

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

The seal of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central figure of a bird, possibly a toucan, perched on a branch. The bird is surrounded by a laurel wreath. Above the bird are three stars. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written along the top inner edge of the circle, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written along the bottom inner edge. Two small dots are positioned on the left and right sides of the inner circle.

SELEÇÃO DE PROGÊNIES, REPETIBILIDADE,
DIVERSIDADE GENÉTICA E VIABILIDADE DE PÓLEN EM
SACHA-INCHI (*Plukenetia volubilis* L.)

MANAUS – AM
2021

JHON PAUL MATHEWS DELGADO

SELEÇÃO DE PROGÊNIES, REPETIBILIDADE, DIVERSIDADE GENÉTICA E
VIABILIDADE DE PÓLEN EM SACHA-INCHI (*Plukenetia volubilis* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obter o título de Doutor no programa de pós-graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas.

ORIENTADOR: Profa. Dra. MARIA TERESA GOMES LOPES

COORIENTADOR: Dr. FRANCISCO CÉLIO MAIA CHAVES

COORIENTADOR: Dr. RICARDO LOPES

MANAUS – AM
2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D352s Delgado, Jhon Paul Mathews
Seleção de progênies, repetibilidade, diversidade genética fenotípica e viabilidade de pólen em sacha-inchi (*Plukenetia volubilis* L.) / Jhon Paul Mathews Delgado . 2021
105 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Maria Teresa Gomes Lopes
Coorientador: Francisco Célio Maia Chaves
Coorientador: Ricardo Lopes
Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Plukenetia volubilis* . 2. Parâmetros genéticos. 3. Herdabilidade. 4. Ganho de seleção. 5. Melhoramento. I. Lopes, Maria Teresa Gomes. II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

SELEÇÃO DE PROGÊNIES, REPETIBILIDADE, DIVERSIDADE GENÉTICA E VIABILIDADE DE PÓLEN EM SACHA-INCHI (*Plukenetia volubilis* L.)

Tese apresentado à Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obter o título de Doutor no programa de pós-graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas.

APROVADO EM: 27 de agosto de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Maria Teresa Gomes Lopes, presidente.
Universidade Federal do Amazonas – UFAM.



MARIO PINEDO PANDURO

Dr. Mario Pinedo Panduro, membro.
Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP.



Dr. Edvan Alves Chagas, membro.
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Roraima.



Dr. Magno Sávio Ferreira Valente, membro.
Instituto Federal do Amazonas – IFAM



Dr. Filipe Almendagna Rodrigues, membro.
Universidade Federal de Lavras – UFLA.

A Bruna Camila, minha namorada, meu complemento...minha admiração, que me devolveu a esperança na humanidade e faz de mim cada dia uma pessoa melhor.

A chacho, meu pai, que sempre está comigo nos meus pensamentos, nas minhas decisões, e em cada coisa que enxergo.

À Teresita, minha mãe, minha fonte de nobreza, sabedoria, incentivo, perseverança e alegria.

A Michael, Jean Carlos, Patrick e Franck, meus irmãos; Shesha, Murrucho, Juanito, Shoco, Magui e Gaby, Bety, os meus abuelitos Octavio e Gilder, a minha família, são parte da minha história.

Ao Ing. Jorge Bardales, Ing. Herminio Inga, Ing. Julio Soplín e a minha prima Magui, in memoriam.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Bruna Camila Gonçalves da Silva e sua família, que me apoiaram economicamente e emocionalmente no doutorado. O apoio deles é incomensurável.

A minha companheira Bruna Camila Gonçalves da Silva, por seu amor incondicional, paciência, suporte e assistência durante os anos de estudo e pesquisa no Brasil.

Ao curso de pós-graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Laboratório de Melhoramento de Plantas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, coordenada pela Dra. Maria Teresa Gomes Lopes.

A meus colegas de orientação e amigos: Suelen Cristina Lima Jennifer Souza Tomaz, Adriel Lira Cordeiro, Brisa Flor, Marleson dos Santos Tavares, Jekiston de Souza Silva Andrade, Adriel Lira, Dina e demais companheiros.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Amazônia Ocidental, pela disponibilidade de sua infraestrutura para a realização dos experimentos.

Especificamente à equipe de funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Pamela Keiko Harada, Dona Rosimar Fernandes de Souza e Ricardo Lopes. Também ao Projeto de Plantas Mediciniais, coordenado por o Dr. Francisco Célio Maia Chaves.

Ao Dr. Francisco Célio Maia Chaves, pela paciência e sua determinação em pesquisa com sacha-inchi. Também por seu apoio econômico no momento mais difícil do doutorado.

À Dra. Maria Teresa Gomes Lopes, por ter confiado em mim, por sua amabilidade, eu tive muita sorte, a minha admiração e gratidão por ela.

A Miqueias, Beбето, Marcelo, Careca, amigos com quem compartilhei a camaradagem do campo e momentos de alegria e muitos cafezinhos. Brigadão.

Aos povos nativos da América tropical que domesticaram a sacha-inchi na Amazônia e em outros lugares, sem isso, não teríamos material de estudo e nem apresentá-lo ao Brasil como um novo cultivo potencial.

Se

Se és capaz de manter a tua calma quando
Todo o mundo ao teu redor já a perdeu e te
culpa;

De crer em ti quando estão todos duvidando,
E para esses no entanto achar uma desculpa;
Se és capaz de esperar sem te desesperares,
Ou, enganado, não mentir ao mentiroso,
Ou, sendo odiado, sempre ao ódio te esquivares,
E não parecer bom demais, nem pretensioso;

Se és capaz de pensar --sem que a isso só te
atires,
De sonhar --sem fazer dos sonhos teus senhores.
Se encontrando a desgraça e o triunfo
conseguires
Tratar da mesma forma a esses dois impostores;
Se és capaz de sofrer a dor de ver mudadas
Em armadilhas as verdades que disseste,
E as coisas, por que deste a vida, estraçalhadas,
E refazê-las com o bem pouco que te reste;

Se és capaz de arriscar numa única parada
Tudo quanto ganhaste em toda a tua vida,
E perder e, ao perder, sem nunca dizer nada,
Resignado, tornar ao ponto de partida;
De forçar coração, nervos, músculos, tudo
A dar seja o que for que neles ainda existe,
E a persistir assim quando, exaustos, contudo
Resta a vontade em ti que ainda ordena:
"Persiste!";

Se és capaz de, entre a plebe, não te
corromperes
E, entre reis, não perder a naturalidade,
E de amigos, quer bons, quer maus, te
defenderes,

Se a todos podes ser de alguma utilidade,
E se és capaz de dar, segundo por segundo,
Ao minuto fatal todo o valor e brilho,
Tua é a terra com tudo o que existe no mundo
E o que mais --tu serás um homem, ó meu filho!

Autor: Rudyard Kipling Joseph
Tradução: Guilherme de Almeida

Si

Si puedes conservar la cabeza cuando a tu
alrededor todos la pierden y te echan la culpa; si
puedes confiar en ti mismo cuando los demás
dudan de ti, pero al mismo tiempo tienes en
cuenta su duda;

si puedes esperar y no cansarte de la espera, o
siendo engañado por los que te rodean, no pagar
con mentiras, o siendo odiado no dar cabida al
odio, y no obstante no parecer demasiado
bueno, ni hablar con demasiada sabiduría...
Si puedes soñar y no dejar que los sueños te
dominen; si puedes pensar y no hacer de los
pensamientos tu objetivo; si puedes encontrarte
con el triunfo y el fracaso (desastre) y tratar a
estos dos impostores de la misma manera;
si puedes soportar escuchar la verdad que has
dicho: tergiversada por bribones para hacer una
trampa para los necios, o contemplar destrozadas
las cosas a las que habías dedicado tu vida y
agacharte y reconstruirlas con las herramientas
desgastadas...

Si puedes hacer un hatillo con todos tus triunfos y
arriesgarlo todo de una vez a una sola carta, y
perder, y comenzar de nuevo por el principio y
no dejar de escapar nunca una palabra sobre tu
pérdida;
y si puedes obligar a tu corazón, a tus nervios y
a tus músculos a servirte en tu camino mucho
después de que hayan perdido su fuerza,
excepto La Voluntad que les dice "¡Continúa!"
Si puedes hablar con la multitud y perseverar en
la virtud o caminar entre Reyes y no cambiar tu
manera de ser;

si ni los enemigos ni los buenos amigos pueden
dañarte, si todos los hombres cuentan contigo
pero ninguno demasiado;

si puedes emplear el inexorable minuto
recorriendo una distancia que valga los sesenta
segundos tuya es la Tierra y todo lo que hay en
ella, y lo que es más, serás un hombre, hijo mío.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição de origem dos acessos de <i>Plukenetia volubilis</i> usados no estudo em plantado em Manaus (Brasil) em setembro de 2018.	44
Tabela 2. Resumo da análise de variância - ANOVA e parâmetros genéticos para as características de produção e qualidade do fruto em doze progênes de <i>Plukenetia volubilis</i>	47
Tabela 3. Correlação genotípica (diagonal superior) e fenotípica (diagonal inferior) para as características de produção e qualidade do fruto em doze progênes de <i>Plukenetia volubilis</i>	49
Tabela 4. Estimativa dos efeitos diretos e indiretos do número total e peso total de frutos, número total de sementes e peso médio de frutos sobre o peso total de sementes em nível fenotípico de <i>Plukenetia volubilis</i>	51
Tabela 5. Ganho de seleção direta (GSD%) e indireta (GSI%) para as características de produção e a qualidade do fruto em doze progênes de <i>Plukenetia volubilis</i>	52
Tabela 6. Ganho de seleção direta (GSD%) e indireta (GSI%) para as características de produção e o peso médio de fruto em doze progênes de <i>Plukenetia volubilis</i> a partir de diferentes intensidades de seleção.	55
Tabela 7. Estimativas de coeficiente de repetibilidade (\hat{r}), de determinação (R^2) e número de meses de colheita (n) requeridos para obter diferentes R^2 , em relação ao número total de frutos, peso total de frutos e peso total de sementes durante março 2019 – agosto 2019 em progênie de sachá-inchi.	66
Tabela 8. Período mínimo de colheitas sucessivas (n), repetibilidade (\hat{r}) e determinação (R^2), em relação ao número total de frutos, peso total de frutos e peso total de sementes durante março-agosto 2019 em progênes de sachá-inchi.	67
Tabela 9. Estimativas de coeficiente de repetibilidade (\hat{r}), de determinação (R^2) e número de meses de colheita (n) requeridos para obter diferentes R^2 , em relação ao número total de frutos, peso total de frutos e peso total de sementes durante março 2019 – agosto 2019 em indivíduos de sachá-inchi.	68
Tabela 10. Período mínimo de colheitas sucessivas (n), repetibilidade (\hat{r}) e determinação (R^2), em relação ao número total de frutos, peso total de frutos e peso total de sementes durante março-agosto 2019 em indivíduos de sachá-inchi.	69
Tabela 11. Resumo da análise de variância para as características morfo-agronômicas de progênes de <i>Plukenetia volubilis</i>	81

Tabela 12. Comparação de médias entre doze progênies de <i>P. volubilis</i> em relação a características morfoagronômicas.	82
Tabela 13. Correlação fenotípica entre características morfo-agronômicas e Adequação da Amostra de Kayser-Meyer-Olkin para cada variável na diagonal em progênies de <i>Plukenetia volubilis</i>	83
Tabela 14. Componentes principal (CP), Autovalores (λ_j), variância explicada (S ²), variância cumulativa (Cum.) e cargas totais associadas aos primeiros três componentes em progênies de <i>P. volubilis</i>	84
Tabela 15. Comparação de médias entre doze progênies de <i>P. volubilis</i> em relação a características morfoagronômicas agrupadas em três componentes principais (CP).....	84
Tabela 16. Dissimilaridade entre progenitores de sachá-inchi baseado na Distância Euclidiana Média acima da diagonal, obtida a partir dos escores dos três primeiros componentes Principais. Distância de Mahalanobis abaixo da diagonal, obtida a partir das oito variáveis originais em sachá-inchi.	88
Tabela 17. Média do conteúdo mineral em diferentes estágios de crescimento do pistilo floral.	99
Tabela 18. Germinação de pólen de sachá-inchi em diferentes meios de cultura.....	101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 TAXONOMIA.....	20
3.2 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA	22
3.3 DISTRIBUIÇÃO ECOLÓGICA DA ESPÉCIE.....	23
3.4 UTILIZAÇÃO E MANEJO DA ESPÉCIE.....	24
3.4.1 UTILIZAÇÃO.....	24
3.4.2 MANEJO DA ESPÉCIE	25
3.4.2.1 PROPAGAÇÃO	25
3.4.2.2 SISTEMA DE PLANTIO.....	26
3.4.2.3 ADUBAÇÃO MINERAL.....	26
3.4.2.4 ESPAÇAMENTO, COLHEITA E PRODUÇÃO DE FRUTOS.....	26
3.5 VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE SACHA-INCHI.....	27
3.6 AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLEÇÕES DE TRABALHO NO MELHORAMENTO GENÉTICO.....	27
3.7 ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS E SELEÇÃO EM COLEÇÕES DE TRABALHO EM FRUTEIRAS TROPICAIS	28
3.8 ANÁLISE DE DADOS MULTIVARIADA	30
3.9 VIABILIDADE DE PÓLEN EM SACHA-INCHI	32
REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO I- SELEÇÃO DE PROGÊNIES PARA PRODUÇÃO DE SEMENTE EM SACHA-INCHI.....	39
RESUMO	39
ABSTRACT	40
KEYWORDS:	40
INTRODUÇÃO.....	41
DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	43
DESENHO EXPERIMENTAL	43
PRODUÇÃO DE MUDAS E PLANTIO	44
COLETA DE DADOS.....	45
ANÁLISE DE DADOS.....	45

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO II - REPETIBILIDADE DE CARACTERES DE PRODUÇÃO DE FRUTOS E SEMENTES PARA SELEÇÃO EM SACHA-INCHI.....	60
RESUMO	60
ABSTRACT	61
MATERIAL E MÉTODOS.....	64
ANÁLISE DE DADOS.....	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
CAPÍTULO III – DIVERSIDADE GENÉTICA FENOTÍPICA EM SACHA-INCHI COM O MÉTODO DE COMPONENTES PRINCIPAIS	75
RESUMO	75
ABSTRACT	76
INTRODUÇÃO.....	77
COLETA DE DADOS.....	79
ANÁLISE DE DADOS.....	79
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90
CAPÍTULO IV. ANÁLISE MULTIELEMENTAR DO PISTILO FLORAL E GERMINAÇÃO DE PÓLEN DE SACHA-INCHI	92
RESUMO	92
ABSTRACT	93
INTRODUÇÃO.....	94
MATERIAL E MÉTODOS.....	95
ANÁLISE MULTIELEMENTAR COM FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF).....	95
GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	97
RELAÇÃO ENTRE O TESTE DIRETO E INDIRETO.....	98
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98

ANÁLISE MULTIELEMENTAR COM FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF)	98
GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	100
RELAÇÃO ENTRE O TESTE DIRETO E INDIRETO.....	101
CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	105

RESUMO

Sacha-inchi (*Plukenetia volubilis* L., Euphorbiaceae) foi introduzida em Manaus, Brasil, com a intenção de desenvolver um nicho de mercado para um óleo com características alimentícias muito nutritivas. A introdução de uma cultura requer avaliação da adaptação da espécie ao seu novo ambiente e planejamento para o futuro desenvolvimento, incluindo melhoramento genético. O objetivo do trabalho foi caracterizar acessos de *P. volubilis* em Manaus e introdução do germoplasma visando a ampliação da variabilidade genética para o melhoramento. Seleção de progênies, análises de repetibilidade, diversidade genética e viabilidade de pólen em sachá-inchi foram realizadas. Progênies de polinização aberta de sachá-inchi mostraram variabilidade genética fenotípica para as características de fruto e produção. Altas correlações genéticas entre o número de frutos, produção de frutos e peso de sementes por planta ($r > 0,96$) e altos valores de herdabilidade nas três características mencionadas ($h^2 > 0,81$) foram observadas. As características número de frutos e peso de frutos mostraram ganhos genéticos indiretos sobre o rendimento em peso de sementes (GS% = 23%). Contudo, a característica peso de frutos é recomendável para inferir a produção de sementes. A seleção direta sobre o peso médio de fruto mostrou efeito negativo nos ganhos genéticos da produção de sementes por planta (GS% = -15%), número (GS = -19%) e produção de frutos por planta (GS% = -12%). A seleção de frutos grandes, como vem sendo realizados pelos produtores, não reflete em bons rendimentos de sementes, o qual também é constatado na falta de efeitos diretos e indiretos do peso médio de fruto sobre o peso de sementes por planta. Baixas intensidades de seleção direta (42%) sobre a produção de frutos por planta permitem ganhos significativos indiretos sobre a produção de sementes por planta (23%) e mostraram potencial para manter a variabilidade genética. Os acessos Cuzco, Dos de Mayo, Shanao, Aucaloma e AM-07 foram selecionados por seus altos rendimentos em frutos e sementes. Para uma boa acurácia do parâmetro de repetibilidade, no método de Componentes Principais (CP), o uso da matriz de covariância mostrou um melhor coeficiente de repetibilidade do que o uso da matriz de correlação para os caracteres número de frutos, produção de frutos e produção de sementes por planta tanto para seleção individual quanto para a seleção de progênies. Como a avaliação do número de frutos é mais fácil do que a produção de frutos e sementes, é recomendável. Assim, para a seleção de progênies e de plantas individuais é indicado três e sete meses de colheita consecutiva, respectivamente. O uso das coordenadas dos Componentes Principais mostrou ser adequado para explorar a diversidade genética fenotípica em sachá-inchi. Segundo a análise da diversidade genética fenotípica as seguintes hibridações são

recomendáveis: Cuzco x Dos de Mayo, Cuzco x Aucasoma, Shanao x Cuzco, Shanao x Aucasoma, Shanao x Dos de Mayo, Shanao x Am07, Dos de Mayo x Aucasoma. A germinação *in vitro*, meio de cultura líquida com 10% de sacarose e 0,03% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ é o melhor método para estimar a viabilidade de pólen de sachá-inchi.

Palavras-chave: Parâmetros genéticos, ganho de seleção, melhoramento vegetal.

ABSTRACT

Sacha-inchi (*Plukenetia volubilis* L., Euphorbiaceae) was introduced in Manaus, Brazil, with the intention of developing a market niche for an oil with very nutritious food characteristics. The introduction of a crop requires assessment of the species' adaptation to its new environment and planning for future development, including genetic improvement. The objective of this work was to introduce accessions of *P. volubilis* in Manaus from Benjamin Constant (AM, Brazil) to expand the existing germplasm aiming at genetic improvement. Progeny selection, repeatability analysis, genetic diversity and pollen viability in sachá-inchi were performed. Open pollinated progenies of sachá-inchi showed phenotypic genetic variability for fruit and yield characteristics. High genetic correlations between the number of fruits, fruit yield and seed weight per plant ($r > 0.96$) and high heritability values in the three mentioned traits ($h^2 > 0.81$) were observed. The characters number of fruits and fruit weight showed indirect genetic gains on seed weight yield (GS% = 23%). However, the fruit weight character is recommended to estimate seed production. Direct selection on average fruit weight showed a negative effect on genetic gains of seed production per plant (GS% = -15%), number (GS = -19%) and fruit production per plant (GS% = -12 %). The selection of large fruits, as has been done by producers, does not reflect good seed yields, which is also observed in the lack of direct and indirect effects of the average fruit weight on the weight of seeds per plant. Low direct selection intensity (42%) on the fruit yield per plant allowed significant indirect gains on the seed yield per plant (23%) and showed potential to maintain genetic variability. Accessions Cuzco, Dos de Mayo, Shanao, Aucasoma and AM-07 were selected for their high yields in fruits and seeds. For good accuracy of the repeatability parameter, in the Principal Components (CP) method, the use of the covariance matrix showed a better repeatability coefficient than the use of the correlation matrix for the characters number of fruits, fruit yield and yield of seeds per plant both for individual selection and for the selection of progenies. As the evaluation of the number of fruits is easier than the production of fruits and seeds, it is recommended to evaluate by the number of fruits. Thus, for the selection of progenies and individual plants, three and seven months of consecutive harvest are indicated, respectively. The use of Principal Components coordinates proved to be adequate to explore the phenotypic genetic diversity in sachá-inchi. According to the analysis of the phenotypic genetic diversity, the following hybridizations are recommended: Cuzco x Dos de Mayo, Cuzco x Aucasoma,

Shanao x Cuzco, Shanao x Aucasoma, Shanao x Dos de Mayo, Shanao x Am07, Dos de Mayo x Aucasoma.germination *In vitro*, liquid culture medium with 10% sucrose and 0.03% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ is the best method to estimate the viability of sacha-inchi pollen.

Keywords: Genetic parameters, selection gain, plant breeding.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos treze anos, a espécie *sacha-inchi*, *inca-peanut* ou *inca nut* (*Plukenetia volubilis* L., Euphorbiaceae) tem sido objeto de intensa pesquisa desenvolvida em várias partes da América tropical e Sudeste asiático. Conseqüentemente, o comércio mundial de óleo de *sacha-inchi* vem se expandindo. Até o ano de 2020, Peru e Colômbia são os maiores exportadores de óleo de *sacha-inchi* com 3000 e 1110 ha de área plantada, respectivamente. Contudo, países fora da América do Sul começaram a cultivar *sacha-inchi*, principalmente no Sudeste asiático, tais como o sul da China, Mianmar, Laos e Tailândia. Nestes países, algumas empresas produzem volumes suficientes de sementes e óleo de *sacha inchi*, que podem competir com empresas da América do Sul, de onde se originou a *sacha inchi*. A Tailândia é a principal fonte de cultivo comercial de *sacha inchi* fora da América do Sul.

Em 2012, a espécie foi introduzida em Manaus-Brasil com a intenção de desenvolver um nicho de mercado para um óleo com características muito peculiares, com alto teor de ácido linolênico (45%), ácido linoleico (37%), tocoferóis e carotenóides (3,8 a 6,3 mg/100 g e 0,08 mg/100 g de óleo, respectivamente). A rápida introdução de qualquer novo cultivo requer a avaliação da adaptação ao seu novo ambiente, tanto físico quanto comercial, bem como planejamento para assegurar o seu desenvolvimento contínuo no caso da introdução atrair o agricultor e o interesse do consumidor. Este estudo examina alguns aspectos biológicos e genéticos deste programa de introdução que são essenciais para avaliar a adaptação e planejamento para seu futuro desenvolvimento.

Análises fenotípicas da biometria do fruto e características de produção já foram realizadas em *sacha-inchi*, mas não há nenhum estudo que analise estas características no primeiro ano de plantio. Em *sacha-inchi*, o desenvolvimento da planta é rápido, iniciando a floração após três meses de plantio e a colheita após três ou quatro meses da floração. Para estimar os parâmetros genéticos das características do fruto e da produção, apenas os primeiros meses de produção do primeiro ano de plantio parecem ser os mais importantes, uma vez que é possível obter cinco a seis colheitas. O principal interesse dos produtores e os melhoristas de plantas é a produção. No caso da *sacha-inchi*, a produção está focada na semente por estar relacionada diretamente com a produção de óleo. A produção é uma característica extremamente complexa que usualmente responde lentamente à pressão de seleção.

A produção de semente é o critério para a seleção de plantas mais produtivas. O rendimento por planta depende mais da estabilidade da planta do que do tempo de avaliação da produção. A análise de repetibilidade fornece estimativas de correlação entre uma colheita e outra, permitindo calcular o número de colheitas necessárias para uma boa seleção no primeiro ano de plantio, conforme o nosso estudo. Ademais, um programa de melhoramento também tem como objetivo, identificar e estudar a interação de vários componentes associados ao rendimento e a outras características. Este foi iniciado no presente estudo.

O sucesso em um programa de melhoramento depende da quantidade de variação fenotípica presente na população base. A proporção da variação fenotípica está determinada por efeitos genéticos aditivos (a partir dos quais a herdabilidade no sentido restrito é estimada) e pela intensidade de seleção praticada. Estes dois critérios mencionados são básicos para o campo da genética quantitativa. O projeto experimental usado no presente estudo foi escolhido para permitir estimativas das variâncias genéticas fenotípicas e aditivas, e a herdabilidade de cada característica de interesse. A precisão da estimativa destas variáveis é promissora pelo número de indivíduos em cada progênie e pela abundância de conhecimento sobre o manejo do cultivo de sachá-inchi. Assim, este estudo fornece um material útil para continuar o melhoramento de sachá-inchi no Brasil.

O requerimento para a alongação do tubo polínico ou a germinação do pólen de sachá-inchi ainda é desconhecido. Estudos em várias espécies de plantas com flores indicam que o íon cálcio desempenha um rol importante na germinação do pólen. Contudo, outros íons, como o K^+ e Mg^{2+} servem como absorção ou ligação do cálcio, e sem a presença destes a porcentagem de germinação é afetada. Aqui, registrou-se pela primeira vez a análise multielementar (Ca, P, S, K e microelementos) em diferentes estágios de desenvolvimento do pistilo, com intuito de ajudar a composição dos elementos no meio de cultivo. Iniciar estudos sobre a germinação de pólen em sachá-inchi é importante para o melhoramento da espécie, já que permite acompanhar os procedimentos de polinização controlada. Cabe mencionar, que a viabilidade do pólen é acompanhada de atividades enzimáticas, as quais podem ser determinadas de forma indireta por algum método colorimétrico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar e selecionar acessos de *Plukenetia volubilis* em Manaus, Amazonas, Brasil, visando o melhoramento genético.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar novos acessos de sachá-inchi;
2. Selecionar progênies para produção de sementes em sachá-inchi;
3. Estimar a repetibilidade de caracteres de produção de frutos e sementes para seleção em sachá-inchi;
4. Analisar a diversidade genética fenotípica em sachá-inchi;
5. Estudar a viabilidade do pólen de sachá-inchi e realizar análise multielementar do pistilo floral.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Taxonomia

Plukenetia L. é um gênero pantropical de 23 espécies de trepadeiras e lianas, com raros casos de subarbusto prostrado, pertencente à família Euphorbiaceae, subfamília Acalyphoideae, tribo Plukenetieae (Benth.) Hutch., subtribo Plukenetiinae Benth. (CARDINAL-MCTEAGUE e GILLESPIE, 2016; GILLESPIE 1993, 1994; WEBSTER, 1975). O gênero destaca pelo ovário de quatro carpelos, estiletes que são parcialmente e inteiramente fusionados e frequentemente maciços, hábito de crescimento do caule do tipo escandente. Outras características importantes incluem: uma ou mais pares de glândulas na face adaxial da lâmina foliar, numerosos estames, flores pistiladas com quatro sépalas (GILLESPIE, 1993).

Atualmente, usando marcadores moleculares, o gênero foi dividido em dois principais grupos de acordo à nervura foliar: peninérvea e palminérvea (Figura 1) (CARDINAL-MCTEAGUE et al., 2019; CARDINAL-MCTEAGUE e GILLESPIE, 2016). O grupo de nervura foliar peninérvea compreende dois subgrupos e é composto de espécies neotropicais, enquanto o grupo palmatinérvea compreende três subgrupos, incluindo espécies do neotropical, a seção *Plukenetia*, a africana seção *Angostylidium*, a africana ou sudeste-asiática sect. *Hedraiostylus*, e as espécies informais de Madagascar (CARDINAL-MCTEAGUE e GILLESPIE, 2016; CARDINAL-MCTEAGUE et al., 2019) (Figura 1). Recentemente, duas espécies de semente grande foram descobertas, *P. huayllabambana* e *P. carolis-vegae* (BUSSMANN et al., 2009, 2013). Contudo, Cardinal-McTeague et al. (2019) indicam que *P. huayllabambana* poderia ser um híbrido entre *P. volubilis* e *P. carolis-vegae* do centro-sul do Peru.

Dentro de *Plukenetia*, cinco espécies são cultivadas tradicionalmente para alimentação e uso medicinal na região tropical dos Andes (*P. volubilis*, sachá-inchi; *P. carolis-vegae* e *P. hullaybambana*, conhecidos como sachá-inchi de montanha), a Amazônia (*P. polyadenia*, Mani-del-Monte em espanhol ou Amuji em Huitoto), e África (*P. conophora*, Awusa ou African walnut). No Peru, *P. volubilis* é cultivada por populações rurais entre os 100 e 1000 de altitude (CESPEDES, 2008; DEL CASTILLO et al., 2019; VASEK et al., 2017). *P. hullaybambana* é endêmica no município de Rodriguez de Mendoza no Peru, ocorrendo naturalmente nas bordaduras de clareias da floresta ou áreas alteradas por agricultura a aproximadamente 1700 m de altitude. *P. polyadenia* ocorre naturalmente em quintais de etnias de origem Huitoto na bacia do rio

Putumayo, Napo e Ampiyacu no Peru. A espécie é conhecida como Amuji (Huitoto). No entanto, no Brasil é possível ser encontrado nos quintais de descendentes da etnia Huitoto que migraram para o município de Tabatinga e Venjamin Contans no estado de Amazonas.

