibilidade entre os cruzamentos de plantas fenotipicamente contrastantes de procedências distintas. No Banco Ativo de Germoplasma de Macaúba foram avaliadas hibridações, durante três anos consecutivos, entre materiais fenotipicamente contrastantes com procedências em MG, SP, MS, PA e região NO, a autofecundação e polinização aberta. Dois tipos de metodologias de polinização foram efetuadas, a abertura manual e natural das espatas. Os caracteres avaliados foram: relação das variáveis climáticas e época de polinizações artificiais, pegamento e produção (flores, frutos e sementes), análise histoquímica das flores femininas da abertura manual e natural da espata e caracterização morfológica das sementes. Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva, teste de média tukey e análise multivariada de componentes principais. O período das polinizações das espatas se sobrepôs na estação chuvosa em todos os anos com características intrínsecas a procedência das plantas. A abertura manual da espata apresentou viável para polinização mediante receptividade e análises histoquímicas das flores femininas. As flores femininas de abertura manual apresentaram menor degradação do conteúdo nos idioblastos e quantidade de compostos fenólicos comparada as de abertura natural. Os cruzamentos dirigidos entre plantas fenotipicamente contrastantes de procedências distintas indicaram sucesso na compatibilidade mediante a nova metodologia de polinização. As sementes F_1 apresentaram variabilidade morfológica com características relacionada

ao genitor feminino de cada cruzamento. Apesar da divergência de identificação e classificação taxonômica da macaúba, este estudo evidenciou que as plantas fenotipicamente contrastantes de diferentes regiões podem produzir progênies com sucesso. Tais resultados mostraram que as hibridações entre fenótipos de procedências distintas geram variabilidade que pode ser explorada em linhas de pesquisas e na obtenção de híbridos, e recomenda abertura manual da espata para processos de polinização dentro do programa de melhoramento da macaúba. Este trabalho se caracteriza como pioneiro e indica a continuidade do mesmo para avaliações de parâmetros genéticos.

Palavra-chave: *Acrocomia spp*, polinização, hibridação e variabilidade.

Cross breeding in macaúba: compatibility between macaúba from different origins

Abstract - Macauba stands out as a sustainable alternative for the food, oleochemical and biofuel sectors, due to its productivity, oil quality and climatic adaptability. This palm tree is in the process of domestication whose studies are still incipient in the area of genetic improvement. Of the genus *Acrocomia*, it distinguishes itself in plants with marked characteristics depending on its geographical origin. This diversity indicates the existence of distinct gene *pools* that can be exploited through hybridizations. On the other hand, abortion is often observed early in fruit development interfering with the success of hybridizations. It was necessary to improve the knowledge about the compatibility between the crosses of phenotypically contrasting plants of different origins. In the Macauba Germplasm Active Bank, hybridizations were evaluated for three consecutive years between phenotypically contrasting materials with provenances in MG, SP, MS, PA and NO region, self - pollination and open pollination. Two types of pollination methodologies were performed, the manual and natural opening of the spathe. The evaluated characteristics were: climatic variables and time of artificial pollinations, glue and production (flowers, fruits and seeds), histochemical analysis of the female flowers of manual and natural opening of the spathe and morphological characterization of the seeds. Data were analyzed through descriptive statistics, tukey mean test and multivariate analysis of main components. The period of the pollination of the spaths overlapped in the rainy season in all the years with intrinsic characteristics the origin of the plants. The manual opening of the spat showed viable for pollination through receptivity and histochemical analyzes of the female flowers. The female flowers with manual opening presented lower degradation of the content in the idioblasts and quantity of phenolic compounds compared to natural opening. Crosses directed between phenotypically contrasting plants of different provenances indicated success in the compatibility with the new pollination methodology. F₁ seeds presented morphological variability with characteristics related to the female parent of each crossing. Despite the divergence of macaúba identification and taxonomic classification, this study showed that phenotypically contrasting plants from different regions can produce progenies successfully. These results showed that the hybridizations between phenotypes of different origins generate variability that

can be explored in research lines and in obtaining hybrids, and recommends manual opening of the spathe for pollination processes within the macaúba breeding program. This work is characterized as a pioneer and indicates the continuity of the same for evaluations of genetic parameters.

Keywords: *Acrocomia* spp, pollination, hybridization and variability.

1. Introdução

A oleaginosa macaúba se destaca pela produção de dois tipos de óleo, o do mesocarpo e o da semente, que podem ser destinados para diversos fins nas indústrias alimentícia, oleoquímica e de biodiesel (Cesar et al., 2015; Cardoso et al., 2017). Além disso, os resíduos sólidos do fruto podem gerar subprodutos de valor mercadológico (Padilha et al., 2015). Na última década, essa palmeira apresentou grande destaque pelas suas estimativas de rendimento e qualidade de óleo. Predições apontam para uma produção de até seis toneladas de óleo ha⁻¹ (Motoike et al., 2013; Navarro-Díaz et al., 2014). Devido ao seu potencial produtivo, a macaúba tem sido comparada à maior cultura de oleífera do mundo, a palma de óleo (*Elaeis guineenses*) (Motoike and Kuki; 2009; Pires et al, 2012; MAPA, 2015). Entretanto, a palma de óleo possui como exigência climática altas precipitações, o que limita seu cultivo as áreas tropicais úmidas (Cardoso et al., 2017). Em contrapartida, a macaúba é passível de ser cultivada em climas tropicais savânicos e subtropicais, suprindo assim a lacuna do cultivo da palma de óleo nestas regiões. Além disso, tem a característica de se adaptar às condições edafoclimáticas adversas devido a sua plasticidade fenotípica (Motoike & Kuki, 2009; Abreu et al., 2012).

A macaúba, da família Areaceae, é a palmeira de maior dispersão no território nacional, e se encontra em maior densidade nas regiões Centro-Oeste e Sudeste (Henderson et al., 1995). Seu centro de origem é situado em Minas Gerais (Lanes et al., 2015). A espécie possui 15 pares de cromossomos ($2n = 30$) (Abreu et al., 2012). A macaúba tem como principal característica morfológica a presença de espinhos na região dos nós (Lorenzi, 2006). Ela é uma planta monoica, apresentando inflorescência em espádices, com flores masculinas na parte distal e as femininas na parte proximal do cacho (Brito, 2013). O sistema reprodutivo é considerado predominantemente alógamo com marcante protoginia (Scariot, 1991; Lanes et al., 2016). A polinização ocorre principalmente por besouros e por ação do vento, de forma secundária. A receptibilidade da flor feminina é em torno de 15 horas após abertura da espata em plantas de procedência mineira (Brito et al., 2013). A floração ocorre na época chuvosa (Scariot et al., 1991).

A capacidade da macaúba de naturalmente povoar diversos ambientes é acompanhada de notórias diferenças morfológicas, o que gerou grande diversidade entre populações (Ciconini et al., 2013). Estudos de diversidade, na etapa de pré-

melhoramento no banco de germoplasma (BAG - Macaúba/UFV), mostraram a variabilidade e a formação de grupos com características morfológicas que se diferem quanto à procedência geográfica (Rueda, 2014; Costa et al., 2018). Esta diversidade indica a existência de *pools* gênicos distintos que podem ser explorados por meio de hibridações (Lanes et al., 2015).

A macaúba é uma espécie ainda em processo de domesticação. Apesar de existir muitas pesquisas de pré-melhoramento, carece de estudos mais fortemente direcionados à etapa de melhoramento *per se*, que se inicia com as hibridações dirigidas de materiais previamente caracterizados no BAG - Macaúba/UFV.

A hibridação é uma técnica que proporciona novas combinações genéticas, sendo importante na transferência de genes de interesse agrônômico (Stummel e Bosland, 2006; Judd et al., 2009). Em programas de melhoramento, os cruzamentos dirigidos entre genitores divergentes apresentam maior eficiência em gerar indivíduos com características desejáveis, maior variabilidade genética nas gerações segregantes e aumento do efeito de heterose (Falconer, 1989; Govindaraj et al., 2015). O conhecimento de características fenotípicas dos genitores para o cruzamento é de extrema importância para culturas em domesticação. O contraste dos fenótipos pode indicar possíveis formações de grupos heteróticos. Caso haja compatibilidade, as plantas de macaúba de diferentes procedências podem subsidiar à formação inicial desses possíveis grupos, contribuindo para a consolidação da cultura.

A compatibilidade contribui para manter e aumentar a diversidade (Zhang et al., 2009). Entretanto, a hibridação depende do sucesso dela, e a compatibilidade pode ser um desafio para a obtenção de novas variedades através de hibridações dirigidas, inter e intraespecíficas (Bandeira et al., 2011). A compatibilidade pode ser afetada por vários fatores, como os pré-zigóticos, por influência de polinizadores, condições climáticas e fisiológicas da planta, pós-zigóticos e a autoincompatibilidade. A macaúba possui fatores depressivos pós-zigóticos, como aborto de frutos, viabilidade das sementes e mortalidade de plântulas, com provável sistema de autoincompatibilidade (Abreu et al., 2012). A baixa frutificação em polinizações controladas em macaúba efetuadas por Scariot et al. (1991), corrobora para a presença de autoincompatibilidade (Lanes et al., 2016). Além disso, estudos indicaram níveis de autoincompatibilidade na macaúba, variando conforme o seu habitat como forma de sobrevivência (Lanes et al., 2016). Neste contexto é

necessário o estudo da compatibilidade de cruzamentos entre plantas de macaúba de procedências distintas e características morfológicas contrastantes.

Portanto, diante da divergência de características morfológicas e de produção de óleo entre os acessos do BAG - Macaúba, é factível o cruzamento entre plantas de procedências distintas para início da etapa de obtenção de híbridos. Assim, objetivou-se a avaliação da compatibilidade de cruzamentos dirigidos entre plantas de macaúba de procedências distintas, e, adicionalmente, diferentes metodologias de polinização.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal e hibridações

O experimento foi realizado no BAG - Macaúba/UFV que é estruturado em famílias de meios-irmãos, de sementes originadas de diversas regiões/ecossistemas do Brasil.

