


UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS E
AMBIENTAIS



**“FENOLOGIA, VIABILIDADE DO PÓLEN, EMERGÊNCIA
DE SEMENTE E CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE
AÇAIZEIROS (*Euterpe spp.*).”**

MANAUS - AM

2020

MARLESON DOS SANTOS TAVARES

**“FENOLOGIA, VIABILIDADE DO PÓLEN, EMERGÊNCIA
DE SEMENTE E CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE
AÇAIZEIROS (*Euterpe spp.*)”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais – PPGCIFA -UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Florestais e Ambientais.

ORIENTADORA: Dra. MARIA TERESA GOMES LOPES

COORIENTADOR: Dr. RICARDO LOPES

COORIENTADOR: Dr. MARCELO DOMINGUES MARTINS RAIZER

MANAUS - AM

2020

Ficha Catalográfica

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

T231v	<p>Tavares, Marleson dos Santos</p> <p>Fenologia, viabilidade do pólen, emergência de semente e conteúdo de DNA nuclear de açazeiros (<i>Euterpe spp.</i>) / Marleson dos Santos Tavares, Maria Teresa Gomes Lopes. 2020 66 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes Coorientador: Ricardo Lopes Coorientador: Marcelo Domingues Martins Raizer Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. Açai. 2. hibridação. 3. biologia floral. 4. melhoramento genético. 5. semente. I. Lopes, Maria Teresa Gomes. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	--

MARLESON DOS SANTOS TAVARES

FENOLOGIA, VIABILIDADE DO PÓLEN, EMERGÊNCIA
DE SEMENTE E CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE
AÇAIZEIROS (*Euterpe* spp.)

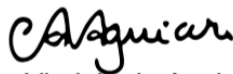
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais, área de concentração em Ciências Florestais e Ambientais.

Aprovada em 15 de julho de 2020

BANCA EXAMINADORA



Dr^a. Maria Teresa Gomes Lopes- Presidente
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Dr^a. Ananda Virginia de Aguiar - Membro
Embrapa - Embrapa Florestas



Dr. Gabriel Dequigiovanni - Membro
Centro Universitário Univel - UNIVEL

AGREDECIMENTOS

À Deus, imensamente pela vida e pela saúde que me deste para finalizar esse mestrado.

À minha família, por sempre está do meu lado em todas as fases da minha vida.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade da realização do mestrado por intermédio do Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais (PPG-CIFA) e a todos os professores (as) doutores (as) do programa por todo conhecimento transmitido aos discentes.

À CAPES, pela concessão da bolsa no decorrer do mestrado;

À Professora Maria Teresa Gomes Lopes, por toda dedicação, apoio e incentivo ao longo de toda a realização do mestrado.

À Embrapa Amazônia Ocidental, em nome do Dr. Ricardo Lopes pelas orientações, ensinamentos e todo apoio incansável na realização de experimentos de laboratório e atividades de campo.

Ao Dr. Marcelo Domingues Raizer, pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos transmitidos;

Á minha esposa que sempre esteve ao meu lado apoiando durante o mestrado.

À banca avaliadora pela disponibilização de tempo para leitura e avaliação, e pelas contribuições.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos colegas de Laboratório: Jekiston, Macaulay, Pâmela, Daniele, Cibelle, Eduardo, Rosinha e Alex Cysne.

RESUMO

Os açazeiros, *Euterpe precatoria* e *Euterpe oleracea*, são espécies da família Arecaceae, distribuídas por toda a região Amazônica. Essas palmeiras possuem grande valor socioeconômico nas regiões de ocorrência e são usadas para diferentes finalidades, como na alimentação, cosméticos, óleos e fibras. A caracterização do seu germoplasma quanto a fenologia, viabilidade polínica e o estabelecimento de plântulas permitirá o avanço de programas de melhoramento em *Euterpe*. Os objetivos do trabalho foram estudar os eventos fenológicos e a viabilidade polínica de *E. precatoria*; a emergência de plântulas e o conteúdo de DNA de *E. precatoria*, *E. oleracea* e seus híbridos interespecíficos. Os eventos fenológicos de *E. precatoria* foram acompanhados em 20 genótipos em um período de 12 meses. Para o estudo da viabilidade polínica, foi coletado pólen em inflorescências de indivíduos de *E. precatoria* da área da Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental em Manaus. Foi determinado o meio de cultura ideal para a germinação dos grãos de pólen e avaliada a porcentagem de germinação. Foram testados também três soluções de corante para determinar a viabilidade polínica: Tetrazólio (0,1%), Cotton Blue (0,05 %) e Azul de Tripán (0,2 %) e foi avaliada a viabilidade do pólen por 180 dias. A emergência de plântulas e o conteúdo de DNA nuclear de *E. precatoria* e *E. oleracea* e de seus híbridos interespecíficos também foram avaliados. A floração foi verificada em todos os meses, com pico ocorrendo nos meses de agosto a dezembro. O período de frutificação foi registrado em todo o período de avaliação, sendo mais intensa entre setembro a maio. A maior porcentagem de germinação do pólen ocorreu no meio de cultura com 100 g L⁻¹ de sacarose e 300 mg L⁻¹ de Ca (NO₃)₂ 4H₂O. Com o uso dos três corantes, os valores médios de pólen viáveis foram considerados altos (acima de 70%), facilitando o uso dos métodos de coloração no melhoramento genético da espécie. Os grãos de pólen armazenados, na geladeira (5 °C), no freezer (-20 °C) e no ultrafreezer (-80 °C), permaneceram viáveis até os 180 dias avaliados. Observou-se que as plântulas de *E. oleracea* apresentaram Índice de Velocidade de Emergência (IVE) variando de 2,14 a 3,18, em comparação às de *E. precatoria* que variaram de 0,62 a 1,03 e às dos híbridos interespecíficos que apresentaram IVE intermediário, entre 0,74 a 1,80. De maneira geral, o conteúdo médio de DNA de *E. precatoria*, *E. oleracea* e dos híbridos interespecíficos foram de 7,52 pg, 6,17 pg e 6,95 pg, respectivamente. A melhor época para coleta do pólen de *E. precatoria* é entre agosto a dezembro. O pólen dessa espécie

apresenta alta viabilidade (acima de 70%), mesmo quando armazenado por 180 dias e permite hibridação artificial para cruzamentos controlados.

Palavra-chave: Açaí, biologia floral, hibridação, floração, melhoramento genético, semente.

ABSTRACT

Açaizeiros, *Euterpe precatoria* and *Euterpe oleracea*, are species of the Arecaceae family, distributed throughout the Amazon region. These palms have great socioeconomic value in the regions where they occur and are used for different purposes, such as food, cosmetics, oils and fibers. The characterization of its germplasm in terms of phenology, pollen viability and the establishment of seedlings will allow the advancement of breeding programs in *Euterpe*. The objectives of the research were to study the phenological events and the pollen viability of *E. precatoria*; the emergence of seedlings and the DNA content of *E. precatoria*, *E. oleracea* and their interspecific hybrids. The phenological events of *E. precatoria* were followed in 20 genotypes over a period of 12 months. For the study of pollen viability, pollen was collected in inflorescences from individuals of *E. precatoria* from the Experimental Station of Embrapa Amazônia Ocidental in Manaus. The ideal culture medium for the germination of pollen grains was determined and the percentage of germination was evaluated. Three dye solutions were also tested to determine pollen viability: Tetrazolium (0.1%), Cotton Blue (0.05%) and Trypan Blue (0.2%) and pollen viability was evaluated for 180 days. Seedling emergence and nuclear DNA content of *E. precatoria* and *E. oleracea* and their interspecific hybrids were also evaluated. Flowering was verified every month, with the peak occurring from August to December. The fruiting period was recorded throughout the evaluation period, being more intense between September and May. The highest percentage of pollen germination occurred in the culture medium with 100 g L⁻¹ of sucrose and 300 mg L⁻¹ of Ca (NO₃)₂ 4H₂O. With the use of the three dyes, the average viable pollen values were considered high (above 70%), facilitating the use of staining methods in the genetic improvement of the species. The pollen grains stored in the refrigerator (5°C), in the freezer (-20°C) and in the ultrafreezer (-80°C), remained viable until the 180 days were evaluated. It was observed that the seedlings of *E. oleracea* showed an Emergency Speed Index (ESI) ranging from 2.14 to 3.18, compared to *E. precatoria* that ranged from 0.62 to 1.03 and to interspecific hybrids that presented intermediate ESI, between 0.74 to 1.80. In general, the average DNA content of *E. precatoria*, *E. oleracea* and the interspecific hybrids were 7.52 pg, 6.17 pg and 6.95 pg, respectively. The best time to collect pollen from *E. precatoria* is between August and December. The pollen of this species has high viability (above 70%), even when stored for 180 days allowing for artificial hybridization for controlled crosses.

Keyword: Açaí, floral biology, hybridization, flowering and genetic improvement, seed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>E. precatoria</i> Mart., caule e frutos (BUSSMANN; ZAMBRANA, 2012).....	21
Figura 2. <i>E. Oleracea</i> Mart., caule e frutos (BUSSMANN; ZAMBRANA, 2012)	22
Figura 3. Inflorescência de <i>E. precatoria</i> (OLIVEIRA et al., 2019)	24
Figura 4. Local de estudo e obtenção de material vegetal.....	28
Figura 5. Área do estudo fenológico, km 74 da rodovia AM-070	29
Figura 6. (A) Visualizações das fases fenológicas; (B) Indivíduo com inflorescência em antese e espata fechada; (C) Indivíduo com cacho maduro e inflorescência seca.....	29
Figura 7. (A) Indivíduo de <i>E. precatoria</i> com inflorescência em antese; (B) Ráquila com flores estaminadas abertas.....	30
Figura 8. (A) Dispersão dos grão de pólen com o auxílio de uma alça de Drigalsky para germinação em meio de cultura. (B) Meios de culturas prontos com pólen na BOD.....	32
Figura 9. Lâminas preparadas com corantes: (A) Tetrazólio (0,1%); (B) Azul de Tripan (0,2 %) e (C) Cotton Blue (0,05 %)......	33
Figura 10. A semeadura em bandejas de poliestireno de sementes de <i>E. Oleracea</i> , <i>E. precatoria</i> e híbridos na casa de vegetação.....	35
Figura 11. Plantas de <i>E. precatoria</i> consideradas híbridas.....	38
Figura 12. Fenologia reprodutiva de <i>Euterpe precatoria</i> Mart.....	40
Figura 13. Pólenes de <i>E. precatoria</i> germinados em meio ágar.....	43
Figura 14. (A) Pólen corado com Tetrazólio (0,1%); (B) Pólen corado com Cotton Blue (0,05, (C) Pólen corado com Azul de Tripan (0,2 %).....	45
Figura 15. Porcentagem de viabilidade dos grãos de pólen de <i>E. precatoria</i> obtida com o uso dos corantes avaliados (Cotton Blue (0,05 %), Tetrazólio (0,1%) e Azul de Tripan (0,2 %), nos 5 períodos de avaliação (0, 30, 60, 90, 180 dias).....	49
Figura 16. Histograma de citometria de fluxo em núcleos das plantas <i>E. precatoria</i> (P1EPC) plantada no CERU, <i>E. Oleracea</i> , (P1EOC) oriunda do CERU, Híbrido interespecífico (H64POC) oriundo do cacho da planta P1EOC, Híbrido interespecífico oriundo do plantio em Manacapuru e <i>E. precatoria</i> (P1EPC) oriunda do plantio em Manacapuru.....	54

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados para a avaliação da germinação in vitro de grãos de pólen de <i>E. precatoria</i>	31
Tabela 2. Genótipos de açazeiros das espécies <i>E. Oleracea</i> , <i>E. precatoria</i> e possíveis híbridos <i>E. precatoria</i> x <i>E. Oleracea</i> analisados para quantificação do DNA nuclear por citometria de fluxo.....	36
Tabela 3. Análise de variância da porcentagem da germinação do pólen in vitro de <i>E. precatoria</i>	41
Tabela 4. Germinação in vitro de pólen de Euterpe precatoria em meio ágar com diferentes concentrações de sacarose, boro e cálcio.....	42
Tabela 5. Análise de variância de porcentagem de pólen viável utilizando três soluções corantes Tetrazólio (0,1%), Cotton Blue (0,05 %) e Azul de Tripán (0,2 %).....	44
Tabela 6. Valores médios para percentual de pólen viável de <i>E. precatoria</i> recém coletado, avaliado com os corantes Cotton Blue (0,05 %), Tetrazólio (0,1%) e Azul de Tripán (0,2 %)	44
Tabela 7. Análise de variância de porcentagem de pólen viável utilizando três soluções (Tetrazólio (0,1%) 0,1 %, Cotton Blue (0,05 %) e Azul de Tripán (0,2 %), armazenado nas três temperaturas (5°, -20° e -80° C) nos cinco tempo de armazenamento (0, 30, 60, 90, 180 dias).....	46
Tabela 8. Análise do desdobramento da interação corante x tempo de armazenamento, com teste de Tukey a 5% de probabilidade para os valores da viabilidade polínica de <i>E. precatoria</i>	47
Tabela 9. Análise do efeito da temperatura através do teste de Tukey a 5% de probabilidade para os valores da viabilidade polínica de <i>E. precatoria</i>	48
Tabela 10. Resumo da análise de variância para Índice de Velocidade de Emergência (IVE) e taxa de emergência (TE) em sementes de <i>E. precatoria</i> , <i>E. olereraceae</i> e híbridas de <i>E. precatoria</i> x <i>E. Oleracea</i>	50
Tabela 11. Médias para índice de velocidade de emergência (IVE) e taxa de emergência (TE) em sementes de <i>E. precatoria</i> , <i>E. Oleracea</i> e híbridas de <i>E. precatoria</i> x <i>E. Oleracea</i> , submetidas a imersão em água com diferentes temperaturas e tempos de imersão.....	51