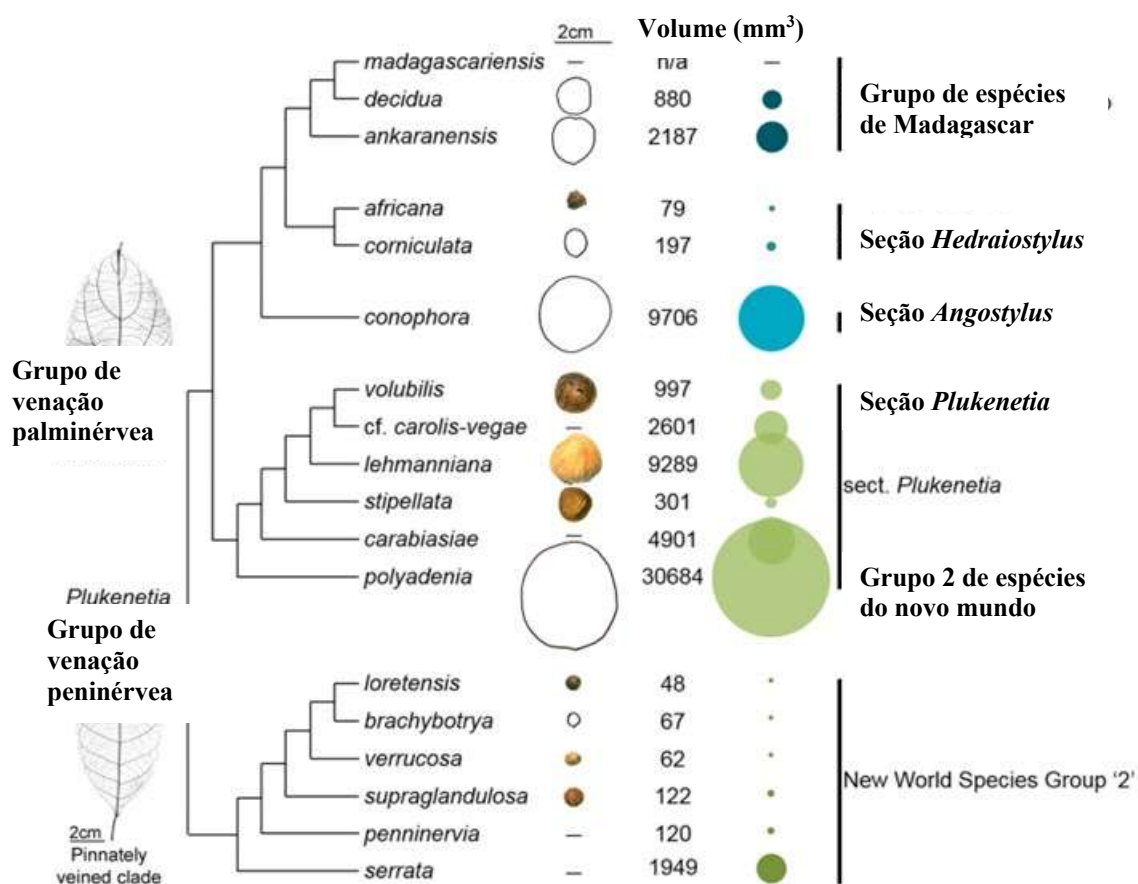


Figura 1. Dendrograma que descreve as relações prováveis entre espécies de *Plukenetia*. Fotos ou contornos de sementes foram providenciados ao lado do nome das espécies. Círculos coloridos representam estimativas de volumes de sementes. Baseada em cloroplasto e marcadores nucleares de DNA (CARDINAL-MCTEAGUE et al., 2019).

Dados moleculares e biogeográficos sugerem que o gênero *Plukenetia* teve origem entre Amazônia ou Mata Atlântica do Brasil durante o oligoceno. Embora a origem seja ambígua entre essas duas regiões, é provável que houve migração através da vegetação aberta formada diagonalmente durante o Oligoceno e início ou metade do Mioceno. Os ancestrais da Amazônia sofreram pelo menos duas dispersões independentes na América Central e no México antes da formação do Istmo do Panamá na metade ou final do Mioceno. O ancestral de *P. volubilis* e *P. cf. carolis-vegae* era a única linhagem a retornar à Amazônia desde a América Central e Noroeste da América do Sul, devido a uma provável dispersão sobre os Andes durante o Plioceno. A distribuição pantropical de

Plukenetia é melhor explicada por dispersões transoceânica de longa distância, primeiro para a África no final do Mioceno e depois, independentemente, para Madagascar e o Sudeste Asiático, durante o final do Mioceno e Plioceno (CARDINAL-MCTEAGUE et al., 2010).

O tamanho de semente em *Plukenetia* varia desde muito pequenas (38 mm^3) a muito grandes (30.000 mm^3). Sementes grandes em *Pukenetia* provavelmente tiveram um único ancestral. Estudos indicam que a evolução desta foi dinâmica e esteve correlacionada positivamente com o tipo de caule (lenhoso e semi-lenhoso), tipo de fruto (seco-deiscente e suculento-indeiscente), e ecologia de mudas (tolerante ao sombreamento e de clareiras ou bordas de florestas). Mudanças de bioma desde predominantemente úmido a seco aparentemente não tem associação com o tamanho da semente, no entanto, a transição para um sazonal, savana controlada por fogo indicam provável associação com redução do tamanho da semente (CARDINAL-MCTEAGUE et al., 2010).

3.2 Descrição morfológica

A espécie é uma trepadeira semi-lenhosa de crescimento indeterminado (CESPEDES, 2008; GILLESPIE, 1993). As folhas são alternas, espiraladas, cordadas; de 9 a 14 cm de comprimento e 5 a 10 cm de largura, as nervuras nascem na base, com nervura central digitada para o vértice, lâmina adaxial verde escuro, abaxial verde claro, apresentam duas glândulas base-laminar, ápice foliar acuminado, com base plana ou semi-arredondada, pecíolos com arestas recobertas por indumentos brancos. Inflorescência em racemo 2-8 cm comprimento, localizada na axila foliar, com brotos distribuídos em 4-15 cachos alternos e cruzados, com dois tipos de flores: as masculinas são pequenas, esbranquiçadas, dispostas em racimos, pediceladas, 4-5 pétalas, dialipétalas, actinomorfas, 17-19 estames, polistêmone; as femininas em geral estão localizadas na base das inflorescências, mas podem ocorrer no pecíolo foliar e são na maioria dos casos solitárias, mas podem ocorrer em duas ou mais flores, possuem ovário súpero com 4-5 lóculos, podendo ocorrer variações para mais ou para menos. É cápsula de 3-5 cm de diâmetro, cor verde quando imaturo e castanho-escuro quando maduros. Normalmente tem quatro lóculos, mas pode ocorrer 3-7, cápsulas com sementes ovais, ligeiramente levantadas no centro e achatadas nas bordas, cor marrom escura com nervura oval, com 1,5 a 2 cm de diâmetro (GILLESPIE, 1993). Estas características são

semelhantes à *Plukenetia Huayllabambana*, porém, este difere de *P. volubilis* por ter um maior número de sépalas (5) nas flores estaminadas, bem como filamentos mais curtos (0,1 – 0,3 mm), frutos maiores, e sementes maiores com estrias pronunciadas (REINER et al., 2009).

Em comparação a *P. volubilis*, *Plukenetia polyandenia* Mull.Arg difere claramente na lâmina da folha por ser elíptica, base obtusa ou arredondada. Além disso, os frutos são maiores, sub-globosos, carnosos e indeiscentes (GUILLESPE, 1993). No entanto, outras diferenças, foram descritas por Rodriguez et al. (2010).

3.3 Distribuição ecológica da espécie

Plukenetia volubilis é uma espécie neotropical. Populações naturais de sacha-inchi são encontradas nas Antilhas Menores, Suriname e ao longo da borda noroeste da bacia Amazônica incluindo Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Brasil. A espécie é encontrada usualmente ao longo de bordadura de florestas ou áreas com distúrbios, especificamente em floresta úmida ou nebulosa abaixo de 900 m de altitude (GILLESPIE, 1993).

Em sistemas de cultivo, a espécie se desenvolve em temperaturas desde 8 a 36 °C, precipitação de 1500 mm ano⁻¹ e altitude de 30 a 2110 m. Tolerante a sombra, porém é exigente em luz, precisando ser cultivada em campo aberto para não afetar o volume de biomassa da planta e a produção de frutos, sendo assim considerada uma planta pioneira (CAI, 2011; CAI et al., 2012; CARDINAL-MCTEAGUE et al., 2019).

Plukenetia volubilis é cultivada em solos férteis como os solos dos andes peruanos (CESPEDES, 2008) e do sudeste do Brasil (RODRIGUES et al., 2014), ou solos pobres em nutrientes como os da Amazônia (RODRIGUES, 2013). Na Amazônia peruana é comum cultivar *Plukenetia volubilis* em solos de várzea alta, os quais possuem fertilidade média. Também é cultivada no Brasil na trílice fronteira.

A espécie inicia a floração após 86 a 151 do transplante, a frutificação ocorre após 119 a 185 dias do transplante e a colheita de frutos acontece 202 a 249 dias após o transplante (CESPEDES, 2006; CAI et al., 2012; VALENTE et al., 2017b). Precipitação distribuída uniformemente permite encontrar flores e frutos durante todo o ano (JIAO et al., 2012; VALENTE et al., 2017b).

3.4 Utilização e manejo da espécie

3.4.1 Utilização

Plukenetia volubilis tem sido cultivado em tempos pré-colombianas entre 3000 – 5000 anos atrás e a ocorrência de espécies cultivadas ou variedades locais no neotrópico indica que teve dois eventos independentes de domesticação antiga (BRACK, 1999; CARDINAL-MCTEAGUE et al., 2019). Segundo Clement (2001), sacha-inchi poderia ser considerado um cultivo nativo domesticado, já que é encontrada predominantemente em áreas criadas por humanas especificamente em paisagens cultivadas ou intensamente manejadas como a roça/capoeira (paisagem onde humanos combinam o cultivo e o manejo), ademais, altos teores de óleo e amidos, consequentemente energia, e bom nível de proteínas (CHIRINOS et al., 2013; HAMAKER et al., 1992), característica peculiar em cultivos de alto grau de domesticação (CLEMENT, 2001). Neste contexto, sacha-inchi pode ter sido um cultivo de grande importância alimentícia nos tempos pré-colombianas. Contudo, *P. volubilis* é ainda considerada não totalmente domesticada e o melhoramento intencional tem sido recentemente pelos pequenos produtores no Peru e Amazônia Ocidental, focando principalmente a seleção de sementes grandes para estabelecer novos plantios, com o objetivo incrementar a produção (VASEK et al., 2017).

O interesse científico e comercial por *P. volubilis* é devido suas sementes apresentarem alto teor de ácidos graxos insaturados, como linoleico (35% a 41%) e linolênico (37% a 44%), tocoferóis (78,6 a 137,0 mg/100 g de semente) e proteínas (27%) (CHIRINOS et al., 2013; HAMAKER et al., 1992). Os dois ácidos graxos mais abundantes no óleo de sacha-inchi, linoleico e linolênico, são dois ácidos graxos essenciais requeridos pelo humano, eles são necessários para funções biológicas, mas não podem ser sintetizados pelo corpo. O conteúdo de lipídios em *P. volubilis* (entre 45 à 55%) é comparável a aqueles dos principais cultivos oleaginosas com alto teor de lipídios por peso de semente, tais como, girassol (*Helianthus annuus* L., entre 36-50%) e canola (*Brassica napus* L, entre 31- 47%) (FOLLEGATTI-ROMERO et al., 2009; KODAHN, 2020; RAUF et al., 2017; WU et al., 2016;). Porém, é maior do que nos principais cultivos oleaginosos cultivados comumente, que incluem o dendê (*Elaeis guineensis* Jack.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), canola, girassol, amendoim (*Arachis hypogaea* L.), sementes de algodão (*Gossypium* L. sp) e oliva (*Olea europaea* L.), onde o conteúdo de ácido linolênico ao redor de 10% (GUNSTONE et al., 2007; KODAHN, 2020). Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é uma exceção, contendo entre 56% de ácido linolênico, embora o

conteúdo total de frações de ácidos graxos poli-insaturados (aproximadamente 71%) e o total de lipídios (aproximadamente 33%) é menor do que em *P. volubilis* (WAKJIRA et al., 2004).

O óleo disponível para comercialização normalmente é extraído por prensagem a frio seguido de filtração (NUSSELDER e CLOESEN, 2014), por isso sacha-inchi oferece vantagens industriais, tal como, o óleo obtido está livre de contaminação de solventes de extração, bem como usar equipamentos relativamente simples, contudo, o rendimento pode ser baixo em comparação com outros métodos (FOLLEGATTI-ROMERO et al., 2009). A extração com solvente orgânico resulta em um maior rendimento de óleo, porém, o uso de solventes orgânicos, exemplo, hexano, pode causar contaminação do óleo com resíduos tóxicos. Além disso, o uso de altas temperaturas incrementa o risco de degradação do óleo (FOLLEGATTI-ROMERO et al., 2009).

Outra vantagem industrial de sacha-inchi é a alta estabilidade do óleo. O óleo derivado de *P. volubilis*. A estabilidade do óleo tem sido sugerida por causa da alta quantidade de tocoferóis encontrados em sementes de *P. volubilis* (HAMAKER et al., 1992; CHIRINOS et al., 2013). A vida do óleo de sacha-inchi extraído a frio foi estimada em 3,29, 1,79 e 0,79 anos quando armazenados a 20, 25 e 30 °C, respectivamente (RODRIGUEZ et al., 2015). Também, a capacidade de estabilidade do óleo incrementa com o torrar das sementes, possivelmente devido à formação dos compostos fenólicos (CISNEROS et al., 2014; STERBOVA et al. 2017).

3.4.2 Manejo da Espécie

3.4.2.1 Propagação

A espécie é propagada normalmente por semente. Assim, utilizando os frutos de casca de cor marrom escuro ou depois da deiscência, a semente atinge aproximadamente 80% de germinação em 13 dias após a semeadura (CESPEDES, 2008; OLIVEIRA et al., 2013). O tempo máximo de armazenamento é desconhecido, sabe-se apenas que a germinação atinge menos de 60% após 60 dias de armazenamento no ambiente (CESPEDES, 2006).

Estudos indicam 80% de enraizamento em estacas com 2,4-4,2 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento com aplicação de ácido indolbutírico, independentemente da posição de origem da estaca na planta matriz (SOLSOL e MESEN, 2010).

Sacha-Inchi também pode ser propagado por enxertia do tipo garfagem, visando o controle de doenças que atuam principalmente na raiz ou coleto da raiz. Desta forma, a enxertia atinge 55% de sucesso (CACHIQUE et al., 2018).

3.4.2.2 Sistema de Plantio

Quando propagado por semente, no plantio indireto, o transplante é feito após 40 dias da repicagem das mudas. Pode ser usado sistemas de tutorado, espaldeira ou cobertura (CAI, 2011; CAI et al., 2013; CÉSPEDES, 2008). Contudo, o plantio também pode ser de plantio direto (CESPEDES, 2008).

3.4.2.3 Adubação mineral

Cespedes (2008) recomenda aplicar 30 g de ureia, 45 g de superfosfato triplo, e 30 g de cloreto de potássio por planta em intervalos de três meses, no entanto, o autor não indica em que fase fenológica a adubação é realizada e qual é a estimativa da produção de frutos. Alguns estudos indicam que fertilização com 60 g por planta (200 kg ha^{-1}) de uma mistura (kg:kg:kg) de N-P₂O₅-K₂O não tem efeito significativo na produção de frutos, porém, é possível obter rendimentos de 1 340 a 2 486 kg ha⁻¹ de semente em solos com características químicas de: pH 5,42; carbono orgânico 5,65% (peso/volume); nitrogênio total 0,34 g ka⁻¹, nitrogênio disponível 46 mg kg⁻¹; P disponível 14,1 mg kg⁻¹; e K disponível 22 mg kg⁻¹ (YANG et al., 2014).

3.4.2.4 Espaçamento, colheita e produção de frutos

Sacha inchi pode ser plantado em espaçamentos de 3 x 2 m ($1.666 \text{ planta ha}^{-1}$); 2 x 2 m ($2.500 \text{ planta ha}^{-1}$) e 1,5 x 1,5 m ($4.000 \text{ plantas ha}^{-1}$) entre linha e planta, respectivamente. Contudo, estudos indicam que maiores rendimentos de sementes podem ser obtidos em densidades de $4.000 \text{ plantas ha}^{-1}$ que em densidade de 1.666 e $2.500 \text{ plantas ha}^{-1}$, com valores de 2155 kg ha^{-1} e 1500 kg ha^{-1} , respectivamente (YANG et al., 2014).

O rendimento de semente é aproximadamente 50% do peso do fruto. A colheita é realizada em intervalos de 15 dias, sendo colhidos apenas os frutos de cor marrom escuro (CESPEDES, 2008).

Cespedes (2008) indica que o rendimento de frutos no primeiro ano pode atingir 2,2 a 2,5 t.ha⁻¹, já no segundo ano, o rendimento pode ser limitado pela infestação de nematoides e fungos do gênero *Fusarium*, diminuindo a 0,7 a 1,7 t ha⁻¹. A infestação por *Fusarium oxysporum* atinge mais de 50% do plantio até o segundo ano de plantio (CHAI et al., 2018).

3.5 Variabilidade genética em populações naturais de sachá-inchi

Vasek et al. (2017) indicam que a variabilidade genética em *Plukenetia volubilis* L. é explicada em 25% a 32% entre populações, quando estudaram a diversidade genética da sachá-inchi em parcelas de pequenos produtores, no raio de 72 Km² no extremo norte da Amazônia peruana usando Marcadores AFLP. Os autores também propõem que o efeito antrópico estaria influenciando na diversidade genética das populações de Sachá-Inchi, o qual foi corroborado com uma população pouco acessível e inabitada como a população “Dos de Mayo”, que diferiu com a populações de “Aucaloma e Pachilla” (município com fluidez comercial com Ponto Renato e Shanão) que também foram analisados em nosso estudo.

De outra forma, a diferença genética entre população poderia ser determinada por a distância geográfica, tal como a diferenças genéticas encontrada entre populações de Sachá-Inchi de Cuzco e San Martin no Peru usando marcadores ISSR - Inter simple sequence repeats (RODRIGUEZ et al., 2010), devido que ambas as populações estão distanciadas em aproximadamente 800 Km em linha reta.

3.6 Avaliação e caracterização de coleções de trabalho no melhoramento genético

A genética quantitativa oferece um guia para o melhoramento de plantas (SIMMONDS, 1979). Neste sentido, Falconer (1981) indica que a genética quantitativa é o estudo da variação, especificamente a variação estatística observada em populações naturais ou, principalmente, experimentais. A partição de esta variância experimental em componentes atribuíveis a diferentes causas é a base da genética quantitativa, permitindo estimar quanta da variação hereditária está presente e como pode ser manipulada. Também, a genética quantitativa identifica quais componentes poderiam ser atribuídos a um determinado parâmetro genético da população experimental (CRUZ et al., 2012; FALCONER, 1981; SIMMONDS, 1979).

É importante destacar que a variação fenotípica em uma determinada população experimental é uma função do gene subjacente e das frequências de alelos da amostra populacional e o ambiente em que a população se desenvolve (CRUZ et al., 2012; FALCONER, 1981). Desse modo, quaisquer estimativas de variância genética e parâmetros são específicos para a população amostrada no ambiente na qual ela é estudada (FALCONER, 1981).

3.7 Estimativas de parâmetros genéticos e seleção em coleções de trabalho em fruteiras tropicais

Todos os planos de melhoramento são projetados para explorar ao máximo a diversidade genética disponível e a herdabilidade das características de importância econômica (SIMMONDS, 1979). Em fruteiras nativas perenes, esses planos devem ser eficientes porque é muito caro manter o experimento a longo prazo, e é muito raro que um experimento possa ser plantado apenas para estimar a herdabilidade que ajudarão a definir a metodologia mais adequada (CLEMENT, 2001; CORNELIUS et al., 2006; VALENTE et al., 2017a, 2017b). Além disso, o financiamento de programas de melhoramento de fruteiras não convencionais costumam ser instáveis para empresas públicas, razão pela qual é importante tomar decisões na fase inicial do melhoramento e a seleção precisa ser eficiente (VAN LEEUWEN, 2005).

A maioria dos programas de melhoramento de espécies perenes convencionais no Brasil tais como pupunha (*Bactris gasipaes* (Kunth)) (CLEMENT et al., 2001), dendê (*Elaeis guineensis* Jacq), guaraná (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.) e não convencionais tais como camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh) pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) iniciam com a seleção massal de populações originadas de polinização aberta (ATROCH et al., 2010; CLEMENT, 2001; CORNELIUS et al., 2006; LOPES et al., 2012; SMID et al., 2017; SOUZA et al., 2002). Com polinização aberta, porém, é somente possível selecionar um parente, conseqüentemente o ganho genético poderia ser relativamente lento, a menos que a herdabilidade seja alta (CLEMENT, 2001). No entanto, todo novo germoplasma adicionado ao programa de melhoramento desde o banco de germoplasma é inicialmente selecionado de progênies de polinização aberta.

A partir dessa população selecionada, que é a mesma para a recombinação, é possível fazer cruzamentos controlados entre apenas alguns progenitores selecionados,

seguido por testes de progênie (CLEMNET, 2001; DE RESENDE et al., 2005). Essa metodologia é mais trabalhosa comparada à seleção massal, mas, permite um avanço mais rápido (SIMMONDS, 1979). Segundo Cruz et al. (2012) e De Resende et al. (2005) esta é a forma mais eficiente de explorar a variância genética aditiva presente na população base que originou o programa de melhoramento. Devido ao pequeno número de pais que são usados em cada ciclo, porém, um rápido estreitamento da base genética da população melhorada é inevitável. Portanto é importante adicionar um novo germoplasma a cada ciclo de seleção, o qual também aumenta a variância genética aditiva disponível.

Em sachá-inchi, uma espécie perene alógama, a seleção entre progênies também é uma estratégia que vem sendo aplicada no Brasil (VALENTE et al., 2017a, 2017b). Valente et al. (2017b) demonstraram que a herdabilidade é alta tanto nas características de produção tal como o número total de frutos, número total de sementes, peso total de frutos ($h^2 = 0,72$) como nas características de biometria do fruto tal como peso médio de semente, peso médio de fruto, tamanho de sementes e número de sementes mostram alta herdabilidade ($h^2 = 78-97\%$) (VALENTE et al., 2017b, 2017c). Estes resultados indicam que é provável obter altos ganhos genéticos na produção e outras características do fruto.

Valente et al. (2017c) determinaram que a seleção de progênies mais produtivas de sachá-inchi é obtida com um mínimo de cinco meses de colheitas, atingindo uma acurácia de 90%. Embora não seja especificado o momento da contagem das colheitas, considerando que sachá-inchi inicia a produção em aproximadamente seis meses após o plantio e apresenta dois picos de produção de frutos durante um ano, é provável que a seleção poderia ser realizada no primeiro ano de plantio, devido a espécie iniciar a primeira colheita após seis meses de plantio (VALENTE et al., 2017b).

Sachá-inchi é muito variável morfológicamente, tanto em bancos de germoplasmas como em toda sua distribuição natural, principalmente para a característica do fruto (VALENTE et al., 2017b). Variáveis biométricas do fruto são promissórias para caracterizar acessos de sachá-inchi. Estudos indicam que acessos de sachá-inchi procedentes do estado de Amazonas no Brasil variam significativamente em número de sementes por fruto (média \pm desvio padrão; $3,86 \pm 0,14$) peso de fruto ($3,42 \pm 0,21$ g), peso de semente ($0,95 \pm 0,15$ g), comprimento ($17,63 \pm 1,44$ mm), largura ($15,18 \pm 0,71$ mm) e altura de semente ($10,15 \pm 0,86$ mm), e teor de óleo na semente ($30 \pm 8\%$) (VALENTE et al., 2017b). No entanto, ainda falta determinar como as características do fruto afetam os ganhos genéticos na produção de semente, que certamente está relacionada com a produção de óleo, característica de importância econômica.

3.8 Análise de dados multivariada

A análise de dados multivariada mostra ser uma alternativa eficiente para explorar a variabilidade das populações de *sacha-inchi*. O método pode identificar grupos diversos explorando em conjuntos as variáveis preditoras ou independentes. Uma vez identificado os grupos ou padrões possíveis cruzamentos ou formação de bancos de germoplasma apenas com material promissório podem ser recomendados. Depois, a avaliação da variabilidade fenotípica da população selecionada pode ser complementada com a caracterização molecular (CRUZ et al., 2012; FRANCO, 2003).

Os dados multivariados são muito parecidos com os univariados. Estes consistem de uma ou mais variáveis independentes (preditoras) e duas ou mais variáveis dependentes (respostas). Dados multivariados podem ser quantitativos ou qualitativos (FRANCO, 2003; GOTELLI e ELLISON, 2016). Neste estudo, estará focada em variáveis quantitativas.

A partir de vários métodos multivariados de natureza quantitativa pode-se estimar a diferença entre observações individuais, amostrais, grupos de tratamentos ou populações. Estas diferenças com frequência são expressas como distâncias entre observações no espaço multivariado (GOTELLI e ELLISON, 2016).

A distância euclidiana é a medida mais utilizada (obtida aplicando o teorema de Pitágoras); embora, ele nem sempre é a mais recomendável para calcular a distância entre os objetos multivariados. Em geral, as distâncias euclidianas, de Manhattan, de Corda, e Bray-Curtis são usadas principalmente para dados numéricos contínuos, sendo considerados exemplos de distâncias métricas (GOTELLI e ELLISON, 2016; CRUZ et al., 2012).

Os métodos multivariados podem ser divididos em dois grandes grupos. O primeiro grupo é denominado de ordenação e são usados para ordenar dados multivariados. O segundo grupo é chamado de classificação, que é o processo do qual agrupamos os objetos. Enquanto o objetivo da ordenação é separar as amostras ao longo de gradientes ambientais ou biológicos (eixos), o objetivo da classificação é agrupar objetos similares em classes identificáveis e interpretáveis que podem ser distinguidas das classes vizinhas (GOTELLI e ELLISON, 2016).

A ordenação cria novas variáveis, chamadas de eixos principais, onde as amostras recebem escores. Esta técnica é uma técnica de redução de dados, já que começa com um

conjunto de n variáveis, gera um número de menor variáveis que, ainda assim, consegue captar a variação importante nos dados. A ordenação pode ser usada para discriminar ou separar amostras ao longo de eixos ou as novas variáveis (CRUZ et al., 2012; FRANCO, 2003; GOTELLI e ELLISON, 2016).

A Análise de Componentes principais (PCA) é a maneira mais simples para ordenar os dados. Usamos PCA para criar algumas poucas variáveis importantes, chamadas de componentes principais (onde as variáveis originais estão agrupadas), que caracterizam o máximo possível a variação em um conjunto de dados multivariados. A característica mais importante da PCA é que as novas variáveis não são correlacionadas umas às outras. Portanto, essas variáveis não correlacionadas podem ser usadas na regressão múltipla ou na ANOVA, por não apresentarem colinearidade. Nesse sentido, é possível usar os métodos dos componentes principais como uma variável univariada simples e usar ANOVA para testar diferenças entre grupos de tratamentos ou populações de amostras (GOTELLI e ELLISON, 2016). A PCA é eficiente na medida em que existem fortes intercorrelações nos dados originais. Se no começo todas as variáveis não são correlacionadas, ou poucas variáveis correlacionadas, não ganhamos nada com a PCA, devido que não podemos capturar a variação em umas poucas variáveis novas (FIELD, 2013; GOTELLI e ELLISON, 2016).

Depois de extrair os componentes principais, é possível calcular a proporção que as variáveis estão relacionadas a esses componentes (cálculo das cargas das variáveis em cada componente). Aqui, é observado que a maioria das variáveis tem cargas altas no componente mais importante e cargas baixas nos demais componentes. Essa característica torna a interpretação difícil. Desta limitação, a técnica de Rotação de Fatores é usada para distinção entre fatores ou componentes, tanto na análise fatorial como na análise de componentes principais, respectivamente. Assim, o objetivo das rotações fatoriais é encontrar uma solução interpretável, onde cada variável apresente carga elevada em poucos fatores ou apenas um (DAMASIO, 2012; FIELD, 2013).