Durante três anos consecutivos foram realizados cruzamentos entre famílias de procedências distintas, conforme Tabela 1. A escolha dos genitores foi embasada nos fenótipos contrastantes, quanto às características agrônômicas desejáveis, incluindo presença e frequência de espinho, altura, produção de frutos, produtividade de óleo, e quanto as regiões de procedências (Tabela 1). Durante o período de avaliação experimental, alguns acessos foram usados de acordo com o manejo das polinizações, ocasionado pela disponibilidade e diferenças na altura e época de floração das plantas.

A logística para cruzamento manual, nos primeiros dois anos de testes (2015 e 2016), é descrita na Figura 3 – metodologia geral (vide Revisão de Literatura). As hibridações, em cada ano, contaram sempre com plantas de três tipos de procedências. Quatro cruzamentos dirigidos foram testados: autofecundação, cruzamento com mix de pólen das famílias de MG, cruzamento com mix de pólen das famílias de SP, PA e região NO, respectivamente, em 2015, 2016 e 2017; e cruzamento com mix de pólen das famílias de MS, os quais, juntamente com a polinização aberta configuraram os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 1. Acessos de diferentes famílias e suas informações referentes as procedências, utilizados nos cruzamentos entre plantas de macaúba em três anos consecutivos, 2015, 2016 e 2017, no BAG - Macaúba/UFV.

Código BAG - Macaúba UFV	Gleba			Origem	Latitude	Longitude	Aspectos da região e plantas de cada procedência		
	Localização	Ano de introdução	Ano de produção				Clima	Bioma	Características distintas*
Acessos hibridizados no ano 2015									
BGP 47	I	2009	5°	São Paulo (SP)	S 22°29'13''	W 50°46'20''	Verão quente, inverno ameno	Cerrado	Pouca presença de pecíolo remanescentes aderidos ao estipe e espinhos. Menores comprimentos de espata. Plantas muito altas.
BGP 50	I	2009	5°	Minas Gerais (MG)	S 19°10'7''	W 45°29'25''	Verão chuvoso, inverno seco	Cerrado	Presença de pecíolo remanescentes aderidos ao estipe. Alta presença de espinhos e densidade de copas. Maiores comprimentos de espata. Teores maiores de óleo nos frutos ¹
BGP 115	III	2011	3°	Mato Grosso do Sul (MS)	S20°53'05''	W 55°51'50''	Verões quentes e chuvosos, inverno seco	Pantanal	Ausência de pecíolo remanescentes aderidos ao estipe. Pouco espinhos. Baixa densidade da copa. Frutos pequenos. Plantas baixas. Teores maiores de amido na polpa ²
Acessos hibridizados no ano 2016									
BGP69	III	2009	3°	Minas Gerais (MG)	S 19°44'54''	W 44°48'2''	Verão quente, inverno seco	Cerrado	1
BGP99	III	2011	3°	Pará (PA)	S 21°44'40''	W 57°28'37''	Verão quente e chuvoso, pequena estação seca	Amazônia	Características de pecíolo remanescentes aderidos ao estipe, densidade de copa, espinho, e tamanho das espatas intermediárias entre plantas de MG e MS. Tamanho de frutos grandes ³ .
BGP117	III	2011	3°	Mato Grosso do Sul (MS)	S 20°50'17''	W 55°54'51''	Verões quentes e chuvosos, inverno seco	Pantanal	2
Acessos hibridizados no ano 2017									
BGP69	II	2009	3°	Minas Gerais (MG)	S 19°44'54''	W 44°48'2''	Verão quente, inverno seco	Cerrado	1
BGP117	III	2011	3°	Mato Grosso do Sul (MS)	S 20°50'17''	W 55°54'51''	Verões quentes e chuvosos, inverno seco	Pantanal	2
BGP133	IV	2011	2°	Região Norte (NO)	ND**	ND**	-	Amazônia	3

*Características baseadas em observações de campo. **ND: sem identificação da localidade. 1, 2 e 3: características das regiões de MG, MS e região NO/PA, respectivamente.

Tabela 2. Descrição do esquema dos cruzamentos, autofecundação e polinização natural entre plantas de procedências diferentes.

Tratamento*	Sigla	Descrição	Sigla dos cruzamentos
Autofecundação	(Aut)	Plantas polinizadas [§] com próprio pólen.	Aut
Cruzamento com mix de pólen das famílias de MG	(PMG)	Plantas polinizadas [§] com mistura de pólenes provenientes de plantas de MG.	MG _♀ x MG _♂ MS _♀ x MG _♂ SP _♀ x MG _♂ PA _♀ x MG _♂ NO _♀ x MG _♂
Cruzamento com mix de pólen das famílias de MS	(PMS)	Plantas polinizadas [§] com mistura de pólenes de plantas de MS.	MG _♀ x MS _♂ MS _♀ x MS _♂ SP _♀ x MS _♂ PA _♀ x MS _♂ NO _♀ x MS _♂
Cruzamento com mix de pólen das famílias de SP/NO/PA	(PSP / PPA / PNO)	Plantas polinizadas [§] com mistura de pólenes de plantas de SP, PA e NO, respectivamente, em 2015, 2016 e 2017.	MG _♀ x SP _♂ MS _♀ x SP _♂ SP _♀ x SP _♂ MG _♀ x PA _♂ MS _♀ x PA _♂ PA _♀ x PA _♂ MG _♀ x NO _♂ MS _♀ x NO _♂ NO _♀ x NO _♂
Polinização aberta**	(PAB)	Espatas não isoladas para permitir a eficiência natural do tratamento – polinização natural.	PAB

*A cada espata emitida pela planta foi direcionado um dos tratamentos.

**Polinizadores naturais - coleópteros das famílias *Curculionidae* e *Nitidulidae* - e ação do vento; acessos dispostos nas glebas I, II, III e IV entorno de plantas da mesma e outra família.

Símbolos: ♀: genitor feminino - receptor de pólen; ♂: genitor masculino - doador de pólen. §: em uma única espata.

No último ano experimental (2017), foi utilizado uma nova metodologia de hibridação – mantendo-se os mesmos tratamentos - com o intuito de otimizar o pegamento dos frutos, que nos anos anteriores mostrou-se inexpressivo com baixa produção de frutos. Neste novo processo de polinização, a abertura da espata ocorreu de modo artificial. Houve um acompanhamento do desenvolvimento da espata na planta, e ao notar que a mesma atingia sua circunferência máxima (observação de campo) foi realizado a abertura de uma fenda longitudinal, com auxílio de uma faca inox, e neste momento certificou-se a viabilidade da flor feminina, indicado pela coloração rosada do estigma (Figura 1). A polinização (Aut, PMG, PNO, PMS) foi feita imediatamente após a abertura manual da espata.

Os cachos polinizados foram isolados em sacos de organzas. Somente no primeiro ano de testes (2015), o saco de organza foi mantido por 32 dias para coleta de flores fecundadas em desenvolvimento e aquelas abortadas. Em 2017, após dois

dias da polinização, o saco de organza foi substituído por saco de nylon para o mesmo fim.



Figura 1. Processo da nova metodologia de hibridação desenvolvida no ano de 2017. (A) espata em circunferência máxima (observação de campo); (B) espata com abertura longitudinal artificial; (C) cacho floral exposto com detalhe da flor feminina receptiva (coloração rosada do estigma) (D) detalhe da coloração rosada do estigma – viabilidade; (E) flor feminina; (F) flor masculina. Fonte: Figura 1E e 1F, adaptadas de Brito (2013).

2.2 Avaliações

Monitoramento climático e período das polinizações manuais

Em todos os anos, no período de realização das hibridações, foram monitorados: dados de temperatura média (°C) e precipitação acumulada (mm) da região; e as datas de abertura natural das espatas e as polinizações dirigidas em cachos de cada acesso.

Relação de produção de flores femininas por cacho

Após a colheita de 2018, dos frutos oriundos das hibridações de 2016, os cachos de todos os cruzamentos dirigidos e de polinizações naturais foram coletados. Em cada cacho foi efetuado a contagem de marcas referentes à inserção de cada flor feminina produzida, indicando a relação de produção de flores femininas por cacho.

O índice da eficiência reprodutiva e de autoincompatibilidade, baseado na razão percentual entre as produções de flores e frutos formados de polinização aberta, autofecundação e de cruzamentos dirigidos (Zapata e Arroyo 1978; Bullock, 1985) serão calculados nas produções somente do ano 2019. Os dados referentes as

hibridações dos anos de 2015 e 2016 não foram submetidos ao cálculo do índice devido ao elevado abortamento dos frutos.

Pegamento dos frutos

Nos dois primeiros anos, o pegamento foi avaliado aproximadamente no sexto mês após as polinizações. Os dados foram ajustados em uma escala de 0 a 4, que correspondem ao cacho: 0 – vazio; 1 – pouco frutos (1 a 25%); 2 – moderado (26 a 50%); 3 – moderado à quase completo (51 a 75%); 4 – cheio (76 a 100%).

Estudos anatômicos utilizando testes histoquímicos

A comparação das flores femininas entre a abertura manual e natural da espata foi realizada através de estudos anatômicos. Para tanto, as flores femininas foram coletadas, no dia de ambos rompimentos das espatas de plantas de procedência MG, MS e NO em 2017. O material coletado foi fixado em FAA (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%, 1:1:18, volume:volume) por 48 h e conservadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etanólica e incluídas em 2-hidroxi-etil-metacrilato. Seções longitudinais (5 µm de espessura) foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático.

Para análise histoquímica, as amostras foram submetidas aos seguintes reagentes: azul de toluidina 0,05% pH 4,4 (O'Brien et al., 1964) para carboidratos e compostos fenólicos; sudan red (Pearse, 1972) para lipídios; lugol (Johansen, 1940) para amido; xilidine ponceau – XP (Vidal, 1970) para proteínas e vermelho de rutênio (Johansen, 1940) para pectinas. O controle foi conduzido simultaneamente para cada teste, de acordo com o método proposto pelos autores.

As imagens das análises, estrutural e histoquímica, foram obtidas em um microscópio de luz (Olympus AX70) acoplados a câmera fotográfica digital, usando o programa de captura de imagens Axion Vision (AxioCam HRc, Zeiss, Göttinger, Alemanha).