Tabela 12. Estimativa da quantidade de DNA nuclear de <i>E. precatória</i> , <i>E. Oleracea</i> e prováveis híbridos interespecíficos nas diferentes áreas de origem, obtido por análise de citometria de fluxo.....	52
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	Família Areacaceae	19
3.2	<i>Euterpe precatoria</i> e <i>Euterpe oleracea</i>	20
3.2.1	Características gerais	20
3.2.2	Importância econômica.....	22
3.2.3	Florescimento	23
3.3	Viabilidade polínica	24
3.4	Germinação de sementes.....	25
3.5	Citometria de fluxo	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Fenologia reprodutiva em <i>E. precatoria</i>	28
4.2	Estudo da viabilidade polínica	30
4.2.1	Germinação in vitro do pólen de <i>E. precatoria</i>	30
4.2.2	Viabilidade polínica de <i>E. precatoria</i> a partir de métodos colorimétricos....	32
4.2.3	Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento na viabilidade do pólen de <i>E. precatoria</i>	34
4.3	Emergência de plântulas em sementes de Açazeiros (<i>E. precatoria</i> , <i>E. Oleracea</i> e “híbrido entre <i>E. precatoria</i> x <i>E. oleracea</i>)	35
4.4	Quantidade de DNA genômico de <i>E. precatoria</i> , <i>E. oleracea</i> e do híbrido interespecífico <i>E. precatoria</i> x <i>E. oleracea</i>	36
5	RESULTADOS E DISCURSÃO.....	38
5.1	Fenologia reprodutiva em <i>E. precatoria</i>	38

5.2	Estudo da Viabilidade Polínica.....	41
5.2.1	Germinação in vitro do pólen de <i>E. precatória</i>	41
5.2.2	Viabilidade polínica em <i>E. precatória</i> por métodos colorimétricos	43
5.2.3	Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento na viabilidade do pólen de <i>E. precatória</i>	46
5.3	Emergência de plântulas em sementes de Açaizeiros <i>E. precatória</i> , <i>E. oleracea</i> , e híbrida <i>E. precatória</i> x <i>E. oleracea</i>	50
5.4	Quantidade de DNA genômico de <i>E. precatória</i> , <i>E. oleracea</i> e do híbrido interespecífico <i>E. precatória</i> x <i>E. oleracea</i>	52
6	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

A família Arecaceae possui cerca de 2.600 espécies reunidas em mais de 240 gêneros das palmeiras (LORENZI et al., 2004), ocupando quase todos os habitats (HENDERSON et al., 1995). O Brasil apresenta grande diversidade de palmeiras, sendo registradas mais de 200 espécies e 39 gêneros (HENDERSON; SCARIOT, 1993).

O gênero *Euterpe* Mart. contém sete espécies distribuídas na América do Sul e Central, das quais cinco são encontradas no Brasil (HENDERSON; GALEANO, 1995). As espécies *Euterpe edulis* Mart., *Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe. precatoria* Mart., devido a alta demanda e valor de mercado no setor da alimentação, são consideradas como as mais importantes do gênero (CASTRO, 1992).

E. oleraceae ocorre espontaneamente, nos Estados do Amapá, Maranhão, Pará (CALZAVARA, 1972) e a *E. precatoria* tem maior ocorrência nos estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Pará (HENDERSON, 1995). As principais utilidades de importância econômica dessas duas palmeiras são como alimento, pelo consumo da polpa do fruto e do palmito e o uso do estipes e folhas para construções rústicas (CALZAVARA, 1972). O suco ou “vinho” extraído da polpa do fruto é comum no hábito alimentar da população na região norte, é rico em proteínas, lipídios, fibras, vitamina E e elevado teor de antocianinas, sendo considerado como um excelente energético (PAGLIARUSSI, 2010). A expansão da demanda de açaí no mercado nacional e internacional e o bom preço de mercado promoveu o aumento da pressão no extrativismo do fruto e o interesse dos agricultores da região norte para o cultivo (HOMMA, 2006).

Com a expansão dos cultivos comerciais surgiu à demanda por tecnologias que proporcionem maior produtividade e qualidade de frutos e que assegurassem retorno econômicos e segurança aos investimentos realizados pelos produtores. Neste contexto, cultivares com alta produtividade e qualidade de fruto, resistência a pragas e doenças, bem como, práticas de manejos que permitam explorar o potencial genético do germoplasma das espécies, deverão proporcionar melhor lucratividade e menor risco para o produtor. Apesar da importância econômica da cadeia produtiva do açaí e da ampla variabilidade genética disponível nas populações nativas, existem apenas duas cultivares da espécie *E. oleracea* e ainda não existem cultivares de *E. precatoria* disponível para os agricultores.

Estudos demonstraram que as espécies *E. oleraceae* (OLIVEIRA et al., 2000) e *E. precatoria* (RAMOS et al., 2019), são preferencialmente alógamas. Devido a isso

normalmente apresentam grande variação para os mais diversos caracteres de interesse, como precocidade, produtividade de frutos, rendimento de polpa e época de produção. Estas características proporcionam grandes desafios para futuros programas de melhoramento genético dessas culturas.

O melhoramento genético explora diferentes estratégias de seleção, a escolha depende de características do sistema de produção da espécie e do controle genético dos caracteres de interesse. O conhecimento sobre a biologia floral é essencial para dar subsídio ao melhoramento genético, manejo e domesticação da espécie, além de explicar as relações existentes entre as plantas e o ambiente em que vivem e por contribuir na interpretação de mecanismos relacionados à polinização (OLIVEIRA, et al., 2003). Diversas estratégias de melhoramento genético utilizam a hibridação controlada de indivíduos selecionados para o avanço de gerações e obter ganhos genéticos, em alguns casos, é necessária até mesmo para a autopolinização. A hibridação controlada depende de procedimentos que garantam a legitimidade dos cruzamentos, ou seja, que as sementes produzidas são do cruzamento desejado. A legitimidade do cruzamento depende de procedimentos de isolamento de inflorescências, coleta e armazenamento de pólen e da polinização em momento adequado. É essencial conhecer o florescimento da espécie, como conservar o pólen para manter sua viabilidade até o momento de uso e também conhecer métodos que permitam analisar a viabilidade do pólen antes do uso (BIONDO; BATTISTIN, 2001; ALEXANDER, 2019).

Pesquisas sobre conservação e viabilidade de grãos de pólen em palmeiras vem sendo realizadas para dar suporte a realização de cruzamentos controlados, tanto intra como interespecíficos (LÉDO, et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2001; SOUSA et al., 2010). A viabilidade do pólen é influenciada pela temperatura de armazenamento, umidade relativa do ar, umidade do pólen, fatores genéticos e fisiológicos (GANESHAN et al., 2008; FONSECA, 2005; WESTGATE, 2005; ARONNE et al., 2006). De maneira geral, os grãos de pólen da maioria das espécies permanecem viáveis por mais tempo em baixa temperatura.

Na literatura alguns trabalhos foram feitos para avaliar a viabilidade polínica do gênero *Euterpe*, entretanto, para *E. precatoria* ainda é insuficiente para um melhor entendimento da viabilidade de seu pólen. Algumas pesquisas já demonstraram a presença de alta viabilidade dos grãos de pólen em indivíduos de açazeiro (OLIVEIRA et al., 2010), contudo, acredita-se que ocorram variabilidade nos caracteres relacionados a viabilidade polínica, variando genótipos e condições ambientais, devendo este aspecto ser melhor abordado. Além disso, informações sobre o período ideal de coleta de pólen e tempo de armazenamento, aliado aos conhecimentos sobre eventos fenológicos relacionados a

floração e frutificação em *E. precatoria*, oferecerão maiores subsídios para futuros trabalhos de hibridação na espécie.

O sucesso no estabelecimento de plantios de uma espécie deve-se ao fato de suas sementes germinarem de forma rápida e uniforme, dentre os principais fatores requeridos para a germinação das sementes, água, luz e temperatura são vitais (BORGES, 2003). Apesar da elevada importância econômica, do ponto de vista científico, ainda existem muitas lacunas sobre o conhecimento das espécies *E. oleracea* e *E. precatoria*, principalmente sobre os seus híbridos interespecíficos. Uma dessas lacunas, são as limitadas informações sobre a germinação, emergência e o desenvolvimento das plantas.

A caracterização das espécies vegetais tem como objetivo conhecer a variabilidade existente no germoplasma disponível e pode ser feita por caracteres agronômicos, botânicos ou genéticos. O conteúdo de DNA é uma das informações genéticas utilizadas para caracterização de espécie ou de indivíduo, sendo atualmente a citometria de fluxo uma forma de obtenção dessa informação (OLIVEIRA, 2011). São diversas as utilizações da citometria de fluxo no melhoramento genético, como na análise do nível de ploidia e na identificação de híbridos interespecíficos (DOLEZEL, 1997), por exemplo entre as espécies *E. precatoria* e *E. oleracea*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o período dos principais eventos fenológicos e protocolos de manuseio de pólen, armazenamento e viabilidade do pólen da espécie *E. precatoria*, e estimar o conteúdo de DNA e a emergência em sementes das espécies *E. precatoria* e *E. oleracea* e dos híbridos interespecíficos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o período dos principais eventos fenológicos relacionados à floração e frutificação de *E. precatoria*;
- Definir protocolo de análise da viabilidade do pólen de *E. precatoria* por método colorimétrico e in vitro antes e após um período de armazenamento;
- Determinar procedimento para viabilizar a emergência de plântulas em *E. precatoria* e *E. oleracea* e seus híbridos interespecíficos de maneira mais adequada;
- Quantificar o conteúdo de DNA nuclear em *E. precatoria* e *E. oleracea* e seus híbridos interespecíficos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Família Arecaceae

Arecaceae Schultz Sch é a única família representante da Ordem Arecales, possui vestígios que remontam mais de 120 milhões de anos, sendo considerada um dos grupos de vegetais mais antigos (LORENZI et al, 2004). Cinco subfamílias compõem a família Arecaceae: Calamoideae, Nypoideae, Coryphoidae, Ceroxyloideae, Arecoideae, as quais são compostas por tribos e subtribos (DRANSFIELD et al., 2008). Existem cerca de 2.600 espécies, reunidas em mais de 240 gêneros das palmeiras (LORENZI et al., 2004), ocupando quase todos os habitats (HENDERSON et al., 1995). O Brasil apresenta grande diversidade de palmeiras, sendo registradas mais de 200 espécies e 39 gêneros (HENDERSON; SCARIOT, 1993).

A família Arecaceae constitui-se, dentre todos os grupos vegetais, na terceira família mais utilizada do mundo, ficando atrás apenas das gramíneas e leguminosas, sendo inúmeras espécies de palmeiras com grande importância na economia, e alto potencial socioeconômico para as diversas regiões no mundo (IUCN, 1996), especialmente no Brasil. As palmeiras são muito importantes em vários aspectos, geram produtos utilizados como alimentos para o homem e para a fauna, produtos para construção de abrigos, cera, óleo, produtos para artesanato, fibras para a indústria e substrato para uso na agricultura.

Segundo Lorenzi et al. (2004), essa família apresenta espécies em sua maioria lenhosas, diferenciando-se da maior parte das Monocotiledônea, que é principalmente composta por espécies herbáceas. Apresentam morfologia bastante variada, com sistema radicular geralmente subterrâneo e ocasionalmente aéreo. Algumas espécies apresentam único estipe, simples, solitário, ou vários (múltiplos), formando uma touceira. O caule poderá ser subterrâneo, tornando-as aparentemente acaules. As folhas apresentam extensa variedade de formas, tamanhos e divisões; as inflorescências podem ser infra foliares, interfoliares e suprafoliares, do tipo espiga, racemo ou panícula; as flores são pouco atraentes por serem muito pequenas, geralmente desprovidas de colorido vistoso; e os frutos são muito variáveis no tipo, cor, tamanho e forma e são geralmente preenchidos por uma única semente dura e densa. As flores possuem termogênese (produção de calor) o que volatiliza os compostos odoríferos das flores atraindo seus polinizadores (RIBEIRO et al., 1999).

Os frutos variam muito conforme a espécie, com relação a inúmeras características, desde cor, tamanho, forma, textura, etc. São formados basicamente por três camadas:

epicarpo, mesocarpo e endocarpo, o endocarpo é duro e lenhoso e fortemente aderido às sementes (HENDERSON, 2002).

3.2 *Euterpe precatoria* e *Euterpe oleracea*

3.2.1 Características gerais

Euterpe precatoria Mart. conhecida vulgarmente como açazeiro, açai-do-Amazonas, açai-solteiro, açai-da-mata, pertence à família Arecaceae, é uma palmeira típica da região amazônica, sendo uma das espécies mais difundidas e comuns da família e do gênero, nos Neotrópicos (HENDERSON, 1995). Calzavara (1972) e Castro (1992) consideram as espécies *E. precatoria*, *E. oleracea* e *E. edulis* como as mais importantes do gênero. A espécie tem distribuição desde a América Central (Belize, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica e Panamá) até o norte da América do Sul (Colômbia, Venezuela, Trinidad, Guianas, Equador, Peru, Brasil e Bolívia). As maiores áreas ocupadas com essas espécies, encontram-se na Amazônia brasileira (OLIVEIRA et al., 2000). Ocorrem em vários habitats, em terrenos alagados e também em terras não alagadas.