As rotações fatoriais podem ser de dois tipos: ortogonais ou oblíquas. As rotações ortogonais pressupõem que os componentes principais extraídos sejam independentes em si, enquanto a rotação oblíqua permite que os componentes principais sejam correlacionados entre si. Por conseguinte, se os componentes não forem correlacionados, os resultados obtidos com a rotação oblíqua serão semelhantes à rotação ortogonal (DAMASIO, 2012). Portanto, em nosso estudo, assumimos o método de rotação oblíqua para obter uma melhor interpretação das cargas dos componentes principais.

A análise de agrupamentos é a análise é a técnica mais usada do método de análise de classificação: a análise de agrupamentos usa “ m ” observações, das quais cada uma está associada com “ n ” variáveis numéricas contínuas e separará as observações em grupos. O agrupamento inicia com várias observações separadas e os vai reunindo em agrupamentos sucessivamente maiores até formar um conglomerado único.

Os métodos de agrupamento usam uma matriz quadrada $m \times m$ de distâncias na qual os valores são as distâncias morfológicas par-a-par medidas para cada par de genótipos em nosso estudo, sendo as distâncias euclidianas as mais simples de usar (CRUZ et al. 2012). Gotelli e Ellison (2016) indicam que as posições dos métodos dos componentes principais gerados da PCA têm a mesma distância euclidiana entre si que os dados originais no espaço multivariado. Essa propriedade é mantida apenas quando as distâncias euclidianas são calculadas usando todos os componentes principais, mas, isso não acontece se é usado algum dos primeiros componentes para calcular a distância euclidiana. Embora existam essas diferenças entre as distâncias euclidianas dos dados originais e dos primeiros componentes principais, os padrões entre as amostras (genótipos) são mantidas (CRUZ et al., 2012). Por tanto, é possível utilizar a matriz de distâncias euclidianas obtidas a partir dos escores dos componentes principais extraídos.

Cardinal-McTeague et al. (2019) verificaram em *Plukenetia carolis-vegae*, *Plukenetia huayllabamban*, e *Plukenetia volubilis* que o comprimento do estilete do pistilo das espécies, coincidem inversamente com o tamanho de sementes ou, certamente, o tamanho de frutos (CARDINAL-MCTEAGUE et al., 2019; RODRIGUEZ et al., 2010). Estas variáveis morfológicas têm potencial para explorar a diversidade genética dos genótipos, junto com as variáveis de produção ou biometria de sementes.

3.9 Viabilidade de pólen em sachá-inchi

Estudos de viabilidade *in vitro* e colorimétrico não são relatados em sachá-inchi, exigindo assim pesquisas. A viabilidade do pólen pode ser estimada por métodos indiretos baseados em coloração citológica ou germinação *in vitro*. O método *in vitro* é bastante usado nos estudos por ser um método mais eficiente, rápido e fácil de observar (BREWBAKER e KWACK, 1963). Cabe mencionar, que o método do corante superestima a porcentagem de germinação do pólen (EINHARDT et al., 2006; VARGAS et al., 2009).

Brewbaker e Kwack (1963) indicam que o íon cálcio é indispensável na germinação *in vitro* do pólen de várias espécies de plantas com flores (86 espécies, incluindo 79 géneros representando 39 famílias). Os pesquisadores indicam que embora o cálcio não pode ser omitido de nenhum meio sem prejudicar a germinação, é provável que outros íons necessitam estar presentes juntos ou separados tais como o K, Mg, B ou Na, para melhorar a germinação. Contudo, em *Jatropha curcas* é possível obter entre 81% de germinação *in vitro*, quando usado o meio de cultura recomendado por Brewbaker e Kwack (1963) (DINESH, 2018).

Se a germinação *in vitro* apresenta dificuldade para estimar a viabilidade de grãos de pólen, é possível estimar a viabilidade através de métodos colorimétricos, tal como acontece em espécies selvagens ou cultivadas de *Manihot esculenta* (MBAHE et al., 1991; VIERA et al., 2012). Contudo, esta hipótese ainda não foi confirmada em *sachinchi*.

A viabilidade do pólen é importante no melhoramento de plantas, porque permite o sucesso na hibridação controlada. Em geral, em algumas espécies cultivadas tais como o maracujá (COSTA et al., 2009) e o açaí (*Euterpe precatoria* Mart.), o pólen colhido de flores em adequado estado de desenvolvimento (da antese) e sob efeito do íon cálcio germinam muito bem, o qual certamente pressupõe que teste de viabilidade não são necessários (COSTA et al., 2009; TAVARES, 2020). Contudo, em certas ocasiões, o pólen é colhido em outras regiões ou até em intercâmbios com outros países, sendo necessário o armazenamento do pólen para seu transporte. Neste caso, é recomendável testar a viabilidade do mesmo antes de ser usado.

REFERÊNCIAS

ATROCH, A. L.; DO NASCIMENTO FILHO, F. J.; DE RESENDES, M. D. V., Lopes, R.; CLEMENT, C. R. Avaliação e seleção de progênies de meios-irmãos de guaranazeiro. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 53, n. 2, p. 123-130, 2010.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American journal of botany**, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.

BRACK, E. A. **Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Peru**. Cuzco: Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas, 1999.

BUSSMANN, R. W.; TÉLLEZ, C.; GLENN, A. *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Peru. **Nordic Journal of Botany**, v. 27, p. 313–315, 2009.

BUSSMANN, R. W.; ZAMBRANA, N. P.; TÉLLEZ, C. *Plukenetia carolis-vegae* (Euphorbiaceae)—a new useful species from Northern Peru. **Economic Botany**, v. 67, n. 4, p. 387–392. 2013.

CACHIQUE, D.H.; SOLSOL, H. R.; SANCHEZ, M. A. G.; LOPES, L. A. A. Vegetative propagation of the underutilized oilseed crop sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 18, n. 65, p. 2027, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0659-9>

CAI, Z. Q. Shade delayed flowering and decreased photosynthesis, growth and yield of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) plants. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p.1235-1237, 2011.

CAI, Z. Q.; JIAO, D. Y.; LEI, Y. B.; XIANG, M. H.; LI, W. G. Growth and yield responses of *Plukenetia volubilis* L. plants to planting density. **The Journal Of Horticultural Science And Biotechnology**, v. 88, n. 4, p. 421-426, 2013.

CAI, Z. Q. D.; JIAO, Y.; TANG, S. X.; DAO, X. S.; LEI, Y. B.; CAI, C. T. Leaf photosynthesis, Growth, and Seed Chemicals of Sacha Inchi Plants Cultivated Along an Altitude Gradient. **Crop Science**, v. 52, p. 1859-1867, 2012.

CARDINAL-MCTEAGUE, W. M; WURDACK, K. J; SIGEL, E. M; GILLESPIE, L. J. Seed size evolution and biogeography of *Plukenetia* (Euphorbiaceae), a pantropical genus with traditionally cultivated oilseed species. **BMC Evol Biol**, v. 19, n. 29, 2019.

CARDINAL-MCTEAGUE, W. M; GILLESPIE, L. J. Molecular phylogeny and pollen evolution of Euphorbiaceae Tribe Plukenetieae. **Systematic Botany**, v. 41, n. 2, p. 329–347, 2016.

CHAI, X; YANG, FU, Z.; Q.; PAN, B. Z.; TANG, M., LI, C.; Xu, Z. F. First Report of Root and Basal Stem Rot in Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) Caused by *Fusarium oxysporum* in China. **Plant Disease**, v. 102, n. 1, p. 242-242, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0784-PDN>>

CHIRINOS, R.; ZULOETA, G.; PEDRESCHI, R.; MIGNOLET, E.; LARONDELLE, Y.; CAMPOS, D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1732–1739, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.078>>.

CLEMENT, C. R. Melhoramento de espécies nativas {Improvement of native species}. In: Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos & melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso, 2001, p. 423-441.

CISNEROS, F. H.; PAREDES, D.; ARANA, A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Chemical composition, oxidative stability and antioxidant capacity of oil extracted from roasted seeds of Sacha-Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 5191–5197, 2014.

CORNELIUS, J. P.; CLEMENT, C. R.; WEBER, J. C.; SOTELO-MONTES, C.; VAN LEEUWEN, J.; UGARTE- GUERRA, L. J.; RICSE-TEMBLADERA, A.; ARÉVALO-LÓPEZ, L. The trade-off between genetic gain and conservation in a participatory improvement programme: the case of peach palm (*Bactris gasipaes* KUNTH). **Forests, Trees and Livelihoods**, v. 16, p. 17–34. 2006.

COSTA, R. S.; MORO, F. V.; OLIVEIRA, J. C. Influência do momento de coleta sobre a viabilidade de grão de pólen em maracacujá-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 956-961, 2009.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**, Viçosa: UFV, 2012.

DAMÁSIO, F. B. Uso da análise fatorial exploratória em psicologia. Avaliação Psicológica. **Interamerican Journal of Psychological Assessment**, v. 11, n. 2, p. 213-228, 2012.

DE RESENDE, M. D. V.; BARBOSA, M. H. P.; REZENDE, G. D. S.; AGUIAR, A. M.; DIAS, L. D. S.; STURION, J. A. Métodos e estratégias de melhoramento de espécies perenes: estado da arte e perspectivas. In: Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais...Passo Fundo: Embrapa Trigo, Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas**, 2005., 2005.

DEL CASTILLO, A. M. R.; GONZALEZ-ASPAJO, G.; SANCHEZ-MARQUEZ, M. F.; KODAHN, N. Ethnobotanical Knowledge in the Peruvian Amazon of the Neglected and Underutilized Crop Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Economic Botany**, v. 73, p. 281–287. 2019.

DINESH, B. Pollen biology and morphology of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **International Journal of Botany Studies**, v. 3; n. 4; p. 01-03, 2018.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. do C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FALCONER, D. S. 1981. **Introduction To Quantitative Genetics**, London: Longman, 1981.

FRANCO, T. L. **Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos**, Cali, Colombia: Instituto Internacional de Recursos Genéticos – IPGRI, 2003. 89 p. Boletín Técnico No. 8.

FIELD, A. **Discovering statistics using IBM SPSS statistics**. 4. Ed. London: SAGE, 2013.

FREITAS, R. G. 2015. **Avaliação e seleção de genótipos de *Jatropha curcas* L.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2015. Tese de doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, 2015.

FREITAS, R.G.; DIAS, L. A. S.; CARDOSO, P. M. R.; EVARISTO, A. B.; SILVA, M. F.; ARAÚJO, N. M. Diversity and genetic parameter estimates for yield and its components in *Jatropha curcas* L. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.4238/gmr.15017540>>.

FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; PIANTINO, C. A.; GRIMALDI, R.; FERNANDO, A. C. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 49, p. 323–329, 2009.

GILLESPIE, L. J. A Synopsis of Neotropical Plukenetia (Euphorbiaceae) including two new species. **Systematic Botany**, v. 18, n. 4, p. 575-592. 1993.

GILLESPIE, L. J. Pollen morphology and phylogeny of the tribe Plukenetieae (Euphorbiaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 317–348. 1994.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. **The lipid handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2007.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia**. Porto Alegre, Brasil: Artmed Editora, 2016.

HAMAKER, B. R.; VALLES, C.; GILMAN, R.; HARDMEIER, R. M.; CLARK, D.; GARCIA H. H.; GONZALES, A. E.; KOHLSTAD, I.; CASTRO, M.; VALDIVIA, R.; RODRIGUEZ, T.; LESCANO, M. Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis*). **Cereal Chemistry**, v. 69, p. 461-463. 1992.

JIAO, D. Y.; XIANG, M. H.; LI, W. G.; CAI, Z. Q. Dry-season irrigation and fertilization affect the growth, reproduction, and seed traits of *Plukenetia volubilis* L. plants in a tropical region. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 311-316, 2012.

KODAHL, N. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) — from lost crop of the Incas to part of the solution to global challenges? **Planta**, v. 251, p. 1-22, 2020.

LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; RESENDE, M. D. V. Produção de cachos e parâmetros genéticos de híbridos de caiaué com dendezeiro. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, v. 47, n. 10, p. 1496-1503, 2012.

NUSSELDER, H. A. N. S.; CLOESEN, P. A. U. L. Noble seeds: Sacha inchi from Amazonia to the Caribbean Basin?. In: **Un recorrido por líneas locales. Aportes para políticas públicas en el sector rural de Centroamérica, el Caribe y la Región Andina**. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural, 2014. p. 5-14.

OLIVEIRA, S. A. G.; LOPES, M. T. G.; CHAVES, F. C. M.; MARTINS, C. C.; ALVES, C. C. 2013. Estimation of genetic parameters of *Plukenetia volubilis* L. seed germination. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 56, p. 49-54. 2013.

RAUF, S.; JAMIL, N.; TARIQ, S. A.; KHAN, M.; KAUSAR, M.; KAYA, Y. Progress in modification of sunflower oil to expand its industrial value. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p.1997–2006. 2017.

RAINER, W.; BUSSMANN, C. T.; ASHLEY, G. *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Peru. **Nordic Journal of Botany**, v. 27, p. 313-315, 2009.

RODRIGUEZ, A.; CORAZON-GUIVIN, G.; CACHIQUE, D.; MEJÍA, K.; DEL CASTILLO, D.; JEAN-FRANÇOIS, R.; GARCÍA-DÁVILA, C. Differentiation morphological and by Inter simple sequence repeats (ISSR) of species of genus *Plukenetia* (Euphorbiaceae) from Peruvian Amazon: suggestion for a new species. **Revista Peruana de Biología**, v. 17, n. 3, p. 325 – 330. 2010.

RODRIGUES, H. S. **Caracterização genética, morfológica e agrônômica de germoplasma de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) no estado do Amazonas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 2013.

RODRIGUES, P. H. V.; BORDIGNON, S. R.; AMBROSANO, G. M. B. Horticultural performance of *in vitro* propagated plants of Sacha inchi. **Ciência Rural**, v. 44, n. 6, p. 1050-1053. 2014.

RODRÍGUEZ, G.; VILLANUEVA, E.; GLORIO, P.; BAQUERIZO, M. Estabilidad oxidativa y estimación de la vida útil del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Scientia Agropecuaria**, v. 6, n. 3, p.155–163. 2015.

SIMMONDS, N. W. **Principles of crop improvement**. London: Longman, 1979.

ŠMÍD, J.; KALOUSOVÁ, M.; MANDÁK, B.; HOUŠKA, J.; CHLÁDOVÁ, A.; PINEDO, M.; LOJKA, B. Morphological and genetic diversity of camu-camu [*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh] in the Peruvian Amazon. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0179886, 2017.

SOLSOL, H. R; MESÉN, M. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estaquilla en el enraizamiento de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* l.). **Agronomía Costarricense**, v. 34, n. 2, p. 259-267. 2010.

SOUZA, A. G. C.; RESENDE, M. D. V.; SILVA, S. E. L.; SOUZA, N. R. The cupuaçuzeiro genetic improvement program at Embrapa Amazônia Ocidental. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 471-478, 2002.

STERBOVA, L.; CEPKOVA, P. H.; VIEHMANNNOVA, I.; CACHIQUE, D. H. Effect of thermal processing on phenolic content, tocopherols and antioxidant activity of sacha inchi kernels. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 2, p. e12848, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfpp.12848>>

TAVARES, M. dos S. Fenologia, viabilidade do pólen, emergência de semente e conteúdo de DNA nuclear de açazeiros (*Euterpe* spp.). Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2020. 66 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais. Universidade Federal do Amazonas, 2020.

VALENTE, M. S. F.; LOPES, G. M. T. G.; CHAVES, M. F. C.; PANTOJA, C. M.; SOUSA, G. F. M.; CHAGAS, E. A. 2017a. Molecular genetic diversity and mating system in sacha inchi progenies. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 4, p. 480-487, 2017a.

VALENTE, M. S. F.; CHAVES, F. C. M.; LOPES, M. T. G.; OKA, J. M.; RODRIGUES, R. A. F. Crop yield, genetic parameter estimation and selection of sacha inchi in central Amazon. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 2, p. 226-236. 2017b.

VALENTE, M. S. F.; LOPES, G. M. T. G.; CHAVES, M. F. C.; OLIVEIRA, A. M.; FREITAS de, D. R. B. Repeatability of biometric and fruit and seed yield traits of sacha inchi. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 3, p. 195-202. 2017c.

VAN LEEUWEN, J.; LLERAS-PÉREZ, E.; CLEMENT, C. R. Field genebanks may impede instead of promote crop development: lessons of failed genebanks of “promising” Brazilian palms. **Agrociencia**, v. 9, p. 61-66, 2005.

VASEK, J.; ČEPKOVA, H. P.; VIEHMANNNOVA, I.; OCELAK, M.; HUANSI, C. D.; VEJL, P. Dealing with AFLP genotyping errors to reveal genetic structure in *Plukenetia volubilis* (Euphorbiaceae) in the Peruvian Amazon. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1-24, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184259>>

WAKJIRA, A.; LABUSCHAGNE, M. T.; HUGO, A. Variability in oil content and fatty acid composition of Ethiopian and introduced cultivars of linseed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 601–607, 2004.

WEBSTER, G. L. Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. **Taxon**, v. 24, p. 593–601, 1975.

WU, Z.; WANG, B.; CHEN, X.; WU, J.; KING, G. J.; XIAO, Y.; LIU, K. (2016) Evaluation of linkage disequilibrium pattern and association study on seed oil content in brassica napus using ddRAD sequencing. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146383, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146383>>

YANG, C.; JIAO, D. Y.; GENG, Y. J.; CAI, C. T.; CAI, Z. Q. Planting density and fertilisation independently affect seed and oil yields in *Plukenetia volubilis* L. plants. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 201-207, 2014.

CAPÍTULO I - SELEÇÃO DE PROGÊNIES PARA PRODUÇÃO DE SEMENTE EM SACHA-INCHI

Resumo

Os programas de melhoramento de sachá-inchi (*Plukenetia volubilis* L), geralmente visam selecionar indivíduos com maior rendimento de sementes, uma vez que existe uma forte correlação entre rendimento de sementes e produção de óleo. Contudo, a remoção manual da casca da semente para a avaliação dessa característica é trabalhosa e onera os programas de melhoramento. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi estimar parâmetros genéticos e estimar ganhos de seleção direta e indireta para caracteres de produção de sementes em 12 progênies de polinização aberta. Parâmetros genéticos e ganhos de seleção direta e indireta foram estimados para os caracteres de produção de sementes, em doze progênies de polinização aberta de sachá-inchi. Fortes correlações genéticas foram observadas entre número de frutos, frutos colhidos e produção de sementes por planta ($r > 0,96$), e todas as três características demonstraram alta herdabilidade ($h^2 > 0,81$). Portanto, plantas com alto número de frutos colhidos e produção de frutos (por exemplo, acessos Cuzco, Dos de Mayo, Shanao, Aucaloma e AM-07) podem ser usadas para selecionar indiretamente as características genéticas de maior rendimento de sementes ($GS\% = 23\%$). Futuros programas de melhoramento de sachá-inchi podem selecionar progênies com alto número de frutos colhidos e produção de frutos para facilitar a seleção de progênies com alto rendimento de sementes por planta.

Palavras-chave: Correlação genética, Correlação fenotípica, Herdabilidade, Parâmetros genéticos, Resposta à seleção.

Abstract

Breeding programs for the improvement of sachainchi, *Plukenetia volubilis* L, generally aim to select individuals with greater seed yield since there is a strong correlation between seed yield and oil production. However, the manual removal of seed husks for evaluating this trait is laborious and costly, thereby discouraging breeding efforts. Accordingly, the objective of the present study was estimated genetic parameters and both direct and indirect selection gains were estimated for seed yield traits in 12 open-pollinated progenies. Strong genetic correlations were observed between number of fruits, fruits yield and seeds yield per plant ($r > 0.96$), and all three traits demonstrated high heritability ($h^2 > 0.81$). Therefore, plants with high numbers of fruits and fruits yield (e.g., accessions Cuzco, Dos de Mayo, Shanao, Aucaloma, and AM-07) can be used to indirectly select the genetic traits of higher seed yields (GS% = 23%). Future sachainchi improvement programs can select progenies with high numbers of fruits and fruits yield to facilitate the selection of progenies with high seeds yield per plant.

Keywords:

Genetic correlation, Phenotypic correlation, Heritability, Genetic parameter, *Plukenetia volubilis*, Selection response.

INTRODUÇÃO

A promoção do cultivo de *sacha-inchi* no Peru, desde início da década de 2000, vem sendo realizada em áreas que coincidem com resultados de pesquisas de diversidade genética de populações *in situ*. Tais estudos tem revelado que a diversidade dentro é maior que entre as populações nas diferentes regiões (RODRIGUEZ et al., 2010; VASEK et al., 2017). Embora exista variabilidade genética, o desenvolvimento do cultivo de *sacha-inchi* está ocorrendo sem que instituições públicas ou empresas tenham desenvolvido variedades melhoradas da espécie para as diversas regiões produtoras e os produtores adquirem semente através de troca ou nos mercados locais (DEL CASTILLO et al., 2019). A dinâmica do autofornecimento de semente pode colaborar para a redução da diversidade entre cultivos das comunidades de pequenos produtores em grandes áreas geográficas (VASEK et al., 2017). No entanto, é possível encontrar populações mais divergentes quanto menos acessíveis sejam estas dos principais centros de comércio.

Estudos de diversidade genética com marcadores moleculares do tipo AFLP indicam que existe diferença significativa entre a população originada da comunidade de Dos de Mayo (San Martin, Peru) com populações de comunidades localizadas em um raio de 70 Km na mesma região (RODRIGUEZ et al., 2010; VASEK et al., 2017) e que seria possível fazer seleção massal nos cultivos. Os produtores normalmente selecionam sementes de maior tamanho para estabelecer seus plantios, com intuito de incrementar a produção. Como a espécie é alógama (VALENTE et al., 2017a) e a seleção é praticada após a produção dos frutos, esta incide apenas sobre os genitores femininos, com contribuição de toda a população como genitores masculinos, por isso os ganhos genéticos com este tipo de seleção são menores ao se comparar com os obtidos em cruzamentos controlados.

Estudos sobre a base genética dos componentes da produção de sementes em *sacha-inchi* e das correlações entre eles podem contribuir para definição de estratégias de seleção que proporcionem maior ganho genético e para disponibilizar aos agricultores em menor tempo cultivares com produtividade superior aos plantios atuais.

Devido ao potencial de produção e uso nutracêutico das sementes, bem como, a capacidade adaptativa da planta a diferentes ambientes, a espécie tem se tornado relevante para a agricultura. Embora já existam para a espécie estudos botânicos, morfológicos, genéticos, agrônômicos e na área de tecnologia de alimentos, entre outros (KODAHL, 2020), ainda existem muitas lacunas no sistema de produção da espécie, começando pela

ausência de cultivares. Apesar do longo tempo de uso e cultivo, sachá-inchi ainda é considerada uma espécie não completamente domesticada e a caracterização de seu germoplasma é recente.

O produto de maior importância comercial da sachá-inchi é o óleo extraído das sementes, por isso, a produtividade das sementes é uma variável importante na seleção de cultivares (YANG et al., 2014). Para avaliação da produção de sementes é necessário que estas sejam extraídas manualmente após a colheita dos frutos, um processo dispendioso para a avaliação de grande número de genótipos. Valente et al. (2017b) demonstraram que a seleção simultânea sobre o rendimento em número de frutos, peso de fruto e número de semente por planta indica ganhos genéticos similares em sachá-inchi, no entanto, são desconhecidos como estes estão correlacionadas com os ganhos de seleção na produção de semente.

A produção de determinado componente da planta geralmente apresenta correlações com outros componentes, com magnitude e sentidos variados. Estudos sobre as correlações entre características das plantas nas populações de seleção são de interesse para o melhoramento, principalmente pela possibilidade de obter ganhos de seleção de forma indireta. A seleção indireta se justifica quando a característica de interesse principal tem alto custo ou complexidade de avaliação e apresenta forte correlação com outra característica, que apresenta menor custo ou complexidade de avaliação (CRUZ et al., 2012; FALCONER, 1960). A escolha pela seleção indireta deve considerar os ganhos estimados comparados com a seleção direta, o que depende da magnitude da correlação entre as características e da herdabilidade de cada uma.

Além dos ganhos genéticos obtidos no ciclo de seleção que está sendo praticado, é importante que seja mantida variabilidade genética na população de melhoramento para que ganhos genéticos possam ser alcançados com sucessivos ciclos de seleção, para isso deve ser escolhida uma intensidade de seleção adequada (CORNELIUS et al., 2006). Por meio da seleção massal pode selecionar os indivíduos que irão formar a próxima geração. Essa estratégia de seleção, embora com ganhos genéticos menores, pode gerar rapidamente uma nova cultivar. O método é recomendado para espécies com programa de melhoramento no em fase inicial (VAN LEEUWEN et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi estimar os parâmetros genéticos e estimar ganhos de seleção para caracteres de produção de sementes em progênies de polinização aberta de sachá-inchi que são vendidas em feiras livres, em Benjamin Constant – AM, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da área de estudo

O experimento foi instalado no Campo Experimental da Sede da Embrapa Amazônia Ocidental (2° 53' 29,141" S e 9° 58' 39.9" O), na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. O solo da área é classificado como Latossolo Amarelo distrófico no Sistema Brasileiro de Classificação do Solos (MOREIRA e FAGERIA, 2008). A região tem clima equatorial úmido, com curta estação seca (julho-setembro com precipitação mensal de 50-100 mm), e um mês de transição seca-úmida (outubro). A estação úmida se estende de novembro a junho (precipitação mensal de 200-300 mm). A temperatura média anual é 27 °C (FISCH et al., 1999).

Desenho experimental

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com doze progênies de meios-irmãos, três repetições e quatro plantas por parcela. As progênies avaliadas foram obtidas a partir de frutos de polinização aberta, oito adquiridas a partir de feiras livres em Benjamin Constant – AM, Brasil, nominadas pelo vendedor por: Dos de Mayo, Shanao, São Pedro, Cuzco, Aucaloma, Ponto Renato, João Guerra, Novo Horizonte, e quatro do banco ativo de germoplasma de sacha-inchi da Embrapa Amazônia Ocidental (AM-07, AM-13, AM-17 e AM-21) (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição de origem dos acessos de *Plukenetia volubilis* caracterizados em Manaus (Brasil), em setembro de 2018, localização de origem e conteúdo de DNA

Acessos	Coordenadas geográficas	Localização de origem	Conteúdo de DNA pg ^a	
			1 C (pg)	Tamanho do genoma (Mb)
Novo Horizonte	4° 23' 0,01" S 70° 1' 53,1" O	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	1,41	1378,98
Cuzco	4° 23' 0,01" S 70° 1' 53,1" O	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	1,26	1233,28
Aucaloma	4° 23' 0,01" S 70° 1' 53,1" O	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	-	-
São Pedro	4° 23' 0,01" S 70° 1' 53,1" O	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	-	-
Shanao	4° 23' 0,01" S 70° 1' 53,1" O	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	-	-
Ponto Renato	4° 23' 0,01" S 70° 1' 53,1" O	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	-	-
Dos de Mayo	4° 23' 0,01" S 70° 1' 53,1" O	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	1,25	1222,5
João Guerra	4° 23' 0,01" S 70° 1' 53,1" O	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	-	-
AM-7	2° 53' 29,141" S 9° 58' 39,9" O	Manaus, Brasil	-	-
AM-17	2° 53' 29,141" S 9° 58' 39,9" O	Manaus, Brasil	-	-
AM-13	2° 53' 29,141" S 9° 58' 39,9" O	Manaus, Brasil	-	-
AM-21	2° 53' 29,141" S 9° 58' 39,9" O	Manaus, Brasil	-	-

^a Conteúdo de DNA em picogramas obtido por Citometria de fluxo comparada à planta padrão *Pisum sativum* L (conteúdo de DNA: 9,09 pg; CV:1,34). Foi utilizado o Citômetro de Fluxo Faescalibur 4 cores da Becton Dickinson. Os histogramas foram obtidos com o software CellQuest e analisados no software WinMDI 2.8. ^e Coeficiente de variação.

Produção de mudas e plantio

A semeadura das progênies de sacha-inchi foi realizada em agosto de 2018, e as plântulas, após quatorze dias, foram transplantadas para sacos plásticos de 2 L. A profundidade do substrato para desenvolvimento das raízes foi de 30 cm de solo, do tipo Latossolo Amarelo. O plantio no campo foi realizado quando as mudas apresentavam dois pares de folhas e aproximadamente 20 cm de altura após quinze dias do transplante. Antes do plantio, o solo foi corrigido com calcário dolomítico 2 t ha⁻¹. Na adubação de

cobertura foram utilizadas 35 g de ureia, 35 g de superfosfato triplo, 23 g de cloreto de potássio e 1 L de esterco de galinha poedeira por planta, em dezembro de 2018, março de 2019 e junho 2019.