Avaliação das sementes F₁

Sementes originárias dos frutos das safras 2016/2017 e 2017/2018 - pertencentes aos cruzamentos: MS♂ x MG♀; MG♂ x SP♀; MS♂ x SP♀; SP♂ x SP♀; NO♂ x MG♀; PA♂ x PA♀; MG♂ x PA♀; PA♂ x MS♀; MG♂ x MS♀; das autofecundações: MG_{Aut}, SP_{Aut} e MS_{Aut}; e da polinização aberta SP_{PAB}, MS_{PAB}, PA_{PAB} e MG_{PAB} - foram avaliadas quanto as caracteres morfológicos quantitativos: comprimento (o opérculo como referencial para medição) e largura das sementes, e qualitativos: coloração e textura do tegumento (testa) da semente.

2.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado, em todos os anos de hibridação, foi em blocos casualizados. Em cada ano, as hibridações constaram de três regiões e cinco tipos de polinização, com três repetições, sendo cada planta de um acesso uma unidade experimental.

Os dados coletados das variáveis-respostas: pegamento; produção de frutos e sementes; relação do período de polinização com dados climatológicos foram analisados por estatística descritiva. As médias de produção de flores femininas por cacho foram submetidas à análise de variância pelo teste F e comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. Para análise de variabilidade de sementes, as médias para as características avaliadas foram submetidas à técnica exploratória multivariada de componentes principais.

3. Resultados

Nos cruzamentos dirigidos, observou-se compatibilidade entre genitores de diferentes procedências, sendo verificada variação na produção de frutos e nas características das sementes (F₁) resultantes dos cruzamentos.

3.1 Monitoramento climático e das hibridações

Em todos os anos, as hibridações se concentraram na época chuvosa, de outubro a janeiro, período em que as espatas se apresentavam maduras e iniciavam a abertura espontânea. Mesmo havendo a influência dos fatores ambientais de precipitação e temperatura, observou-se que o período da abertura de espatas, e

consequente a disponibilidade de pólen, ocorreu de acordo com a região de procedência das plantas (Figura 2). Isso permite balizar a escolha do período ideal para coincidir ou intercalar cruzamentos entre genitores de regiões distintas.

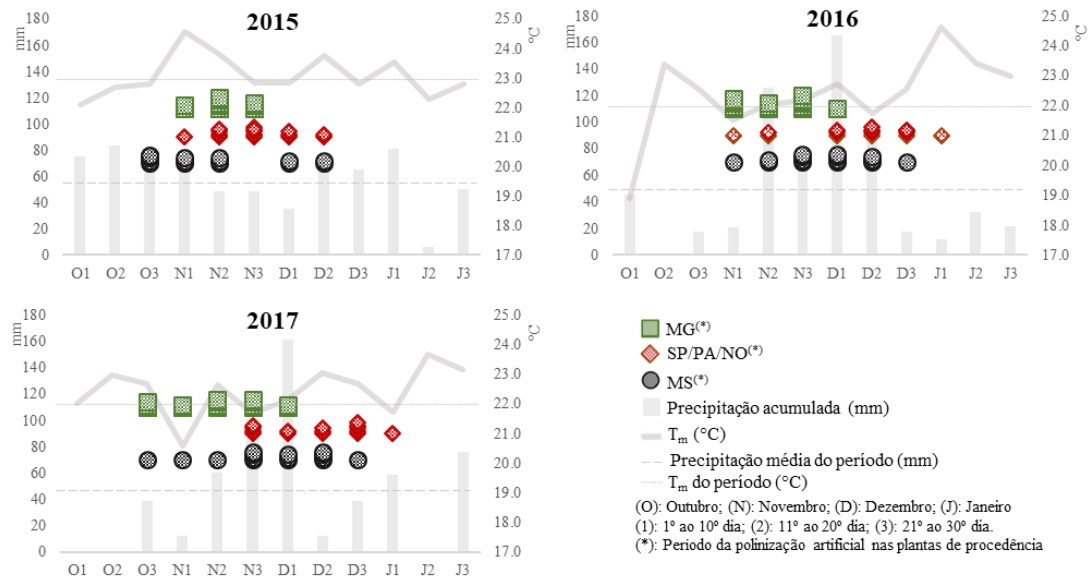


Figura 2. Temperatura média, precipitação acumulada e período de polinização artificial das plantas, de procedências de MG, SP, PA, NO e MS nos anos de 2015 à 2017.

Nas plantas de procedências de MG, as polinizações foram efetuadas em um período compreendido entre final de outubro, no ano de 2017, ao início de dezembro, em 2016. Novembro foi o mês em que a realização da hibridação foi mais frequente, devido a maior disponibilidade de espatas abertas, que foi mais expressiva em 2015, quando a precipitação foi mais uniforme em relação aos outros anos. O mesmo foi notado em plantas de SP, em que as polinizações efetuadas se estenderam de novembro a dezembro, concentradas no mês de novembro. Conforme observações de campo, estas plantas apresentaram ter a abertura espontânea de forma mais abundante em um determinado período.

As plantas do PA e NO se apresentaram mais tardias para a maturação das espatas e conseqüentemente para realização das polinizações, as hibridações realizadas se concentraram no final de novembro e em dezembro, nos anos de 2016 e 2017, coincidindo com a época de maior precipitação. Portanto, é possível que plantas do norte do país sejam mais influenciadas pelo acúmulo de precipitação para ocorrência da abertura das espatas.

Nas plantas de procedências de MS, as polinizações manuais foram iniciadas, com a maturação das espatas, no final de outubro e estenderam se até o fim de dezembro, ocorrendo na mesma época em todos os anos, o que indica que a maturação das espatas das plantas desta procedência é menos influenciada da quantidade de precipitação que as demais.

Todas as hibridações ocorrem no período chuvosa, mas com variações intrínsecas a cada procedência, devido a resposta da interação genótipos por ambientes.

3.2 Quantidade de flores femininas por cacho

Nas plantas, polinizadas em 2016, com produção em 2018, foi observada variação na quantidade de flores femininas produzidas por cacho de cada procedência. As plantas de procedências de PA apresentaram 48% e 41% menos quantidades de flores (484) que nas de plantas de MG e MS, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de flores femininas por cacho, referente ao ano de 2016, em plantas de macaúba de procedências de MG, PA e MS.

Procedência	Produção de flores femininas/cacho (Polinização 2016/Produção 2018)*
PA	484 b
MS	825 a
MG	942 a
CV (%)	29,37

*A frutificação da macaúba é de natureza supra-anual com maturação dos frutos de aproximadamente 14 meses, da polinização à colheita.

3.3 Hibridações, pegamento e produção de frutos – 2015 a 2018

No primeiro ano (2015), as hibridações entre os acessos de SP, MG e MS resultaram em baixo pegamento e, conseqüentemente, em baixa produção de frutos (Figura 3A e B). Nos cruzamentos $SP_{\text{f}} \times SP_{\text{m}}$ e $MS_{\text{f}} \times SP_{\text{m}}$ não houve nenhum pegamento (cachos em escala 0). No cruzamento $MG_{\text{f}} \times MS_{\text{m}}$ e SP_{PAB} obteve-se cachos próximos a escala 2. Nos demais cruzamentos e polinização natural, a taxa de pegamento foi na escala 1.

Pegamento e produção de frutos referentes as hibridações de 2015 a 2017*

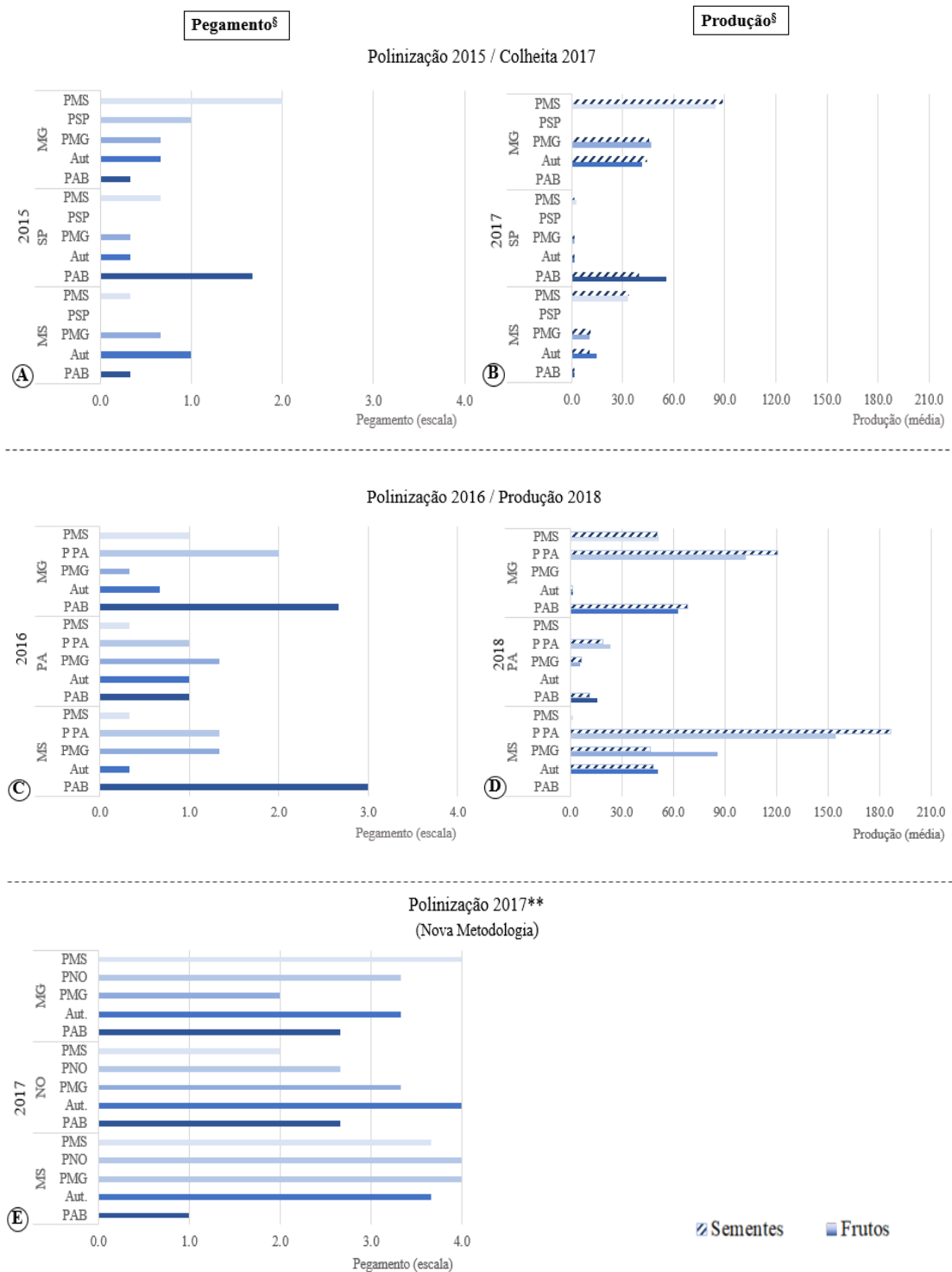


Figura 3. Valores, em média, do pegamento e produção de frutos e sementes provenientes de hibridações entre plantas de procedências distintas e polinização natural nos anos de 2015 a 2018.