E. precatoria Mart. é uma palmeira monocaule (Figura 1), que frutifica na época de outubro a março, com 10 a 20 m de altura e o caule liso medindo de 10 a 23 cm de diâmetro. Possui folhas do tipo pinadas variando de 10 a 20 cm, bainha fechada lisa de coloração verde com até 1,5 m de comprimento; pecíolo até 51 cm de comprimento; e agrupadas regularmente. Inflorescência infrafoliar na antese, frutos globulosos lisos, medindo 1,1 cm x 1,1 cm de diâmetro, de coloração negro-violácea na maturidade (MIRANDA et al., 2001). As flores e frutos podem ser encontrados durante todo o ano, mas sempre há o período da safra (junho a outubro) (FERREIRA, 2005).



Figura 1. Planta de *E. precatoria* Mart., caule e frutos (BUSSMANN; ZAMBRANA, 2012).

Euterpe oleracea Mart. conhecida vulgarmente com açai-do-pará, açai-de-touceira e açazeiro, é uma palmeira tipicamente tropical e de distribuição em quase toda a América Latina, ocorrendo no norte da América do Sul, Panamá, Equador, Trinidad, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e Colômbia (HENDERSON; GALEANO, 1996). No Brasil, ocorre nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e no Amapá, em matas de terra firme, várzeas e igapós da região amazônica (LORENZI et al., 1996). Ocorre em áreas que apresentam pluviosidade superior a 2.300 mm anuais e elevada temperatura (MIRANDA et al., 2001).

E. oleracea apresenta touceiras de até 25 caules, raramente aparecendo solitário (Figura 2). Seu estipe é liso, delgado, podendo ser curvado, alcançando até 30 m de altura e de 7 a 18 cm de diâmetro. Sustenta no ápice um capitel de 12 a 14 folhas compostas, pinadas, bainha incluindo uma pequena lígula marrom escura, roxa, verde, vermelho-esverdeada escura ou verde-amarelada (CAVALCANTE, 2010). O estipe é envolvido por uma bainha, onde é inserida a folha, constituída de pecíolo com 20 a 40 cm de comprimento e limbo distintos. As folhas têm comprimento de 3,5 m em plantas adultas (NOGUEIRA, 1997). O fruto é uma drupa globosa, com diâmetro variando entre 1 cm e 2 cm e peso médio de 1,5g, de coloração negro violáceo ou verde, o mesocarpo polposo apresenta cerca de 1 mm de espessura envolvendo um endocarpo volumoso (OLIVEIRA et al., 2007).



Figura 2. *E. oleracea* Mart., caule e frutos (BUSSMANN; ZAMBRANA, 2012).

3.2.2 Importância econômica

Dentre as palmeiras presentes na região Amazônica, *E. oleracea* e *E. precatoria* possuem uma grande importância socioeconômicas por apresentam multiplicidade de usos e altos níveis de exploração, principalmente em virtude da importância econômica em função da extração do suco dos frutos e do palmito.

O açazeiro pode fornecer madeira para construções rurais, palha para coberturas, remédios, matéria-prima para artesanatos e corantes. Contudo, é como fonte de alimentos a sua primordial importância (CANTO, 2001). Oferece o palmito e o fruto, de onde é extraído o suco do açaí. O mesocarpo comestível é a parte mais utilizada do fruto, onde é extraído a polpa, a partir de frutos frescos, também conhecido na Amazônia como vinho de açaí, por apresentar a coloração semelhante ao do vinho, um dos mais populares e tradicionais recursos nutricionais das populações tradicionais amplamente consumido na Amazônia brasileira em todos os níveis socioeconômicos da população (CASTRO, 1992). O fruto do açazeiro vem sendo utilizado por grandes empresas nacionais e internacionais para produção de produtos como: o açaí congelado, sucos e polpas de açaí, energético de açaí; hidratantes e shampoos para o cabelo, hidratantes para a pele; suplementos e vitaminas; pó de açaí, dentre outros (SEBRAE, 2015).

A comercialização da polpa do fruto do açaí está se destacando como uma das principais potencialidades para o uso de produtos florestais não-madeireiros, apresentando demanda crescente tanto no mercado nacional como internacional (BAYMA et al., 2008)

No Brasil foram produzidos em 2017, 289.885 toneladas de frutos de açaí, esse inclui *E. oleracea* e *E. precatoria*, ambos são comercializados como açaí (IBGE, 2019). O principal produtor de açaí no Brasil é o estado do Pará, onde foram extraídas 141.913 toneladas em 2017, em seguida, Amazonas (50.503 toneladas), Maranhão (18.330 toneladas), Acre (4.665 toneladas), Amapá (2.770 toneladas) e Rondônia (1.500 toneladas).

3.2.3 Florescimento

O período de florescimento e frutificação das palmeiras não é bem conhecido. Eventos como a época de florescimento e o período entre a polinização e a maturidade do fruto podem estar relacionados com fatores climáticos ou ambientais como temperatura, água, nutrientes e luz (VAN SCHAİK et al., 1993). Essas informações são fundamentais para compreender tanto o seu processo, quanto o seu sucesso reprodutivo (FISCH et al., 2000). Existem na literatura estudos fenológicos para algumas espécies de palmeiras, entretanto são poucas as informações para *E. precatoria* (JESUS; OLIVEIRA, 2014).

A fenologia da *E. precatoria* em Belém (PA), observaram que os eventos de floração ocorreram o ano inteiro, porém a emissão de bráctea foi mais frequente no segundo semestre (JESUS; OLIVEIRA, 2014). Aduração do ciclo reprodutivo de *E. precatoria* é de 12 meses (um ano), que se manifesta a partir da formação da espata, sua abertura e exposição de botões florais, antese floral masculina, abertura e fertilização de flores femininas, coagulação, desenvolvimento, maturação e queda dos frutos até não mais observar a presença do cacho seco na planta (GARCÍA, 2011). As inflorescências nascem axilares e são infrafoliares na antese. Cada indivíduo pode produzir de uma a quatro inflorescências em sucessão durante um período de floração e depois da senescência da folha mais velha sendo protegidas por estruturas denominadas ferófilos (KÜCHMEISTER et al., 1997). A Figura 3 mostra uma inflorescência de *E. precatória*.



Figura 3. Inflorescência de *E. precatória* (OLIVEIRA et al., 2019).

Em *E. oleraceae* a floração ocorre em todos os meses do ano, com um pico de fevereiro a maio correspondendo ao período da estação mais chuvosa, tendo o menor pico de julho a setembro, correspondendo ao período da estação menos seca, a frutificação ocorre em todos os meses do ano, com um pico de junho a outubro e de fevereiro a abril (JARDIM; KAGEYAMA, 1994). A inflorescência dessa espécie é infrafoliar, sendo envolvida por duas brácteas conhecidas por espatas que, ao abrirem, expõem o cacho (OLIVEIRA et al., 2002). O número de cachos por indivíduo varia até 8, sendo mais comum de 3-4, porém, em ambos os casos, sempre em diferentes estágios de desenvolvimento, desde a inflorescência encerrada na espata até os cachos com frutos maduros (CAVALCANTE, 2010).

3.3 Viabilidade polínica

A viabilidade polínica é um dos fatores responsáveis pela seleção de genótipos para programas de melhoramento, pois, estão diretamente relacionadas ao potencial reprodutivo dos gametas e os grãos de pólen viáveis influenciam diretamente o sucesso da fertilização (CABRAL et al., 2013). A utilização de espécies que possuem pólen com alta viabilidade, é importante para o sucesso do melhoramento genético, uma vez que permite obter maior sucesso nos cruzamentos realizados e na condução da polinização controlada (CYSNE, 2015). A viabilidade de pólen também pode ser útil em estudos taxonômicos, ecológicos, genéticos e palinológicos (FRESCURA et al., 2012).

O planejamento de programas de melhoramento para hibridações artificiais requer o conhecimento da viabilidade dos grãos de pólen durante o armazenamento (FERREIRA et

al., 2007). No entanto, podem comprometer a viabilidade do pólen e dificultar a produção de híbridos o uso de técnicas inadequadas de coleta, transporte, extração e armazenamento de pólen (MENCK et al., 1990).

A viabilidade do pólen pode ser avaliada por um grande número de metodologias e podem ser separadas em métodos diretos ou indiretos (DAFNI, 1992). Dentre os métodos diretos pode-se mencionar a germinação do grão de pólen através do teste de germinação in vitro. Neste teste rápido e barato, o pólen é induzido a germinar em meio de cultura apropriado, tendo o crescimento do tubo polínico como indicador. O meio de cultura deve simular as condições do estigma para induzir a germinação do tubo polínico, sendo a determinação do meio de cultura ideal para cada espécie um processo crucial para o sucesso da utilização deste método (FERREIRA et al., 2007; PIO et al., 2007). Dentre os métodos indiretos, técnicas que utilizam coloração são empregadas para estimar a quantidade de grãos de pólen viáveis, teoricamente estão aptos a germinar (MENCK et al., 1990).

Vários estudos realizados para avaliar a viabilidade polínica do gênero *Euterpe* são encontrados na literatura, entretanto, para a espécie *E. precatória* ainda existem lacunas que precisam ser estudadas, por exemplo, protocolos para germinação do pólen in vitro e métodos colorimétricos eficientes na análise indireta da viabilidade do pólen. Em outras palmeiras, este estudo tem recebido atenção especial, devido a importância da hibridação controlada para o melhoramento genético, sendo realizado em grãos de pólen frescos e conservados sob baixas temperaturas (OLIVEIRA, 2001).

3.4 Germinação de sementes

A germinação é um fenômeno biológico, considerado pelos botânicos como a retomada da atividade metabólica do embrião, conseqüentemente o rompimento do tegumento e emergência da radícula (LABOURIAU, 1983). A germinação pode ser influenciada por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, podendo estes atuar por si ou em interação; os intrínsecos são os hormônios e substâncias inibidoras não hormonais, enquanto os extrínsecos que mais influenciam são umidade, temperatura, luz e oxigênio (BORGES; RENA, 1993).

A propagação das palmeiras se dá principalmente por sementes que, em sua maioria apresenta germinação lenta, desuniforme, frequentemente baixa e influenciada por vários fatores relacionados ao ambiente, ou à própria planta, tais como estágio de maturação, presença ou não de pericarpo, tempo entre colheita e semeadura, dormência física,

temperatura do ambiente e substrato, entre outros (BROSCHAT, 1994; PIVETTA et al., 2007). O fator mais importante na germinação de sementes de palmeiras é a hidratação, combinada com alta temperatura constante (MARCUS; BANKS, 1999). Ainda que sob condições favoráveis, é frequente que muitas palmeiras demonstrem dificuldades para germinar, podendo este fato estar relacionado a obstáculos mecânicos como espessura da testa e endocarpo (TOMLINSON, 1990). Muitas espécies de palmeiras apresentam dormência das sementes, que pode ser superada através da escarificação, exposição à luz (às vezes a um específico comprimento de onda) ou à radiação, estratificação fria ou quente, tratamento com várias substâncias químicas, ou simplesmente lavagem com água (ODETOLA, 1987).

A germinação de sementes de *E. precatória* e *E. oleracea* em condições naturais apresentam germinação bastante lenta e desuniforme. Essa germinação lenta e desuniforme é um problema prático para o estabelecimento de plantios comerciais dessas palmeiras, sendo esses uns dos principais motivos para se buscar abreviar e uniformizar a germinação dessas palmeiras. (BOVI et al., 1975).

3.5 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo pode ser usada nas plantas para estudos sobre nível de ploidia, estimativa do tamanho do genoma de diferentes espécies, detecção de híbridos interespecíficos, detecção de plantas haploides, detecção de aneuploidias, entre outros (DOLEZEL, 1997). De acordo com esse mesmo autor, a citometria de fluxo é um excelente método para analisar as propriedades ópticas (tais como fluorescência e dispersão da luz) de partículas que fluem em suspensão, que podem ser células, núcleos, cromossomos, organelas, dentre outras, e é nesta suspensão de partículas que se pode realizar as análises.

A medição da quantidade de DNA em plantas é baseada no uso de fluorocromos específicos do DNA e na análise da intensidade relativa de fluorescência emitida pelos núcleos corados. Para determinar o conteúdo de DNA nuclear em unidades absolutas, a intensidade de fluorescência dos núcleos é comparada com a intensidade de fluorescência de núcleos isolados de uma espécie com tamanho conhecido de genoma nuclear (DOLEZEL; DOLEZELOVA; NOVAK, 1994). Dependendo do aparelho, as leituras podem sofrer algumas variações que, geralmente, são expressas através do coeficiente de variação (CV%), que, em plantas, pode variar de 1% a 10%, podem ser tomados como aceitáveis coeficientes de variação de até 5 % devido ao alto grau de resolução da citometria de fluxo.

(GALBRAITH et al., 2002; DOLEZEL, 1991). Em geral são necessários 10000 núcleos, que podem ser obtidos com cerca de 50 mg de tecidos (BENNET; LEITCH, 1995).

É possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar de plantas, em um método relativamente simples que compreende a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). A quantidade de DNA é expressa em picogramas (pg), 10-12 g, sendo que 1 pg corresponde a 978 Mpb (DOLEZEL et al., 2003).