A condução das plantas foi realizada no sistema de espaldeira utilizando postes de concreto a cada 6 m de distância na linha e arames fixados horizontalmente a 1.0 e 1.5 m de altura do solo. Para a condução do caule, as plantas foram amarradas nos arames com fitilho de algodão. O espaçamento utilizado foi de 3 m entre linha e 2 m entre plantas. O plantio foi irrigado por gotejamento (1 L de água planta⁻¹ dia⁻¹), sendo realizado a cada dois dias na estação chuvosa (nov. – mai.) quando não houvesse precipitação durante este intervalo, e diariamente na estação seca (jul. - sep.).

Coleta de dados

A colheita de frutos iniciou no mês de março de 2019, aproximadamente 212 dias após o plantio, e foi realizada semanalmente até agosto de 2019, totalizando seis meses consecutivos de produção. Os frutos com cor marrom escuro, no estágio de máxima maturidade antes da deiscência dos frutos, foram colhidos a mão e secados na sombra a temperatura ambiente por 7 dias, depois secados em sala climatizada a 18 °C por 30 dias. Na avaliação das progênes foram consideradas as seguintes características: número de frutos por planta; produção de frutos por planta, em g.planta⁻¹; número de sementes por planta; produção de sementes por planta, em g.planta⁻¹; peso médio de fruto, em gramas; número de semente por fruto; peso médio de sementes, em gramas; e relação entre a produção de sementes e a produção de frutos. Também foi avaliado o início da primeira colheita, em dia (IC).

Análise de dados

Para análise foi usado a soma de seis meses de colheitas. Os componentes da variância e parâmetros genéticos foram estimados para cada característica de acordo com Cruz et al. (2012) nas análises de dados usado no Software Genes (CRUZ, 2013).

A análise de variância (ANOVA) foi realizada segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + B_j + e_{ij}$$

Onde: Y_{ij} = observação na i ésima progênie (i) do j ésimo bloco (j); μ = média geral; G_i = Efeito aleatório da i ésima progênie; B_j = efeito aleatório do j ésimo bloco; e_i = efeito aleatório do erro experimental.

A herdabilidade no sentido restrito foi estimada por $h^2 = \sigma_g^2 / \sigma_f^2$, sendo a estimativa σ_f^2 calculada com base na média de famílias. O coeficiente de variação genética entre as progênies (CVg), o coeficiente de variação ambiental (CVe) e o coeficiente de variação relativa (CVr) foram calculados por $CVg = 100(\sigma_g^2)^{1/2} / \bar{x}$, $CVe = 100(\sigma_e^2)^{1/2} / \bar{x}$ e $CVr = CVg / CVe$, respectivamente, onde \bar{x} é a média geral.

Baseado no resultado da ANOVA, a correlação genética e fenotípica foram estimadas como segue: correlação fenotípica: $r_p = \sigma_{p(x,y)} / (\sigma_{fx} \sigma_{fy})$; correlação genética: $r_g = \sigma_{g(x,y)} / (\sigma_{gx} \sigma_{gy})$; sendo $\sigma_{g(x,y)} = (\sigma_{p(x,y)} - \sigma_{e(x,y)}) / r$ (blocos), $\sigma_{gx} = (\sigma_{p(x)} - \sigma_{e(x)}) / r$, $\sigma_{gy} = (\sigma_{p(y)} - \sigma_{e(y)}) / r$. Adicionalmente, foi realizada análise de trilhas (CRUZ et al., 2014) para descobrir os efeitos diretos e indiretos entres os caracteres que apresentaram correlação com o peso total de sementes.

A seleção direta e indireta consistiu em usar o diferencial de seleção e a herdabilidade. O ganho esperado pela seleção direta no carácter X foi estimado como segue: $GS_x = (X_s - X_o) h_x^2 = DS \cdot h_x^2$, em que X_s é a média das progênies selecionadas para o carácter X; X_o é a média da população original; DS é o diferencial de seleção praticado na população; e h_x^2 é a herdabilidade do carácter X. A estimativa para o ganho indireto no carácter X, pela seleção no carácter Y, é dada por $GS = DS_{x(y)} \cdot h^2$, em que $DS_{x(y)}$ é o diferencial de seleção indireto obtido em X a partir da média das progênies selecionadas pela superioridade em Y, sobre o qual se pratica a seleção direta.

A estimativa para ganho de seleção percentual: $GS\% = GS \cdot 100 / X_o$, onde X_o é a média da população inicial. Na seleção foi usado uma intensidade de seleção de 25%, 33% e 42%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a classificação dos coeficientes de variação experimental (CVe) proposta por Pimental-Gomes (2009), para variáveis avaliadas a campo, a maioria dos valores foram considerados baixos ou médios, indicando alta e boa precisão experimental, respectivamente, as exceções foram para número de frutos, produção de frutos e produção de sementes por planta, sendo observados altos CVe e baixa precisão experimental (Tabela 2). Não existe classificação de valores de CVe específicos para as variáveis de sachá-inchi analisadas, no entanto, quando comparadas às obtidas por Valente et al. (2017b) com mesma espécie, estes encontraram valores de 58% e 63% para número de frutos e produção de frutos por planta, respectivamente. Tais valores são maiores do que aqueles encontrados neste estudo.

Tabela 2. Resumo da análise de variância - ANOVA e parâmetros genéticos para as características de produção e qualidade do fruto em doze progênies de *Plukenetia volubilis*.

Fontes de Variação	gl ^a	Nº frutos por planta	Produção de frutos por planta (g)	Nº sementes por planta	Produção de sementes por planta (g)	Quadrado Médio				
						Peso médio de frutos (g)	Nº Sementes/fruto	Peso médio de sementes (g)	Sementes/ Frutos (gr/gr)	Início da colheita (dia)
Valores de quadrados médios										
Blocos	2	64650	2878281	957099	978517	0,360	0,001	0,002	0,003	1220
Progênies	11	5592 *	163740 *	78157 *	67321 *	1,246 *	0,035 *	0,014 *	0,004 *	1105 ^{ns}
Resíduo	22	820	29220	11380	11984	0,177	0,011	0,002	0,00	520
Média		132	905	509	510	7,13	3,87	1,01	0,55	212
Cve (%) ^b		22	19	21	22	6	3	5	4	11
Parâmetros genéticos										
$\sigma^2 g^c$		1591	44840	22259	18443	0,357	0,008	0,004	0,001	198
$\sigma^2 f^d$		1864	54580	26052	22440	0,415	0,012	0,005	0,001	371
h^2 (%) ^e		85	82	85	82	86	67	83	90	53
Cvg (%) ^f		30	23	29	27	8	2	6	6	7
Cvg/Cve		1,39	1,24	1,4	1,24	1,42	0,85	1,27	1,71	0,62

^a gl: grau de liberdade; ^b Cve (%): coeficiente de variação residual; ^c $\sigma^2 g$: variância genotípica; ^d $\sigma^2 f$: variância fenotípica; ^e h^2 : herdabilidade no sentido amplo; ^f Cvg (%): coeficiente de variação genotípica. ** Significativo ao 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns} não significativo pelo teste F.

O efeito de progênies foi significativo na análise de variância em todas as variáveis estudadas, exceto para o início da colheita, isso indica que existe variabilidade genética entre as progênies, portanto, que há possibilidade de ganhos com seleção (Tabela

2). A Figura 2 apresenta variabilidade em tamanho de frutos e sementes nos doze acessos das progênies estudadas.

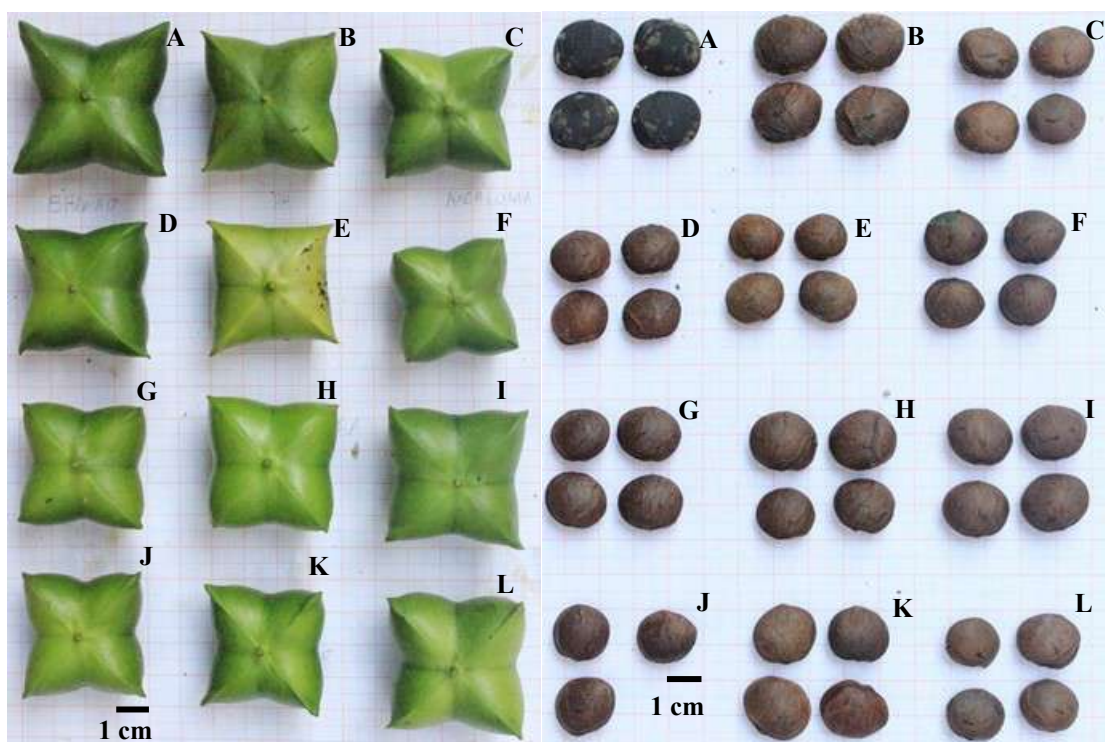


Figura 2. Tamanho de frutos e sementes em doze acessos de *Plukenetia volubilis*. A. Shanao, B. Novo Horizonte, C. Aucaloma, D. Ponto Renato, E. Cuzco, F. Dos de Mayo, G. João Guerra, H. São Pedro, I. AM-13, J. AM-07, K. AM-17, L. AM-21.

Em geral, o início da colheita foi após 212 dias do plantio, aproximadamente 7 meses (Tabela 2). Resultados diferentes obteve Valente et al. (2017b), quando estudaram a produção de frutos de sacha-inchi na Amazônia brasileira, iniciando após 6 meses do plantio.

A herdabilidade variou entre 82 e 85% para as características de produção, tais como o número total de frutos, peso total de frutos, número total de semente e peso total de sementes (Tabela 2). Os resultados diferem de Valente et al. (2017b), os quais obtiveram entre 34% e 36% de herdabilidade, quando avaliaram a produção total de número e peso de frutos e número e peso de sementes em progênies de *P. volubilis*. As diferenças de valores de herdabilidade encontrados no estudo com aqueles reportados por Valente et al. (2017b) podem ser explicadas pela utilização de populações com diferentes bases genéticas (CRUZ et al., 2012).

Os altos valores obtidos para as estimativas de herdabilidade e para a relação CVg/Cve , maior que a unidade, indicaram condições favoráveis para ganhos genéticos com a seleção de progênies (Tabela 2) e o uso do método de seleção massal em nível de

progênie, visando maiores ganhos nas características de produção de fruto (FALCONER, 1960).

Valores altos ($r \geq 0,97$), positivos e significativos foram obtidos para estimativas de correlações genéticas entre a produção de sementes, número de frutos, número de sementes e produção de frutos por planta, o que indica que a resposta correlacionada também será alta entre essas características (Tabela 3). Valente et al. (2017b) também encontraram altas correlações positivas e significativas entre o número e peso total de frutos em sacha-inchi. Para *Jatropha curcas* L., espécie da mesma família, também foi observada alta correlação entre o peso de sementes com as outras características ($r = 0,99$; FREITAS et al., 2015).

Tabela 3. Correlação genotípica (diagonal superior) e fenotípica (diagonal inferior) para as características de produção e qualidade do fruto em doze progênies de *Plukenetia volubilis*.

	Nº frutos por planta	Produção de frutos por planta (g)	Nº sementes por planta	Produção de sementes por planta (g)	Peso médio de frutos (g)	Nº Sementes/fruto	Peso médio de sementes (g)	Sementes /Frutos (gr/gr)	Início da colheita (dia)
Nº frutos por planta		0,97 **	0,99 **	0,97 **	- 0,75 **	-0,22	-0,24	0,73 **	-0,19
Prod. de frutos por planta	0,96 **		0,97 **	0,99 **	- 0,54	-0,22	-0,02	0,68 *	-0,33
Nº sementes por planta	0,99 **	0,96 **		0,97 **	- 0,73 **	-0,16	-0,25	0,73 **	-0,18
Prod. de sementes por planta	0,97 **	0,98 **	0,97 **		- 0,64 *	- 0,28	0,00	0,81 **	-0,32
Peso médio de frutos	- 0,70 *	-0,49	- 0,68 *	-0,57 *		0,25	0,54	-0,73 **	-0,11
Nº Sementes por fruto	-0,19	-0,16	-0,12	-0,19	0,26		-0,37	-0,30	0,08
Peso médio de sementes	-0,23	0,03	-0,24	0,00	0,59 *	-0,22		0,10	-0,44
Sementes por Frutos	0,67 *	0,61 *	0,67 *	0,73 **	- 0,68 *	-0,14	-0,11		-0,22
Início da colheita	-0,12	-0,2	-0,12	-0,19	-0,01	0,01	-0,21	-0,21	

** , * Significativo pelo teste-t ao 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. ^a Ic – início da colheita.

Os produtores comercializam as sementes por peso no Peru (DEL CASTILLO et al., 2019), assim, o objetivo do melhoramento genético deve ser selecionar plantas com maior produção de sementes. Para obter a produção de sementes é necessário a extração manual das sementes dos frutos, o que é extremamente oneroso em mão de obra, por isso, se outros componentes de produção de mais fácil avaliação apresentam alta correlação com esta característica, estes podem ser úteis na seleção indireta. Os resultados

encontrados mostraram que as características número de frutos e produção de frutos, apresentaram altas estimativas de herdabilidade e alta correlação genética com a produção de sementes (Tabelas 2 e 3).

Produtores do Peru selecionam plantas pelo tamanho das sementes produzidas (KODAHN, 2020), porque quanto maior o tamanho, espera-se que maior será o peso médio das sementes. Entretanto, não houve correlação significativa entre o peso médio de sementes com o peso total das sementes por planta (Tabela 3), o que indica que a seleção praticada pelos agricultores, se fosse nessa população de trabalho, não resultaria em ganhos de produtividade.

Visando explorar os efeitos direto e indiretos dos caracteres que apresentaram unicamente correlação significativa com a produção de sementes, tais como o número de frutos por planta e produção de sementes por planta, número sementes por planta e peso médio de frutos, foi realizada análise de trilha (CRUZ et al., 2012; LI, 1975) (Tabela 4). Assim, a produção de frutos registrou alto e positivo efeito direto sobre a produção de sementes (0,725) (Tabela 4), o qual significa que a resposta correlacionada através da seleção indireta será eficiente. Umamaheswari et al. (2009) também reportaram que o peso total de frutos de *Jatropha curcas* L. é uma variável importante para a seleção indireta de plantas com maior rendimento de sementes e óleo, baseado sobre análise de trilhas.

Tabela 4. Estimativa dos efeitos diretos e indiretos do número total e peso total de frutos, número total de sementes e peso médio de frutos sobre o peso total de sementes em nível fenotípico de *Plukenetia volubilis*.

Caracteres		Coefficientes padronizados
Número de frutos por planta	Efeito direto sobre a produção de sementes por planta	0,046
	Efeito indireto via produção de frutos por planta	0,711
	Efeito indireto via o número de sementes por planta	0,222
	Efeito indireto via o peso médio de frutos	0,006
	Total (coeficiente de correlação)	0,985
Peso de frutos por planta	Efeito direto sobre a produção de sementes por planta	0,725
	Efeito indireto via produção de frutos por planta	0,045
	Efeito indireto via o número de sementes por planta	0,218
	Efeito indireto via peso médio de frutos	0,005
	Total (coeficiente de correlação)	0,994
Número sementes por planta	Efeito direto sobre a produção de sementes por planta	0,222
	Efeito indireto via produção de frutos por planta	0,046
	Efeito indireto via o número de sementes por planta	0,714
	Efeito indireto via peso médio de frutos	0,006
	Total (coeficiente de correlação)	0,988
Peso médio de frutos	Efeito direto sobre a produção de sementes por planta	-0,011
	Efeito indireto via produção de frutos por planta	-0,025
	Efeito indireto via o número de sementes por planta	-0,286
	Efeito indireto via o número total de sementes	-0,116
	Total (coeficiente de correlação)	-0,438
Coeficiente de determinação		0,995

O ganho de seleção direta no rendimento em número de frutos por planta (25%) e produção de frutos por planta (20%) foi semelhante ao ganho indireto da produção de sementes por planta (23%) (Tabela 5). Por tanto, o programa de melhoramento poderá aumentar a produção de sementes de sacha-inchi por planta em 23% no primeiro ciclo de seleção (1 ano) simplesmente via rendimento em número de frutos ou peso de frutos por planta. Este resultado diverge da recomendação de Valente et al. (2017b), que propõe selecionar progênies mais produtivas usando o aumento simultâneo nas características número total de sementes e número e peso total de frutos. Neste caso, os resultados mostram que a seleção de progênies mais produtivas para produção de sementes pode ser realizada indiretamente via número ou produção de frutos por planta, como já mencionado anteriormente.

Tabela 5. Ganho de seleção direta (GSD%) e indireta (GSI%) para as características de produção e a qualidade do fruto em doze progênies de *Plukenetia volubilis*.

Variável selecionada	Respostas nas variáveis ^b	X _o	X _s	h ² %	GS	GS %	Progênies Seleccionadas
Nº frutos por planta	Nº frutos	132	171	85	34	25	Dos de Mayo, Shanao, Cuzco, Acaloma, AM-07
	Prod. de frutos	905	1122	82	179	20	
	Nº sementes	509	654	85	124	24	
	Prod. de sementes	510	653	82	118	23	
	Peso médio de frutos	7,129	6,824	86	-0,262	-4	
	Sementes/Frutos	0,553	0,576	90	0,020	4	
Produção de frutos por planta (g)	Nº frutos	132	171	85	34	25	Dos de Mayo, Shanao, Cuzco, Acaloma, AM-07
	Prod. de frutos	905	1122	82	179	20	
	Nº sementes	509	654	85	124	24	
	Prod. de sementes	510	653	82	118	23	
	Peso médio de frutos	7,129	6,824	86	-0,262	-4	
	Sementes/Frutos	0,553	0,576	90	0,020	4	
Nº de sementes por planta	Nº frutos	132	171	85	34	25	Dos de Mayo, Shanao, Cuzco, Acaloma, AM-07
	Prod. de frutos	905	1122	82	179	20	
	Nº sementes	509	654	85	124	24	
	Prod. de sementes	510	653	82	118	23	
	Peso médio de frutos	7,129	6,824	86	-0,262	-4	
	Sementes/Frutos	0,553	0,576	90	0,020	4	
Produção de sementes por planta (g)	Nº frutos	132	171	85	34	25	Dos de Mayo, Shanao, Cuzco, Acaloma, AM-07
	Prod. de frutos	905	1122	82	179	20	
	Nº sementes	509	654	85	124	24	
	Prod. de sementes	510	653	82	118	23	
	Peso médio de frutos	7,129	6,824	86	-0,262	-4	
	Sementes/Frutos	0,553	0,576	90	0,020	4	
Peso médio de frutos (g)	Nº frutos	132	102	85	-25	-19	Shanao, São Pedro, AM-13, AM-21, Ponto Renato
	Prod. de frutos	905	772	82	-109	-12	
	Nº sementes	509	401	85	-92	-18	
	Prod. de sementes	510	415	82	-78	-15	
	Peso médio de frutos	7,129	7,695	86	0,485	7	
	Sementes/Frutos	0,553	0,526	90	-0,025	-4	
Sementes/Frutos (g/g)	Nº frutos	132	158	85	23	17	Dos de Mayo, Cuzco, AM-07, Guerra, Novo Horizonte
	Prod. de frutos	905	1017	82	92	10	
	Nº sementes	509	607	85	84	16	
	Prod. de sementes	510	600	82	74	14	
	Peso médio de frutos	7,129	6,647	86	-0,414	-6	
	Sementes/Frutos	0,553	0,585	90	0,029	5	

X_o: média da população inicial, X_s: média da população selecionada, h²: herdabilidade no sentido amplo, GS: ganho de seleção.

A seleção direta para aumentar a produção de semente ou frutos reduziu os ganhos indiretos no peso médio de frutos sobre diferentes intensidades de seleção (Tabela 6),

concordando com a correlação negativa mostrada entre as características. Embora o objetivo seja aumentar a produção de semente em sachá-inchi, a alta intensidade na seleção poderia diminuir a variabilidade genética da população melhorada (KODAHN, 2020). Como alternativa, no primeiro ciclo de seleção, o uso de uma baixa intensidade de seleção (*i*) mostrou ser uma estratégia promissora para incluir genótipos divergentes em outras características (Tabela 6). Com *i* de 25% (três progênies) foi selecionada progênies com frutos significativamente pequenos (Genótipo: média \pm desvio padrão, Aucaloma = $6,83 \pm 0,38$ g) e muito pequenos (Cuzco = $6,02 \pm 0,55$ e Dos de Mayo = $6,31 \pm 0,12$ g); porém, com *i* de 42% (cinco progênies) possibilitou selecionar progênies de frutos grandes (Shanao = $8,05 \pm 0,36$ g), medianos (AM-07 = $7,33 \pm 0,23$), pequenos (Aucaloma) ou muito pequenos (Cuzco) (Teste de Skott-Knott, $p < 0,05$ para cada comparação). Por tanto, a baixa intensidade de seleção aplicada no estudo (42%) foi viável, já que a população era pequena. Além disso, ainda falta avaliar outras características de interesse industrial e do produtor, tais como o teor de ácidos graxos insaturados (CHIRINOS et al., 2013; HAMAKER et al., 1992) e a resistência às doenças do gênero *Fusarium* (CHAI et al., 2018; YANG et al., 2017), respectivamente.

As progênies Dos de Mayo, Shanao, Cuzco, Aucaloma e AM-07 foram selecionadas com base no rendimento em número de frutos ou produção de frutos. Estas progênies podem ser multiplicadas via estaquia, na casa de vegetação com sistema de subirrigação (SOLSOL et al., 2010). Depois de formar as mudas (estacas), podem ser plantadas isoladamente. As sementes produzidas neste jardim clonal via polinização aberta, já podem ser fornecidas como semente melhorada para os produtores, constituindo assim a população melhorada (CORNELIUS et al., 2006).

Após recombinação das cinco progênies selecionadas é esperado que a geração seguinte (população melhorada) produza em média $1.122 \text{ g planta}^{-1}$ ou 1.246 Kg ha^{-1} de fruto seco (cálculo baseada em $1111 \text{ plantas.ha}^{-1}$) (Tabela 5). Resultados superiores aos encontrados por Valente et al. (2017b), que selecionaram dez progênies de sachá-inchi, manejadas na mesma área e condições do presente estudo, encontrando uma média de $763 \text{ g.planta}^{-1}$ ou 847 kg.ha^{-1} .

Os cinco acessos selecionados no estudo possuem variabilidade genética para seleção. Embora as metodologias de análise sejam diferentes, progênies de origem diferente, vale a pena ressaltar que o estudo de análise de genética molecular para acessos da região San Martin, no Peru, realizado para as populações de Dos de Mayo, de Shanao e de Aucaloma, revelou a existência de variabilidade genética (VASEK et al., 2017),

assim como detectado no presente estudo para as populações da região de Benjamin Constant, Am, Brasil. Os autores encontraram também que Dos de Mayo seria uma população diferente de Shanao e Aucaloma. A variabilidade genética que encontrada para o acesso Cuzco também foi verificada no estudo de Rodriguez et al. (2010). Embora o aumento da intensidade de seleção reduza os ganhos genéticos (Tabela 6) e as populações estudadas apresentem variabilidade genética, recomenda-se usar baixas intensidades de seleção, para evitar a perda rápida da variabilidade genética nas populações melhoradas de sachá-inchi, como descrito no melhoramento de *Bactris gasipaes* (CONERLIUS et al., 2006).

Tabela 6. Ganho de seleção direta (GSD%) e indireta (GSI%) para as características de produção e o peso médio de fruto em doze progênies de *Plukenetia volubilis* a partir de diferentes intensidades de seleção.

Variável selecionada	Respostas nas variáveis ^b	h ² %	Intensidade de seleção											
			25% (3 progênies)				33% (4 progênies)				42% (5 progênies)			
			Xo	Xs	GS	GS%	Xo	Xs	GS	GS%	Xo	Xs	GS	GS%
N° frutos por planta	N° frutos	85	132	190	49	37	132	181	42	32	132	171	34	25
	Prod. de frutos	82	905	1184	230	25	905	1153	204	23	905	1122	179	20
	Prod. de sementes	82	510	685	144	28	510	678	138	27	510	653	118	23
	Peso médio de frutos	86	7,13	6,38	-0,64	-9	7,13	6,52	-0,53	-7	7,13	6,82	-0,26	-4
	PS ^a				1; 4; 6				1; 4; 6; 7				1; 2; 4; 6; 7	
Produção de frutos por planta (g)	N° frutos	85	132	190	49	37	132	181	42	32	132	171	34	25
	Prod. de frutos	82	905	1184	230	25	905	1153	204	23	905	1122	179	20
	Prod. de sementes	82	510	685	144	28	510	678	138	27	510	653	118	23
	Peso médio de frutos	86	7,13	6,38	-0,64	-9	7,13	6,52	-0,53	-7	7,13	6,82	-0,26	-4
	PS				1; 4; 6				1; 4; 6; 7				1; 2; 4; 6; 7	
Produção de sementes por planta (g)	N° frutos	85	132	185	46	35	132	181	42	32	132	171	34	25
	Prod. de frutos	82	905	1154	204	23	905	1153	204	23	905	1122	179	20
	Prod. de sementes	82	510	690	148	29	510	678	138	27	510	653	118	23
	Peso médio de frutos	86	7,13	6,41	-0,61	-9	7,13	6,52	-0,53	-7	7,13	6,82	-0,26	-4
	PS				1; 4; 6				1; 4; 6; 7				1; 2; 4; 6; 7	
Peso médio de frutos (g)	N° frutos	85	132	103	-25	-19	132	108	-20	-15	132	102	-25	-19
	Prod. de frutos	82	905	796	-90	-10	905	823	-67	-7	905	772	-109	-12
	Prod. de sementes	82	510	421	-73	-14	510	444	-54	-11	510	415	-78	-15
	Peso médio de frutos	86	7,13	7,95	0,70	10	7,13	7,79	0,57	8	7,13	7,69	0,49	7
	PS				2; 8; 10				2; 3; 8; 10				2; 3; 8; 9; 10	

Xo: média da população inicial, Xs: média da população selecionada, h²: herdabilidade no sentido amplo, GS: ganho de seleção. ^a PS – Progênies selecionadas: 1 – Dos de Mayo; 2 – Shanao; 3 – São Pedro; 4 – Cuzco; 5 – AM -17; 6 – Acaloma; 7 – AM - 07; 8 – AM - 13; 9 – AM - 21; 10 – Ponto Renato; 11 – João Guerra; 12 – Novo Horizonte.

CONCLUSÃO

A seleção de progênies mais produtivas em número e produção de frutos proporciona maior ganho genético indireto de progênies produtivas em produção de sementes por plantas em sachá-inchi.

As progênies superiores para peso total de sementes são Dos de Mayo, Shanao, Cuzco, Aucaloma e AM-07. Estas podem ser clonadas via estaquia e plantadas isoladamente para produzir sementes oriundas de polinização aberta para distribuição aos produtores, constituindo assim uma população melhorada.

Devido à ausência de cultivares recomendadas para o plantio de sachá-inchi, o método de seleção massal em nível de progênie pode ser utilizado com eficiência para iniciar um programa de melhoramento e disponibilizar sementes com qualidade genética para as regiões de plantio.