*A frutificação da macaúba é supra-anual com maturação dos frutos por aproximadamente 14 meses, da polinização à colheita, variando entre genótipos. **Os valores, em média, da produção de frutos de 2019 não foram apresentados devido os frutos ainda estarem em processo de maturação, com polinização efetuada entre outubro a dezembro de 2017. § Os dados de pegamento de frutos no cacho correspondem a escala: 0 – vazio; 1 – pouco frutos (1 a 25%); 2 – moderado (26 a 50%); 3 – moderado à quase completo (51 a 75%); 4 – cheio (76 a 100%). Os dados de produção correspondem a contagem de frutos e sementes obtidos.

Em geral, houve um elevado abortamento nos primeiros meses após a polinização, que se estendeu de forma decrescente, durante o desenvolvimento dos frutos. Devido a isso, a produção de frutos e obtenção de sementes foi relativamente baixa, com média de 30 frutos (variação de 1 a 90). Entretanto, todos os cruzamentos resultaram em frutos maduros, exceto em $SP_{\text{f}} \times SP_{\text{m}}$, $MS_{\text{f}} \times SP_{\text{m}}$, $MG_{\text{f}} \times SP_{\text{m}}$ e MG_{PAB} . Apesar do alto índice de abortamento, notou-se que plantas de MG obtiveram uma maior produção de frutos que demais plantas de outras regiões (em média 77% maior). Em relação à produção de sementes, as plantas de MS receptoras de pólen de MG e de autofecundação, geraram mais de uma semente por fruto e as demais seguiram o padrão de uma semente por fruto (Figura 3B).

No ano subsequente (2016), nas hibridações entre os acessos de MG, PA e MS, os índices de pegamento e produção continuaram baixos, porém com um visível aumento em relação ao ano anterior (Figura 3C). A utilização dos sacos de organzas somente nos primeiros dias após polinização pode ter interferido para diminuição do abortamento neste ano pela presença de mofo em flores abortadas, devido excesso de umidade e ausência de ventilação. Em todos os cruzamentos e polinização natural houve pegamento nos primeiros meses; e os cachos apresentaram a escala 1. Os cruzamentos $MG_{\text{f}} \times PA_{\text{m}}$, $PA_{\text{f}} \times MG_{\text{m}}$, $PA_{\text{f}} \times MS_{\text{m}}$ e $MS_{\text{f}} \times MG_{\text{m}}$ obtiveram cachos com pegamento na escala 2, seguido das polinizações abertas PA_{PAB} e MS_{PAB} com pegamento, em média, em 50% do cacho (escala 3).

O abortamento de frutos seguiu o mesmo padrão que no ano anterior, ou seja, mais intenso nos primeiros meses após a polinização. A produção de frutos e obtenção de sementes foi ausente nos tratamentos $MG_{\text{f}} \times MG_{\text{m}}$, $PA_{\text{f}} \times MS_{\text{m}}$, $MS_{\text{f}} \times MS_{\text{m}}$; PA_{Aut} e MS_{PAB} . Os demais apresentaram produção com poucos frutos, a exceção dos cruzamentos: $MS_{\text{f}} \times PA_{\text{m}}$, $PA_{\text{f}} \times PA_{\text{m}}$ que apresentaram moderada produção de um cacho (escala 3). Ao contrário, do ano anterior, as plantas com maiores produções de frutos foram as de procedências de MS seguida das de MG. Em relação à produção de sementes, também foi notado que as plantas de procedências de MS e de MG receptoras de pólen de PA e MG_{PAB} , geraram mais de uma semente por fruto (Figura 3D). As plantas de MS apresentaram mais de uma semente por fruto nos dois anos consecutivos de estudo, o que pode indicar ser esta uma característica das plantas desta região.

Com mudança da metodologia de polinização, no ano de 2017, ao contrário dos anos anteriores, observou uma alta taxa de pegamento em todas as modalidades

de hibridação (Figura 3E). Os cruzamentos $MS_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$, $MS_{\text{♀}} \times NO_{\text{♂}}$, $MG_{\text{♀}} \times MS_{\text{♂}}$ apresentaram cachos cheios (escala 4). Ao contrário, o MS_{PAB} apresentou escala 1. Os demais cruzamentos mantiveram pelo menos a metade de frutos aderidos ao cacho, variando da escala 2 a 3. As plantas de MS apresentaram as maiores taxas de pegamento, com todos os cruzamentos dirigidos em escala 4. Em relação aos anos anteriores, o abortamento em 2017 foi menos intenso, em decorrência da nova metodologia aplicada (Figura 3A, 3B e 3E). As plantas do NO apresentaram ataques de praga, o que pode ter induzido o abortamento de alguns frutos nos cruzamentos $MS_{\text{♂}} \times NO_{\text{♀}}$; $NO_{\text{♂}} \times NO_{\text{♀}}$.

Outro fator considerável é o pegamento dos cruzamentos dirigidos apresentar-se superior aos da polinização natural. Os cruzamentos apresentaram de 50 a 100% de pegamento nos cachos, e os de PAB apresentaram, em média, 50% dos cachos (escala 2) (Figura 3E). O protocolo de polinização com a abertura precoce da espata garantiu um maior sucesso de polinização e fertilização para fins das etapas de hibridações importantes para o programa de melhoramento.

3.4 Análises histoquímicas das flores femininas na abertura manual e natural da espata

A análise histoquímica para presença de carboidratos (PAS) e compostos fenólicos solúveis de acordo com a reação diferenciada com os compostos celulares e o azul de toluidina evidenciou a presença destes compostos nas flores femininas de todas as procedências, porém com diferença na estrutura celular dos tipos de abertura da espata (Figura 4).

Na abertura natural das espatas de todas as procedências, as flores femininas apresentaram células de idioblastos com maior degradação do conteúdo (Figura 4C e 4E). O citoplasma se mostrou com conteúdo menos denso e com precipitação ao redor das ráfides, observando haver um consumo de carboidrato nas flores de abertura natural (Figura 4E). Em uma mesma amplitude, as flores femininas de abertura manual apresentaram células de idioblastos com conteúdo denso e células subdivididas, fatores que podem contribuir para o maior pegamento dos frutos (Figura 4F). Em relação aos compostos fenólicos, as flores de abertura natural apresentaram mais células com conteúdo fenólicos solúveis, sendo mais localizada na região dos estames (região 1) e diminuindo a intensidade para regiões mais

internas das flores femininas (região 2 e 3a) (Figura 4G e 4H). Entretanto, as flores de abertura manual apresentaram menos células onde foi evidenciada a presença de compostos fenólicos (Figura 4I e 4J).