A hibridação interespecífica é frequentemente aplicada para transferir caracteres desejados de uma espécie para outra. Se as espécies parentais diferirem o suficiente em suas quantidades de DNA nuclear, a citometria de fluxo pode detectar híbridos interespecíficos de acordo com seus valores intermediários de DNA (DOLEŽEL, 1997). Essa é uma das aplicações mais comuns da citometria de fluxo em programas de melhoramento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fenologia reprodutiva em *E. precatória*

O estudo foi realizado em indivíduos de *E. precatória* Mart. em uma plantação comercial localizado no km 74 da rodovia AM-070 (Latitude 03° 15' 02,18805" S e Longitude 60° 36' 48,82136" W), no município de Manacapuru (Figura 4).

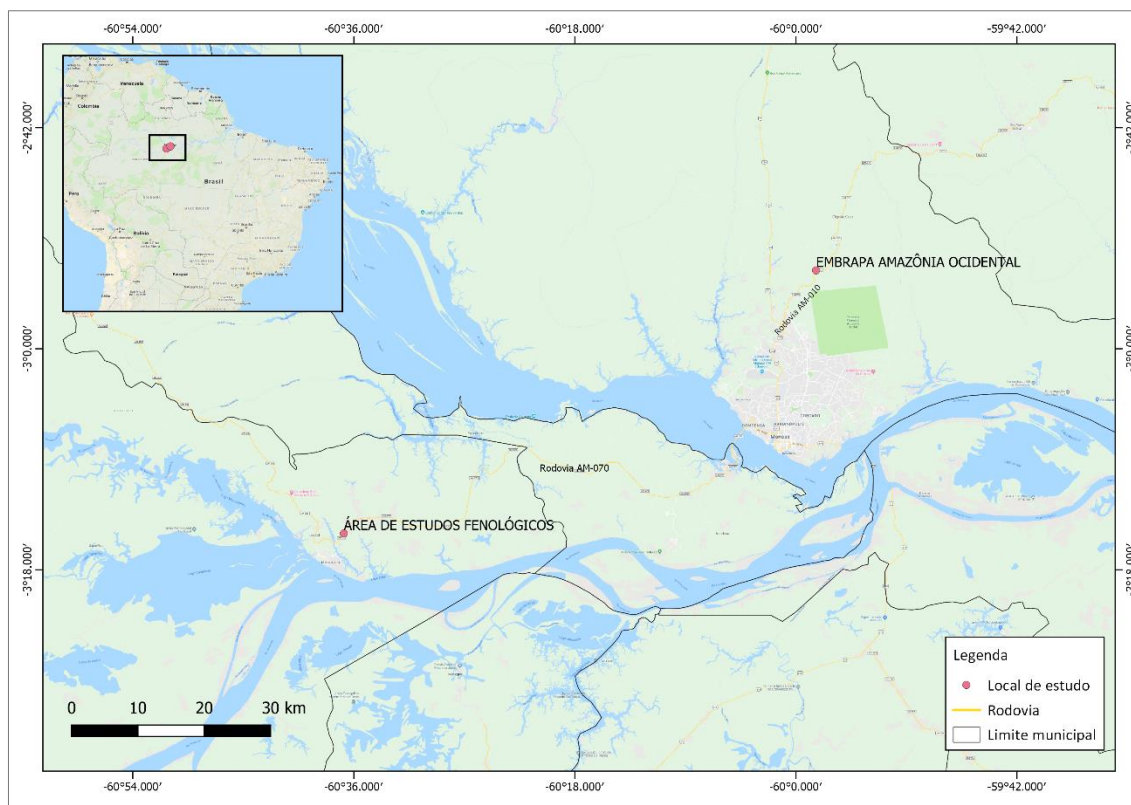


Figura 4. Local de estudo e obtenção de material vegetal.

Foram acompanhados 20 indivíduos de *Euterpe precatória* para os registros fenológicos escolhidos aleatoriamente no plantio (Figura 5). Os indivíduos foram georreferenciados com auxílio de GPS.



Figura 5. Área do estudo fenológico, km 74 da rodovia AM-070.

As avaliações fenológicas foram feitas a cada 15 dias, num período de 12 meses. As duas principais fenofases acompanhadas foram: I- floração – que abrangeu desde a visualização das espatas fechadas, abertura das espatas e exposição das inflorescências (pré-antese, antese e pós-antese) até a queda das flores; e II- frutificação – que é subdividida em cachos verdes, cachos maduros. Em cada avaliação foram realizadas observações cuidadosas da copa das plantas, com o auxílio de binóculos Tasco® 10x30 (Figura 6).



Figura 6. (A) Visualizações das fases fenológicas; (B) Indivíduo com inflorescência em antese e espata fechada; (C) Indivíduo com cacho maduro e inflorescência seca.

O clima de Manacapuru, AM é do tipo Afi, de acordo com a classificação de Köppen, com precipitação pluvial superior a 2.000 mm, as quais são distribuídas uniformemente nos meses do ano. Essa região, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia- INMET, apresentou temperatura média de 25,04° C a 32,66° C, precipitação de 2.767,5 mm e umidade relativa do ar de 78,44% durante os 12 meses de acompanhamento fenológico.

Os dados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva no programa R (R Development Core Team Citação??), como a média, os valores mínimo e máximo e o coeficiente de variação (CV).

4.2 Estudo da viabilidade polínica

Os testes de viabilidade polínica foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. O pólen foi coletado em inflorescências de indivíduos de *E.precatoria* localizados na área da sede da Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, Amazonas (Figura 7).

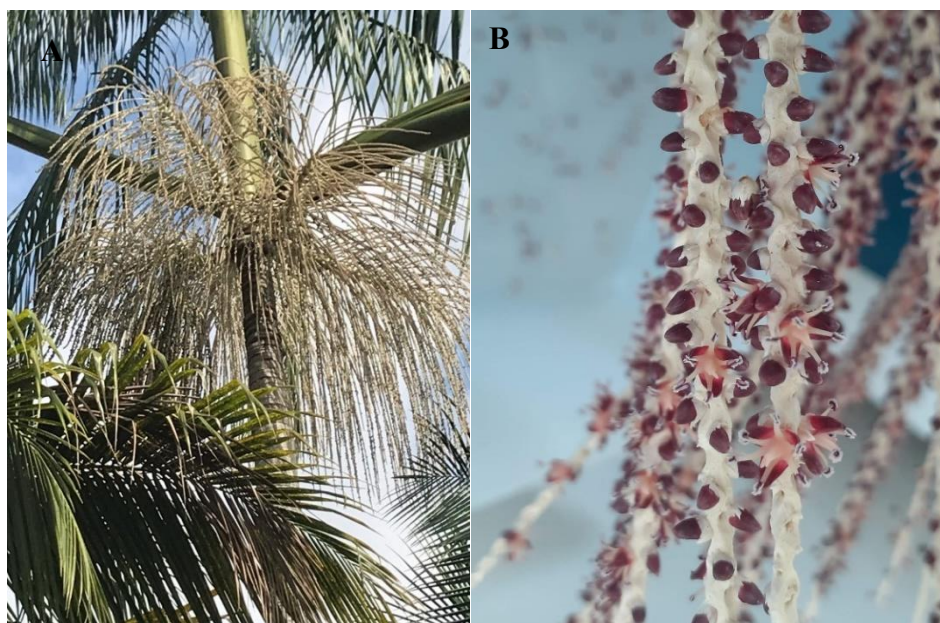


Figura 7. (A) Indivíduo de *E. precatoria* com inflorescência em antese; (B) Ráquila com flores estaminadas abertas.

4.2.1 Germinação in vitro do pólen de *E. precatoria*

Na análise da germinação do pólen in vitro foi utilizado meio ágar (10 g L⁻¹) com adição de diferentes concentrações de sacarose, boro e cálcio (Tabela 1). Os tratamentos foram definidos a partir de resultados obtidos em estudos realizados com pólen de várias

espécies (BREWBAKER; KWACK, 1963; SOUSA, et al., 2010; MOURA, 2015; MENDEZ; ACMA, 2018). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 (concentrações de sacarose) x 2 (concentrações de H_3BO_3) x 2 (concentrações de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$).

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados para a avaliação da germinação *in vitro* de grãos de pólen de *E. precatória*.

Meio	Sacarose (g L ⁻¹)	H ₃ BO ₃ (mg L ⁻¹)	Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O (mg L ⁻¹)
M1	50	-	-
M2	50	100	-
M3	50	-	300
M4	50	100	300
M5	100	-	-
M6	100	100	-
M7	100	-	300
M8	100	100	300

O meio de cultura foi preparado com o auxílio de um Becker para cada tratamento onde foram acrescentados todos os elementos componentes dos meios e o volume total completado com água destilada. A solução foi então aquecida em forno microondas até a dissolução completa dos componentes. Em cada tratamento foi utilizado 60 mL de meio, que foi dividido 20 mL em cada placa de Petri, sendo três placas de Petri por tratamento. Uma quantidade de 0,010 g mL⁻¹ de pólen de *E. precatória* foi colocado em 60 µL água destilada, e desta suspensão foi pipetada sobre a superfície do meio de cultura, em cada placa de Petri e distribuída com o auxílio de uma alça de Drigalsky (Figura 8 A). As placas contendo os meios de cultura foram colocadas em estufa tipo BOD a temperatura constante de 37° C ± 3° C num período de 4 h (Figura 8 B).

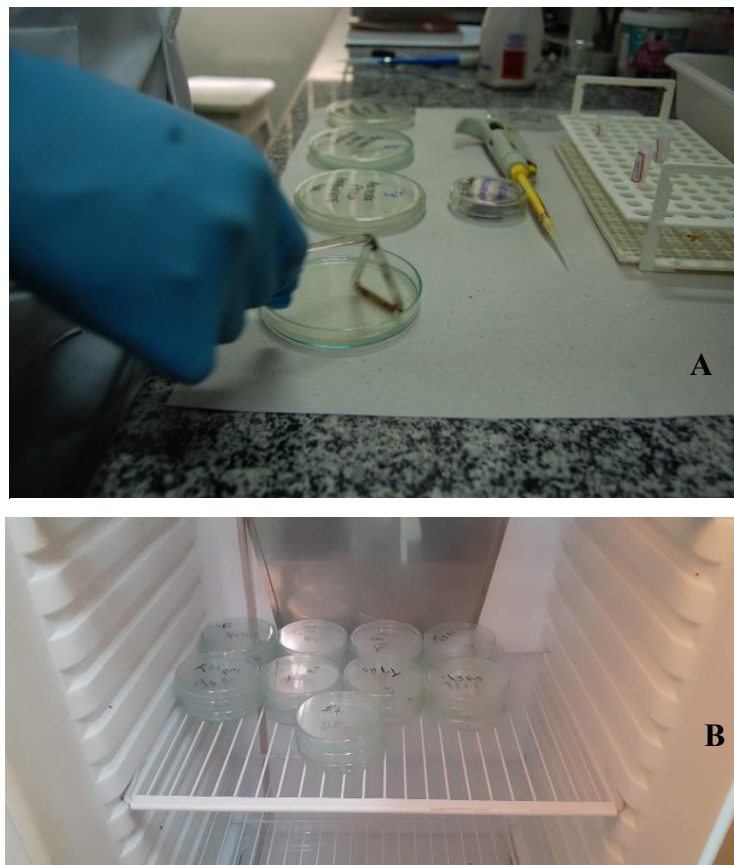


Figura 8. (A) Dispersão dos grão de pólen com o auxílio de uma alça de Drigalsky para germinação em meio de cultura. (B) Meios de culturas prontos com pólen na BOD.

Após quatro horas de incubação, foi realizada a contagem de grãos de pólen germinados, com auxílio de microscópio óptico com objetiva de aumento de 10 vezes. Foram avaliadas três placas de Petri por tratamento, cada placa correspondendo a uma repetição. Foram contados 200 grãos de pólen por lâmina. A percentagem de pólen viável foi obtida calculando o número total de grãos viáveis dividido pelo número de grãos contados e multiplicado por 100. Foram considerados germinados os grãos que apresentaram tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen.

Os dados foram submetidos à análise de variância. Quando observada diferenças significativas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. Todas as análises foram realizadas com base nos procedimentos do programa estatísticos Rbio (BHERING, 2017).

4.2.2 Viabilidade polínica de *E. precatória* a partir de métodos colorimétricos

As inflorescências de *E. precatória* em fase de liberação de pólen foram selecionadas, levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Amazônia

Ocidental para coleta das anteras. Essas foram colocadas em lâmina para serem maceradas com o auxílio de lamínula para liberação dos grãos de pólen. Em cada lâmina foram utilizadas quatro anteras. Após este processo, foi retirado os resíduos macerados das anteras. Em cada lâmina foi adicionada uma gota de solução de corante sobre as anteras. Foram utilizados três diferentes métodos colorimétricos em nove lâminas: as soluções Tetrazólio (0,1%) (LAKON, 1949), Cotton Blue (0,05 %) (NICOLSON, 1959) e Azul de Tripan (0,2 %) (HAYMAN, 1970) (Figura 9). As lâminas foram então identificadas cada uma de acordo com o tratamento utilizado, sendo três repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram conduzidos diferentemente. As lâminas preparadas com a solução de Tetrazólio (0,1%) foram cobertas com papel alumínio e colocadas dentro de uma incubadora biológica (B.O.D.) por 2 horas, em temperatura de 37 ± 3 °C. As amostras preparadas com o corante Cotton Blue (0,05 %) tiveram as lâminas colocada em placa de Petri com papel filtro umedecidos e permaneceram na B.O.D também a 37 ± 3 °C por 30 minutos. Já as do corante Azul de Tripan (0,2 %) permaneceram em temperatura ambiente por 5 minutos.