REFERÊNCIAS

- CHAI, X.; YANG, Z.; FU, Q.; PAN, Z.; TANG, M.; LI, C.; XU, F. First report of root and basal stem rot in sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) caused by *Fusarium oxysporum* in China. **Plant Disease**, v.102, p. 242-242, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0784-PDN>.
- CHIRINOS, R.; ZULOETA, G.; PEDRESCHI, R.; MIGNOLET, E.; LARONDELLE, Y.; CAMPOS, D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 141, p.1732–1739, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.078>.
- CORNELIUS, J. P.; CLEMENT, C. R.; WEBER, J. C.; SOTELO-MONTES, C.; VAN LEEUWEN, J.; UGARTE-GUERRA, L. J.; RICSE-TEMBLADERA, A.; ARÉVALO-LÓPEZ, L. The trade-off between genetic gain and conservation in a participatory improvement programme: the case of peach palm (*Bactris gasipaes* (Kunth)). **Forests, Trees and Livelihoods**, v. 16, p. 17–34, 2006.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, p. 271-276, 2013.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa: UFV, 2012.
- DEL CASTILLO, A. M. R.; GONZALEZ-ASPAJO, G.; SANCHEZ-MARQUEZ, M. F.; KODAHN, N. Ethnobotanical Knowledge in the Peruvian Amazon of the Neglected and Underutilized Crop Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Economic Botany**, v. 73, p. 281–287, 2019.
- FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. Edinburgh, London: Oliver & Boyd, 1960.
- FISCH, G.; MARENCO, J. A.; NOBRE, C. A. (1999). The climate of Amazonia - a review. **Acta Amazonica**, v. 28, p. 101-126, 1999.
- FREITAS, R.G.; DIAS, L. A. S.; CARDOSO, P. M. R.; EVARISTO, A. B.; SILVA, M. F.; ARAÚJO, N. M. Diversity and genetic parameter estimates for yield and its components in *Jatropha curcas* L. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016. <https://doi.org/10.4238/gmr.15017540>.
- GILLESPIE, L. J. A. Synopsis of Neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species. **Systematic Botany**, v. 18, p. 575-592, 1993.

- HAMAKER, B. R.; VALLES, C.; GILMAN, R.; HARDMEIER, R. M.; CLARK, D.; GARCIA, H. H.; GONZALES, A. E.; KOHLSTAD, I.; CASTRO, M.; VALDIVIA, R.; RODRIGUEZ, T.; LESCANO, M. Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis*). **Cereal Chemistry**, v. 69, p. 461-463, 1992.
- KODAHN, N. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.)—from lost crop of the Incas to part of the solution to global challenges? **Planta**, v. 251, p. 1-22, 2020.
- LI, C. C. **Path Analysis-a primer**. California, USA: The Boxwood Press, 1975.
- MOREIRA, A.; FAGUERIA, N. K. Potential of Amazon Soils for Food and Fiber Production. **Dynamic Soil, Dynamic Plant**, v. 2, p. 82-88, 2008.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba:FEALQ, 2009.
- RODRIGUES, P. H. V.; BORDIGNON, S. R.; AMBROSANO, G. M. B. Horticultural performance of *in vitro* propagated plants of Sacha inchi. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1050-1053, 2014.
- RODRIGUEZ, A., CORAZON-GUIVIN, G., CACHIQUE, D., MEJÍA, K., DEL CASTILLO, D., JEAN-FRANÇOIS, R.; GARCÍA-DÁVILA, C. Differentiation morphological and by Inter simple sequence repeats (ISSR) of species of genus *Plukenetia* (Euphorbiaceae) from Peruvian Amazon: suggestion for a new species. **Revista Peruana de Biología**, v. 17, 325 – 330, 2010.
- SOLSOL, H. R.; MESEN, M. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estaquilla en el enraizamiento de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Agronomía Costarricense**, v. 34, p. 259-267, 2010.
- UMAMAHESWARI, D.; PARAMATHMA, M.; MANIVANNAN, N. Association analysis between oil yield and its component characters in *Jatropha*. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 1, p. 78-81, 2009.
- VALENTE, M. S. F.; LOPES, G. M. T. G.; CHAVES, M. F. C.; PANTOJA, C. M.; SOUSA, G. F. M.; CHAGAS, E. A. Molecular genetic diversity and mating system in sachá inchi progenies. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, p. 480-487, 2012a.
- VALENTE, M. S. F.; CHAVES, F. C. M.; LOPES, M. T. G.; OKA, J. M.; RODRIGUES, R. A. F. Crop yield, genetic parameter estimation and selection of sachá inchi in central Amazon. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, p. 226-236, 2017b.
- VAN LEEUWEN, J.; LLERAS-PÉREZ, E.; CLEMENT, C. R. Field genebanks may impede instead of promote crop development: lessons of failed genebanks of “promising” Brazilian palms. **Agrociencia**, v. 9, n. 1-2, p. 61- 66, 2005.
- VASEK, J.; ČEPKOVA, H. P.; VIEHMANNOVA, I.; OCELAK, M.; HUANSI, C. D.; VEJL, P. Dealing with AFLP genotyping errors to reveal genetic structure in *Plukenetia volubilis*

(Euphorbiaceae) in the Peruvian Amazon. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1-24, 2017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184259>.

YANG, L. Y.; CHEN, P.; GUO, L. J.; ZHOU, Y.; WANG, G. F.; DU, Q. J.; HUANG, J. S. First Report of Vine Wilt Disease Caused by *Fusarium solani* on Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) in China. **Plant Disease**, v. 101, p. 1675-1675, 2017.

YANG, C.; JIAO, D. Y.; GENG, Y. J.; CAI, C. T.; CAI, Z. Q. Planting density and fertilisation independently affect seed and oil yields in *Plukenetia volubilis* L. plants. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, p. 201-207, 2014.

CAPÍTULO II - REPETIBILIDADE DE CARACTERES DE PRODUÇÃO DE FRUTOS E SEMENTES PARA SELEÇÃO EM SACHA-INCHI

Resumo

Para promover o cultivo de espécies não convencionais como a sachá-inchi, é necessário a seleção de genótipos produtivos, dependendo de métodos experimentais adequados para estimar os parâmetros genéticos. O objetivo do estudo foi estimar o coeficiente de repetibilidade e calcular o número mínimo de colheitas para seleção de plantas individuais e de progênies de meios-irmão de sachá-inchi superiores para produção de frutos e sementes no primeiro ano de plantio. O método de análise de Componentes Principais usando a matriz de variância-covariância fenotípica e a matriz de correlação foram realizadas para estimar o coeficiente de repetibilidade para as características de produção de frutos e sementes. No método de Componentes Principais, o uso da matriz de covariância mostrou melhor coeficiente de repetibilidade que o uso da matriz de correlação para as três características de produção, tanto para seleção individual (0,28-0,36 vs. 0,18-0,24) quanto na seleção de progênies (0,64-0,72 vs. 0,43-0,56). Como a avaliação do número total de frutos é mais fácil do que a produção em peso total de frutos e sementes, é recomendável. Para a seleção de progênies e seleção individual é indicado, respectivamente, três ($R^2=90\%$) e sete meses ($R^2=80\%$) de colheita consecutiva. O método de componentes principais com base da matriz covariância apresenta melhor estimativa do coeficiente de repetibilidade para produção de frutos e sementes em sachá-inchi independente da avaliação ser realizada no nível de progênies ou de indivíduos.

Palavras chaves: *Plukenetia volubilis*. Componentes principais. Parâmetros genéticos. Número de avaliações. Principal Component Analysis.

Abstract

To promote the cultivation of unconventional species such as sacha-inchi, it is necessary to select productive genotypes, depending on adequate experimental methods to estimate the genetic parameters. The aim of the study was to estimate the repeatability coefficient and calculate the minimum number of harvests for selecting individual plants and superior sacha-inchi half-sib progenies for fruit and seed production in the first year of planting. The Principal Component Analysis method using the phenotypic variance-covariance matrix and the correlation matrix were performed to estimate the repeatability coefficient for the fruit and seed yield characteristics. In the Principal Components method, the use of the covariance matrix showed a better repeatability coefficient than the use of the correlation matrix for the three production characteristics, both for individual selection (0.28-0.36 vs. 0.18-0.24) and in the selection of progenies (0.64-0.72 vs. 0.43-0.56). As the evaluation of the number of fruits is easier than the production of fruits and seeds, it is recommended to evaluate by the number of fruits. For the selection of progenies and individual selection, three (R²=90%) and seven months (R²=80%) of consecutive collection. The principal components method based on the covariance matrix presents a better estimate of the repeatability coefficient for fruit and seed production in sacha-inchi regardless of whether the evaluation is carried out at the level of progenies or individuals.

Keywords: *Plukenetia volubilis*. Principal Component Analysis. Genetic parameters. Number of evaluations.

INTRODUÇÃO

O êxito do melhoramento genético depende da aplicação de procedimentos eficientes para amostragem e avaliação do germoplasma (CLEMENT, 2001; CRUZ et al., 2004; FALCONER, 1960; RESENDE, 2002). Sacha-inchi é uma planta alógama (VALENTE et al., 2017a) e grande variabilidade genética é encontrada entre e dentro de cultivos de pequenos agricultores (VASEK et al., 2017; RODRIGUEZ et al., 2010; KODAL, 2020) e também em bancos de germoplasma (VALENTE et al., 2017a, 2017b; RODRIGUES et al., 2014; RODRIGUES, 2013). Considerando as características da planta e a variabilidade genética no germoplasma disponível, uma estratégia para iniciar o programa de melhoramento genético de sachá-inchi é a avaliação de progênies de meios-irmãos, obtidas a partir de sementes de polinização aberta, utilizando delineamentos experimentais adequados. Como sachá-inchi é uma espécie perene que permite múltiplas colheitas durante o ano, uma das informações necessárias para seleção dos genótipos superiores é o número mínimo de colheitas para atingir a acurácia desejada na seleção, o que pode ser obtido pela estimativa de coeficiente de repetibilidade das características de interesse.

O coeficiente de repetibilidade (\hat{r}) estatisticamente pode ser conceituado como a correlação entre medidas repetidas no tempo ou no espaço em um mesmo indivíduo ou genótipo e representa o limite máximo para a herdabilidade no sentido amplo para a característica na população avaliada (CRUZ et al., 2004). A partir das estimativas do \hat{r} é possível saber o número de medidas necessárias para que a seleção de indivíduos ou genótipos seja realizada com o nível de acurácia desejado (ABEYWARDENA, 1972; CRUZ et al., 2004), o que pode ser aplicado na definição do número de colheitas mensais de sachá-inchi necessário para selecionar com eficiência os genótipos mais produtivos.

Para obter estimativas do \hat{r} para produção de frutos em espécies perenes, diversos estudos identificaram o método de componentes principais (PC) como mais eficiente do que o método da ANOVA (CEDILLO et al., 2008; CHIA et al., 2009; TEODORO et al., 2016), que inclui *Plukenetia volubilis* (VALENTE et al., 2017c). O método dos componentes principais consiste em obter uma matriz com os coeficientes de correlação entre genótipos para cada par de medições (períodos de avaliação), da qual são determinados os autovetores e autovalores normalizados. O autovetor que cujos períodos de avaliação apresentam o mesmo sinal e magnitudes próximas é aquele que expressa a consistência dos indivíduos em manterem ao longo do tempo a sua posição em relação uns aos outros e a proporção do autovalor associado

a este autovetor corresponde a estimativa do coeficiente de repetibilidade da característica (ABEYWARDENA, 1972; CRUZ et al., 2004).

Em progênies de sachá-inchi o método de PC baseado na matriz de variância e covariância fenotípicas foi de duas a três vezes mais eficiente na estimativa do \hat{f} para produção de frutos que outros métodos, tais como o método da ANOVA de dois fatores, PC baseado na matriz de correlação e Análise Estrutural baseada na matriz de correlação intraclasses, e indicou que cinco meses consecutivos de avaliação da produção de frutos seriam suficientes para obter 90% de acurácia na seleção de genótipos superiores (VALENTE et al., 2017c). Contudo, como sachá-inchi também pode ser propagada vegetativamente, é importante estimar o coeficiente de repetibilidade a nível individual visando a seleção massal.

A primeira colheita em sachá-inchi é realizada, em média, seis meses após o plantio (VALENTE et al., 2017b; ROGRIGUES, 2013), por conseguinte, no primeiro ano de plantio é possível registrar seis meses consecutivos de produção. No entanto, é necessário verificar a eficácia da seleção de genótipos superiores com base nos seis primeiros meses de avaliação da produção, considerando que as variações podem afetar de maneira desigual a produção dos indivíduos ou genótipos nesse período de produção. Quanto menor o ciclo de melhoramento mais rápido poderá ser obtido e disponibilizado aos agricultores cultivares com alto desempenho produtivo, por isso, é importante verificar a possibilidade de selecionar com eficácia genótipos superiores já no primeiro ano de plantio de sachá-inchi. Além disso, ressalta-se que os parâmetros genéticos são propriedades específicas da população para a qual são estimados, por isso, é importante que estes sejam obtidos e analisados para cada população de melhoramento.

O objetivo do estudo foi estimar o coeficiente de repetibilidade e calcular o número mínimo de colheitas para seleção de indivíduos e progênies de meios-irmãos de sachá-inchi superiores em produção de frutos e sementes no primeiro ano de plantio.

MATERIAL E MÉTODOS

A descrição da área de estudo e dos acessos utilizados, bem como a instalação, condução do experimento e coleta de dados foram descritos em material e métodos do Capítulo 1.

Análise de dados

Os coeficientes de repetibilidade para as características de produção foram obtidos pelo método dos componentes principais (PC) (ABEYWARDENA, 1972) com base na matriz de correlação e a matriz de variâncias e covariâncias fenotípicas entre cada par de medições avaliadas nos diferentes genótipos (VALENTE et al., 2017c). As análises foram realizadas no programa computacional Genes (CRUZ, 2013).

As estimativas dos coeficientes de repetibilidade foram obtidas com base na produção mensal média das progênes e das plantas individuais, uma vez que existe interesse na seleção das melhores progênes para reprodução por sementes e também na seleção das melhores plantas para reprodução clonal por estaquia.

A matriz de correlação entre os genótipos em cada par de medições é dada por:

$$\hat{R} = \frac{1}{\eta} \begin{bmatrix} 1 & p & \dots & p \\ p & 1 & \dots & p \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ p & p & \dots & 1 \end{bmatrix}_{\eta}$$

Cujo autovalor λ_1 é dado por $1+(\eta-1)p$. A partir da matriz \hat{R} foi estimado o coeficiente de repetibilidade por RUTLEDGE (1974), que dado por: $\hat{r} = (\lambda_1 - 1)/\eta - 1$, onde: η = número de períodos avaliados, λ = autovalor obtido da matriz R associado ao autovetor cujos elementos têm o mesmo sinal e magnitudes semelhantes.

O coeficiente de repetibilidade foi também estimado baseado na matriz de variâncias e covariâncias fenotípicas:

$$\Gamma = \sigma_y^2 \begin{bmatrix} 1 & p & \dots & p \\ p & 1 & \dots & p \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ p & p & \dots & 1 \end{bmatrix}_{\eta}$$

Cujo autovalor λ_1 é dado por: $\sigma_y^2 [1+(\eta-1)p]$. Considerando a matriz Γ , o coeficiente de repetibilidade é obtido por meio de: $\hat{r} = (\lambda_1 - \sigma_y^2)/\sigma_y^2 (\eta - 1)$, em que $\sigma_y^2 = \sigma^2 +$

σ_g^2 , sendo λ_1 o autovalor obtido de Γ associado ao autovetor cujos elementos têm o mesmo sinal e magnitudes semelhantes.

A estimativa do coeficiente de determinação (R^2), a qual representa a certeza da predição do valor real dos indivíduos para o caráter analisado baseado sobre o η medidas realizadas, foi obtido por (MARÇAL et al., 2016; GUILHEM et al., 2019):

$$R^2 = \eta \hat{r} / [1 + \hat{r}(\eta - 1)]$$

Após estimar o coeficiente de repetibilidade (\hat{r}), o cálculo do número de medições (η) necessárias para predizer o valor real dos indivíduos com o coeficiente de determinação genotípica (R^2) desejado (80, 85, 90%) é obtida pela equação descritos por Marçal et al. (2016) e Guilhem et al. (2019):

$$\eta = R^2(1 - \hat{r}) / (1 - R^2) \hat{r}.$$

Onde: \hat{r} é o coeficiente de repetibilidade, obtidos tanto para as duas abordagens do método de componentes principais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estimativas do coeficiente de repetibilidade (\hat{r}) obtidas pelo método dos componentes principais com base na matriz de covariância (PCA-COV) foram superiores às obtidas com base na matriz de correlação (PCA-COR) em todas as características avaliadas (Tabela 7). A estimativa de \hat{r} obtida pela PCA-COV para número total de frutos (0,72) foi superior a encontrada para mesma característica e pelo mesmo método de obtenção na população avaliada por Valente et al. (2017c), 0,66, já para peso total de frutos (0,55), a estimativa foi inferior a apresentada por esses autores, 0,68. Essas estimativas de parâmetros são propriedades das populações, mas as diferenças também podem ser atribuídas a procedimentos experimentais, como a variação no número de indivíduos avaliados por parcela experimental. Valores de estimativas do \hat{r} são considerados altos quando superiores à 0,6 e médios quando maiores do que 0,3 e inferiores a 0,6 (RESENDE, 2002), portanto, os valores encontrados para médias de progênies podem ser considerados de médio a altos para de produção de frutos em sachá-inchi, o que indica condição favorável ao melhoramento genético.

Tabela 7. Estimativas de coeficiente de repetibilidade (\hat{r}), de determinação (R^2) e número de meses de colheita (n) requeridos para obter diferentes R^2 , em relação ao número total de frutos, peso total de frutos e peso total de sementes durante março 2019 – agosto 2019 em progênie de sachá-inchi.

Abordagem	Valores obtidos com seis medidas		n e valores de R^2 arbitrário		
	\hat{r}	R^2 %	80%	85%	90%
			Número total de frutos		
PCA-COV ^a	0,72	94	2	2	3
PCA-COR ^b	0,56	88	3	4	7
			Peso total de frutos		
PCA-COV	0,55	88	3	5	7
PCA-COR	0,43	82	5	8	12
			Peso total de sementes		
PCA-COV	0,64	91	2	3	5
PCA-COR	0,49	85	4	6	9

^a Estimativa obtida pelo método de Componentes Principais, usando a matriz de variância e covariância fenotípica; ^b Estimativa obtida pelo método de Componentes Principais, usando a matriz de correlação.

Os coeficientes de determinação (R^2) também foram superiores para as estimativas obtidas pelo método PCA-COV. No entanto, os valores obtidos por ambas as abordagens foram

elevados, entre 82% e 94% (Tabela 7). Valores de R^2 superiores a 90% também foram observados para produção de frutos em sacha-inchi por Valente et al. (2017c).

A partir do número mínimo de meses de colheita estimado para atingir os valores pré-estabelecidos para o coeficiente de determinação (Tabela 7), verificou-se em todas as características que é possível com cinco meses de avaliação da produção garantir acurácia seletiva igual ou superior a 85% quando as estimativas de \hat{r} foram obtidas pelo método PCA-COV. Portanto, é possível realizar com alta eficácia a seleção para produção de frutos com base na média das progênies de meio irmãos no primeiro ano após o plantio em campo de sacha-inchi. Para atingir R^2 de 85% a característica que exige maior tempo de avaliação é peso total de frutos (PTF), seguida de peso total de sementes (PTS) e número total de frutos (NTF). A necessidade de número reduzido de meses de avaliação da produção de frutos para seleção de progênies de sacha-inchi também foi verificada por Valente et al. (2017c). A partir de valor pré-estabelecido para R^2 em 85% e \hat{r} obtido pelo método do PCA-COV, os autores verificaram serem necessários três meses de avaliação das progênies, tanto para seleção com base em NTF como para PTF.

Tabela 8. Período mínimo de colheitas sucessivas (n), repetibilidade (\hat{r}) e determinação (R^2), em relação ao número total de frutos, peso total de frutos e peso total de sementes durante março-agosto 2019 em progênies de sacha-inchi.^a

Meses de colheita	n	Número total de frutos		Peso total de frutos		Peso total de sementes	
		\hat{r}	R^2 %	\hat{r}	R^2 %	\hat{r}	R^2 %
mar-abr	2	0,40	57	0,25	40	0,32	48
abr-Mai	2	0,59	74	0,78	88	0,64	78
mai-jun	2	0,95	98	0,91	95	0,92	96
jun-Jul	2	0,76	86	0,60	75	0,69	82
jul-ago	2	0,79	75	0,66	79	0,72	84
mar-mai	3	0,50	75	0,38	64	0,39	66
abr-jun	3	0,76	91	0,59	81	0,68	87
mai-jul	3	0,80	92	0,67	86	0,74	89
jun-ago	3	0,77	90	0,62	83	0,71	88
mar-jun	4	0,76	93	0,59	85	0,67	89
abr-jul	4	0,72	91	0,55	83	0,64	88
may-ago	4	0,78	93	0,64	88	0,72	91
mar-jul	5	0,74	93	0,57	87	0,65	90
abr-ago	5	0,72	91	0,55	83	0,64	88
mar-ago	6	0,72	94	0,55	88	0,64	91

^a Estimativa obtida pelo método de Componentes Principais, usando a matriz de variância e covariância fenotípica.

Os resultados indicaram que as progênies de sacha-inchi estabilizaram a produção a partir do nono mês de plantio, no período entre maio e junho (Tabela 8). Neste período, o \hat{r} nas

três características de produção atingiu valores considerados entre moderado (entre 0,30 e 0,60) a alto (maior de 0,60) (RESENDE, 2002). Por conseguinte, com quatro meses de avaliação (maio-agosto) da produção em NTF, PTF e PTS, possibilitaria selecionar progênies de sachainchi com mínimo de 88% de certeza, desde que seja a partir do nono mês de plantio. Esta conclusão coincide com a de Teodoro et al. (2016) para pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), que verificaram serem necessários quatro meses de colheitas para selecionar genótipos superiores em produção de grãos com R^2 de 85%.

Assim como para seleção com base na média de progênies, para seleção a nível de indivíduos as estimativas do \hat{r} obtidas pelo método dos componentes principais baseado na matriz de covariância foram superiores às obtidas com base na matriz de correlações (Tabela 9). Considerando os seis meses de avaliação da produção, os valores das estimativas do \hat{r} obtidas pela análise PCA-COVAR a nível de indivíduo foram moderados para número de frutos (0,36) e peso total de sementes (0,34) e baixo para peso total de frutos (0,28), com valores de R inferiores a 80% para as três características.

Tabela 9. Estimativas de coeficiente de repetibilidade (\hat{r}), de determinação (R^2) e número de meses de colheita (n) requeridos para obter diferentes R^2 , em relação ao número total de frutos, peso total de frutos e peso total de sementes durante março 2019 – agosto 2019 em indivíduos de sachainchi.

Abordagem	Valores obtidos com seis medidas		n e valores de R^2 arbitrário		
	\hat{r}	R^2 %	80	85	90
			Número total de frutos		
PCA-COV ^a	0,36	77	7	10	16
PCA-COR ^b	0,24	65	13	18	29
			Peso total de frutos		
PCA-COV	0,28	70	10	15	23
PCA-COR	0,18	57	18	26	41
			Peso total de sementes		
PCA-COV	0,34	76	8	11	18
PCA-COR	0,21	61	15	21	34

^a Estimativa obtida pelo método de Componentes Principais, usando a matriz de variância e covariância fenotípica; ^b Estimativa obtida pelo método de Componentes Principais, usando a matriz de correlação.

Os resultados indicam que a acurácia para seleção de indivíduos de sachainchi no primeiro ano de plantio é inferior à obtida com a seleção a nível de progênies, tal como acontece em híbridos entre *E. oleifera* e *E. guineensis* (CHIA et al., 2009). Para atingir a acurácia de 85% as estimativas indicam serem necessários dez meses de avaliação para NTF, 15 para PTF e 11 para PTS. Esses resultados demonstram que no caso da seleção a nível de indivíduos a avaliação apenas durante o primeiro ano de plantio não é suficiente para alcançar alta acurácia na

identificação dos indivíduos superiores, sendo necessário maior tempo de avaliação. Embora para obter a mesma acurácia o período de avaliação para seleção de indivíduos seja superior ao necessário para seleção de progênies, no mínimo três vezes superior, deve-se considerar que sachá-inchi é uma cultura perene que poderá ser explorada por muitos anos. Assim, a estratégia de seleção deve considerar os ganhos genéticos que a seleção individual poderá proporcionar considerando o ciclo de seleção completo.

As avaliações da produção de NTF, PTS e PTS após oito meses de plantio mostraram ser mais importantes para a seleção individual em sachá-inchi (Tabela 10). Os primeiros seis meses após o plantio compreendem a fase de crescimento vegetativo das plantas de sachá-inchi. A primeira colheita foi realizada aos 185 dias após o plantio, quando aproximadamente 50% das plantas já apresentavam frutos maduros. Nos primeiros meses a produção de fruto foi mais baixa e irregular, o que está de acordo com a informação de Valente et al. (2017a), que indicam que o potencial de produção dos genótipos só é atingido no sexto mês após o início da colheita. Além da irregularidade inerente à espécie nos primeiros meses de produção, fatores ambientais podem afetar a produção inicial das plantas, como as condições climáticas, sanidade e nutrição das plantas, entre outras práticas de manejo.

Tabela 10. Período mínimo de colheitas sucessivas (n), repetibilidade (\hat{r}) e determinação (R^2), em relação ao número total de frutos, peso total de frutos e peso total de sementes durante março-agosto 2019 em indivíduos de sachá-inchi.^a

Months	n	Número total de frutos		Peso total de frutos		Peso total de sementes	
		\hat{r}	R^2 %	\hat{r}	R^2 %	\hat{r}	R^2 %
mar-abr	2	0,35	52	0,39	56	0,40	57
abr-mai	2	0,59	75	0,61	76	0,55	71
mai-jun	2	0,79	89	0,73	84	0,75	86
jun-jul	2	0,49	66	0,40	58	0,48	65
jul-ago	2	0,48	65	0,48	65	0,48	65
mar-mai	3	0,38	65	0,40	67	0,38	65
abr-jun	3	0,45	71	0,32	58	0,40	67
mai-jul	3	0,55	78	0,46	72	0,52	76
jun-ago	3	0,53	77	0,46	72	0,52	77
mar-jun	4	0,41	74	0,29	62	0,37	70
abr-jul	4	0,40	72	0,29	62	0,36	69
mai-ago	4	0,53	82	0,46	77	0,51	81
mar-jul	5	0,37	75	0,27	65	0,34	72
abr-ago	5	0,40	77	0,31	69	0,37	75
mar-ago	6	0,36	77	0,28	70	0,34	76

^a Estimativa obtida pelo método de Componentes Principais, usando a matriz de variância e covariância fenotípica.

Correlação genotípica alta e positiva foi verificada entre NTF e PTS (0,97) e também entre PTF com o PTS (0,99). O produto de importância comercial da *sacha-inchi* são as sementes (DEL CASTILLO et al., 2019), portanto, o melhoramento deve ser realizado para aumento de produtividade em peso de sementes. Na avaliação de progênies nos programas de melhoramento genético é necessário fazer o registro da produção por planta, e para obter o peso de sementes é necessário retirar manualmente a casca dos frutos (VALENTE et al., 2017b), procedimento laborioso quando considerado o elevado número de plantas a serem avaliadas. A alta correlação entre o PTS com as características NTF e PTF indica a possibilidade de usar essas características para a seleção indireta de plantas mais produtivas em peso total de sementes. As características de NTF e PTF são fáceis e de rápida avaliação, e têm alta correlação genética com PTS, por isso elas têm grande potencial para serem utilizadas na seleção indireta de genótipos mais produtivos em peso de sementes em *sacha-inchi* com menor custo e dispêndio de tempo.

A característica número total de frutos (NTF) é de fácil avaliação, obtida de forma rápida e direta pela contagem do número de frutos produzidos pela planta, e apresentou estimativas de coeficiente de repetibilidade e de determinação superiores as características peso total de frutos (PTF) e peso total de sementes (PTS), portanto, permite selecionar genótipos com maior acurácia em menor tempo de avaliação e com menor custo do que estas características. Além disso, o NTF apresenta correlação genética alta e positiva com PTS, principal característica que o melhoramento busca aumento de produtividade em *sacha inchi*. De acordo com os resultados obtidos, tanto para seleção com base na média de progênies como a nível de indivíduos, a estratégia com menor tempo de avaliação (menor ciclo de seleção) e menor dispêndio de recursos para obter ganhos em produtividade para PTS é pela seleção indireta baseada no NTF.

Como existe forte correlação entre o NTF e o PTS, é recomendável usar o NTF para selecionar indiretamente os indivíduos mais produtivos em PTS, pela facilidade de avaliação daquele. Além disso, seria melhor usar a matriz de covariância para estimar a repetibilidade. Nestas circunstâncias, seriam necessários sete meses de colheita para obter um valor real de produção no NTF com 80% de acurácia, utilizando a matriz de covariância (Tabela 10), devendo ser considerado a partir do nono mês de plantio. Ademais, tendo em conta a baixa precisão da seleção individual e que os indivíduos clonados são submetidos a ensaios clonais antes da multiplicação comercial, é preferível evitar uma seleção muito intensa, de modo que um maior número de genótipos possa ser avaliado em um delineamento experimental adequado para uma melhor discriminação.