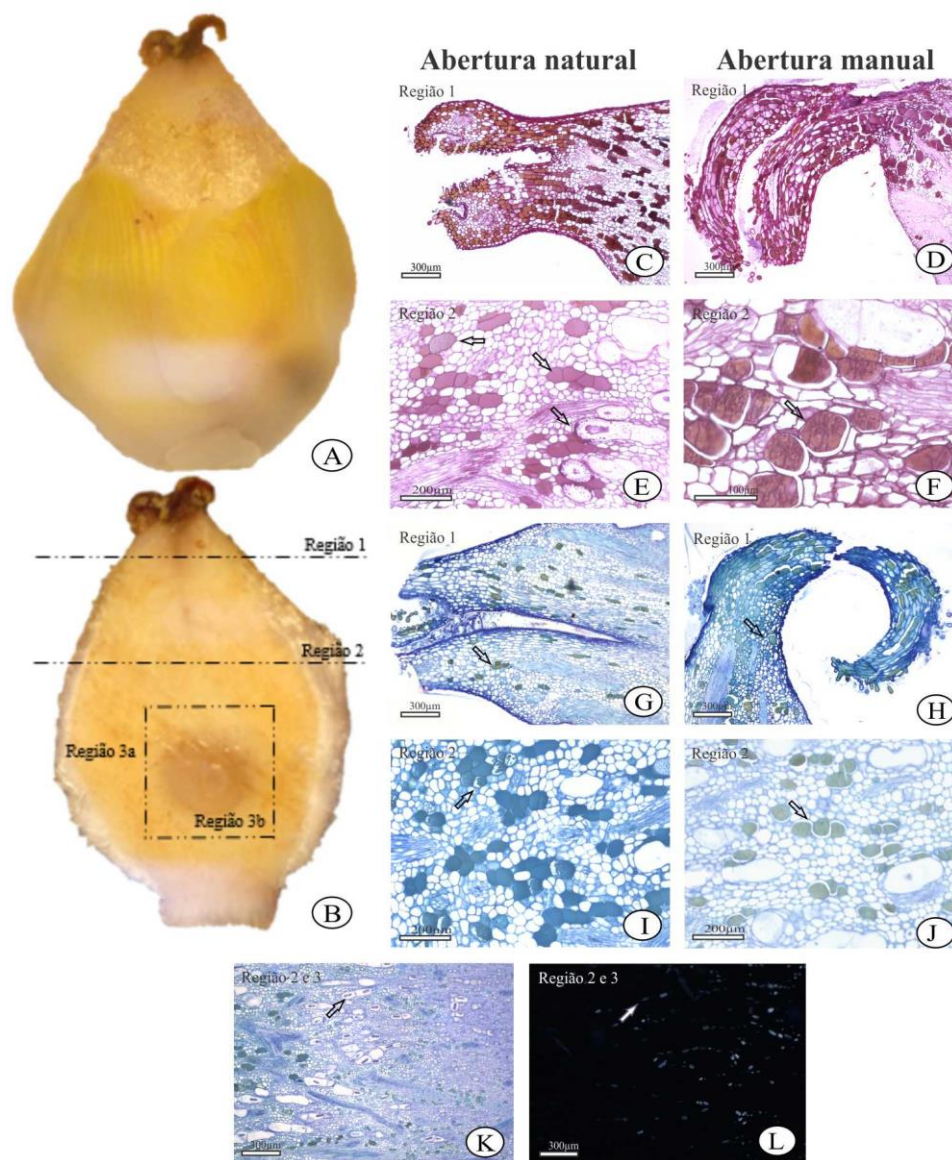


Figura 4. Caracterização histoquímica das flores femininas coletadas no dia da abertura artificial e natural das espatas de macaúba. (A) flor feminina de macaúba; (B) flor feminina seccionada na vertical e repartição da localização das diferentes regiões da flor; (C e D) região 1 da flor referente ao teste para carboidrato; (E e F) região 2 da flor referente ao teste para carboidrato; (G e H) região 1 da flor referente ao teste para fenólicos solúveis; (I e J) região 2 da flor referente ao teste para composto fenólico; (K e L) região 2 e 3 corado com azul de toluidina . As imagens (C, D, E e F), mostram resultado positivo para presença de carboidrato pelo reagente PAS, as setas indicam a diferença na estruturação do idioblasto e na precipitação de conteúdo entre abertura manual e natural. As imagens (G, H, I e J), mostram resultado positivo para presença de compostos fenólicos pelo reagente azul de toluidina, indicados pela seta preta. As imagens (K e L) mostram presença de ráfides em luz normal e polarizada, respectivamente.

Idioblastos contendo ráfides foram observadas em ambas aberturas de todas as procedências, em maior abundância na região 2 (Figura 2K e 2L). Em todas as procedências, em ambos tipos de abertura da espata, não houve diferença visual quanto a mucilagem e presença de cristais. Entretanto, as flores da região NO, mostraram presença de maior número de vacúolos e feixes vasculares que as demais. Na análise histoquímica, observou-se reação negativa para presença de proteínas, lipídeos e amidos nas flores de ambos tipos de abertura da espata.

3.5 Variabilidade das sementes

As sementes oriundas das produções de frutos das safras 2016/2017 e 2017/2018, apresentaram variabilidade morfológica quanto aos cruzamentos realizados e polinização natural, conforme visto nas figuras 5 e 6. As características das sementes provenientes dos cruzamentos se diferiram em relação à procedência geográfica do genitor feminino. De acordo com análise multivariada realizada, foram gerados dois componentes principais (fator 1 e fator 2), formando dois grupos distintos em relação às características analisadas (Figura 5). Um dos grupos se caracterizou por apresentar sementes de maior tamanho, coloração clara e superfície lisa. Este foi composto pelos cruzamentos $PA_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$, $PA_{\text{♀}} \times PA_{\text{♂}}$, $MG_{\text{♀}} \times PA_{\text{♂}}$, $MG_{\text{♀}} \times MS_{\text{♂}}$, a autofecundação MG_{Aut} , e a polinização natural MG_{PAB} e PA_{PAB} . O outro grupo apresentou sementes menores, coloração escura e aspecto rugoso, e foi formado pelos cruzamentos $MS_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$, $MS_{\text{♀}} \times MS_{\text{♂}}$, a autofecundação MS_{Aut} e polinização natural MS_{PAB} , com predominância dos com genitores femininos de MS. Os demais cruzamentos $SP_{\text{♀}} \times SP_{\text{♂}}$, $SP_{\text{♀}} \times MS_{\text{♂}}$, $SP_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$, $MG_{\text{♀}} \times MG_{\text{♂}}$, $MS_{\text{♀}} \times PA_{\text{♂}}$ apresentaram características intermediárias entre os dois grupos com plantas de procedências de MG, PA e MS. Os cruzamentos recíprocos entre MG e PA apresentaram características morfológicas semelhantes, exceto a tonalidade da coloração (Figura 6), em decorrência das características dos genitores femininos.

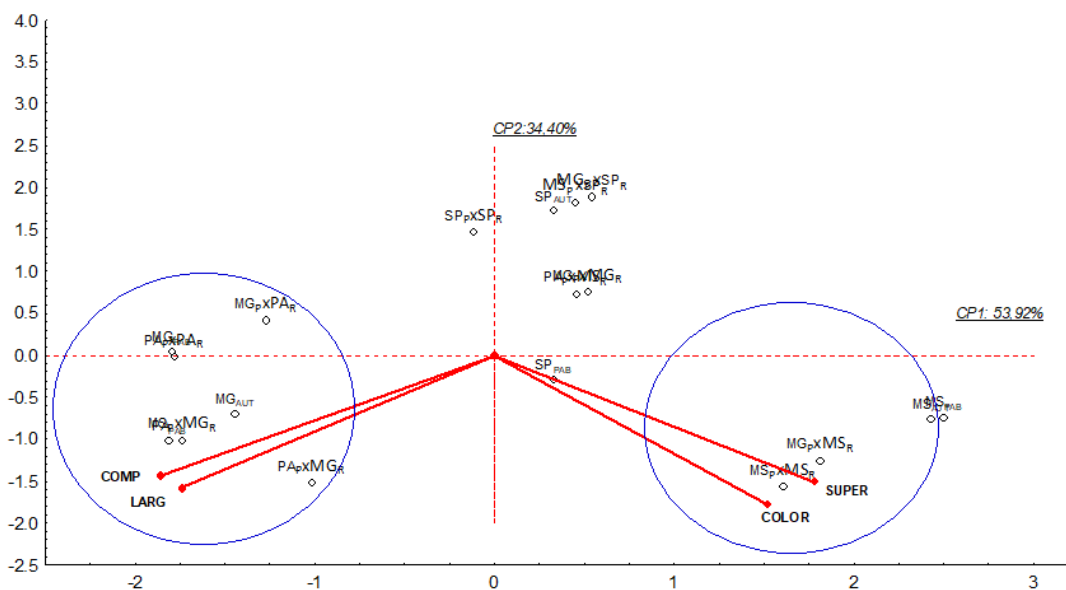


Figura 5. Análise multivariada usando componentes principais, com formação de dois grupos distintos mostrando variabilidade das sementes quanto ao tipo de cruzamento.

*COM: comprimento; LARG: largura; SUPER: superfície; COLOR: coloração; r: genitor feminino – receptor de pólen; d: genitor masculino – doador de pólen.

4. Discussão

Dentre as pesquisas abordadas no BAG - Macaúba/UFV, destaca-se o pioneirismo de abordagem da avaliação da compatibilidade entre cruzamentos de plantas de procedências distintas e fenotipicamente contrastantes. As hibridações entre famílias de meios-irmãos provenientes de regiões de MG, MS, NO, PA e SP se destacaram com resultados positivos e com presença de variabilidade entre as sementes. A abertura manual da espata, no momento da polinização, favoreceu o pegamento de frutos, com presença de flores femininas viáveis e melhores desenvolvidas quanto ao conteúdo celular em nível anatômico.

No período de realização das polinizações observou um padrão de maturação e abertura espontânea das espatas de cada procedência, que se sobrepõe em um mesmo período

Sementes provenientes das polinizações de 2015 / produção 2017

BGP 47 - BGP 50 - BGP 115



Sementes provenientes das polinizações de 2016 / produção 2018

BGP 69 - BGP 99 - BGP 117

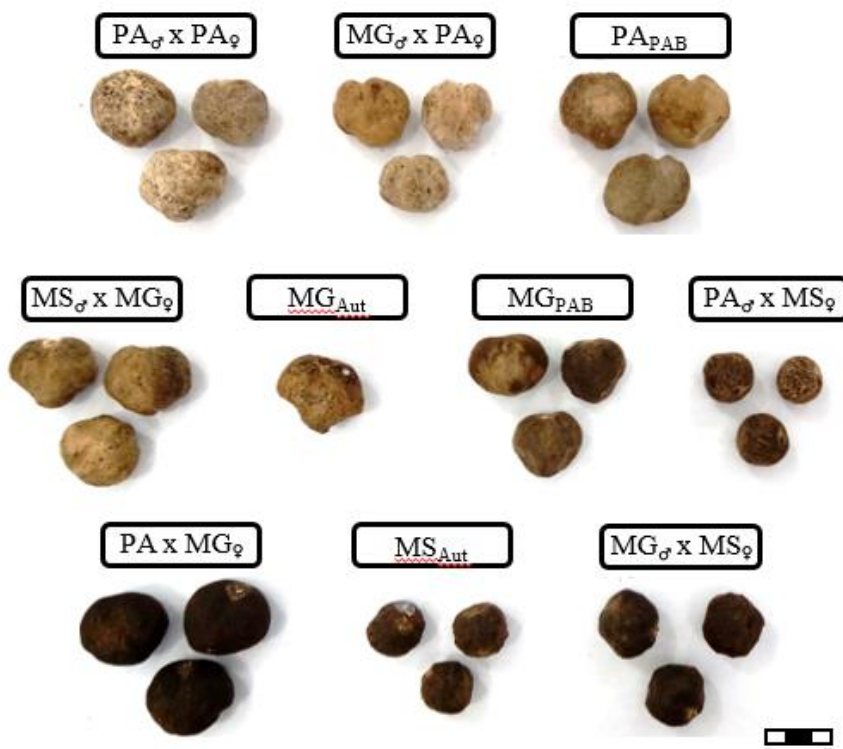


Figura 6. Sementes provenientes de cruzamentos entre plantas de macaúba de procedências distintas com polinização em 2015 e 2016, respectivamente. Escala: 0.75:15 cm.

O planejamento das hibridações demanda o conhecimento da época de floração para sincronização da polinização dos genitores. Brito (2013) demonstrou a influência da abertura de espatas da macaúba com início da estação chuvosa em populações naturais de Acaiaca/MG. O mesmo foi observado nos genitores em estudo, que demonstraram que a abertura dos cachos é influenciada por fatores ambientais de precipitação e temperatura. As polinizações manuais se iniciaram com a maturação e abertura das espatas de cada acesso. Entretanto, em todos os anos, notou-se a existência de um padrão do período de espatas aptas para polinização, que é intrínseco para cada acesso de uma região, além da sobreposição dos mesmos em determinado período.