A viabilidade foi determinada pelo padrão de coloração dos grãos de pólen, para os corantes Tetrazólio (0,1%) e Cotton Blue (0,05 %) (Figura (9A e 9B)). Foram considerados viáveis aqueles que coraram fortemente, e os inviáveis os que coraram com menor intensidade ou não coraram. Para o método com Azul de Tripan (0,2 %) (Figura 9C), foram considerados viáveis aqueles que coraram com menor intensidade ou não coraram, e os inviáveis os que corarem fortemente. A análise dos grãos de pólen viáveis foi feita em microscópio e a leitura da lâmina foi determinada na área com melhor dispersão dos grãos em relação ao campo de visão. A percentagem de pólen viável foi obtida calculando o número de grãos viáveis dividido pelo número de grãos contados e multiplicado por 100, sendo contados 200 grãos/lâmina.

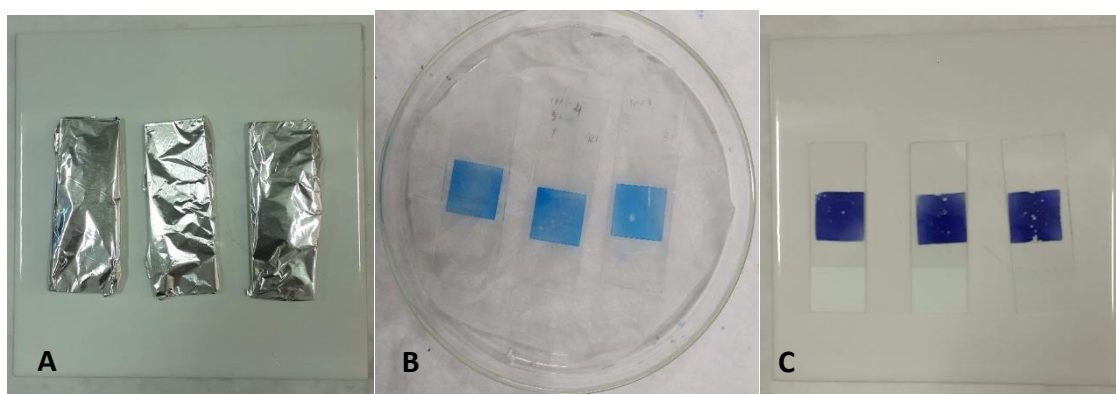


Figura 9. Lâminas preparadas com corantes: (A) Tetrazólio (0,1%); (B) Azul de Tripan (0,2 %) e (C) Cotton Blue (0,05 %).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três tratamentos e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando houve diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa para análises estatísticas Rbio (BHERING, 2017).

4.2.3 Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento na viabilidade do pólen de *E. precatoria*

As inflorescências em antese de flores masculinas foram coletas no início da manhã, colocadas em sacos de polietileno e transportados imediatamente ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Amazônia Ocidental. As ráquulas foram retiradas das inflorescências e colocadas em bandejas de alumínio, em seguida levadas para estufa para retirada da umidade durante 24 horas a 37° C. Após esse procedimento foram retiradas todas as flores e botões florais das ráquulas e colocados em sacos de papel, feito uma leve compressão utilizando um rolo de madeira para liberação dos grãos de pólen dos botões que por ventura ainda estavam fechados e o conteúdo total da embalagem foi colocado sob peneiradas para extração do pólen. Os grãos de pólen foram armazenados em tubos eppendorf e mantidos em três diferentes temperaturas: 5° C (geladeira), -20° C (freezer) e -80° C (ultra freezer) e amostras avaliadas para viabilidade após cinco períodos de armazenamento: 0 dias, 30 dias, 60 dias, 90 dias e 180 dias. Após serem retiradas da condição de armazenamento, as amostras foram colocadas para hidratar por duas horas, em placa de Petri com papel filtro umedecido e, em seguida foram submetidas aos testes de viabilidade pelos métodos colorimétricos com uso dos corantes Cotton Blue (0,05 %), Tetrazólio (0,1%) e Azul de Tripán (0,2 %), conforme descrito no item 4.2.2.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 3x3x5, 3 métodos colorimétricos, 3 temperaturas de armazenamento e 5 períodos de armazenamento, com 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância. Quando observada diferenças significativas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. Todas as análises foram realizadas no programa estatísticos Rbio (BHERING, 2017).

4.3 Emergência de plântulas em sementes de Açaizeiros (*E. precatoria*, *E. Oleracea* e “híbrido entre *E. precatoria* x *E. oleracea*)

O estudo foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Amazônia Ocidental em Manaus, com condições ambientais controladas. As sementes *E. precatoria* foram obtidas de frutos coletados de plantas de na área da sede da Embrapa Amazônia Ocidental e as de *E. oleracea* no Campo Experimental do Rio Urubu (CERU) da Embrapa Amazônia Ocidental. As semente consideradas como híbridas foram coletadas de um cacho proveniente de uma planta de *E. precatoria* conduzida no meio de um plantio de *E. oleracea*. A espécie *E. precatoria* é alógama e não existe sobreposição das fases masculinas e femininas (RAMOS et al., 2019), essas informações levaram a hipótese das sementes produzidas serem híbridas *E. precatoria* x *E. oleracea*.

Os frutos foram despulpados manualmente, sob água corrente, por atrito em peneira de aço. Após este processo, as sementes foram selecionadas descartando aquelas danificadas ou anormais para o padrão das sementes do cacho, por exemplo, muito pequenas.

Para superação da dormência as sementes foram imersas em água morna, com diferentes associações de temperatura e tempo de imersão. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 3 (sementes de *E. Oleracea*, *E. precatoria* e híbridos) x 3 (5 min, 10 min e 20 min de embebição na água quente) x 2 (temperaturas da água de 40°C e 50°C) e um tratamento controle adicional com sementes despulpadas sem tratamento térmico. Foram usados 3 repetições por tratamento, sendo uma bandeja com 36 células (sementes) considerada uma repetição.

A semeadura foi feita em bandejas de poliestireno contendo 36 células com substrato comercial, as quais foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado nas bancadas da casa de vegetação (Figura 10).



Figura 10. A semeadura em bandejas de poliestireno de sementes de *E. Oleracea*, *E. precatoria* e híbridos na casa de vegetação.

Foi avaliado a taxa de emergência (TE) e o índice de velocidade de emergência (IVE). Os dados foram calculados de acordo com adaptação realizada no método usado por Santos e Nascimento, (1999). O IVE foi determinado a partir da contagem diária do número de plântulas emergidas, sendo esse número dividido pelo número de dias transcorridos da data de semeadura. O total desses valores somados é considerado o índice de velocidade de emergência. Foram usados os dados de emergência de plântulas aos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 dias.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatísticos Rbio (BHERING, 2017).

4.4 Quantidade de DNA genômico de *E. precatoria*, *E. oleracea* e do híbrido interespecífico *E. precatoria* x *E. oleracea*

A determinação do conteúdo de DNA foi realizada por Citometria de Fluxo no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. Como fonte de amostras foram utilizadas folhas jovens, coletadas de mudas ou de plantas adultas. Vinte e cinco genótipos foram analisados, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Genótipos de açaizeiros das espécies *E. oleracea*, *E. precatoria* e possíveis híbridos *E. precatoria* x *E. oleracea* analisados para quantificação do DNA nuclear por citometria de fluxo.

Identificação da amostra	Genótipo	Origem
P1EPC	<i>E. precatoria</i>	Planta da espécie <i>E. precatoria</i> localizada isoladamente em meio de plantio da espécie <i>E. oleracea</i> mantido no Campo Experimental do Rio Urubu (CERU) / Embrapa Amazônia Ocidental, no município de Rio Preto da Eva, AM.
P1EOC, P2EOC e P3EOC	<i>E. oleracea</i>	Três plantas da espécie <i>E. oleracea</i> vizinhas da planta P1EPC no plantio mantido no CERU.
H4POC, H6POC, H32POC. H60POC,	<i>E. precatoria</i> x <i>E. oleracea</i>	Dez plantas obtidas de sementes de um cacho coletado na planta P1EPC. Estudos realizados com a

H64POC, H83POC, H93POC, H104POC, H115POC, H118POC		espécie <i>E. precatoria</i> definiram a espécie como alógama (Ramos et al., 2019), bem como, em teste com isolamento da inflorescência, não ocorreu formação de frutos, essas informações levaram a hipótese das sementes produzidas serem híbridas <i>E. precatoria</i> x <i>E. oleracea</i> .
H1POM, H2POM, H4POM, H6POM, H7POM, H8POM, H9POM, H10POM	<i>E. precatoria</i> x <i>E. oleracea</i>	Oito plantas identificadas como possíveis híbridos em um plantio da espécie <i>E. precatoria</i> no município de Manacapuru, AM (Figura 11). De acordo com o responsável pelo plantio, todas as plantas foram geradas a partir de um cacho coletado em uma única planta matriz de <i>E. precatoria</i> , contudo, algumas plantas apresentam perfilhamento e morfologia das folhas diferente de <i>E. precatoria</i> , por isso, surgiu a hipótese de serem híbridos naturais de <i>E. precatoria</i> x <i>E. oleracea</i> .
P1EPM, P2EPM e P3EPM	<i>Euterpe precatoria</i>	Três plantas da espécie <i>E. precatoria</i> coletadas no mesmo plantio comercial das plantas HPOMx, as quais, pela informação do responsável pelo plantio, pressupõe-se serem meio-irmãos, visto que foram obtidas de sementes de um único cacho.



Figura 11. Plantas de *E. precatória* consideradas híbridas.

Para a determinação da quantidade de DNA utilizou-se aproximadamente 50 mg de folha. Com auxílio de um bisturi os fragmentos de tecido foliar foram triturados em placa de petri contendo 1 mL de tampão de extração de núcleos Marie. Em seguida, o material extraído foi filtrado em malha de 50 μm (DOLEŽEL, 1997). A suspensão foi corada com 25 μL de solução de iodeto de propídio. Para cada amostra pelo menos dez mil núcleos foram analisados quanto à emissão de fluorescência para quantificação do conteúdo de DNA. Os histogramas foram obtidos no citômetro FacsCalibur 4 cores (Becton Dickinson) e analisados no software Cell Quest. Para a quantificação do DNA foi utilizado como padrão de referência a folha de *Vicia faba* (26,90 pg de DNA). Os dados foram comparados pelo teste paramétricos Kruskal-Wallis utilizando o software Action (EQUIPE ESTATICAMP, 2014).

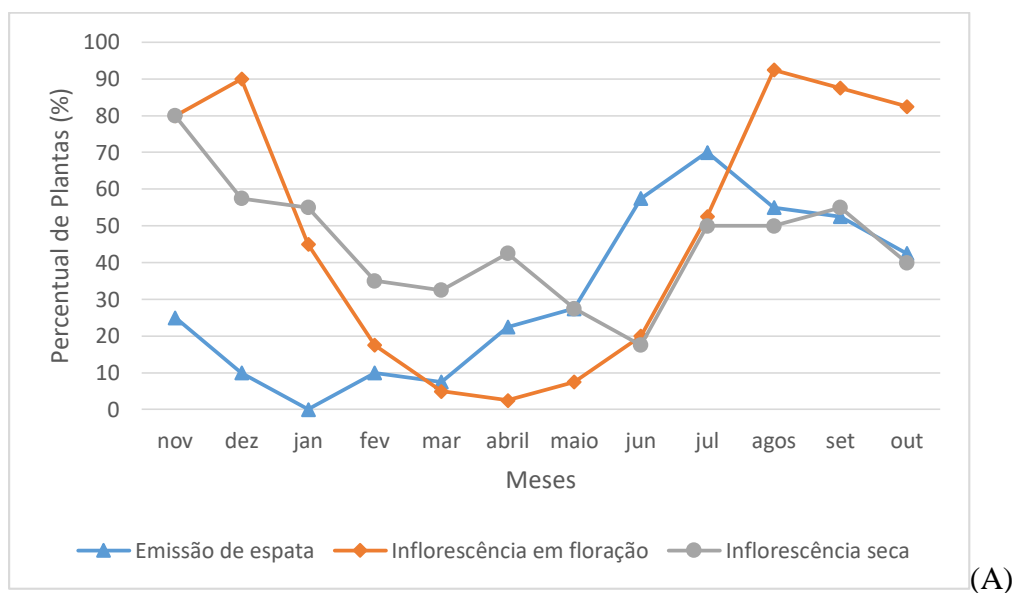
5 RESULTADOS E DISCURSÃO

5.1 Fenologia reprodutiva em *E. precatória*

A emissão de espata ocorreu em todo o período de avaliação, com exceção do mês de janeiro, tendo pico máximo de emissão de espata no mês de julho. A ocorrência de indivíduos com inflorescências em fase de floração (com botões florais visíveis ou flores em antese) foram verificadas em todos os meses do ano, mas com maior frequência no período

de agosto a dezembro. O período de floração coincidiu com o período de menos precipitação, com queda acentuada no período de janeiro até maio, quando o percentual de indivíduos com inflorescências em floração começa a aumentar. Observa-se que o período de agosto a dezembro como o ideal para realizar trabalhos de polinização cruzada, e obtenção de pólen, uma vez que é o período com maior disponibilidade de inflorescência. A ocorrência de inflorescências abortadas (secas) que não se desenvolveram e secaram presas à planta, também ocorreu em todo o período avaliado, tendo pico no mês de novembro (Figura 12 A). Tal fato pode ser explicado, em parte, devido a existência de inflorescências quase desprovidas de flores femininas.