CONCLUSÃO

O método de componentes principais com base na matriz variância e covariância fenotípica apresenta melhor estimativa do coeficiente de repetibilidade para a produção de frutos e sementes em sachá-inchi.

A seleção de progênies de sachá-inchi pode ser realizada pela seleção indireta com base no número total de frutos produzidos com avaliação durante três meses.

A seleção de indivíduos de sachá-inchi mais produtivos em peso total de sementes de sachá-inchi pode ser realizada pela seleção indireta com base no número total de frutos produzidos com avaliação durante dez meses.

Os dois primeiros meses de colheita de frutos de sachá-inchi podem ser descartados das avaliações.

REFERÊNCIAS

- ABEYWARDENA, V. An application of principal component analysis in genetics. **Journal of genetics**, v. 61, p. 27-51, 1972.
- CEDILLO, D. S. O.; BARROS, W. S.; FERREIRA, F. M.; DIAS, L. A. D. S.; ROCHA, R. B., CRUZ, C. D. Correlation and repeatability in progenies of African oil palm. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, p. 197-201, 2008.
- CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. D.; ROCHA, R. N. C. D.; LOPES, M. T. G. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 249-253, 2009.
- CLEMENT, C. R. Melhoramento de espécies nativas. **NASS, LL; VALOIS, ACC; MELO, IS de; VALADARES-INGLIS, MC (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento: plantas. Rondonópolis: Fundação MT**, p. 422-441, 2001.
- CHIRINOS, R.; ZULOETA, G.; PEDRESCHI, R.; MIGNOLET, E.; LARONDELLE, Y.; CAMPOS, D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1732–1739, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.078>
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J., CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2004.
- CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, p. 271-276, 2013.
- CORDEIRO, I.; SECCO, R. 2015. Plukenetia. in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22740>.
- DE ALMEIDA RIOS, S.; DA CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; BARCELOS, E.; DA ROCHA, R. N. C.; DE LIMA, W. A. A. Correlation and Path analysis for yield components in Dura oil palm germplasm. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 724-733, 2018.
- DEL CASTILLO, A. M. R.; GONZALEZ-ASPAJO, G.; SANCHEZ-MARQUEZ, M. F.; KODAHN, N. Ethnobotanical Knowledge in the Peruvian Amazon of the Neglected and Underutilized Crop Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Economic Botany**, v. 73, p. 281–287, 2019.
- DOS SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. T.; DOS ANJOS, L. H. C.; DE OLIVEIRA, V. Á.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; CUNHA, T. J. F. **Brazilian soil classification system**. Brasília: *Embrapa Solos-Livro técnico-INFOTECA-E*, 2018.
- FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. Edinburgh, London: Oliver & Boyd, 1960.
- FISCH, G.; MARENCO, J. A.; NOBRE, C. A. Uma revisão geral sobre o clima da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 28, p. 101-126, 1999.

GILLESPIE, L. J. A. Synopsis of Neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species. **Systematic Botany**, v. 18, p. 575-592, 1993.

GUILHEN, J. H. S.; NOIA, L. R.; DE OLIVEIRA BERNARDES, C.; DOS SANTOS OLIVEIRA, W. B.; MARÇAL, T. D. S.; DA SILVA FERREIRA, M. F.; FERREIRA, A. Repeatability analysis of guava fruit and leaf characteristics. **Bioscience Journal**, v. 35, p. 377-388, 2019.

HAMAKER, B. R.; VALLES, C.; GILMAN, R.; HARDMEIER, R. M.; CLARK, D.; GARCIA, H. H.; GONZALES, A. E.; KOHLSTAD, I.; CASTRO, M.; VALDIVIA, R.; RODRIGUEZ, T.; LESCANO, M. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis*). **Cereal Chemistry**, v. 69, p. 461-463, 1992.

KODAHN, N. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) — from lost crop of the Incas to part of the solution to global challenges? **Planta**, v. 251, p. 1-22, 2020.

MARÇAL, T. D. S.; GUILHEN, J. H. S.; OLIVEIRA, W. D. S.; FERREIRA, M. D. S.; DE RESENDE, M. D. V.; FERREIRA, A. Repeatability of biometric characteristics of juçara palm. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 890-898, 2016.

OLIVEIRA, S. A. G.; LOPES, M. T. G.; CHAVES, F. C. M.; MARTINS, C. C.; ALVES, E. U. Estimation of genetic parameters of *Plukenetia volubilis* L. seed germination. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 56, p. 49-54, 2013.

RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002.

RODRIGUES, H. S.; BOREM, A.; LOPES, M. T. G.; CRUZ, C. D.; CHAVES, F. C. M.; DA SILVA BENTES, J. L. Genetic diversity of sachá inchi accessions detected by AFLP molecular markers. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 56, p. 55-60, 2013.

RODRIGUEZ, A., CORAZON-GUIVIN, G., CACHIQUÉ, D., MEJÍA, K., DEL CASTILLO, D., JEAN-FRANÇOIS, R., GARCÍA-DÁVILA, C. Differentiation morphological and by Inter simple sequence repeats (ISSR) of species of genus *Plukenetia* (Euphorbiaceae) from Peruvian Amazon: suggestion for a new species. **Revista Peruana de Biología**. v. 17, p. 325 – 330, 2010.

RODRIGUES, Haroldo Silva. **Caracterização genética, morfológica e agrônômica de germoplasma de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) no estado do Amazonas**. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 2013.

RODRIGUES, P. H. V.; BORDIGNON, S. R.; AMBROSANO, G. M. B. Horticultural performance of in vitro propagated plants of Sachá inchi. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1050-1053, 2014.

RUTLEDGE, J. J. A scaling which removes bias of Abeywardena's estimator of repeatability. **Journal Genetics**, v. 61, p. 247-250, 1974.

TEODORO, P. E.; DIAS, C. R.; ROCHA, R. B.; LAVIOLA, B. G. Número mínimo de medições para a avaliação acurada de características agrônômicas de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 112-119, 2016.

VALENTE, M. S. F.; LOPES, M. T. G.; CHAVES, M. F. C.; PANTOJA, C. M.; SOUSA, G. F. M.; CHAGAS, E. A. Molecular genetic diversity and mating system in sacha inchi progenies. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, p. 480-487, 2017a.

VALENTE, M. S. F.; CHAVES, F. C. M.; LOPES, M. T. G.; OKA, J. M.; RODRIGUES, R. A. F. Crop yield, genetic parameter estimation and selection of sacha inchi in central Amazon. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, p. 226-236, 2017b.

VALENTE, M. S. F.; LOPES, M. T. G.; CHAVES, F. C. M.; OLIVEIRA, A. M.; FREITAS, D. R. B. Repeatability of biometric and fruit and seed yield traits of sacha inchi. **Acta Amazonica**, v. 47, p. 195-202, 2017c.

VASEK, J.; ČEPKOVA, H. P.; VIEHMANNOVA, I.; OCELAK, M.; HUANSI, C. D.; VEJL, P. Dealing with AFLP genotyping errors to reveal genetic structure in *Plukenetia volubilis* (Euphorbiaceae) in the Peruvian Amazon. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1-24, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184259>.

CAPÍTULO III – DIVERSIDADE GENÉTICA FENOTÍPICA EM SACHA-INCHI COM O MÉTODO DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Resumo

Os métodos de análise de dados multivariados permitem analisar em conjunto várias características medidas em cada acesso do germoplasma, permitindo a descrição daqueles baseada em várias características simultaneamente, sem deixar de considerar a relação existente entre elas. As coordenadas dos componentes principais podem ser usadas para análise univariada e multivariado. O estudo objetivou analisar a diversidade genética fenotípica de acessos de sachá-inchi usando os escores de componentes principais no método de Agrupamento Hierárquico (UPGMA) e a ANOVA. O método de análise de componentes principais mostrou ser adequado para analisar os dados (Teste de esfericidade de Bartlett, $p < 0.000$; e $KMO = 0,55$). O método sugeriu três componentes (Variação explicada = 73%). O componente 1 teve relação positiva com o caractere número de sementes por fruto ($r = 0,73$), mas relação negativamente com o caractere de produção de sementes ($r = -0,67$) e comprimento do pistilo ($r = -0,63$); o componente 2 foi associada com o tamanho de semente ($r = 0,82$), peso de semente ($r = 0,90$) ou fruto ($r = 0,76$); e o componente 3 mostrou correlação positiva com o comprimento de racemo ($r = 0,89$) e a largura de fruto ($r = 0,84$). O uso das coordenadas dos componentes principais mostrou ser ideal para analisar a diversidade genética em sachá-inchi. As coordenadas dos Componentes Principais são adequados para analisar a diversidade genética em sachá-inchi, tanto por métodos univariados como por métodos multivariados. É recomendável as seguintes hibridações: Cuzco x Dos de Mayo, Cuzco x Aucasoma, Shanao x Cuzco, Shanao x Aucasoma, Shanao x Dos de Mayo, Shanao x AM-07, Dos de Mayo x Aucasoma. O acesso Shanao é um genótipo com características de frutos e inflorescências de maior tamanho que os acessos Dos de Mayo, Aucasoma, AM-07 e Cuzco. Este último apresenta frutos e inflorescências maiores do que os acessos Dos de Mayo, Aucasoma e AM-07.

Palavras chaves: *Plukenetia volubilis*. Componentes principais. Hibridação. Agrupamento hierárquico.

Abstract

The methods of multivariate data analysis allow to analyze together several characteristics measured in each germplasm accession, allowing the description of those based on several characteristics simultaneously, without neglecting the existing relationship between them. The coordinates of the principal components can be used for univariate and multivariate analysis. The study aimed to analyze the phenotypic genetic diversity of sachainchi accessions using principal component scores in the Hierarchical Clustering method (UPGMA) and ANOVA. The principal component analysis method proved to be adequate to analyze the data (Bartlett's sphericity test, $p < 0.000$; and KMO = 0.55). The method suggested three components (Explained variation = 73%). Component 1 had a positive relationship with the character number of seeds per fruit ($r = 0.73$), but a negative relationship with the seed production character ($r = -0.67$) and pistil length ($r = -0.63$); component 2 was associated with seed size ($r = 0.82$), seed weight ($r = 0.90$) or fruit ($r = 0.76$); and component 3 showed a positive correlation with raceme length ($r = 0.89$) and fruit width ($r = 0.84$). The use of the coordinates of the principal components proved to be ideal for analyzing the genetic diversity in sachainchi. The coordinates of the Principal Components are suitable for analyzing the genetic diversity in sachainchi, both by univariate and multivariate methods. The following hybridizations are recommended: Cuzco x Dos de Mayo, Cuzco x Aucasoma, Shanao x Cuzco, Shanao x Aucasoma, Shanao x Dos de Mayo, Shanao x AM-07, Dos de Mayo x Aucasoma. The Shanao accession is a genotype with larger fruit and inflorescence characteristics than the Dos de Mayo, Aucasoma, AM-07 and Cuzco accessions. The latter has fruits and inflorescences larger than the accessions Dos de Mayo, Aucasoma and AM-07.

Keywords: *Plukenetia volubilis*. Principal Component Analysis. Hybridization. Hierarchical grouping.

INTRODUÇÃO

A análise multivariada é uma ferramenta eficiente para explorar a diversidade genética fenotípica entre acessos de sachá-inchi (RODRIGUES, 2010), como é usado no melhoramento de outras culturas (FRANCO, 2003). Esse método pode identificar grupos (acessos) diversos através da análise conjunta das características medidas em cada acesso, sem deixar de considerar a relação existente entre elas (FRANCO, 2003; GOTELLI e ELLISON, 2016). Deste modo, a discriminação de grupos permite recomendar cruzamentos (ou a formação de população selecionada) que visem manter a variabilidade genética, baseada em genótipos com características de interesse, mas sem descartar as diferenças de outras características (CRUZ et al, 2004). Após a avaliação da variabilidade fenotípica da população selecionada pode ser complementada com a caracterização molecular.

Segundo o objetivo, os métodos multivariados podem ser do tipo ordenação ou classificação. O primeiro permite reduzir as um conjunto de variáveis em poucas e o segundo agrupa objetos que compartilham características em comum (FIELD, 2013; FRANCO, 2003; GOTELLI e ELLISON, 2016).

Entre os métodos de ordenação, temos a Análise de Componentes Principais (PCA), que é um método simples de redução de variáveis, baseado na matriz de correlação destas. Este método é recomendado na análise de dados quantitativos e tem a vantagem de poder usar os escores de cada componente para continuar com outras análises, que podem ser do tipo univariado e multivariado. Os componentes podem ser usados em análise univariado como a ANOVA e testar a diferença entre genótipos, logo, é possível realizar testes *a posteriori* de médias (GOTELLI e ELLISON, 2016). Os componentes também podem gerar matrizes de dissimilaridade e serem usados nos métodos de Análises de Agrupamentos (CRUZ et al., 2004). Esta abordagem é possível já que os componentes não apresentam colinearidade, podendo ser considerados variáveis independentes (GORELLI e ELLISON, 2016). A PCA também permite selecionar as variáveis mais discriminatórias para reduzir o número de medições em caracterizações posteriores (CRUZ et al., 2004; FRANCO, 2003).

Entre os métodos de classificação ou agrupamento, temos a técnica de Agrupamento Pareado Proporcionalmente Ponderado (UPGM), o mais usado na análise da diversidade genética em bancos de germoplasmas (CRUZ et al., 2004). Como já mencionado, este pode ser construído a partir da matriz de dissimilaridade dos Componentes Principais.

Neste contexto, o objetivo do estudo foi analisar a diversidade genética fenotípica de acessos de sachá-inchi usando os escores de componentes principais nos métodos de agrupamento Hierárquico (UPGMA) e a ANOVA.

MATERIAL E MÉTODOS

A descrição da área de estudo e dos acessos utilizados, bem como a instalação e condução do experimento foram descritos em material e métodos do Capítulo 1.

Coleta de dados

Para a avaliação das progênies foram considerados o número total de frutos por planta (Nf), peso total de frutos (Pf), em g.planta^{-1} , número total de sementes por planta (Ns), peso total de sementes (Ps), em g.planta^{-1} . A partir das variáveis de produção foi calculado o peso médio de fruto (Pf/Nf), em gramas, número de semente por fruto (Ns/Nf), peso médio de semente (Ps/Ns), em gramas. Cabe destacar que, das variáveis de produção, apenas o Ps foi usado na análise.

Também, foi medido o comprimento de racemo floral (mm), desde a inserção do pistilo até o ápice do racemo; comprimento do pistilo (mm), apenas em aqueles que mostraram o estigma aberto ou desenvolvido; largura do fruto (mm), apenas considerado um lado do fruto, pois os mesmos são simétricos. Ademais, foi calculado o tamanho de semente (mm^3), mensurando o comprimento, largura e altura de sementes. As dimensões foram convertidas em volumes, estimados com base na fórmula para um elipsóide ($v = 4/3 \pi abc$). As medições foram realizadas de uma planta selecionada ao acaso de cada parcela ou repetição. O total de trinta medições foram realizadas para cada variável.

Análise de dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$). A média dos tratamentos foram analisadas com os testes de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

Foi usado análise de componentes principais (PCA) para a reduzir as variáveis originais em um conjunto de variáveis lineares ou componentes, que expliquem no mínimo 70% da variância total disponível. Primeiro, foi analisado se os dados podem ser submetidos ao processo de PCA.

Para isso, dois métodos de avaliação foram utilizados: o critério de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) (KAISER, 1974); e o teste de esfericidade de Bartlet (DZIUBAN e SHIRKEY, 1974). O índice de KMO, também conhecido como índice de adequação da amostra, é um teste

estatístico que indica a proporção da variância das variáveis originais pode ser explicada por uma variância comum. O KMO é estimado por meio do quadrado das correlações totais dividido pelo quadrado das correlações parciais das variáveis avaliadas (Field, 2005). Seu valor pode variar de zero a um. Valores iguais ou próximos a zero indicam que a soma das correlações parciais dos itens avaliados é muito alta em relação à soma das correlações totais. Nesses casos, possivelmente a PCA será inapropriada. Valores maiores de 0,50 foram considerados aceitáveis (HAIR et al., 1987).

O Teste de esfericidade de Bartlett avalia em que medida a matriz de covariância é similar a uma matriz-identidade (Os elementos da diagonal principal têm valor igual a um, e os demais elementos da matriz são aproximadamente zero, ou não apresentam correlações entre si) (FIELD, 2005). Também, o teste avalia a significância geral de todas as correlações em uma matriz de dados (FIELD, 2005). Valores do teste de esfericidade de Bartlett com níveis de significância $p < 0,05$ indicam que a matriz é passível de compor novos conjuntos de variáveis, rejeitando a hipótese nula de que a matriz de dados é similar a uma matriz-identidade.

Com objetivo de facilitar a interpretação dos componentes, visto que muitas vezes as variáveis analisadas apresentam cargas fatoriais elevadas em mais de um fator, o método de rotação de fatores foi realizado. Para isto, foi usada a abordagem de rotação oblíqua direta, a qual permite a correlação entre os componentes (SASS et al., 2010; SCHIMITT et al., 2011; FIELD, 2005).

Os escores dos componentes principais foram usados para testar a diferença entre genótipos de sachá-inchi, para a qual foi usado a ANOVA. Ademais, os escores foram usados para construir uma matriz de distância euclidiana média e ser usada e realizar a análise de Agrupamento Hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*) (CRUZ et al., 2011).

Os componentes da variância e comparação de médias dos tratamentos foram estimados para cada característica usando o Software Genes (CRUZ, 2013). E para a análise de componentes principais foi usado o Software estatístico IBM SPSS, versão 20.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os acessos apresentaram diferença significativa em todas as características avaliadas (Tabela 11), a qual significa que existe variabilidade para ser explorada no programa de melhoramento. As progênies Cuzco, Am07, Dos de Mayo, Aucaloma, Shanao mostraram ser significativamente mais produtivas em sementes (Produção) (Tabela 12), a principal característica de importância econômica por sua relação direta com a produção de óleo (YANG et al., 2014). Entre os acessos mais produtivos, o acesso Shanao mostrou significativamente maior peso médio de fruto (Mmf), peso médio de sementes (Pms) e tamanho de sementes (TamSem) e largura de fruto (LarFru) do que os outros acessos; ademais, o acesso shanao apresentou significativamente maior comprimento do racemo floral (Race) e do pistilo (Pis) (Tabela 12). Certamente, os resultados indicaram que o acesso shanao possui maior tamanho de frutos e inflorescências que os acessos Cuzco, Am07, Dos de Mayo, Aucaloma. Portanto, Shanao evidenciou potencial de cruzamento com os outros acessos mais produtivos.

Tabela 11. Resumo da análise de variância para as características morfo-agronômicas de progênies de *Plukenetia volubilis*.

Fontes de Variação	gl	Produção	Pmf	Pms	Nsf	TamSem	Race	Pis	LarFru
Blocos	2	978517	0,363	0,002	0,001	640740	121	31	38
Progênies	11	67321**	1,245**	0,014**	0,035*	29970948**	806**	24*	88**
Resíduo	22	11989	0,177	0,002	0,011	6473737	110	8	12
Média		510	7,13	1,01	3,87	5593	71	26	40
CV (%)		26	6	5	3	10	15	11	9

* Significativo pelo teste-F ao 1% e 5% de erro, respectivamente. ¹Produção – Produção de sementes por planta; Pmf - Peso médio de frutos; Pms – Peso médio de sementes; Nsf – Número de sementes por fruto; Race – Comprimento do racemo da inflorescência; Pis – Comprimento do pistilo; LarFru – Largura do fruto verde.

A matriz de correlação mostrou pelo menos três conjuntos de variáveis inter-relacionadas bem definidas (Tabela 13). Assim, o Peso médio de fruto (Pmf), Peso médio de semente (Pms) e Tamanho de sementes (TamSem) conformam um grupo. Freitas et al. (2016) reportaram resultados semelhantes em *Jatropha curcas* L, onde o comprimento e a largura da semente tiveram correlação positiva com o peso de frutos e sementes. Outro conjunto de correlações apresentou o comprimento de racemo floral (Race) com a largura de fruto (LarFru) e comprimento de pistilo (Pis). Esta conclusão diferiu das observações comparativas entre *Plukenetia carolis-vegae*, *Plukenetia huayllabamban*, e *Plukenetia volubilis*, onde o comprimento do estilete (4-7 mm, 6-7,5 e 9 - 35 mm, respectivamente) coincidiram

inversamente com o tamanho de sementes (Largura, comprimento e altura = 27 × 25 × 20 mm, 25–28 × 22–27 × 17–20 mm, 13–22 × 11.8–18 × 5–9 mm, respectivamente) ou tamanho de frutos (CARDINAL-MCTEAGUE et al., 2019; RODRIGUEZ et al., 2010). O terceiro conjunto estaria confirmado pela produção de sementes (Pro), peso médio de frutos (Pmf) e comprimento de pistilo (Pis).

Tabela 12. Comparação de médias entre doze progênies de *P. volubilis* em relação a características morfo-agronômicas.^{a, b, c}

Acessos	Produção	Acesso	Pmf	Acesso	Pms	Acesso	TamSem				
Cuzco	760	a	Am13	8,28	a	Am07	1,12	a	N.Hori	6771	a
Am07	657	a	Sha	8,05	a	Sha	1,12	a	S.Ped	6616	a
D.Mayo	652	a	P.Rena	7,51	b	N.Hori	1,09	a	Auc	6459	a
Auca	642	a	S.Ped	7,33	b	Am13	1,03	b	Am13	6446	a
Sha	552	a	Am21	7,31	b	S.Pe	1,03	b	Sha	6333	a
S.Ped	515	b	N.Hori	7,20	b	P.Rena	1,00	b	Am17	5633	b
N.Hori	486	b	Am17	7,02	c	Am21	0,99	b	Am07	5499	b
J.Guerra	441	b	Am07	6,92	c	Auca	0,98	b	D.May	5259	b
Am13	434	b	Auca	6,83	c	Am17	0,98	b	Am21	4894	b
Am17	406	b	J.Gue	6,79	c	D.Mayo	0,98	b	P.Rena	4741	b
Am21	295	b	D.Mayo	6,31	d	J.Gue	0,95	b	J.Gue	4726	b
P.Rena	275	b	Cuzco	6,02	d	Cuzco	0,90	b	Cuzco	3738	c
Continuação	Racemo	Acesso	Pistilo	Acesso	LarFru	Acesso	Nsf				
Sha	97	a	J.Gue	30	a	N.Hori	54	a	J.Gue	4,13	a
J.Gue	96	a	Am21	29	a	Sha	48	b	Am13	4,01	a
N.Hori	84	b	Am13	29	a	Am17	41	c	S.Ped	3,96	a
Am21	75	b	Sha	28	a	J.Gue	41	c	Sha	3,89	b
Auca	75	b	Am17	28	a	P.Rena	40	c	P.Rena	3,84	b
P.Rena	71	b	S.Ped	27	a	Am07	38	c	Auca	3,83	b
P.Ped	64	c	N.Hori	27	a	Auca	38	d	Am21	3,83	b
Cuzco	61	c	P.Rena	24	b	Cuzco	37	d	Cuzco	3,83	b
Am17	61	c	Auca	24	b	S.Ped	37	d	D.Mayo	3,82	b
Am07	49	d	Cuzco	24	b	Am21	36	d	Am07	3,79	b
D.Mayo	44	d	Am07	23	b	D.Mayo	36	d	Am17	3,79	b
Am13	40	d	D.Mayo	21	b	Am13	35	d	N.Hori	3,76	b

^a Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. ^b Produção – Produção de semente por planta; Pmf - Peso médio de frutos; Pms – Peso médio de sementes; Nsf – Número de sementes por fruto; Race – Comprimento do racemo da inflorescência; Pis – Comprimento do pistilo; LarFru – Largura de fruto verde. ^c Acessos: P.Rena = Ponto Renato; S.Ped = São Pedro; Auca = Acaloma; D.Mayo = Dos de Mayo; J.Gue = João Guerra; Sha = Shanao; N.Hori = Novo Horizonte.

O Teste de esfericidade de Bartlett ($\chi^2_{(1,28)} = 102$, $p < 0.000$) e a Medida de Adequação da amostra de Kaiser-Meyer-Olkin –KMO (0,55) (DAMASIO, 2012; KAISER, 1974, FIELD, 2005) da matriz de correlação das variáveis sugerem que a Análise de Componentes Principais (PCA) é adequada (DAMASIO, 2012; HAIR et al., 1987; FIELD, 2005). As características de produção de semente por planta (Pro) e número de sementes por fruto (Nsf) mostraram medidas de KMO inaceitáveis de KMO, 0,37 e 0,46, respectivamente (Tabela 13), contudo a maioria

dos caracteres avaliados mostraram estar inter-relacionados aceitavelmente (KMO maior de 0,50) por uma variância comum (DAMÁSIO, 2012; FIELD, 2005; HAIR et al., 1987), consequentemente, estes não inviabilizaram a análise.

Tabela 13. Correlação fenotípica entre características morfo-agronômicas e Adequação da Amostra de Kayser-Meyer-Olkin para cada variável na diagonal em progênes de *Plukenetia volubilis*.¹

	Pro	Pmf	Pms	TamSem	Nsf	Race	Pis	LarFru
Pro	0,37 ^a	-0,44 ^{**}	-0,00	0,05	-0,10	-0,13	-0,44 ^{**}	-0,06
Pmf		0,52 ^a	0,62 ^{**}	0,49 ^{**}	0,27	0,09	0,31	0,11
Pms			0,54 ^a	0,58 ^{**}	-0,07	0,05	0,02	0,37 [*]
TamSem				0,76 ^a	0,03	0,07	0,07	0,26
Nsf					0,46 ^a	0,16	0,38 [*]	-0,18
Race						0,56 ^a	0,62 ^{**}	0,58 ^{**}
Pis							0,65 ^a	0,30
LarFru								0,53 ^a

^{*}, ^{**} Significativo pelo teste-t ao 1% e 5% de erro, respectivamente. ¹Pro – Produção de semente por planta; Pmf - Peso médio de frutos; Pms – Peso médio de sementes; TamSem – Tamanho de semente; Nsf – Número de sementes por fruto; Race – Comprimento do racemo da inflorescência; Pis – Comprimento do pistilo; LarFru – Largura de fruto verde.

A PCA indicou que três componentes explicaram 73% da variação total (Tabela 14). As características com cargas altas no componente 1 parecem ter relação com genótipos que apresentam um maior número de sementes por fruto (Nsf), mas que se relaciona negativamente com o caractere de produção de semente (Pro) e comprimento do pistilo (Pis). O Componente 2, a características associadas aparentam ter relação com genótipos com maior tamanho de sementes (TamSem) ou peso médio de sementes (Pms) e frutos (Pmf). Por outro lado, o Componente 3 mostrou relação com genótipos com maior comprimento de racemo (Rac) e a largura de fruto (LarFru).

A PCA determinou que as variáveis peso médio de fruto (Pmf), peso médio de sementes (Pms), largura do fruto (LarFru) e comprimento do racemo floral foram mais importantes e discriminatórias que as variáveis de tamanho de sementes (TamSem) e comprimento de pistilo (Pis); estes por sua vez, más importantes que as variáveis de número de sementes por fruto (Nsf) e produção de sementes (Pro) (Tabela 14).

Existe interesse por combinações híbridas dos acessos mais produtivos em sementes, tais como os genótipos Shanao, Am07, Dos de Mayo, Aocaloma e Cuzco. Consequentemente, de acordo à distância representada nos escores dos componentes 1-3, é recomendável o cruzamento do genótipo Shanao com os genótipos Am07, Aocaloma, Dos de Mayo e Cuzco (Figura 3), bem como Dos de Mayo ou Am07 com os genótipos Cuzco, Aocaloma. Esta

conclusão coincide com a comparação da média das coordenadas dos genótipos nos três primeiros componentes principais, onde o acesso Shanao foi significativamente diferente aos outros acessos já mencionados (Tabela 15). Da mesma forma, os genótipos Dos de Mayo e Am07 apresentaram diferença significativa com os genótipos Cuzco, e Aucaloma (Tabela 15).