A porcentagem de cruzamentos bem-sucedidos em plantas cultivadas varia grandemente em função das condições ambientais (Sedyama et al., 1986). Em termos de melhoramento, as observações deste período de abertura de espatas característicos para plantas de procedências distintas relacionados com condições edafoclimáticas são efetivas na hibridação. Em um estudo com *A. aculeata* (macaúba), as primeiras inflorescências abertas naturalmente apresentaram abortamento quando havia menores precipitações e ressaltou uma correlação entre o pico de floração com a produção de frutos em períodos com maiores volumes de chuva (Scariot et al., 1995). Dessa forma, o conhecimento do padrão de florescimento dos genótipos se apresenta também relevante para eficiência da polinização. Isso pode garantir a produção de quantidades de sementes necessárias para métodos de melhoramento, como o de seleção massal, que requer populações iniciais com maiores números de indivíduos.

Estes dados indicam a ocorrência de um padrão para abertura espontânea das espatas de acessos de regiões distintas. Isto permite um planejamento para realizar a coleta de pólen e a sincronização dos cruzamentos entre regiões distintas, correlacionando com fatores edafoclimáticos do local.

Aspectos sobre o pegamento e produção de frutos que evidenciam nível de compatibilidade e comportamento dos cruzamentos dirigidos e autofecundações

Nos dois primeiros anos de avaliação da compatibilidade de cruzamentos e autofecundação, foi constatado um elevado abortamento dos frutos. A maior intensidade do abortamento ocorreu nos primeiros meses após a fecundação, se

estendendo em menor grau até o final da maturação dos frutos. Com produção de no máximo 80 frutos ($MS_{\sigma} \times MG_{\varphi}$) em 2015 e de 150 frutos ($PA_{\sigma} \times MS_{\varphi}$) em 2016.

As hibridações que envolviam plantas de SP, tanto como receptora ou doadora de pólen, tiveram as mais baixas produções de frutos entre os demais. Essas plantas se mostraram menos receptivas quando houve a polinização manual, com abortamento gradual de frutos e baixa produção; do que na polinização aberta (PAB) que apresentou 90% a mais de frutos que os demais cruzamentos. O abortamento de frutos nos dois primeiros meses após a fecundação também foi relatado em plantas de SP polinizadas com pólenes de SP, MG e autofecundação por Berton et al. (2017).

Contudo, todos os cruzamentos com genitor masculino de SP não apresentaram produção de frutos. As plantas de SP demonstraram níveis de genoma misto das plantas de procedências de MG (*Acrocomia aculeata*) e das de MS (*A. totai*), aceitando a existência destas como duas espécies de macaúba (Abreu et al. 2012, Lanes et al., 2015). As plantas de procedências de SP são vistas como híbrido natural entre procedências de MG e SP, por apresentarem genoma misto e características fenotípicas das duas procedências. Uma hipótese deste estudo é que o resultado do abortamento expressivo em plantas de SP quando cruzados com plantas de MG e MS, pode ter ocorrido como um efeito de depressão endogamia ou incompatibilidade por convergência de genes com ancestrais em comum. Além disso, autofecundação nas plantas de SP gerou sementes F_1 , porém este estudo indica a avaliação a nível molecular para verificar a autenticidade da autofecundação, mesmo que as sementes F_1 apresentaram características intermediárias entre as oriundas de plantas de SP e MG.

As plantas de MG, em 2015, ao contrário das de SP, não obtiveram produção de frutos na PAB, porém foram as mais receptivas ao pólen de MS, MG e autopolinização, com maiores produções em comparação aos demais. No ano seguinte, também se mostraram receptivas para os PMS e PNO, com produção média de 50 e 100 frutos, respectivamente. No entanto, em 2016, por motivo desconhecido houve abortamento total dos cruzamentos $MG_{\varphi} \times MG_{\sigma}$ e MG_{Aut} , que se estendeu ao longo dos meses de maturação, mas de forma mais acentuada no início. Na produção de 2017, exceto em $MG_{\varphi} \times MG_{\sigma}$ e MG_{Aut} , todos os outros cachos polinizados com pólen de MG apresentaram frutos maduros. Em análise de todas as hibridações, os cruzamentos que envolveram plantas de MG tiveram um comportamento positivo, tanto como receptivas ou doadoras de pólen para acessos de outras regiões. Contudo,

em comparação, as produções de frutos foram maiores em plantas de MG receptoras de pólen, indicando-as como bons genitores femininos.

Porém, os cruzamentos que mais se destacaram como compatíveis foram os que envolviam plantas de MS. Estas se mostraram receptivas quanto aos pólenes de outras regiões e autofecundação, mas teve insucesso quanto ao recebimento de pólen de SP, em 2015, MS e polinização aberta, em 2016. Em relação aos cruzamentos em que foi doadora de pólen, somente no $PA_{\text{♀}} \times MS_{\text{♂}}$ não houve nenhuma produção de frutos, no entanto, apresentaram maior abortamento nas PAB. Nos três anos consecutivos as PAB das plantas de MS apresentaram baixo pegamento e produção nas polinizações abertas comparadas com os manuais. Resultados semelhantes foram descritos por Brito (2013) que demonstraram que os polinizadores foram ineficientes se comparados as frutificações obtidas na polinização aberta e a manual feita em macaúba. Em observação de campo, notou-se que as plantas de MS apresentaram produção bem menor de pólen que as de outras procedências.

A diferença da queda de frutos entre o pegamento e a colheita foi mais exacerbada nas plantas de procedência de PA. Estas apresentaram produção somente para os cruzamentos com pólenes de MG, PA e na PAB. A qual comprova as plantas de MG como bons genitores masculinos. Nos dois últimos anos, houve presença de pragas nas plantas do NO e PA que podem ter interferido na queda de frutos. Contudo, os cruzamentos PPA foram os que obtiveram as maiores produções de frutos em relação a todos os outros, em 2017. As plantas de outras procedências se apresentaram altamente receptivas ao pólen proveniente de plantas do PA.

A intensidade de abortamento de frutos já vem sendo relatada em trabalhos anteriores. Na década de 90, a correlação de floração, frutificação e abortamento em macaúba sugeriram várias causas para o abortamento, entre elas a forte influência de fatores abióticos, porém nada conclusivo (Scariot et al., 1995). Já nos últimos anos, as pesquisas mais recentes no BAG - Macaúba/UFV, também fazem referência a elevada taxa de abortamento precoce de frutos como um dos motivos pelo baixo número de descendentes por autopolinização observado ($\hat{s} < 5\%$), podendo a carga mutacional e a presença de depressão endogâmica serem uma das razões (Lanes et al., 2016; Simiquele et al., 2018).

A diferença de pegamento dos mesmos cruzamentos entre os dois primeiros anos de cruzamentos destes estudos, pode ser devido a uma autoincompatibilidade parcial, causa nutricional, fisiológica ou até mesmo a ocorrência de uma forte chuva

que pode ter favorecido a queda de frutos recém-formados (Figura 3). Porém, a perda de viabilidade floral também é uma explicação plausível para o abortamento de flores e possivelmente de frutos, conforme visto na diferença entre a metodologia de polinização aplicadas e nas análises histoquímicas entre flores femininas de aberturas manual e natural (Figura 1 e 4).

Implicações da abertura manual da espata na receptividade da flor feminina no momento da polinização, e no aumento do pegamento no último ano de hibridação

Com a aplicação da nova metodologia de polinização artificial com abertura precoce da espata, em 2017, todos os cruzamentos mostraram altos índices de pegamento (~85%), indicando uma compatibilidade entre as plantas de macaúba de diferentes procedências. Inclusive, revelando a possível viabilidade da autofecundação. Estes resultados permitem inferir que o abortamento de frutos observado por vários pesquisadores, também pode ser influenciado pelo desenvolvimento floral, relacionado a receptividade e o conteúdo celular da flor feminina no momento da polinização.

As flores pistiladas receptivas possuem estigmas secretores, rosados e papilosos, e em até três dias estes já se encontram secos e escurecidos, indicando o término da receptividade da flor (Mazzottini-dos-Santos et al., 2015). Em plantas de MG, a viabilidade da flor feminina tem durabilidade aproximada de um dia após abertura natural da espata (Brito, 2013). Contudo, a abertura antecipada da espata, mostrou que a receptividade da flor feminina, das procedências de MG, MS e região NO, antecede a abertura natural da bráctea. Assim o abortamento natural pode estar mais fortemente ligado a outros fatores do que ao de incompatibilidade genética. As diferenças de padrões temporais no abortamento, em *A. aculeata*, entre áreas semelhantes sugere uma forte influência de fatores abióticos (Scariot, 1995); ou associadas a baixa presença de polinizadores quando comparando com polinização artificial (Brito, 2013).

A abertura manual da espata para polinização evidenciou uma flor feminina com menores quantidades de compostos fenólicos e idioblastos contendo vacúolos mais desenvolvidos e menores precipitações do conteúdo. A presença de compostos fenólicos foi mais abundante na região do estigma para a parte externa do mesocarpo da flor na abertura natural. O acúmulo de idioblastos fenólicos no estigma e na região

conectiva da flor (estigma – ovário) com presença de idioblastos com ráfides na flor de macaúba também foram relatados por Mazzottini-dos-Santos et al. (2015). A presença de compostos fenólicos é geralmente associada à proteção contra-ataques de pragas e doenças (Askgaard et al., 2008). Entretanto, a presença de conteúdos fenólicos solúveis pode também sinalizar a degradação de células. No caso, a abundância de fenólicos solúveis pode ter tido influência na receptividade da flor macaúba, visto que a maior taxa de pegamento foi observada na abertura manual em flores com menores concentrações de fenólicos. Já os idioblastos possuem função de armazenamento de substâncias e produção de energia para planta, com ocorrência próximo aos feixes vasculares, como exemplo os idioblastos com ráfides (Fahn, 1979). Na flor da macaúba observou-se a presença de grande quantidade de idioblastos com ráfides em ambas os tipos de abertura, em algumas partes da flor de ambos os tipos de abertura da espata. Ao oposto, as flores de abertura natural apresentaram precipitação do conteúdo dos idioblastos, o que indica que estas já estavam degradando o conteúdo armazenados para o metabolismo da flor. Esses dados reforçaram o pegamento significativo em espatas com abertura artificial em comparação aos outros anos em que o rompimento da espata ocorreu de forma natural para polinização.