No caso da frutificação foram registrados frutos imaturos em todos os meses, sendo mais intensa entre setembro e maio, quando mais de 70% das plantas apresentaram cachos com frutos imaturos. Os frutos maduros ocorrem em todo período avaliado, com exceção dos meses de dezembro e janeiro, sendo mais intenso de março a setembro (Figura 12 B).



(A)

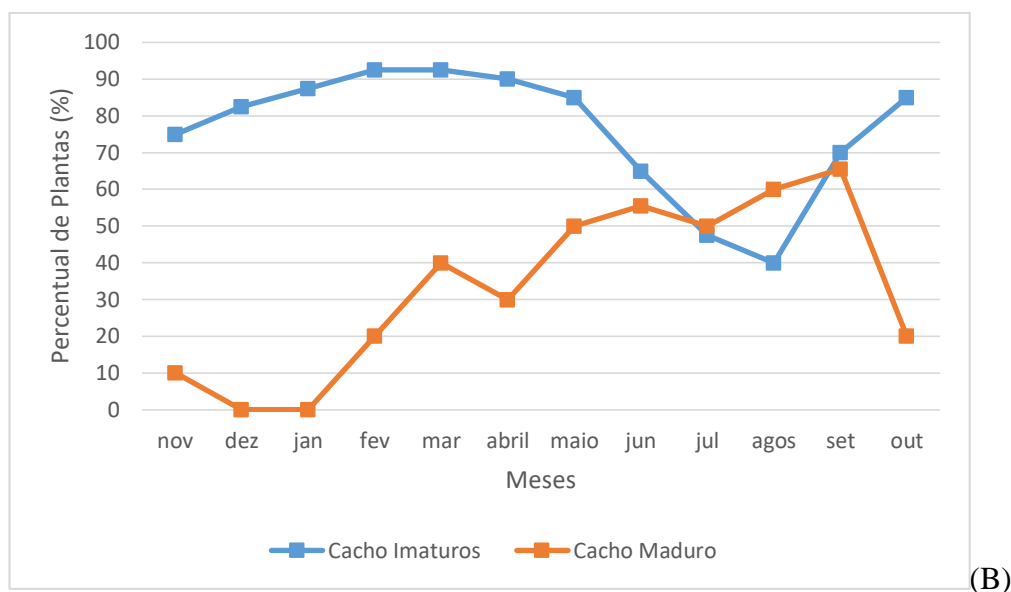


Figura 12. Fenologia reprodutiva de *Euterpe precatória* Mart.

Nota: A) Eventos de floração; B) Eventos de frutificação.

Gama (2000), acompanhou a fenologia de *E. precatória* em Manaus - AM, obteve resultado semelhantes, onde o pico de indivíduos com inflorescências ocorreu de agosto à dezembro no período de menor precipitação. Na área de estudo, no período de agosto a dezembro ocorreram os menores índices de precipitação (cerca de 150 mm) e maiores de temperatura (cerca de 26°C de mínima e 34°C de máxima) conforme INMTE (2020). Resultados obtidos para *E. oleracea*, diferem dos obtidos para *E. precatória*, onde os autores verificaram que os eventos de floração ocorrem o ano inteiro para *Astrocaryum vulgare* Mart. em Belém - PA, com exceção do mês de outubro, com a máxima floração ocorrendo nos meses de março a julho, coincidindo com o período mais chuvoso (OLIVEIRA et al., 2002). No caso da frutificação também registraram frutos maduros em quase todos os meses, exceto no período de junho a agosto, sendo mais intensa entre dezembro e março, quando mais de 50% das plantas apresentaram cachos com frutos maduros.

Os resultados de *E. precatória* do presente trabalho são sementes aos encontrado para os eventos de floração em *E. precatória* em Belém (PA) que ocorreram o ano inteiro, porém a emissão de espata foi mais frequente no segundo semestre (JESUS; OLIVEIRA, 2014). *E. precatória* frutifica de abril a setembro em áreas extrativistas no Acre (ROCHA, 2004). Resultados semelhantes em relação a floração e frutificação, contínuas durante todo o ano, também foram encontrado em *E. oleracea* (ROGEZ, 2000). No entanto, foram observadas diferenças nos picos de florescimento de frutificação, que ocorreram de fevereiro a julho e de agosto a dezembro, respectivamente, mas podem variar conforme a variedade e a

procedência. Foram observados dois picos de floração em *E. oleraceae* em Ubatuba, um de abril a junho e outro de outubro a dezembro, sugerindo que a produção de inflorescências em duas épocas distintas contribuiu para produção de frutos durante todo o ano na população (BOVI et al., 1986). Outra espécie pertencente ao gênero, a *Euterpe edulis* iniciou o pico da floração em agosto, que se estendeu até janeiro na Reserva Ecológica do Trabiju (Pindamonhangaba – SP), semelhante a este estudo (FISCH et al., 2000).

5.2 Estudo da Viabilidade Polínica

5.2.1 Germinação in vitro do pólen de *E. precatória*

Efeitos significativos foram observados para todos os tratamentos: sacarose, Boro e Cálcio, bem como para as interações sacarose x Bo, sacarose x Ca e para a interação tripla sacarose x Bo X Ca, exceto para Ca e Bo (Tabela 3). A adição de nutrientes para maximizar germinação do pólen em meio de cultura vem sendo ressaltada em inúmeros estudos. Dentre esses, o cálcio e o boro desempenham papel fundamental na germinação e crescimento do tubo polínico em diversas espécies (BREWBAKER; KWACK, 1963; SOUSA, et al., 2010; MOURA, 2015; MENDEZ; ACMA, 2018).

Tabela 3. Análise de variância da porcentagem da germinação do pólen in vitro de *E. precatória*

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Sacarose	1	2400	285,86*	0,0000
Boro	1	864	102,91*	0,0000
Cálcio	1	2795,04	332,91*	0,0000
Sacarose x Boro	1	63,37	7,56*	0,0143
Sacarose x Cálcio	1	1908,17	227,27*	0,0000
Cálcio x Boro	1	6	0,716	0,4104
Sacarose x Boro x Cálcio	1	51,04	6,08*	0,0254
Resíduo	16	8,40		
Total	23			

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Coeficiente de variância a 10,66%.

As médias dos meios de cultura com apenas sacarose e ágar não diferiram quanto ao aumento na concentração de 50 g L⁻¹ para 100 g L⁻¹ de sacarose nos percentuais de germinação do pólen (21% para 23,5%) (Tabela 4). Os percentuais de germinação do pólen observados por CHIA et al. (2009) utilizando os mesmos componentes de meio, para as palmeiras caiaué e dendê e seus híbridos interespecíficos foram bastante superiores (maiores que 50%) aos encontrados neste estudo.

Tabela 4. Germinação *in vitro* de pólen de *Euterpe precatoria* em meio ágar com diferentes concentrações de sacarose, boro e cálcio.

Elementos dos meios de cultura	Médias da germinação (%)	
	50 g L ⁻¹ de Sacarose	100 g L ⁻¹ de Sacarose
	–	21 a A
100 mg L⁻¹ de H₃Bo₃	8,33 b A	10,17 d A
300 mg L⁻¹ de Ca (NO₃)₂ 4H₂O	20,83 a B	64,83 a A
100 mg L⁻¹ de H₃Bo₃, 300 mg L⁻¹ de Ca (NO₃)₂ 4H₂O	16 a B	46,67 b A

*médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si, pelo teste de Tukey (p=0,05), todos os meios de cultura continham 10 mg L⁻¹ de agar.

Observou-se que a adição de ácido bórico aos meios de culturas (M2, M4, M6 e M8), foi um fator limitante quanto ao percentual de germinação do pólen comparados aos meios sem a presença de ácido bórico. Uma vez, que a menor porcentagem de germinação (8,33%), ocorreu no meio de cultura com 100 mg L⁻¹ de H₃Bo₃ e 50 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 4). Embora o boro seja considerado um dos nutrientes fundamentais para a germinação e crescimento do tubo polínico, cada espécie requer um protocolo específico para obter uma alta taxa de germinação. O sucesso da germinação *in vitro* depende de vários fatores, como espécie, estado nutricional, estação do ano, época da coleta, fotoperíodo, temperatura, método de coleta, período de incubação e meio de cultura, além de ajustes na composição do meio para cada espécie (STANLEY; LINSKENS, 1974; SOARES et al., 2008).

Constatou-se que houve interação entre a concentração de sacarose e a presença de cálcio no meio de cultura, interferindo na porcentagem de germinação dos grãos de pólen. A maior porcentagem de germinação (64,83%) ocorreu no meio de cultura com 100 g L⁻¹ de sacarose e 300 mg L⁻¹ de Ca (NO₃)₂ 4H₂O (Tabela 4). Alexander (2019), observou que a adição de cálcio ao meio para germinação de pólen de *Dichroa febrifuga*, *Hydrangea macrophylla* e seus híbridos, aumentou a porcentagem de germinação. A importância do cálcio no meio de germinação expressa por Brewbaker; Kwack (1963), foi confirmada para a germinação do pólen em *E. precatoria*. Os gradientes de cálcio funcionam como um sinal intracelular que regula a manutenção do crescimento e controla a polaridade do crescimento no sentido apical do tubo polínico (QIN; YANG, 2011). Os íons Ca²⁺ interagem com as

pectinas, componente importante da parede celular do tubo polínico em expansão, fortalecendo assim a parede celular (HOLDAWAY-CLARKE, et al., 2003). Quanto a sacarose, este resultado corrobora com a maioria dos autores, que asseguram que a sacarose é um dos componentes fundamentais para a germinação de pólen e também exerce a função de equilíbrio osmótico da solução, além de fornecer energia necessária para o crescimento do tubo polínico (SHIVANNA; JOHRI, 1989; STANLEY; LINSKENS, 1974; GALLETTA, 1983).

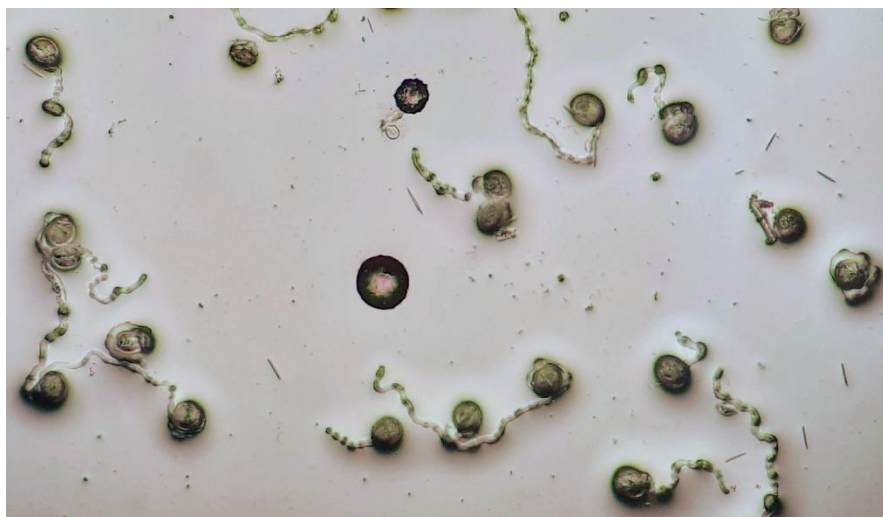


Figura 13. Pólenes de *E. precatória* germinados em meio ágar.

Os meios M4 e M8 contendo todos os elementos testados (sacarose, ácido bórico e nitrato de cálcio), são bastante utilizados em testes de germinação de grãos de pólen (ALEXANDER, L. W, 2019, PIO et al., 2007 e SOUSA et al., 2013), apresentando taxas significativas de germinação, acima de 60%. Contudo para *E. precatória*, esses meios apresentaram baixos percentuais de 16% a 46%, apesar de apresentar além da fonte de energia (sacarose), os íons considerados essenciais para germinação polínica (H^+ , $B3^+$ e $Ca2^+$).

5.2.2 Viabilidade polínica em *E. precatória* por métodos colorimétricos

Na análise de variância foi verificado efeito significativo para corantes (Tabela 5), indicando que existe diferença entre as médias para viabilidade do pólen de uma mesma amostra quando analisada por diferentes corantes.

Tabela 5. Análise de variância de porcentagem de pólen viável utilizando três soluções corantes Tetrazólio (0,1%), Cotton Blue (0,05 %) e Azul de Tripan (0,2 %).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Corante	2	210,167	105,083	15,829	0,004045*
Resíduos	6	39,833	6,639		
Total	8	250.000			

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Coeficiente de variância a 3,19%.

As médias para percentual de pólen viável obtidas com os corantes Cotton Blue (86,67%) e Tetrazólio (80,50 %) não diferiram estatisticamente entre si. Apenas o valor médio de pólen viável com Cotton Blue foi estatisticamente superior a obtida com Azul de Tripan (74,83 %) (Tabela 6). Alta porcentagem de viabilidade do pólen, semelhante à encontrada no presente estudo, também foi observada por Bovi et al. (1987) e Oliveira et al. (2010). Independentemente do método, os valores médios para viabilidade de pólen foram considerados altos (acima de 70%), o que indica que podem ser obtidos bons resultados com o uso deste em cruzamentos controlados. Souza et al. (2002) classificam os valores de viabilidade polínica como alto acima de 70%, médio de 31 a 69% e baixo inferior a 30%.