Tabela 14. Componentes principal (CP), Autovalores (λ_j), variância explicada (S²), variância cumulativa (Cum.) e cargas totais associadas aos primeiros três componentes em progênies de *P. volubilis*.¹

CP	λ_j	S ² (%)	Cum. %	Correlações entre as variáveis e os três primeiros componentes ^a							
				Nsf	Pro	Pis	Pms	Tam sem	Pmf	Rac	Lar Fru
1	2,67	33	33	0,73	-0,67	-0,63	-0,11	-0,10	0,50	0,16	-0,27
2	1,76	22	55	-0,10	-0,10	-0,10	0,90	0,82	0,76	-0,11	0,25
3	1,42	18	73	-0,11	-0,10	0,58	0,10	0,03	-0,10	0,89	0,84
4	0,95	12	85								
5	0,45	6	90								
6	0,33	4	95								
7	0,26	3	98								
8	0,16	2	100								
Importância relativa dos caracteres para a diversidade dos acessos ^b				0,54	0,46	0,74	0,82	0,67	0,87	0,83	0,84

¹Pro – Produção de semente por planta; Pmf - Peso médio de frutos; Pms – Peso médio de sementes; Tam sem – Tamanho de semente; Nsf – Número de sementes por fruto; Rac – Comprimento do racemo da inflorescência; Pis – Comprimento do pistilo; LarFru – Largura de fruto verde.^a Método de Rotação: Oblíqua com normalização de Kayser. ^b Soma dos quadrados das correlações de cada variável com os três componentes principais.

Tabela 15. Comparação de médias entre doze progênies de *P. volubilis* em relação a características morfoagronômicas agrupadas em três componentes principais (CP).^{a, b}

Acessos	CP1	Acessos	CP2	Acessos	CP3
João Guerra	1,369 a	Shanao	1,296 a	Novo Horizonte	1,741 a
Am13	0,867 a	Novo Horizonte	1,131 a	Shanao	1,433 a
Am21	0,751 a	Am13	0,936 a	João Guerra	0,907 b
São Pedro	0,517 a	Am07	0,580 a	Am21	0,120 c
Ponto Renato	0,283 a	São Pedro	0,459 a	Am17	0,108 c
Shanao	0,168 a	Aucaloma	-0,014 b	Ponto Renato	-0,061 c
Am17	0,044 a	Ponto Renato	-0,190 b	Aucaloma	-0,075 c
Aucaloma	-0,468 b	Am17	-0,199 b	São Pedro	-0,300 c
Cuzco	-0,740 b	Am21	-0,461 b	Cuzco	-0,433 c
Novo Horizonte	-0,838 b	Dos Mayo	-0,577 b	Am07	-0,753 d
Am07	-0,937 b	João Guerra	-1,130 c	Dos Mayo	-1,202 d
Dos Mayo	-1,015 b	Cuzco	-1,831 c	Am13	-1,486 d

^a Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente segundo o teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

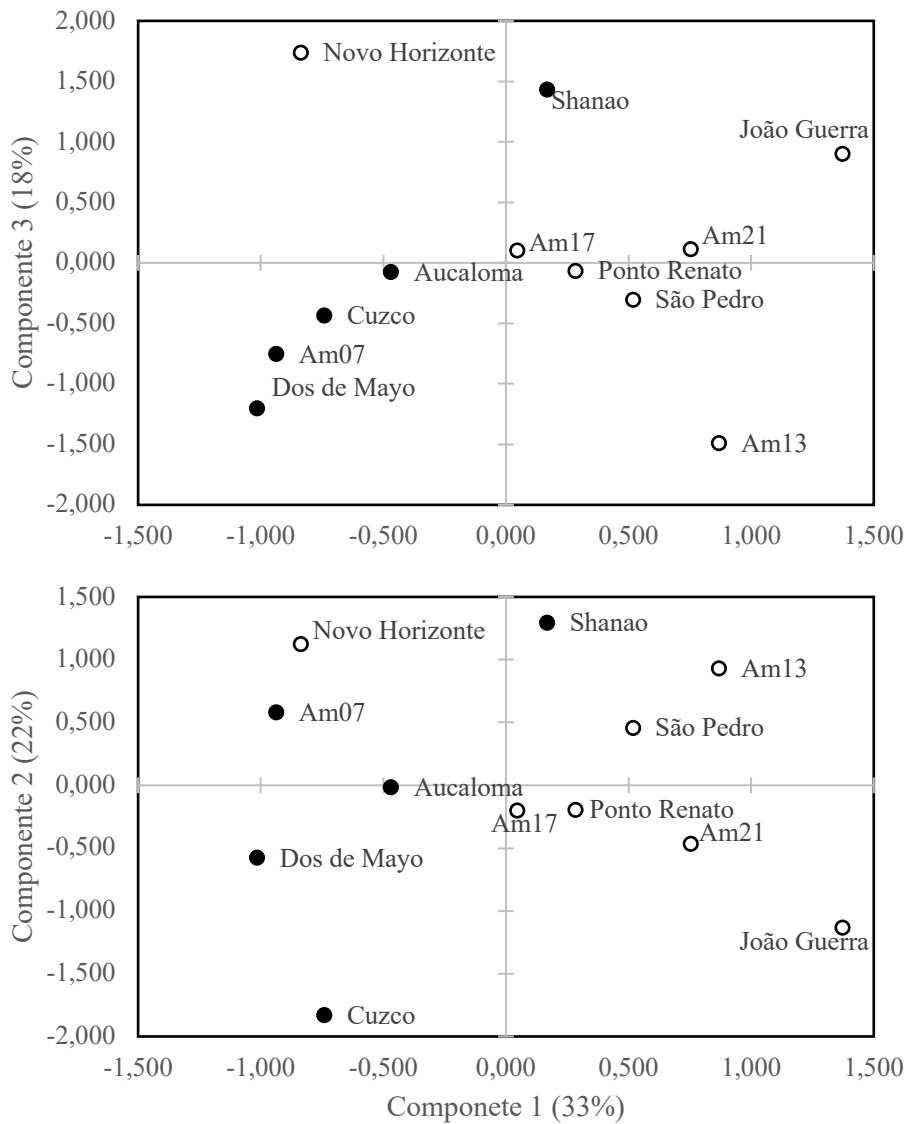


Figura 3. Padrão de estrutura genética morfoagronômica de progênies de sachá-inchi (*Plukenetia volubilis*), baseado na distância euclidiana dos escores de três primeiros componentes principais. Círculos escuros representam as progênies mais produtivas em sementes.

O método de agrupamento Componentes Principais coincidiu com o método de agrupamento hierárquico de Ligação Média entre Grupos, UPGMA (**Figuras 3 e 4**). A análise mostrou distâncias significativas entre os genótipos mais produtivos: Shanao, Am07, Aucaloma, Dos de Mayo e Cuzco, confirmando a viabilidade de cruzamentos entre estes (**Figura 4**). No entanto, pela similitude genética, a combinação híbrida entre os genótipos Dos de Mayo e Am07 não é recomendável (**Figura 4**).

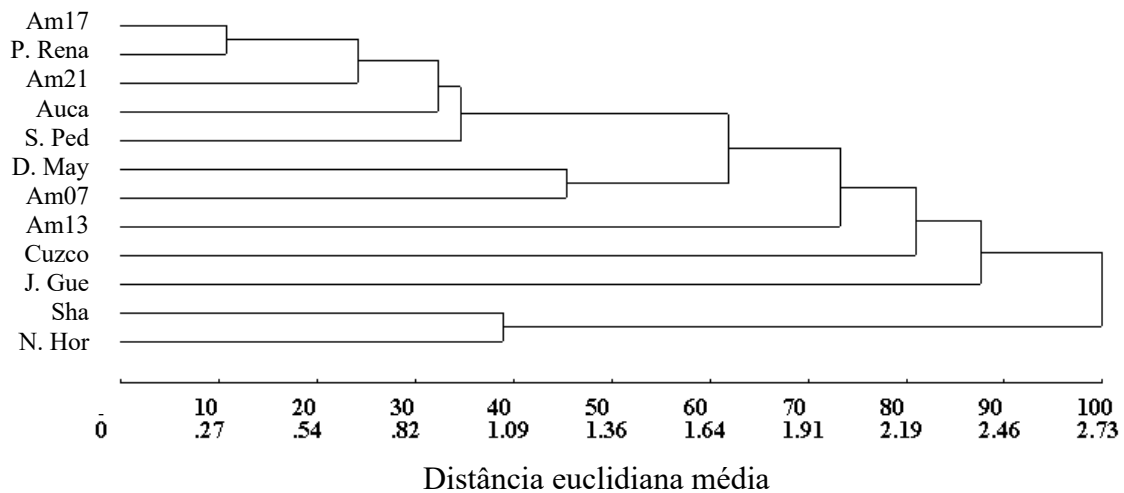


Figura 4. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridades entre doze acessos de *Plukenetia volubilis*, baseado na distância euclidiana dos escores de três primeiros componentes principais. Coeficiente de correlação cofenético: $r = 0,805$. Acessos: P.Rena = Ponto Renato; S.Ped = São Pedro; Auca = Aucaloma; D.Mayo = Dos de Mayo; J.Guera = João Guerra; Sha = Shanao; N.Hori = Novo Horizonte.

Houve alta correlação entre a distância euclidiana média baseada nos escore dos três primeiros componentes principais e a distância de Mahalanobis baseada nas oitos características ($r = 0,83$), a qual indica viabilidade do método de componentes principais para analisar o agrupamento entre genótipos (**Figura 5, Tabela 16**). Gotelli e Ellison (2016) indicam que as posições dos escores dos componentes principais gerados da PCA têm a mesma distância euclidiana entre si que os dados originais no espaço multivariado, sendo possível manter os padrões de agrupamento entre as amostras ou os genótipos (CRUZ et al., 2012). Este explicaria a similitude no padrão de agrupamento dos genótipos no método hierárquico-UPGMA, usando tanto a matrizes originada do escores da PCA como aquele originada da matriz de mahalanobis (**Figura 4 e 6**).

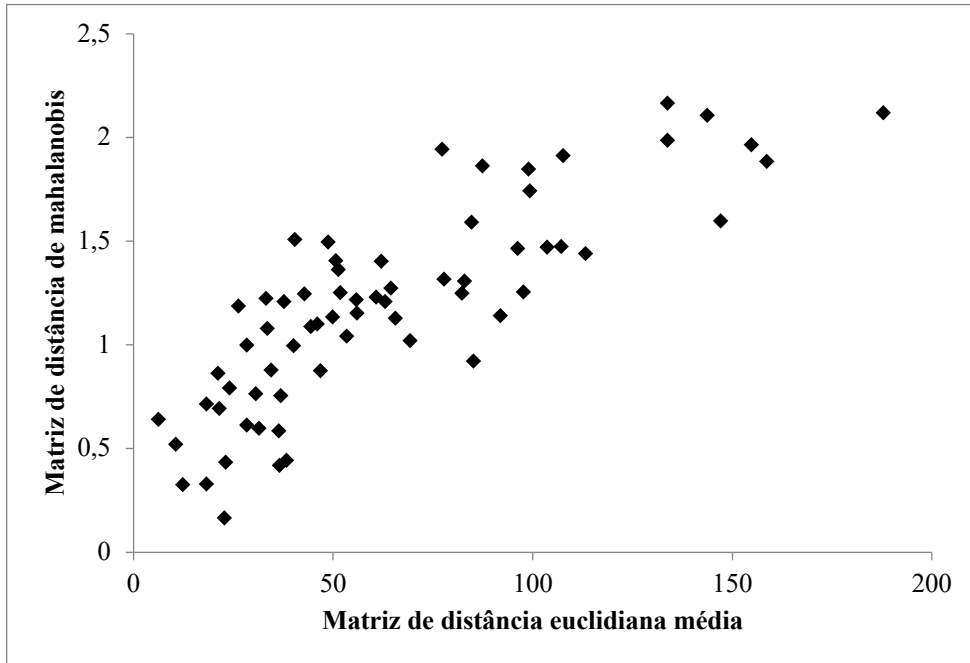


Figura 5. Correlação entre a matriz de dissimilaridade baseada na distância euclidiana média baseada nos escores dos três primeiros componentes principais e distância de mahalanobis baseada nas oito características morfoagronômicas. Coeficiente de correlação cofenético: $r=0,83$, significativo pelo teste de Mantel = $p<0,01$.

Tabela 16. Dissimilaridade entre Progenitores de sachá-inchi baseado na Distância Euclidiana Média acima da diagonal, obtida a partir dos escores dos três primeiros componentes Principais. Distância de Mahalanobis abaixo da diagonal, obtida a partir das oito variáveis originais em sachá-inchi.

ACES.	DMAY	SHA	SPED	CUZ	Am17	AUC	Am07	Am13	Am21	PREN	JGUE	BHOR
DMAY		3,44	2,06	1,50	1,73	1,37	1,24	2,43	2,21	1,77	3,23	3,41
SHA	133		1,96	3,75	2,00	2,10	2,55	3,02	2,27	2,11	2,76	1,07
SPED	26	66		2,62	0,91	1,12	1,53	1,33	1,04	0,73	2,17	2,54
CUZ	21	134	40		1,89	1,87	2,44	3,37	2,10	1,97	2,60	3,68
Am17	39	56	10	44		0,57	1,52	2,12	0,75	0,29	1,81	2,28
AUC	24	63	6	33	18		1,02	2,16	1,31	0,77	2,36	2,18
Am07	18	104	34	51	47	36		1,98	2,17	1,60	3,32	2,56
Am13	61	99	31	77	33	43	92		2,13	1,91	3,20	3,66
Am21	64	83	31	38	23	37	82	61		0,57	1,20	2,77
PREN	69	56	36	50	23	38	85	46	12		1,73	2,50
JGUE	87	85	52	49	53	51	108	99	21	28		3,27
BHOR	154	28	96	188	78	98	107	144	147	113	159	

Progenitores: PREN= Ponto Renato; SPED = São Pedro; AUC = Aucaloma; DMAY = Dos de Mayo; JGUE = João Guerra; SHA = Shanao; NHOR = Novo Horizonte.

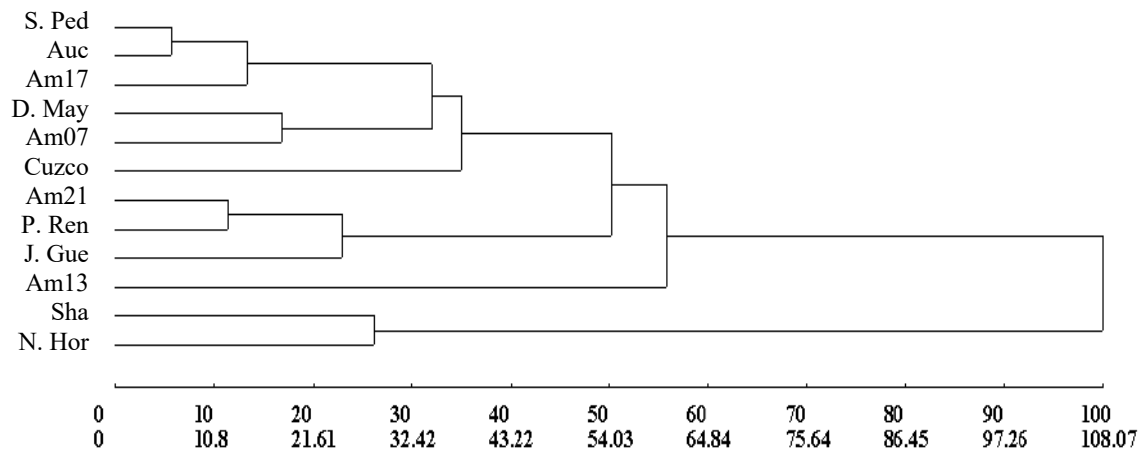


Figura 6. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridade entre doze acessos de *Plukenetia volubilis*, baseado na distância de Mahalanobis. Coeficiente de correlação cofenético: $r = 0,79$. Acessos: P.Ren = Ponto Renato; S.Ped = São Pedro; Auca = Aucaloma; D.May = Dos de Mayo; J.Guera = João Guerra; Sha = Shanao; N.Hor = Novo Horizonte.

CONCLUSÃO

As coordenadas dos Componentes Principais são adequados para analisar a diversidade genética em sachá-inchi, tanto por métodos univariados como por métodos multivariados.

É recomendável as seguintes hibridações: Cuzco x Dos de Mayo, Cuzco x Aucasoma, Shanao x Cuzco, Shanao x Aucasoma, Shanao x Dos de Mayo, Shanao x AM-07, Dos de Mayo x Aucasoma.

O acesso Shanao é um genótipo com características de frutos e inflorescências de maior tamanho que os acessos Dos de Mayo, Aucasoma, AM-07 e Cuzco. Este último apresenta frutos e inflorescências maiores do que os acesso Dos de Mayo, Aucasoma e AM-07.

REFERÊNCIAS

- CARDINAL-MCTEAGUE, W. M.; WURDACK, K. J.; SIGEL, E. M.; GILLESPIE, L. J. Seed size evolution and biogeography of *Plukenetia* (Euphorbiaceae), a pantropical genus with traditionally cultivated oilseed species. **BMC Evolutionary Biology**, v. 19, n. 1, p. 1-23, 2019.
- CESPEDES, I. E. M. **El cultivo de sacha inchi**. San Martín: Instituto Nacional de Investigación Agraria del Perú, 2008. 60 p.
- CHIRINOS, R.; ZULOETA, G.; PEDRESCHI, R.; MIGNOLET, E.; LARONDELLE, Y.; CAMPOS, D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1732–1739, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.078>
- CRUZ, C. D., REGAZZI, A. J., CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. v.1. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2004. 480p.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 620p. 2011.
- CORNELIUS, J. P.; CLEMENT, C. R.; WEBER, J. C.; SOTELO-MONTES, C.; VAN LEEUWEN, J.; UGARTE- GUERRA, L. J.; RICSE-TEMBLADERA, A.; ARÉVALO-LÓPEZ, L. The trade-off between genetic gain and conservation in a participatory improvement programme: the case of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth). **Forests, Trees and Livelihoods**, v. 16, p. 17–34, 2006.
- DAMÁSIO, B. F. Uso da análise fatorial exploratória em psicologia. **Avaliação Psicológica: Interamerican Journal of Psychological Assessment**, v. 11, n. 2, p. 213-228, 2012.
- DEL CASTILLO, A. M. R.; GONZALEZ-ASPAJO, G.; SANCHEZ-MARQUEZ, M. F.; KODAHN, N. Ethnobotanical Knowledge in the Peruvian Amazon of the Neglected and Underutilized Crop Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Economic Botany**, v. 73, p. 281–287, 2019.
- DOS SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. T.; DOS ANJOS, L. H. C.; DE OLIVEIRA, V. Á.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; CUNHA, T. J. F. **Brazilian soil classification system**. Brasília: *Embrapa Solos-Livro técnico-INFOTECA-E*, 2008.
- DZIUBAN, C. D.; SHIRKEY, E. C. When is a correlation matrix appropriate for factor analysis? Some decision rules. **Psychological Bulletin**, v. 81, n. 6, p. 358-361, 1974.
- FALCONER, D. S. **Introdução à Genética Quantitativa**. Viçosa: UFV, 1981. 279p.
- FIELD, A. **Discovering Statistics Using SPSS**. 2. ed., London: Sage, 2005.
- FISCH, G., MARENCO, J. A., NOBRE, C. A. Uma revisão geral sobre o clima da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 28, p. 101-126, 1999.
- FRANCO, T. L. **Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos-Boletín Técnico IPGRI No. 8**. Bioersivity International, 2003.
- FREITAS, R. G.; DIAS, L. A. S.; CARDOSO, P. M. R.; EVARISTO, A. B.; SILVA, M. F.; ARAÚJO, N. M. Diversity and genetic parameter estimates for yield and its components in *Jatropha curcas* L. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.4238/gmr.15017540>>.
- GILLESPIE, L. J. A Synopsis of Neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species. **Systematic Botany**, v. 18, n. 4, p. 575-592, 1993.
- GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia**. Artmed Editora, 2016.
- HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Multivariate data analysis**. New York: Macmillan, 1987.

- HAMAKER, B. R.; VALLES, C.; GILMAN, R.; HARDMEIER, R. M.; CLARK, D.; GARCIA, H. H.; GONZALES, A. E.; KOHLSTAD, I.; CASTRO, M.; VALDIVIA, R.; RODRIGUEZ, T.; LESCANO, M. Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis*). **Cereal Chemistry**, v. 69, p. 461-463, 1992.
- KAISER, H. F. An index of factorial simplicity. **Psychometrika**, v. 39, p. 31-36, 1974.
- KAISER, H. F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, v. 23, 187-200, 1958.
- RODRIGUES, P. H. V.; BORDIGNON, S. R.; AMBROSANO, G. M. B. Horticultural performance of *in vitro* propagated plants of Sacha inchi. **Ciência Rural**, v. 44, n. 6, p. 1050-1053. 2014.
- RODRIGUEZ, A.; CORAZON-GUIVIN, G.; CACHIQUE, D.; MEJÍA, K.; DEL CASTILLO, D.; JEAN-FRANÇOIS, R.; GARCÍA-DÁVILA, C. Differentiation morphological and by Inter simple sequence repeats (ISSR) of species of genus *Plukenetia* (Euphorbiaceae) from Peruvian Amazon: suggestion for a new species. **Revista Peruana de Biología**, v. 17, n. 3, p. 325 – 330. 2010.
- SASS, D. A.; SCHMITT, T. A. A comparative investigation of rotation criteria within exploratory factor analysis. **Multivariate Behavioral Research**, v. 45, n. 1, p. 73-103, 2010.
- SCHMITT, T. A.; SASS, D. A. Rotation criteria and hypothesis testing for exploratory factor analysis: Implications for factor pattern loadings and interfactor correlations. **Educational and Psychological Measurement**, v. 71, n. 1, p. 95-113, 2011.
- SOLSOL, H. R; MESÉN, M. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estaquilla en el enraizamiento de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Agronomía Costarricense**, v. 34, n. 2, p. 259-267. 2010.
- VAN LEEUWEN, J.; LLERAS-PÉREZ, E.; CLEMENT, C. R. Field genebanks may impede instead of promote crop development: lessons of failed genebanks of “promising” Brazilian palms. **Agrociencia**, v. 9, p. 61- 66. 2005.
- VALENTE, M. S. F.; CHAVES, F. C. M.; LOPES, M. T. G.; OKA, J. M.; RODRIGUES, R. A. F. Crop yield, genetic parameter estimation and selection of sachá inchi in central Amazon. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, p. 226-236. 2017a.
- VALENTE, M. S. F.; LOPES, M. T. G.; CHAVES, F. C. M; OLIVEIRA, A. M. FREITAS, D. R. B. Repeatability of biometric and fruit and seed yield traits of sachá inchi. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 3, p. 195-202. 2017b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1809-4392201602623>>.
- VASEK, J.; ČEPKOVA, H. P.; VIEHMANNOVA, I.; OCELAK, M.; HUANSI, C. D.; VEJL, P. Dealing with AFLP genotyping errors to reveal genetic structure in *Plukenetia volubilis* (Euphorbiaceae) in the Peruvian Amazon. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1-24. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184259>>.
- YANG, C.; JIAO, D. Y.; GENG, Y. J.; CAI, C. T.; CAI, Z. Q. Planting density and fertilisation independently affect seed and oil yields in *Plukenetia volubilis* L. plants. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, p. 201-207. 2014.

CAPÍTULO IV - ANÁLISE MULTIELEMENTAR DO PISTILO FLORAL E GERMINAÇÃO DE PÓLEN DE SACHA-INCHI

Resumo

Estudos de viabilidade do pólen de sachá-inchi são escassos. Contudo, podem ser úteis a conservação de pólen armazenado e hibridação artificial em programas de melhoramento, visando promover a sincronia entre dispersão do pólen e receptividade do estigma floral. Para que se obtenha um meio para germinação de pólen é necessário simular as condições aproximadas do estigma e pistilo floral. Dessa forma, o objetivo do estudo foi realizar a análise multielementar do pistilo floral sob fluorescência de raio-x por reflexão total e analisar diferentes meios de cultura líquidos na germinação de pólen. Quatro estágios de desenvolvimento do pistilo floral foram analisados, os quais foram representados por A). Os estágios foram: (A) flores pequenas com estigma fechado: ovário pouco desenvolvido e estigma fechado; (B) flores totalmente desenvolvidas com estigma fechado: ovário pouco desenvolvido e estigma fechado; (C) flores totalmente desenvolvidas com estigma aberto: ovário pouco desenvolvido e estigma aberto; (D) flores fecundadas com estigma aberto: ovário desenvolvido e estigma aberto. Os meios de cultura analisados para germinação foram: 10% de sacarose + 0,01% de H_3BO_3 + 0,03%, 0,06 ou 0,09% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ + 0,01% de KNO_3 + 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 10% de sacarosa + 0,01% de H_3BO_3 ; 10% de sacarose + 0,03% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 10% de sacarose + 0,01% de H_3BO_3 + 0,03% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 10% de sacarose. A germinação em meio de cultura de germinação foi correlacionada com teste colorimétrico à base do corante Azul de Lactofenol, para identificar o método mais simples de análise de viabilidade de pólen para uso em programa de melhoramento. O estágio inicial de desenvolvimento do pistilo (A) apresentou significativamente mais cálcio, potássio, fósforo, enxofre e cloro que os estágios subsequentes. Assim, o cálcio foi um elemento importante para o ajuste do meio de germinação. A análise multielementar do pistilo floral sob fluorescência de raio-x por reflexão total auxilia visando melhor germinação do pólen. O meio de cultura composto por 10% de sacarose e 0,03% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ proporcionou maior porcentagem de germinação do pólen.

Palavras-chave: *Plukenetia volubilis*, viabilidade de pólen, espectrofotometria de raio x.

Abstract

Sacha-inchi pollen viability studies are scarce. However, conservation of stored pollen and artificial hybridization in breeding programs may be useful, aiming to promote synchrony between pollen dispersion and floral stigma receptivity. In order to obtain a medium for pollen germination, it is necessary to simulate the approximate conditions of the stigma and floral pistil. Thus, the aim of the study was to perform a multielemental analysis of the floral pistil under x-ray fluorescence by total reflection and to analyze different liquid culture media in pollen germination. Four stages of development of the floral pistil were analyzed, which were represented by A). The stages were: (A) small flowers with closed stigma: poorly developed ovary and closed stigma; (B) fully developed flowers with closed stigma: poorly developed ovary and closed stigma; (C) fully developed flowers with open stigma: poorly developed ovary and open stigma; (D) fertilized flowers with open stigma: developed ovary and open stigma. The culture media analyzed for germination were: 10% sucrose + 0.01% H_3BO_3 + 0.03%, 0.06 or 0.09% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ + 0.01% KNO_3 + 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 10% sucrose + 0.01% H_3BO_3 ; 10% sucrose + 0.03% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 10% sucrose + 0.01% H_3BO_3 + 0.03% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 10% sucrose. Germination in germination culture medium was correlated with a colorimetric test based on Lactophenol Blue dye, to identify the simplest method of pollen viability analysis for use in a breeding program. The initial stage of pistil development (A) had significantly more calcium, potassium, phosphorus, sulfur and chlorine than subsequent stages. Thus, calcium was an important element for the adjustment of the germination medium. Multielemental analysis of the floral pistil under x-ray fluorescence by total reflection helps to improve pollen germination. The culture medium composed of 10% sucrose and 0.03% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ provided the highest percentage of pollen germination.

Keywords:: *Plukenetia volubilis*, pollen viability, x-ray spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

A viabilidade do pólen pode ser estimada usando métodos diretos baseados em germinação *in vitro* ou por meio de coloração citológica. Porém, o método *in vitro* é mais usado nos estudos por ser mais eficiente, rápido e fácil de obter as taxas de germinação (FLORES et al., 2015). No entanto, estudos de viabilidade de pólen *in vitro* e colorimétrico são escassos em sachá-inchi. Dessa forma, pesquisas devem ser realizadas visando a otimização de metodologias.

Na literatura é relatado que o íon cálcio é indispensável na germinação *in vitro* de pólen de várias espécies de plantas com flores (86 espécies, incluindo 79 gêneros representando 39 famílias) (BREWBAKER e KWACK, 1963). Os estudos indicaram que embora o íon cálcio não possa ser omitido do meio de cultura sem prejudicar a germinação das espécies estudadas, é provável que outros íons necessitem estar presentes juntos ou separados tais como potássio, magnésio e boro, com a finalidade de melhorar a atividade do cálcio (ABDELGADIR et al., 2012; BREWBAKER e KWACK, 1963; DINISCH, 2018). Por exemplo, em *Jatropha curcas*, foi encontrado 81% de germinação de pólen, usando o meio de Brewbaker e Kwack (1963) (DINISCH, 2018), mas, em outro estudo houve 30% de germinação de pólen, usando 1,3 mmol/L de ácido bórico e 1,3 mmol/L de nitrato de cálcio (ABDELGADIR et al., 2012).

Nem sempre é fácil otimizar o meio de cultura para germinação *in vitro*. No entanto, a análise multielementar pode ajudar a entender a constituição do estigma e ajudar a elaborar o meio de germinação.