Um outro motivo para elevada taxa de abortamento encontrada nos primeiros anos de hibridação pode ser a quantidade de produção de flores femininas por cacho - variação de 51% entre plantas das procedências de MS (484) e MG (942). Esta alta quantidade de flores femininas em um cacho pode indicar haver também um processo natural de abortamento, como uma estratégia pela planta para suporte nutricional dos frutos. Em macaúba, Scariot et al. (1995) também relataram que o número de flores femininas produzidas é maior que o número de frutos produzidos, e pode indicar um mecanismo para permitir o aborto seletivo em plantas macaúba.

Logo, o sucesso de uma hibridação está associado a vários fatores, como a ausência de problemas no sistema reprodutivo, decorrente de barreiras de pré e pós-fertilização, tais como a falta de germinação do grão de pólen, o retardamento ou inibição do crescimento do tubo polínico, a morte do embrião devido à degeneração do endosperma, e a esterilidade total ou parcial das plantas híbridas (Pereira et al., 2010).

Plantas fenotipicamente contrastantes e de procedência distintas geram variabilidade que pode ser explorada por cruzamentos dirigidos

O contraste dos fenótipos de genitores pode indicar possível formação de grupos distintos. A formação desses grupos semelhantes entre si e contrastante entre eles, pode resultar em F₁ com possível efeito de heterose. Com o resultado da compatibilidade positiva entre regiões de MG, NO e MS (~85%) e autofecundação (~77%), recomenda-se estudos de diversidade dos híbridos F₁ e da geração de autofecundações para confirmação destes possíveis grupos. Os cruzamentos entre plantas divergentes, em plantas alógamas com base ampla, como o caso da macaúba, pode gerar segregação e obtenção de indivíduos heterozigóticos. Essa variação existente pode ser herdável e agregar ganhos genéticos para características agronomicamente importantes, assim como, aumentar a variabilidade. Variações quanto a fenologia, crescimento vegetativo indicaram também a existência de variação genética entre populações de diferentes procedências em *Cordia africana* (Loha et al., 2003).

As sementes de macaúba obtidas das hibridações apresentaram variabilidade genética com características semelhantes as plantas maternas de cada procedência. Em *Cordia africana*, 71 a 98% da variação total foi atribuída à variação da origem, indicado herdabilidade do sentindo amplo (Loha et al., 2006).

O efeito da variação intraespecífica nas sementes pode ser explicado por várias razões. Entre elas, esse efeito pode ser atribuído pela qualidade e quantidade dos recursos disponíveis no ambiente da planta materna, e/ou pela maior parte do material genético e do endosperma serem de maior parte de herança materna (Charnov, 1979; Bawa e Webb, 1984; Niesenbaum, 1999). Os cruzamentos dentro e entre espécies, particularmente no milho e *Arabidopsis*, possui um equilíbrio entre os genomas maternos e paternos, na proporção de 2:1 na formação do endosperma, necessário para viabilidade das sementes (Gehring et al., 2004). Logo, a complementação entre os genótipos materno e paterno determina o resultado das características de cada semente (Waser et al., 1987). Fator importante nos cruzamentos dirigidos de genitores divergentes. Entretanto, quando a polinização envolve mistura de pólen, ou seja, mais de um genitor masculino, surge competição: na distribuição dos recursos maternos durante formação do endosperma e embriões; diferentes velocidades de crescimento do tubo polínico e/ou habilidade para

fertilização, os quais são vistos como rivalidade entre irmãos podendo causar variação nos fenótipos das sementes (Marshall e Folsom, 1991; Mock e Parker, 1997). Segundo a hipótese da teoria do conflito parental, os fenótipos de sementes recíprocas são resultado de um conflito entre os interesses paternos e descendentes sobre a alocação de recursos maternos. Esta teoria se fundamenta que a parte materna tentará distribuir recursos nutricionais igualmente, já a parte paterna tentará direcionar a quantidade máxima de recursos maternos para seus filhos (Gehring et al., 2004).

A produção da quantidade de sementes por frutos em macaúba também indicou estar relacionada à procedência das plantas. Os cruzamentos com plantas de PA e MS apresentaram mais de uma semente por fruto, se diferenciando dos demais. A macaúba tem capacidade para fertilização para três óvulos, no entanto quando um deles não é fertilizado ocorre degeneração precoce em torno de treze dias (Mazzottini-dos-Santos et al., 2015). Cruzamentos interespecíficos em famílias de angiospermas mostraram que a disfunção dos endospermas é a principal razão para a incompatibilidade híbrida, levando a morte de um dos embriões (Brink & Cooper, 1947). A quantidade de semente por fruto pode influenciar na redução das polinizações manuais requeridas para atingir o tamanho efetivo de populações em etapas de métodos de melhoramento.

A variabilidade observada nas sementes pode favorecer a formação de grupos heteróticos. As sementes oriundas de plantas mães de MS se apresentaram contrastantes quanto as características morfológicas das sementes do PA e MG, sendo inversamente proporcionais quanto ao tamanho, coloração e superfície. Já as sementes de SP apresentaram características mescladas de ambas famílias. Como foi citado, as plantas de SP possuem genoma misto com ascendência em plantas de MG e MS (Lanes et al., 2016). A variação em tamanhos de sementes tem efeito genético (Temme, 1986). Variações morfológicas também foram observadas em sementes oriundas de populações de procedências diferentes de *C. africana* e de *Alliaria petiolata* que apresentaram variações nas características morfométricas (Loha et al., 2006; Susko et al., 2000). As sementes de *A. petiolata*, também apresentaram variação de 2,5 a 7,5 vezes em tamanhos e número de dias da germinação de sementes resultantes das diferenças entre as plantas maternas (Susko et al., 2000).

Considerações sobre os cruzamentos dirigidos entre plantas fenotipicamente contrastantes de procedência distinta de MG, MS e SP-PA-NO

Os cruzamentos de plantas fenotipicamente contrastantes de procedência distintas apresentaram avanços no melhoramento da macaúba quanto ao comportamento das hibridações. No último ano, as plantas de MS se destacaram, sendo as mais efetivas para pegamento de frutos. Em geral, as plantas de procedência de MS e MG se mostraram melhores genitoras femininas, ou seja, receptoras de pólen, conseqüentemente, com maiores produções de frutos. Contudo, as procedências do PA e região NO se destacaram como genitores masculinos, com melhores resultados como doadoras de pólen para MG e MS. Todos as hibridações que obtiveram sucesso, apresentaram na geração das sementes F₁, variabilidade nas características qualitativas e quantitativas. As sementes, assim como as plantas mães, apresentaram características contrastantes.

Devido à grande diversidade fenotípica da macaúba, ainda não há consenso sobre a identidade taxonômica da macaúba (Lima et al., 2018). Nos institutos botânicos ainda falta uma classificação taxonômica definitiva para a macaúba, para esclarecer se os fenótipos são ecótipos, subespécies ou espécies diferentes da *Acrocomia*. Apesar desta divergência de identificação e classificação taxonômica, este trabalho evidenciou que apesar da existência de características fenotípicas próprias de cada região estudada, as plantas de diferentes regiões produziram progênies com sucesso.

5. Conclusões

Este trabalho evidenciou que mesmo com a divergência na identificação, classificação taxonômica da macaúba, a hibridação entre plantas fenotipicamente contrastantes e de procedências distintas produziram progênies com sucesso.

Os cruzamentos dirigidos entre plantas contrastantes de regiões distintas indicaram o sucesso na compatibilidade das hibridações mediante a nova metodologia de polinização. A autofecundação manual pareceu ser possível. Entretanto, recomenda a confirmação de autofecundação mediante análise molecular dos mesmos e a complementação dos dados de produção de frutos e sementes do último ano de hibridação.

A nova metodologia de abertura artificial e antecipada de espata é efetiva para o sucesso das hibridações e é indicada para os processos de polinização dentro do programa de melhoramento da macaúba. As características histoquímicas dos tecidos de flores femininas confirmaram a viabilidade das flores na abertura manual.

Há variabilidade nas sementes em função dos cruzamentos, que pode ser explorada no programa de melhoramento. As características das sementes são fortemente ligadas as características do genitor feminino de cada procedência.

6. Referências Bibliográficas

- ABREU, A.G.; PRIOLLI, R.H.G.; AZEVEDO-FILHO, J.A.; NUCCI, S.M.; ZUCCHI, M.I.; COELHO, R.M.; COLOMBO, C.A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Genet Mol Biol.** 35:119–121. 2012.
- BANDEIRA, J.M.; THUROW, L.B.; PETERS, J.A.; RASEIRA, M.C.B.; BIANCHI, V.J. Caracterização fisiológica da compatibilidade reprodutiva de ameixeira-japonesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 860-867, 2011.
- BERTON, L.H.C.; CARVALHO, F.D.M.; AZEVEDO, J.A.F.; SALVADOR, L.F.; COLOMBO, C.A. Cruzamento dirigido em macaúba – *Acrocomia aculeata*. Anais do congresso: 9º CBMP. 2017.
- BRINK, R.A., COOPER, C. The endosperm in seed development. **Bot. Rev.** 13:423-542. 1947.
- BRITO, A.C. Biologia reprodutiva de macaúba: floração, polinizadores, frutificação e conservação de pólen. **Tese**. UFV, Viçosa. 2013.
- BULLOCK, S.H. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. **Biotropica** 17:287–301. 1985.
- BAWA, K.S., WEBB, C.J. Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. **Am. J. Bot.** 71, 736–751. 1984.
- CARDOSO, A.; LAVIOLA, B.G.; SANTOS, G.S.; SOUSA, H.U.; OLIVEIRA, H.B.; VERAS, L.C.; CIANNELLA, R.; FAVAROA, S.P. Opportunities and challenges for sustainable production of *A. aculeata* through agroforestry systems. **Industrial Crops & Products.** 107: 573–580. 2017.
- CÉSAR, A.S., ALMEIDA, F.A., DESOUSA, R.P., SILVA, G.C., ATABANI, A.E. The prospects of using *Acrocomia aculeata* (macaéba) a non-edible biodiesel feedstock in Brazil. **Renew. Sustain. Energy Rev.** 49, 1213–1220 Golden. 2015.
- CICONINI, G., FAVARO, S.P., ROSCOE, R., MIRANDA, C.H.B., TAPETI, C.F., MIYAHIRA, M.A.M., BEARARI, L., GALVANI, F., BORSATO, A.V., COLNAGO, L.A., NAKA, M.H. Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ind Crop Prod.** 45:208–214. 2013.
- CHARNOV, E.L. Simultaneous hermaphroditism and sexual selection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76, 2480–2484. 1979.
- COSTA, A.M.; MOTOIKE, S.Y.; CORREA, T.R.; SILVA, T.C.; COSER, S.M.; RESENDE, D.V.; TEOFILO, R.F. Genetic parameters and selection of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) accessions: an alternative crop for biofuels. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 18: 259-266, 2018.