Tabela 6. Valores médios para percentual de pólen viável de *E. precatória* recém coletado, avaliado com os corantes Cotton Blue (0,05 %), Tetrazólio (0,1%) e Azul de Tripan (0,2 %)

Corante	Viabilidade %
Cotton Blue (0,05 %)	86,67 a
Tetrazólio (0,1%)	80,50 ab
Azul de Tripan (0,2 %)	74,83 b

*Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Resultado semelhante utilizando Cotton Blue (0,05 %) para determinar a viabilidade polínica foi obtido por Storti, (1993) com a palmeira *Mauritia flexuosa* Lin. Fil, onde obteve 82 % de viabilidade utilizando pólen de flores recém-abertas. *Hyophorbe amaricaulis* Mart, apresentou níveis acima de 90% de viabilidade usando o mesmo corante (WYSE, et al., 1990). Lyra (2011) trabalhando com a mesma técnica para estimar a viabilidade polínica de *Jatropha ribifolia* e *Jatropha molíssima*, obteve resultados próximos aos encontrado neste estudo, maiores de 80% para as duas espécies. A ação do Cotton Blue (0,05 %) se baseia na coloração do citoplasma denso de células vivas, tornando os mesmos azuis, não colorindo

aqueles que não possuem citoplasma ou o contém em baixa quantidade (RADFORD et al., 1974).

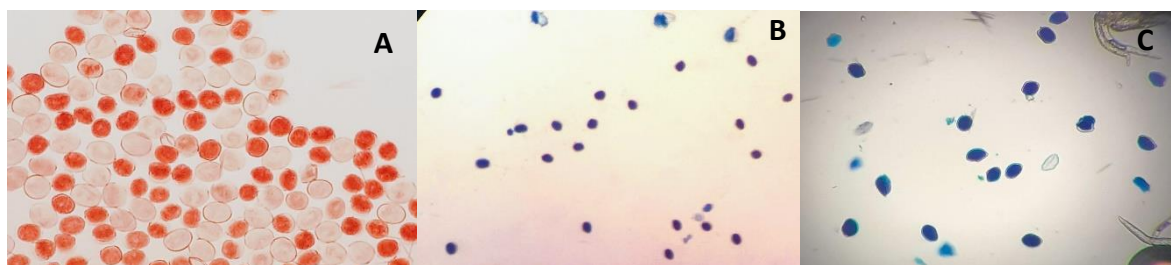


Figura 14. (A) Pólen corado com Tetrazólio (0,1%); (B) Pólen corado com Cotton Blue (0,05, (C) Pólen corado com Azul de Tripan (0,2 %).

O teste colorimétrico com Tetrazólio (0,1%) reflete a atividade de enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos. Como a atividade enzimática do grão de pólen é associada à sua capacidade de germinação (DERIN e ETI, 1999), quando o Tetrazólio (0,1%) reage com o hidrogênio produzido pela respiração celular dá ao pólen uma coloração vermelha indicando viabilidade (HOEKSTRA e BRUINSMA, 1975). Sunilkumar et al. (2013), utilizando o Tetrazólio (0,1%) para estudar a viabilidade polínica em híbridos interespecífico dos cruzamentos entre as palmeiras dende (*Elaeis guineenses*) e caiaué (*Elaeis oleífera*) observaram um valor médio entre 66,39% a 91,15% de viabilidade. Storti (1993) obteve resultado semelhante ao utilizar a mesma técnica em *Mauritia flexuosa* Lin., que apresentou 76% de viabilidade.

O método com o corante Azul de Tripan (0,2 %) é baseado no fato de que, o corante não pode passar dentro da célula, porque possui a membrana plasmática intacta, quando o plasmalema é danificado, o corante penetra ligando-se às proteínas presentes na célula (Rejón, et al. 2010). O resultado é que os grãos inviáveis mancham intenso azul violeta. Desta forma, a viabilidade com o uso do Azul de Tripan (0,2 %) age como um teste de exclusão. Ouyang, et al. (2016), estudando o efeito do dióxido de nitrogênio e dióxido de enxofre na viabilidade e morfologia do pólen do carvalho (*Quercus mongolica*), utilizando o corante Azul de Tripan (0,2 %) para determinar a viabilidade do pólen, obteve valores médios superiores a este estudo, 95,8 % de viabilidade para pólen fresco, sem exposição aos tratamentos com dióxido de nitrogênio e dióxido de enxofre, e variando o valor médio de 90,1 a 84,9 % de viabilidade nos pólen exposto ao dióxido de nitrogênio e 84,9 a 75,2 % de viabilidade nos pólen exposto ao dióxido de enxofre. Rejón et al. (2010), também obteve percentuais médios altos de viabilidade polínica, chegando a 92,6 % em diferentes cultivares

de oliveira (*Olea europaea* L.). Não foram encontrados na literatura estudos utilizando Azul de Tripan (0,2 %) para análise da viabilidade polínica em palmeiras.

Dependendo do método utilizado, a viabilidade apresentou diferentes valores de viabilidade (não esta claro). Esse fato indica que é aconselhável usar pelo menos dois testes de viabilidade diferentes para que os resultados reflitam com mais precisão a qualidade do pólen. Considerando-se que expressão do genótipo de um indivíduo é fruto da contribuição dos gametas masculino e feminino, quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos, e conseqüentemente, aumento da variabilidade genética (SOUZA et al., 2002).

5.2.3 Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento na viabilidade do pólen de *E. precatoria*

Diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos com corantes, tempo e temperatura de armazenamento, bem como as interações, corante x tempo, para a viabilidade do pólen de *E. precatoria* (Tabela 7). O coeficiente de variação foi baixo (3,15%), indicando alta precisão do experimento. Considerando os resultados dos efeitos isolados e da interação entre eles verificados na análise de variância e o tipo de variável independente, para comparar as médias da viabilidade do pólen avaliada por diferentes corantes (variável independente qualitativa), bem como as médias das diferentes temperaturas de armazenamento (variável independente quantitativa com três níveis) foi realizado o teste de médias, enquanto o efeito do tempo de armazenamento (variável independente quantitativa) foi analisado por regressão.

Tabela 7. Análise de variância de porcentagem de pólen viável utilizando três soluções (Tetrazólio (0,1%) 0,1 %, Cotton Blue (0,05 %) e Azul de Tripan (0,2 %), armazenado nas três temperaturas (5°, -20° e -80° C) nos cinco tempo de armazenamento (0, 30, 60, 90, 180 dias)

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Corante	2	3550,96	897,71*	0,0000
Temperatura	2	44,67	11,29*	0,0000
Tempo	4	425,46	107,56*	0,0000
Corante*Temperatura	4	1,33	0,34	0,8500
Corante*Tempo	8	35,07	8,87*	0,0000
Tempo*Temperatura	8	3,66	0,93	0,5000
Corante*Temperatura*Tempo	16	1,69	0,43	0,9700
Resíduo	90	3,96		
Total	134			

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Coeficiente de variância a 3,15%.

Quando analisadas as médias da viabilidade polínica dentro de cada tempo de armazenamento, os valores obtidos com os corantes Cotton Blue (0,05%) e o Tetrazólio (0,2%) não diferiram entre si e foram superiores ao Azul de Tripan (0,1%) em todos os tempos analisados (Tabela 8). Na comparação das médias de viabilidade polínica dos tempos de armazenamento para cada corante, os mesmos resultados são obtidos com os corantes Cotton Blue (0,05%) e Tetrazólio (0,1%), com a média obtida no tempo zero estatisticamente superior as demais, e as médias de 30 a 90 dias não diferiram entre si e são superiores a média obtida com 180 dias de armazenamento. Com o corante Azul de Tripan (0,1%), apenas uma alteração ocorreu na comparação dos tempos de armazenamento, onde a média obtida com 30 dias de armazenamento não diferiu da obtida com o pólen recém colhido (não armazenado).

Tabela 8. Análise do desdobramento da interação corante x tempo de armazenamento, com teste de Tukey a 5% de probabilidade para os valores da viabilidade polínica de *E. precatória*.

Tempo de Armazenamento (Dias)	Corante		
	Cotton Blue (0,05 %)	Tetrazólio (0,1%)	Azul de Tripan (0,2 %)
0	81,67 a A	80,17 a A	65,67 a B
30	77,67 b A	76,11 b A	63,5 ab B
60	76,11 b A	75,78 b A	62,67 b B
90	75,61 b A	75 b A	61,67 b B
180	72,5 c A	71,44 c A	50,72 c B

*médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si, pelo teste de Tukey (p=0,05).

Para médias de viabilidade polínica resultante de diferentes temperaturas de armazenamento, a amostra exposta a temperatura de -20° C (72,14%) foi estatisticamente superior às demais médias obtidas com 5 °C (70,17%) e -80 °C (70,94%), as quais não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 9). Resultado semelhante foi observado por Sunilkumar (2017), no qual estudou o processamento e armazenamento de pólen de dendê (*Elaeis guineense*) em relação a duas variedades, Dura e Pisífera, onde obteve a viabilidade máxima registrada nos pólen armazenados a -20° C. De forma diferente Mesnoua et al. (2018) observaram para seis cultivares de *Phoenix dactylifera* L., onde a viabilidade foi menor para o pólen armazenado a -20° C.

Tabela 9. Análise do efeito da temperatura através do teste de Tukey a 5% de probabilidade para os valores da viabilidade polínica de *E. precatória*.

Temperatura de armazenamento	Viabilidade (%)
-20° C	72,14 a
-80° C	70,94 b
5° C	70,17 b

O armazenamento do pólen como meio de manutenção de sua viabilidade é uma ferramenta valiosa empregada por melhoristas e geneticistas (PIO et al. 2007). Além dos fatores fisiológicos e genéticos, os principais fatores que podem afetar a viabilidade do pólen armazenado são a umidade e a temperatura de armazenamento (GANESHAN et al., 2008).

A análise de regressão da interação entre o método de avaliação e o tempo de armazenamento demonstrou que houve uma redução significativa e gradual na viabilidade do pólen armazenado durante o período de 180 dias (Figura 15). Nos primeiros 30 dias houve uma redução significativa dos percentuais de viabilidade, mantendo-se próximos até os 90 dias, tendo uma outra diminuição significativa até chegar aos 180 dias (Figura 4). Resultado semelhante foram obtidos por Oliveira, et al. (2001). Os autores verificaram que houve uma redução da viabilidade polínica de genótipos de açaizeiros (*E. oleracea*) com o aumento do tempo de armazenamento do pólen, onde no primeiro mês, a percentagem média foi de 79,6%, enquanto nos demais períodos avaliados foram de 77,4%, 74,1% e 61,3% (3, 6 e 12 meses respectivamente) quando avaliou a viabilidade polínica em a partir da solução de Baker (DAFNI 1992). Maryam et al. (2017) observaram que os pólen armazenado da palmeira *Phoenix dactylifera*, corados por Acetocarmina (1%) variaram entre 87 a 65% nos períodos de armazenamento de 1 e 12 meses.