Não existem estudos de análises multielementares do pistilo floral em sachá-inchi e de receptividade do estigma para realizar a polinização controlada. Estigmas de sachá-inchi são facilmente identificados, já que as flores pistiladas são grandes. Em geral, o estigma está receptivo quando apresenta abertura total e túrgida, por apresentar um bom desenvolvimento do ovário e estilete (21 a 30 mm) (HUANSI, 2006). No entanto, para sachá-inchi, estigmas abertos podem ser observados quando o estilete e o ovário são bem menores que estes. O estilete bem desenvolvido com estigmas bem abertos e túrgidos podem ser observados também em flores fecundadas. O turgor e a receptividade do estigma em sachá-inchi podem estar relacionados com liberação controlada de K^+ em plantas. Além do K^+ , Cl^- e açúcares também são os principais solutos envolvidos nas mudanças de turgor em plantas (AHMAD e MAATHUIS, 2014). Outro elemento importante na germinação é o cálcio, pois é um elemento muito abundante nos principais tecidos das plantas com flores (TAIZ e ZEIGER, 2006). Ressalta-se que o pólen contém baixo teor de cálcio (0,03%), o que explicaria a distribuição

uniforme de cálcio ao longo das paredes do tubo polínico (BREWBAKER e KWACK, 1963). Além disso, o íon cálcio é o principal regulador do crescimento da raiz das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2006; THOR, 2019), o que explicaria a semelhança no crescimento da raiz e dos tubos polínicos (BREWBAKER e KWACK, 1963; THOR, 2019).

Neste contexto, a análise multielementar dos principais íons envolvidos no processo de germinação do pólen poderiam ser determinados com a técnica de fluorescência de raio-x por reflexão total (BRANDT e LAZAR, 1958; KLOCKENKÄMPER, 1990; ISO 18507, 2015) em diferentes estágios de desenvolvimento do pistilo para identificar os principais elementos envolvidos na germinação.

Desta forma, os objetivos do estudo foram i) realizar a análise multielementar do pistilo floral sob fluorescência de raio-x por reflexão total; ii) obter meio de cultura líquido adequado para estudar a germinação *in vitro*; iii) analisar a relação entre o teste de viabilidade de pólen *in vitro* e colorimétrico em sachá-inchi.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental em Outubro de 2020, e usando acessos do Banco de Germoplasma de sachá-inchi da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, Amazonas, Brasil (2° 53' 29,141" S e 9° 58' 39.9" W).

Análise multielementar com fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF)

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos, considerando os estágios de desenvolvimento do pistilo floral. Os tratamentos foram: (A) flores pequenas com estigma fechado: ovário pouco desenvolvido e estigma fechado (Figura 7); (B) flores totalmente desenvolvidas com estigma fechado: ovário pouco desenvolvido e estigma fechado; (C) flores totalmente desenvolvidas com estigma aberto: ovário pouco desenvolvido e estigma aberto; e (D) flores fecundadas com estigma aberto: ovário desenvolvido e estigma aberto. Cada tratamento foi avaliado em seis repetições de único acesso. A unidade experimental foi constituída por três observações.

Pistilos de sachá-inchi foram secos à 70 °C por 48 h em estufa de circulação forçada de ar. Em seguida, foram pesados e transferidos para tubo de plásticos pequenos (Eppendorf®). Assim, em um tubo de reação de 1 mL, constituído de 20 mg de amostra, 250 µl de Triton X-

100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n à 1%, 10 ul de solução padrão de Gálio (2 mL/L, Kraft GmbH, Germany). Após homogeneização, 10 ul de cada amostra foram colocados em suportes de cristal de quartzo e secos ao ar. Os dados de TXRF foram coletados durante 1000 s sobre um espectrofotômetro TXRF S4 T-STAR[®] com um tubo de raio-x (Alvo de Mo, 50 kV, 1000 μA). Os espectros de TXRF foram observados, e todos os elementos identificados, usando o programa computacional AXIL.

A concentração dos elementos magnésio, alumínio, fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio, cromo, manganês, ferro, níquel, cobre e zinco foram calculados por referência do padrão de gálio em cada amostra. O interesse nesses elementos, justifica-se por sua função na constituição das plantas. Além de serem considerados fontes de nutrientes, são essenciais na manutenção da atividade osmótica ou sua participação como cofatores de reações enzimáticas.

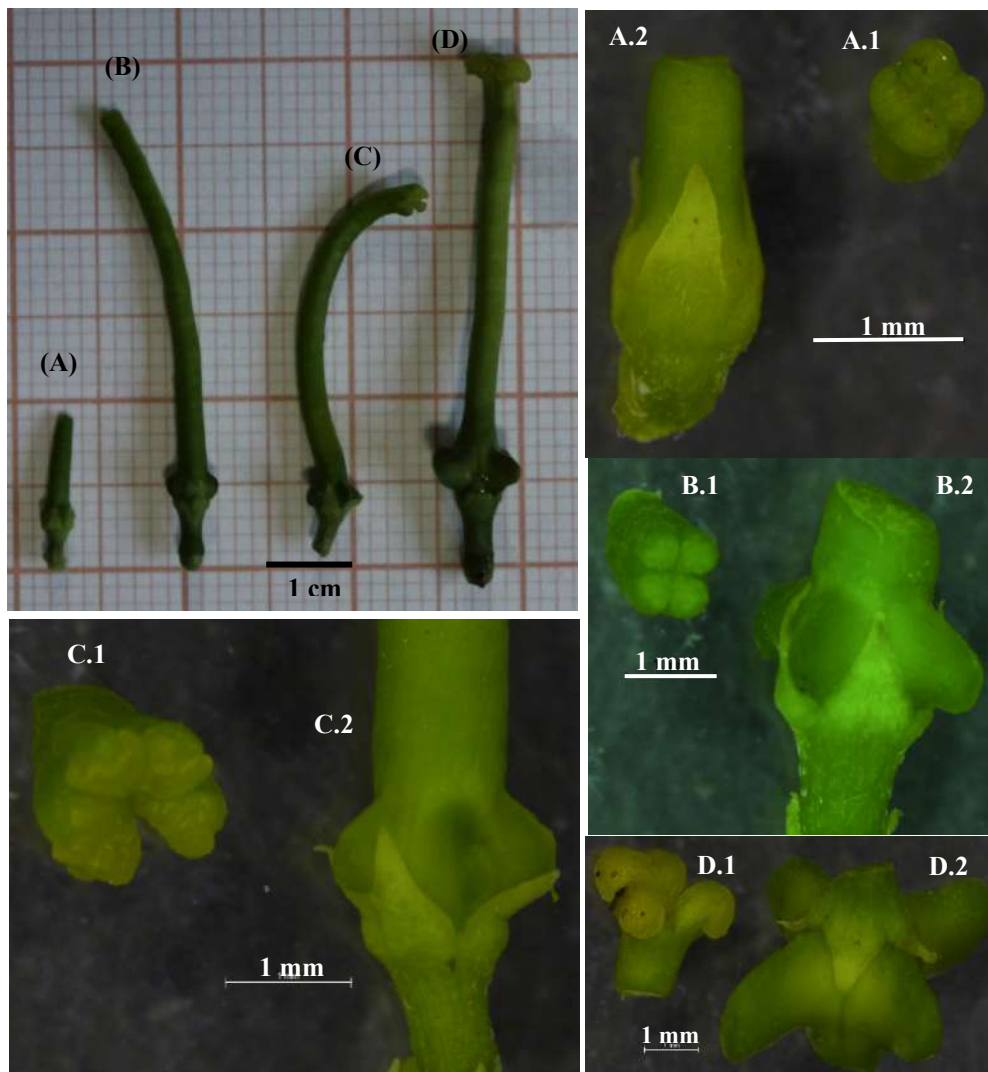


Figura 7. Flores pistiladas de sachá-inchi em diferentes fases de desenvolvimento. (A) flores pequenas com estigma fechado: ovário pouco desenvolvido (A.2) e estigma fechado (A.1); (B) flores totalmente desenvolvidas com estigma fechado: ovário pouco desenvolvido (B.2) e

estigma fechado (B.1); (C) flores totais desenvolvidas com estigma aberto: ovário pouco desenvolvido (C.2) e estigma aberto (C.1); (D) flores fecundadas com estigma aberto: ovário desenvolvido (D.2) e estigma aberto (D.1).

Os dados foram realizados pelo programa computacional SPSS IBM versão 24.0. Para avaliar as diferenças entre os estágios de desenvolvimento do pistilo, foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis. Para determinar diferenças entre as médias dos tratamentos, com p-valor < 0,05 sendo considerado significativo, foram realizados os Testes de Mann-Whitney U.

Germinação *in vitro*

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos de meios de cultura com sete tratamentos e três repetições. A unidade experimental foi constituída por cinquenta pólenes do mesmo acesso.

Os tratamentos foram constituídos de meios de cultura adaptados Brewbaker e Kwack (1963), representados por: 1. 10% de sacarosa; 2. 10% de sacarosa + 0,01% de H_3BO_3 ; 3. 10% de sacarosa + 0,03% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 4. 10% de sacarosa + 0,01% de H_3BO_3 + 0,03% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 5. 10% de sacarosa + 0,01% de H_3BO_3 + 0,03% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ + 0,01% de KNO_3 + 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 6. 10% de sacarosa + 0,01% de H_3BO_3 + 0,06% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ + 0,01% de KNO_3 + 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 7. 10% de sacarosa + 0,01% de H_3BO_3 + 0,09% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ + 0,01% de KNO_3 + 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Os meios foram diluídos em água destiladas e o pH ajustado para 5,8.

Antes da coleta das flores para o estudo, um dia antes da antese, flores abertas foram eliminadas de inflorescências previamente marcadas, ao redor de 16 h. Logo, no dia seguinte às 8-9 h, flores abertas foram coletadas das inflorescências marcadas. Grãos de pólen de aproximadamente setenta e cinco flores foram obtidos e transferidos para microtubos (Eppendorf).

Flores de sacha-inchi foram colocados em microtubos com água destilada e sacudidos levemente. Após 10 min, 10 µl de amostra foi puxado do fundo do tubo e colocado em lâminas de microscópio. Depois, foi adicionado 40 µl de meio de cultura. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 1 h em cima de papel filtro úmido em placas de Petri. Em seguida, em relação a cinquenta pólenes, foi realizada a contagem do número de pólenes com presença de tubo polínico (porcentagem).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de erro.

Relação entre o teste direto e indireto

A análise de correlação entre o teste de viabilidade de pólen foi realizada entre o teste direto e teste indireto. A unidade experimental foi constituída de 20 pólenes. Flores de dezoito inflorescências foram coletadas, separadamente, de uma única planta.

Para o teste direto foi usado a solução com água destilada constituída de 10% de sacarose + 0,01% de H_3BO_3 + 0,03% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ + 0,01% de KNO_3 + 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Cinquenta 50 μ l da solução de germinação foram colocados diretamente na lâmina microscópica, formando uma gota, logo, as anteras das flores são esfregadas levemente para conseguir a aderência do pólen na gota. A presença de pólen foi observada em microscópio até a obtenção de aproximadamente vinte pólenes por lâmina. Após o preparo das lâminas, o pólen foi incubado por 1 h à temperatura ambiente e posteriormente foi analisado.

Para o teste indireto, foram usados 50 μ l do corante Azul de Lactofenol 5% (40% de glicerol, 20% de fenol, 20% de ácido láctico e água). Para a montagem do pólen na lâmina microscópica foi realizado o mesmo procedimento para o teste direto. Após preparo das lâminas, o pólen foi observado 30 min após ser corado.

Os dados foram analisados através da análise de correlação e regressão linear a 5% de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise multielementar com fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF)

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar a diferença entre as médias dos tratamentos. A análise mostrou que o estágio inicial (pequeno) de desenvolvimento do pistilo contém, significativamente, mais cálcio, potássio, cloro, fósforo e enxofre do que os estágios subsequentes (Tabela 17). No entanto, estudos futuros são necessários a fim de verificar se é um estágio de intensa atividade enzimática propício para a polinização controlada. Brewbaker e Kwack (1963) indicam que o cálcio é o elemento mais importante na germinação de pólen em várias espécies com flores, incluindo a família Euforbiácea, como em sacha-inchi. Os

pesquisadores também afirmaram que o potássio e magnésio provavelmente facilitam na absorção e ligação do cálcio. Por outro lado, o maior teor de potássio, cloro, fósforo e enxofre no estágio inicial pode estar relacionado com maior turgência dos tecidos (AHMAD e MAATHUIS, 2014). Este coincide com as observações de campo em sachá-inchi, onde a maior quantidade de pólen é obtida nas primeiras horas da manhã, enquanto nas horas da tarde, as flores estaminadas atingem a murcha.

Tabela 17. Média do conteúdo mineral em diferentes estágios de crescimento do pistilo floral.^{a,b}

Estágio de desenvolvimento do pistilo e órgão analisado ^b	Elemento químico (mg/kg)					
	Mg	Ca	K	P	S	Cl
Pequeno (Ova.,Esti. e Estig.)	133100 a	4079 a	28582 a	16043 a	26441 a	2454 a
Estigma aberto (Ova.,Esti. e Estig.)	114600 a	1728 b	17832 ab	11568 ab	26114 a	2569 ab
Estigma fechado (Ova.,Esti. e Estig.)	524100 a	2907 b	22716 ab	8657 b	12020 b	1893 c
Ovário bem desenvolvido (Esti. e Estig.)	131949 a	2656 b	19391 b	10717 ab	30310 b	2223 ab
Média geral	133100	1808	22148	12700	24490	2112
Continuação	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	
Pequeno (Ova.,Esti. e Estig.)	17 a	240 a	42 a	22 a	25 a	
Estigma aberto (Ova.,Esti. e Estig.)	32 a	383 a	77 a	31 a	19 a	
Estigma fechado (Ova.,Esti. e Estig.)	10 a	169 a	28 a	14 a	29 a	
Ovário bem desenvolvido (Esti. e Estig.)	10 a	100 a	21 a	10 a	31 a	
média geral	14	239	77	24	26	

^a Medianas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo método de comparação múltipla de Testes de Mann-Whitney, ao nível de 5%.

^b Órgãos analisados: Ova. = Ovário; Esti. = Estilete; Estig. = Estigma.

Os teores de Cálcio ($x^2(3) = 12,00, p < 0,05$), Fósforo ($x^2(3) = 14,45, p < 0,05$), Enxofre ($x^2(3) = 19,83, p < 0,05$), Cloro ($x^2(3) = 12,36, p < 0,05$), Potássio ($x^2(3) = 12,00, p < 0,05$) foram significativamente diferentes nos estágios de desenvolvimento do pistilo quando analisado pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados inferem que é provável que a receptividade do estigma esteja acontecendo na fase inicial de desenvolvimento do pistilo, coincidindo com os maiores teores de cálcio, potássio, cloro, fósforo e enxofre. Esta hipótese condiz com o insucesso de testes de receptibilidade em flores pistiladas com estigma aberto de sachá-inchi realizadas neste estudo, tipo a Figura 7C, usando peróxido de hidrogênio a 6% e o peroxtesmo (DAFNI E MAUES, 1998).

A falta de normalidade e homocedasticidade dos dados, provavelmente, deve-se à grande sensibilidade do método. Estudos futuros devem explorar métodos de padronização de amostras, visando melhorar a quantificação. Assim, diferentes fontes de excitação tais como tubos de molibdênio e tungstênio, tipos de agentes solventes tais como Triton X-100 e etanol ou diluição das amostras podem ser testados (TESSARO e GROSS, 2018).

Germinação *in vitro*

A presença do íon cálcio no meio de cultura foi eficiente para a germinação do pólen de sachá-inchi. Além disso, também foi evidente que a retirada dos íons magnésio, boro e potássio não limitavam a porcentagem de germinação (Tabela 18). Assim, não foi observada diferença significativa entre os meios de cultura constituídos de 10% de sacarose + 600 Ca + B + Mg + K, 10% de sacarose + 300 Ca e 10% de sacarose + 300 Ca + B (Tabela 18, Figura 8A, B e C). A média de germinação entre os três meios foi de 70%. Esses resultados coincidem com os obtidos por Brewbaker e Kwack (1963), que indicam que o cálcio promoveu a germinação de pólen de 87 espécies quando o boro foi retido. Mas contradiz a informação de que a presença de outros íons, como o magnésio e potássio, podem estar presentes para permitir a atividade do cálcio.

Os resultados obtidos no presente estudo foram superiores que os de Viera et al. (2012). Esses autores não obtiveram germinação em pólenes de oito variedades de *Manihot esculenta* Crantz utilizando as mesmas concentrações de Ca (NO₃)₂.4H₂O (0,03%); KNO₃ (0,01%); MgSO₄.7H₂O (0,02%) e H₃BO₃ (0,01%) do estudo. Vargas et al. (2009) registraram 13% de germinação em pólenes de *Ricinus communis* L, que trabalharam também com as mesmas concentrações do meio de cultura já mencionadas acima.

Por outro lado, Cuchiara et al. (2012) obtiveram 40% de germinação em pólenes de *R. communis*, usando 10% de sacarose e 0,004% de ácido bórico no meio de cultura. O uso de pólen de flores em fase de pré-antese nos estudos foi diferente do presente experimento, no qual foram utilizadas flores em fase de antese, o que possivelmente prejudicou o estado fisiológico do pólen, e refletiu em menor porcentagem de germinação. Neste sentido, estudos de germinação de pólen em *Jatropha curcas* L., quando usaram o meio de cultura base de Brewbaker e Kwack (1963) e pólen fresco coletado no momento da antese, foram obtidos valores semelhantes ao estudo, entre 71% (LI et al., 2010) e 81% (DINESH, 2018).

Para constatar esta hipótese, também foi realizado experimento de germinação de pólen de flores abertas após 12h, mantidas em água destilada à temperatura ambiente, no qual não houve germinação em todos os tratamentos de meio de cultura usados no presente estudo. Portanto, é evidente que o momento da coleta do pólen é crucial para o sucesso da germinação *in vitro* de pólen de sachá-inchi.

Tabela 18. Germinação de pólen de sachá-inchi em diferentes meios de cultura. ^{a,b}

Tratamentos	Porcentagem de germinação	
10% de sacarose 10% + 600 Ca + B + Mg + K	81	a
10% de sacarose + 300 Ca	67	a
10% de sacarose + 300 Ca + B	64	a
10% de sacarose + 300 Ca + B + Mg + K	60	ab
10% de sacarose + 900 Ca + B + Mg + K	58	ab
10% de sacarose + B	31	bc
10% de sacarose	28	c

^a Ca fornecido como 0,03; 0,06 ou 0,09% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, K como 0,01% de KNO_3 , Mg como 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e B como 0,01% de H_3BO_3 . ^b Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo testes de Tukey a 5% de erro.

Relação entre o teste direto e indireto

Houve relação negativa entre o teste direto (germinação *in vitro*) e o teste indireto (colorimétrico) de viabilidade de pólen em sachá-inchi ($r = -0,54$; $p = 0,022$) (Figura 9). Este resultado é divergente do obtido por Vieira et al. (2012) em *M. esculenta*, que verificara que não existe relação entre os testes de viabilidade de pólen direto e indireto. Os pesquisadores estimaram a viabilidade do pólen maior que 90% no teste indireto, enquanto que o teste direto não possibilitou a germinação da espécie.

No presente estudo a estimativa de viabilidade do pólen no teste indireto teve em média 91% dos pólenes corados, diferente do teste direto que mostrou média 64% de pólen germinado. No teste indireto o pólen viável apresentou coloração mais escura do que o não viável (Figura 8D, 8E).

O teste *in vitro* seria recomendável para os estudos de viabilidade de pólen, pois o modelo de regressão para estimar a viabilidade do pólen via o teste indireto foi baixo (Figura 9, $R^2 = 29\%$). O teste *in vitro* ofereceu a vantagem de não precisar de estufa incubadora ou ambiente controlado, ser fácil de preparação, usando apenas sacarose, mais uma fonte de cálcio, bem como por ser eficiente no momento da avaliação.

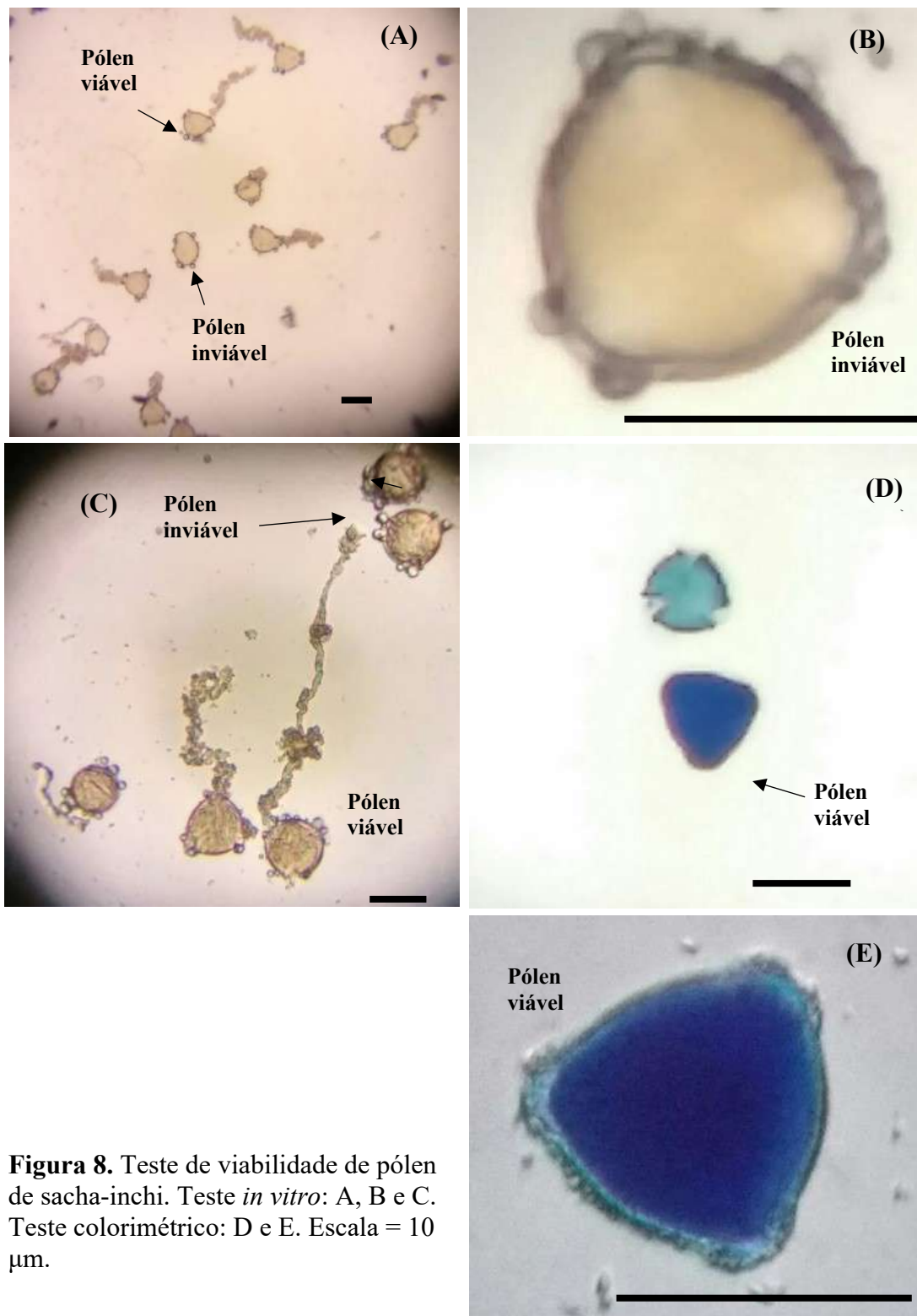


Figura 8. Teste de viabilidade de pólen de sachá-inchi. Teste *in vitro*: A, B e C. Teste colorimétrico: D e E. Escala = 10 μm.

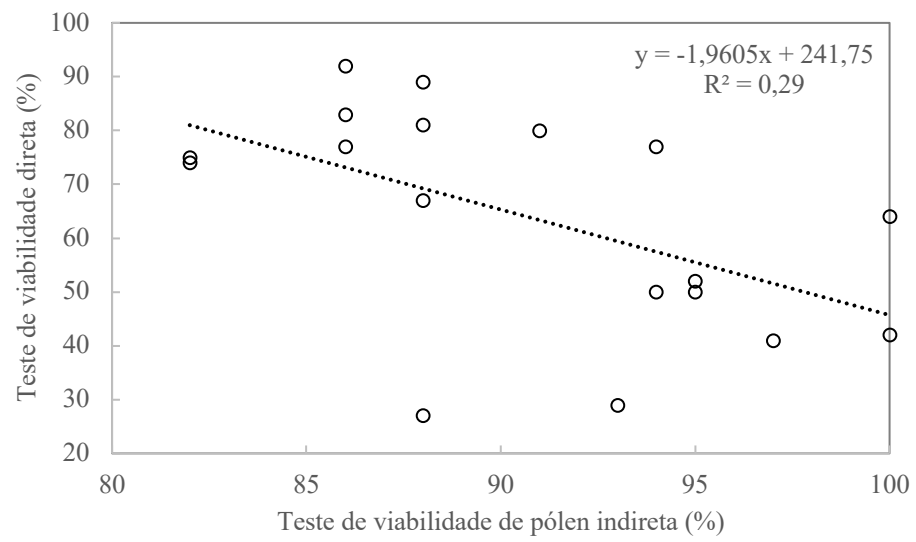


Figura 9. Relação de germinação de pólen entre o teste viabilidade direta e indireta em em sachá-inchi.

CONCLUSÕES

A germinação *in vitro* em meio de cultura líquida acrescido de 10% de sacarose 0,03% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ é o melhor método para estimar a viabilidade de pólen em sachinchi.

O estágio inicial de desenvolvimento do pistilo apresenta mais íons cálcio, potássio, fósforo, enxofre e cloro que os estágios subsequentes.

A análise multielementar do pistilo floral sob fluorescência de raio-x por reflexão total, auxilia na identificação de elementos essenciais, para compor o meio de cultura para a germinação *in vitro* da espécie.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; MAATHUIS, F. J. M. Cellular and tissue distribution of potassium: physiological relevance, mechanisms and regulation. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 9, p. 708-714, 2014.
- BRANDT, C. S.; LAZAR, V.A. Plant Analyses, Analysis of Dried Plant Material by X-Ray Emission Spectrograph. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 306-309, 1958.
- BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.
- CUCHIARA, C. C.; SILVA, S. D. D. A.; BOBROWSKI, V. L. Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. **Revista Ceres**, v. 59, n. 1, p. 82-87, 2012.
- DAFNI, A.; MAUÉS, M. M. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 177-180, 1998.
- DE MELLO, P. R. **Nutrição de plantas**. Editora Unesp, 2021. P.?
- DINESH, B. Pollen biology and morphology of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **International Journal of Botany Studies**, v. 3; n. 4; p. 01-03, 2018.
- FLORES, P. S.; DOS SANTOS, V. B.; DA SILVA, L. M., CAPISTRANO, M. D. C. **Manual para teste de viabilidade e armazenamento de pólen e receptividade de estigma do amendoim forrageiro**. Embrapa Acre-Documentos (INFOTECA-E), 2015.
- GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **A primer of ecological statistics**. Suderland: Sinauer Associates, Inc. 2004. P.?
- HUANSI, C. H. **Biología floral y reproductiva de *Plukenetia volubilis* L. (Euphorbiaceae, sacha-inchi)**. Monografía – Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Peru. 2006. P.?
- ISO 18507. **Surface chemical analysis — Use of Total Reflection X-ray Fluorescence spectroscopy in biological and environmental analysis**. First edition, 2015.p.?
- KLOCKENKÄMPER, R. Total-reflection x-ray fluorescence spectrometry: principles and applications. **Spectroscopy**, v. 5, n. 6, p. 26-32, 1990.
- LI, C.; YU, M.; CHEN, F.; WANG, S. In vitro maturation and germination of *Jatropha curcas* microspores. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 12, p. 541-546, 2010.
- MBAHE, R. E.; AKEN'OVA, M. E.; HAHN, S. K. 1991. Germination of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) pollen. In: **Symposium on Tropical Root Crops in a Developing Economy 380**. 1991. p. 172-177.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Universitat Jaume I, 2006.
- TESSARO, S; GROSS, A. **Biopharmaceutical production: Rapid nutrient and contaminant analysis of cell culture media by TXRF spectroscopy. S4 T·STAR**. Berlin: Bruker Nano GmbH. 2018.
- THOR, K. Calcium-Nutrient and messenger. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 440, 2019.
- VARGAS, D. P.; SOUZA, S. A. M.; SILVA, D. A. S.; BOBROWSKI, V. L. Análise dos grãos de pólen de diferentes cultivares de mamona (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae): conservação e viabilidade. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 115-120, 2009.
- VIEIRA, L. D. J.; SOARES, T. L.; ROSSI, M. L.; ALVES, A. A. C.; SANTOS, F. D. A. R. D.; SOUZA, F. V. D. Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 350-356, 2012.