- FALCONER, D.S. **Introdução a genética quantitativa**. Viçosa, MG: UFV, 279p. (3ªed). 1989.
- FAHN, A. *Secretory Tissues in Plants*. London: Academic Press Inc. **Fisher DB**. 1979.
- GEHRING, M.; CHOI, Y.; FISCHER, R.L. Imprinting and seed development. **The Plant Cell**, Vol. 16, S203–S213. 2004.
- GOVINDARAJ, M., VETRIVENTHAN, M., SRINIVASAN, M., GOVINDARAJ, M., VETRIVENTHAN, M., SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. **Genet. Res. Int.**, 2015(Figure 1):1–14. 2015.
- HENDERSON, A., GALEANO, G., BERNAL, G. *Field Guide to Palm of the Americas*. **New Jersey**: Princeton University, p.166-167. 1995.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. *Sistemática Vegetal. Um enfoque filogenético*. **Artmed**, 632p. 2009.
- JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc. 523p. 1940.
- LANES, E.C.M. Variabilidade molecular e sistema de reprodução de macaúba (*Acrocomia aculeata*) / **Tese**. Viçosa, MG, 2014.
- LANES, E.C.M., MOTOIKE, S.Y., KUKI, K.N., NICK, C., FREITAS, R.D. Molecular characterization and population structure of the macaw palm, *Acrocomia aculeata* (Arecaceae), ex situ germplasm collection using microsatellites markers. **J. Hered.** 1, 1-11. 2015.
- LANES, E.C.M., MOTOIKE, S.Y., KUKI, K.N., RESENDE, M.D.V., CAIXETA, E.T. Mating system and genetic composition of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*): implications for breeding and genetic conservation programs. **J. Hered.** 107, 527–536. 2016.
- LIMA, N.E.; CARVALHO, A.A.; MEEROW, A.W., MANFRINI, M.H. A review of the palm genus *Acrocomia*: Neotropical green gold. **Organisms Diversity & Evolution**. 18:151–161. 2018.
- LOHA, A., TIGABU, M., TEKETAY, D., LUNDKVIST, K., FRIES, A. Provenance variation in seed morphometric traits, germination, and seedling growth of *Cordia africana* Lam. **New Forests**, 32:71–86. 2006.
- LORENZI, G.M.A.C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. – *Arecaceae*: bases para o desenvolvimento sustentável. **Tese** (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná. 2006.

MAPA, 2015. **Anuário estatístico da agroenergia**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 2015.

MARSHALL, D.L., FOLSOM, M.W. (1991) Mate choice in plants: an anatomical to population perspective. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22, 37–63.

MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H.C.; RIBEIRO, L.M.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F. Floral structure in *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): evolutionary and ecological aspects **Plant Syst Evol** 301:1425–1440. 2015.

MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H.C.; RIBEIRO, L.M.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F. Ontogenesis of the pseudomonomerous fruits of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): a new approach to the development of pyrenarium fruits. **Trees.** 29:199–214. 2015.

MOCK, D.W, PARKER, G.A. The evolution of sibling rivalry. In R.M. May and P.H. Harvey (eds). **Oxford Series in Ecology and Evolution**, Oxford University Press, Oxford. 1997.

MOTOIKE, S.Y., CARVALHO, M.C., PIMENTEL, L.D., KUKI, K.N., PAES, J.M.V., DIAS, H.C.T., SATO, A.Y. A cultura da macaúba: implantação e manejo de cultivos racionais. **Editora UFV**, Viçosa-MG 61 p. 2013.

MOTOIKE, S.; KUKI, K. The potential of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) as source of biodiesel in Brazil. **International Review of Chemical Engineering** 1: 632-635. 2009.

NAVARRO-DIAZ, H.J., GONZALEZ, S.L., IRIGARAY, B., VIEITEZ, I., JACHMANIAN, I., HENSE, H., OLIVEIRA, J.V. Macauba oil as an alternative feedstock for biodiesel: characterization and ester conversion by the supercritical method. **J. Supercrit. Fluids Amst.** 93, 130–137. 2014.

NIESENBAUM, R.A. The effect of pollen load size and donor diversity on pollen performance, selective abortion, and progeny vigor in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). **Am. J. Bot.** 86, 261–268. 1999.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue **O. Protoplasma** 59, 367-373. 1964.

PADILHA, J.H.D.; RIBAS, L.L.F.; AMANO, E.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq. (Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. **Acta Botanica brasílica**. Pg. 516-523. 2015.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. Vol.2' 3^a ed. (The Williams & Wilkins Company: Baltimore). 1972.

PEREIRA, R.B.; SILVA, G.O.; PINHEIRO, J.B.; CARVALHO, A.D.F.; VIEIRA, J.V. Herdabilidade e resposta à seleção para peso de raízes e tolerância a queima-das-

folhas em populações de cenoura. Brasília, DF: Embrapa (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Hortaliças; 81), ISSN 1677-2229, 17p., 2010.

PIRES, T.P., SOUZA, E.S., KUKI, K.N., MOTOIKE, S.Y. Ecophysiological traits of the macaw palm: A contribution towards the domestication of a novel oil crop. **Ind Crop Prod.** 44:200–210. 2012.

RUEDA, R.A.P. Avaliação de germoplasma para melhoramento e a conservação da macaúba. **Tese.** Viçosa, MG, 2014.

SEDIYAMA, T.; ALMEIDA, L.A.; MIYASAKA, S.; KIIHL, R.A.S. Genética e melhoramento. In: **A soja no Brasil central.** Campinas: Fundação Cragil, p.21-74. 1986.

SIMIQUELI, G.F.; RESENDE, M.D.V.; MOTOIKE, S.Y.; HENRIQUES, E. Inbreeding depression as a cause of fruit abortion in structured populations of macaw palm (*Acrocomia aculeata*): Implications for breeding programs. **Industrial Crops & Products** 112. 652–659. 2018.

SCARIOT, A., LLERAS, E., HAY, J.D. Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. **Biotropica.** 23:12–22. 1995.

SCARIOT, A., LLERAS, E., HAY, J.D. Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. **Biotropica.** 23:12–22. 1991.

STUMMEL, J.R.; BOSLAND, P. Ornamental pepper. *Capsicum annum*. In: ANDERSON, N.O. Flower breeding and genetics: issues, challenges, and opportunities for the 21st Century, ed. Dordrecht, Holanda: **Springer**, p.561-599. 2006.

SUSKO, D.J., LOVETT-DOUST, L. Patterns of seed mass variation and their effects on seedling traits in *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). **Am. J. Bot.** 87, 56–66. 2000.

TEMME, D.H. Seed size variability: a consequence of variable genetic quality among offspring? **Evolution** 40, 414–417. 1986.

VIDAL, B.C. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochimie.** 15, 289-296. 1970.

WASER, N.M., PRICE, M.V., MONTALVO, A.M. AND GRAY, R.N. Female mate choice in a perennial herbaceous wildflower, *Delphinium nelsoni*. **Trends Plant Sci.** 1, 29–33. 1987.

ZAPATA, T.R., ARROYO, M.T.K. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10:221–23. 1978.

ZHANG, Y.; ZHAO, Z.; XUE, Y. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. Annual Review of **Plant Biology**, Palo Alto, v.60, p.21-42, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As hibridações entre plantas de macaúba fenotipicamente contrastantes de procedências distintas obtiveram sucesso na compatibilidade mediante nova metodologia de polinização e progênies F_1 com variabilidade genética, contribuindo ao programa de melhoramento do BAG-Macaúba/UFV.

Este trabalho evidenciou que apesar da divergência quanto a identificação classificação taxonômica da macaúba, os cruzamentos dirigidos entre plantas de regiões distintas e fenotipicamente contrastantes produziram progênies com sucesso, mediante a nova metodologia de polinização. A autofecundação manual indicou ser possível. A confirmação de autofecundação com base em marcadores moleculares e a complementação dos dados de produção de frutos e sementes são recomendados neste trabalho. A nova metodologia de abertura artificial da espata é indicada para os processos de polinização dentro do programa de melhoramento da macaúba. As características histoquímicas das flores femininas confirmaram a viabilidade antes da abertura natural da espata, inferindo sobre uma das possíveis causas no abortamento de frutos da macaúba em cruzamentos dirigidos. As sementes F_1 apresentaram variabilidade fenotípicas relacionadas as características intrínsecas dos genitores femininos de cada procedência.

A confirmação de cruzamentos constatou a obtenção de híbridos F_1 entre procedências de MG, MS e SP. O estudo da diversidade genética dos F_1 apresentou variabilidade na fase juvenil. A genotipagem agrupou-os quanto à proximidade genética em relação as procedências dos genitores. A caracterização fenotípica distinguiu-os em grupos, sem influência dos genitores devido a base genética ampla da macaúba. Os híbridos A7, A18 e A12 descendentes do BGP105-P1/MS, destacaram-se para obtenção de variedades com pouco espinho e desenvolvimento normal. Os F_1 possuem variabilidade que pode ser explorada na fase de seleção para geração F_2 e na orientação de novos cruzamentos. Tais resultados mostraram que cruzamentos entre genótipos contrastantes de macaúba podem ser explorados para linhas de pesquisas no melhoramento da espécie com auxílio de marcadores moleculares.

O presente estudo apresentou resultados que trazem parâmetros para a continuação e abertura de novas linhas de pesquisas sobre a compatibilidade, abortamento de frutos, hibridações e avaliações de progênies para avanços significativos ao programa de melhoramento da macaúba.