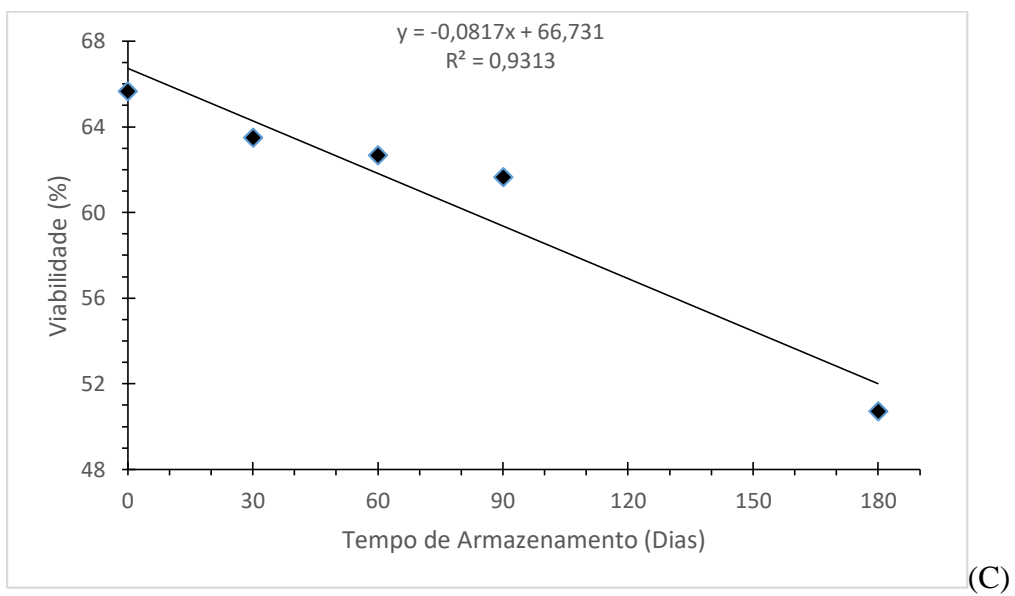
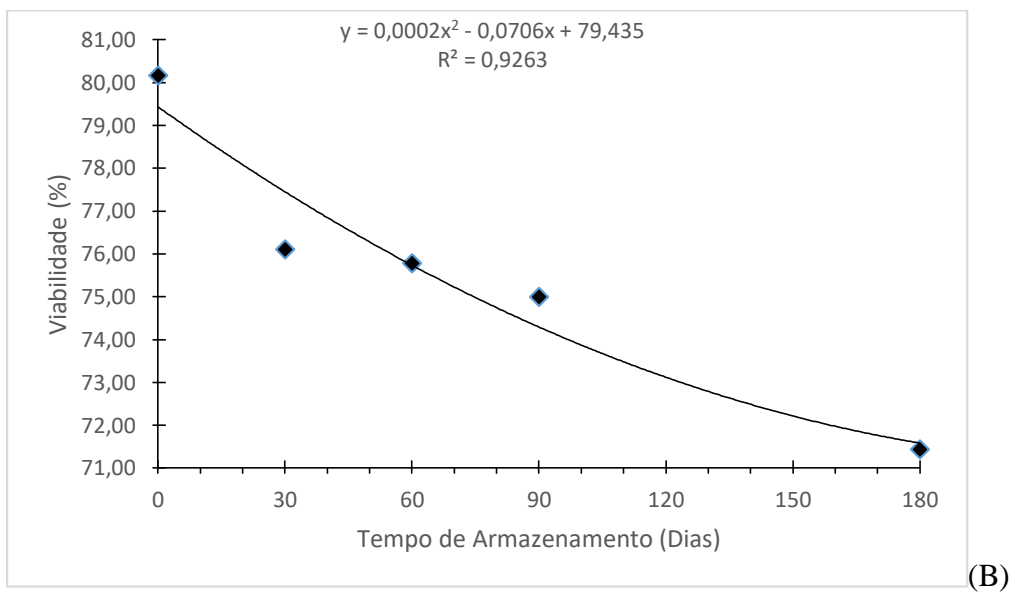
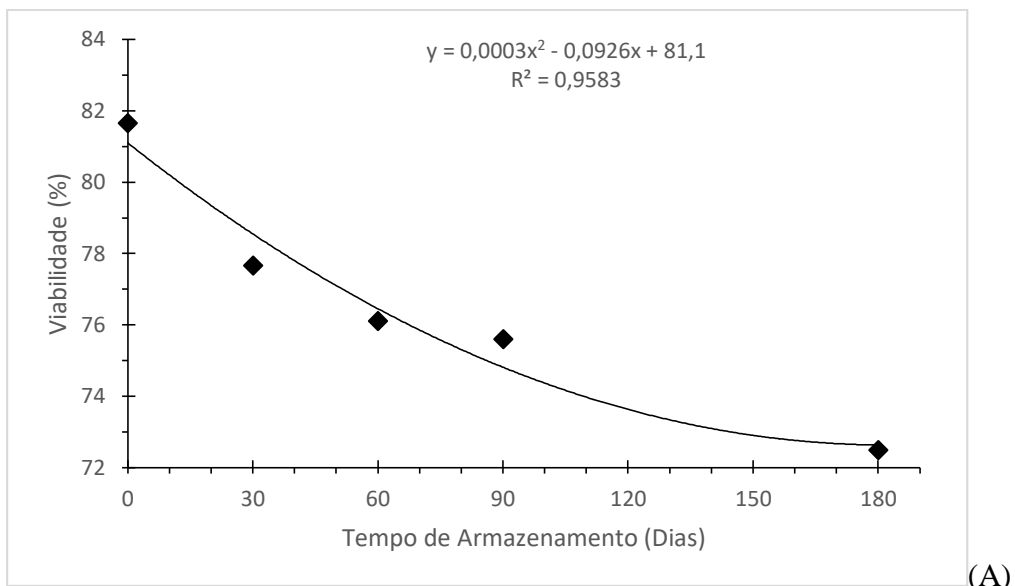


Figura 15. Porcentagem de viabilidade dos grãos de pólen de *E. precatoria* obtida com o uso dos corantes avaliados (Cotton Blue (0,05 %), Tetrazólio (0,1%) e Azul de Tripán (0,2 %)), nos 5 períodos de avaliação (0, 30, 60, 90, 180 dias).

Nota: (A) Cotton Blue (0,05 %), (B) Tetrazólio (0,1%) e (C) Azul de Tripán (0,2 %).

Os valores de viabilidade de pólen encontrados no presente trabalho podem ser considerados altos, capazes de garantir o sucesso de hibridações, utilizando pólen armazenado durante um período de até seis meses. Pereira et al. (2002), trabalhando com clones de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. urophylla* obteve 40% de viabilidade após três meses de armazenamento, e consideraram uma porcentagem alta devido à quantidade de pólen empregada nas polinizações.

5.3 Emergência de plântulas em sementes de Açaizeiros *E. precatoria*, *E. oleracea*, e híbrida *E. precatoria* x *E. oleracea*

Houve efeito altamente significativo de espécie para taxa de emergência (TE) e índice de velocidade de emergência (IVE), e, embora os efeitos isolados de temperatura da água e tempo de imersão das sementes não tenham sido significativos para as duas variáveis, a interação espécie x temperatura da água x tempo de imersão foi significativa para ambas (Tabela 10). Para TE foram também significativas as interações espécie x tempo de imersão e temperatura x tempo de imersão. De acordo com as interações significativas, foram realizados os devidos desdobramentos para comparação das médias.

Tabela 10. Resumo da análise de variância para Índice de Velocidade de Emergência (IVE) e taxa de emergência (TE) em sementes de *E. precatoria*, *E. oleracea* e híbridas *E. precatoria* x *E. oleracea*

FV	DF	IVE	TE
		Fc	Fc
Espécie (F1)	2,00	1,26*	161,75*
Temperatura (F2)	1,00	2,41	0,16
Tempo (F3)	2,00	0,35	0,28
F1*F2	2,00	0,97	2,84
F1*F3	4,00	1,84	3,51*
F2*F3	2,00	0,73	3,75*
F1*F2*F3	4,00	2,91*	3,81*
Residuals	36,00		
Total	53,00		

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Analisando os resultados do IVE, observa-se que as sementes de *E. oleracea* tiveram a emergência de plântulas mais rápido em comparação as de *E. precatoria* e do híbrido interespecífico em todos os tratamentos, sendo estes não diferiram significativamente entre si (Tabela 11). Em relação a valores absolutos o híbrido ficou com valores intermediários em relação as duas espécies, apenas o tratamento com 50° durante 20 minutos a velocidade de emergência em *E. precatoria* foi intermediário (Tabela 11). Bovi et al. (1987), comparando o desenvolvimento vegetativo e a produção de híbridos de palmitreiro (*Euterpe oleracea* x *E. edulis*) com seus genitores, em duas condições diferentes de cultivo, na região de Ubatuba-SP, verificou que ao contrário destes resultados, os híbridos germinaram e emergiram mais rápido em relação a seus genitores.

As sementes dos híbridos apresentaram uma menor taxa de emergência de plântulas em todos os tratamentos (Tabela 11). A *E. oleracea* teve o maior percentual de emergência, não apresentando diferença significativa com a *E. precatoria* nos tratamentos a 50° C a 5 minutos, e 40 e 50° C com 20 minutos. De maneira geral, os efeitos da temperatura e o tempo para as sementes de *E. oleracea* na porcentagem de emergência não foram significativos, apenas no tempo de 5 minutos diferenciou-se significativamente as médias de emergência entre 40 e 50° C. Já para o Híbrido o tempo não influenciou significativamente as emergências das sementes. Resultado semelhante foi obtido por Nazário (2006), estudando tratamentos pre-germinativos para amenizar a dormência de *Astrocaryum aculeatum*, onde a temperatura e o período de embebição não afetaram de modo significativo a emergência, a embebição, em qualquer temperatura ou período testado, favorece a emergência.

Tabela 11. Médias para índice de velocidade de emergência (IVE) e taxa de emergência (TE) em sementes de *E. precatoria*, *E. oleracea* e híbridadas *E. precatoria* x *E. oleracea*, submetidas a imersão em água com diferentes temperaturas e tempos de imersão.

IVE						
Espécie	Tempo					
	5 min		10 min		20 min	
	Temperatura					
	40° C	50° C	40° C	50° C	40° C	50° C
<i>E. oleracea</i>	3,18 aA ^a	2,14 aB ^b	2,37 aA ^b	2,75 aA ^{ab}	3,05 aA ^a	2,91 aA ^a
<i>E. precatoria</i>	0,71 bA ^a	0,93 bA ^a	0,62 bA ^a	0,78 bA ^a	0,94 bA ^a	1,03 bA ^a
Híbrido	0,98 bA ^a	1,45 bA ^a	1,17 bB ^a	1,80 cA ^a	1,19 bA ^a	0,74 bA ^b
TE (%)						
Espécie	Tempo					
	5 min		10 min		20 min	

	Temperatura					
	40° C	50° C	40° C	50° C	40° C	50° C
<i>E. oleracea</i>	83,33 aA ^a	73,15 aA ^a	78,70 aA ^a	83,34 aA ^a	82,41 aA ^a	87,96 aA ^a
<i>E. precatoria</i>	57,41 bB ^a	75,93 aA ^a	58,33 bA ^a	58,34 bA ^a	65,74 aA ^a	74,07 aA ^a
Híbrido	25 cA ^a	37,96 bA ^{ab}	28,70 cA ^a	40,74 bA ^a	34,26 bA ^a	19,44 bA ^b

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas dentro de cada tempo e sobreescritas nas linhas entre as temperaturas, não se diferenciam entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

5.4 Quantidade de DNA genômico de *E. precatoria*, *E. oleracea* e do híbrido interespecífico *E. precatoria* x *E. oleracea*

O conteúdo de DNA nuclear da planta de *E. precatoria* proveniente do Campo Experimental do Rio Urubu (CERU) foi de 7,04 pg, já as plantas de *E. precatoria* do plantio em Manacapuru a média foi 8,01 pg (Tabela 12). A diferença observada entre os DNA das espécies pode estar relacionada aos genótipos avaliados e a plasticidade do genoma nuclear. As plantas de *E. oleracea* e os híbridos oriundo do plantio em Manacapuru, apresentaram médias menores de conteúdo de DNA, diferindo-se significativamente dos híbridos oriundos da planta de *E. precatoria* do CERU (Tabela 12).

Os coeficientes de variação foram considerados baixos, inferiores a 5% (GALBRAITH et al., 2001). Quanto menor o coeficiente de variação menor é a largura do pico e maior é a precisão dos experimentos de citometria de fluxo. O CV expressa as variações observadas nas medições do conteúdo de DNA, que são influenciadas pelas metodologias de isolamento dos núcleos e tipo de fluorocromos usados, além da leitura no citômetro de fluxo (MARIE; BROWN, 1993). Foram avaliados em torno de 10 mil núcleos por indivíduo (Figura 16), com a formação de picos bem definidos para cada uma das espécies.

Tabela 12. Estimativa da quantidade de DNA nuclear de *E. precatoria*, *E. oleracea* e prováveis híbridos interespecíficos nas diferentes áreas de origem, obtido por análise de citometria de fluxo.

Espécie/Local	Conteúdo de DNA
<i>E. precatoria</i> /Manacapuru	8,01 a
Híbrido/CERU	7,35 a
Híbrido/Manacapuru	6,60 b
<i>E. oleraceae</i> /CERU	6,17 b
<i>E. precatoria</i> /CERU	7,04*

*não incluído no teste de médias, amostra única da espécie no local; *médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis.

De acordo com Doležel (1997), é esperado obter valores intermediários na quantidade de DNA nuclear em híbridos interespecíficos em relação as espécies parentais. Entretanto, os genitores dos híbridos interespecíficos oriundos do CERU, apresentaram conteúdo de DNA nuclear menor que a média dos híbridos interespecíficos. Isso pode ser devido a heterose ou vigor híbrido (SNUSTAD; SIMMONS, 2000). Outro motivo pode ser devido a esses híbridos estarem em estágio de mudas, pois, segundo Doležel et al. (2007), o estágio de desenvolvimento da planta pode influenciar em grande parte os resultados da citometria de fluxo. Resultado semelhante foi obtido por Madon et al. (2008), estudando a aplicação da citometria de fluxo para estimar o conteúdo de DNA nuclear no gênero *Elaeis*, onde observou quantidade de DNA nuclear superior do híbrido interespecífico do cruzamento entre *Elaeis oleifera* (Suriname) e *E. guineensis* (*Pisifera*) em relação as espécies parentais.

Oliveira (2011), estudando a palinologia, citogenética e conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Euterpe*, observou valores maiores de conteúdo de DNA usando a citometria de fluxo para *E. oleracea* (8,44 pg) e *E. precatoria* (9,41 pg). Röser, Johnson e Hanson (1997), determinou o conteúdo de DNA nuclear de *E. precatoria* a partir de densitometria por Feulgen (2C de DNA de 10,62 pg), o que é considerado relativamente alto. A variação notada entre as plantas mesmo entre aquelas da mesma espécie pode ser explicada por pequenas variações na quantidade de DNA nos parentais, uma vez que os materiais analisados por esses autores não são os mesmos analisados neste trabalho. Essas diferenças na quantidade de DNA entre genótipos, populações, linhagens ou cultivares dentro de uma espécie são comuns (Doležel, 1997). Schifino-Wittmann (2001), explica que quando os resultados de determinação da quantidade de DNA por diferentes autores são divergentes, deve-se a plasticidade do genoma nuclear ou as metodologias aplicadas.

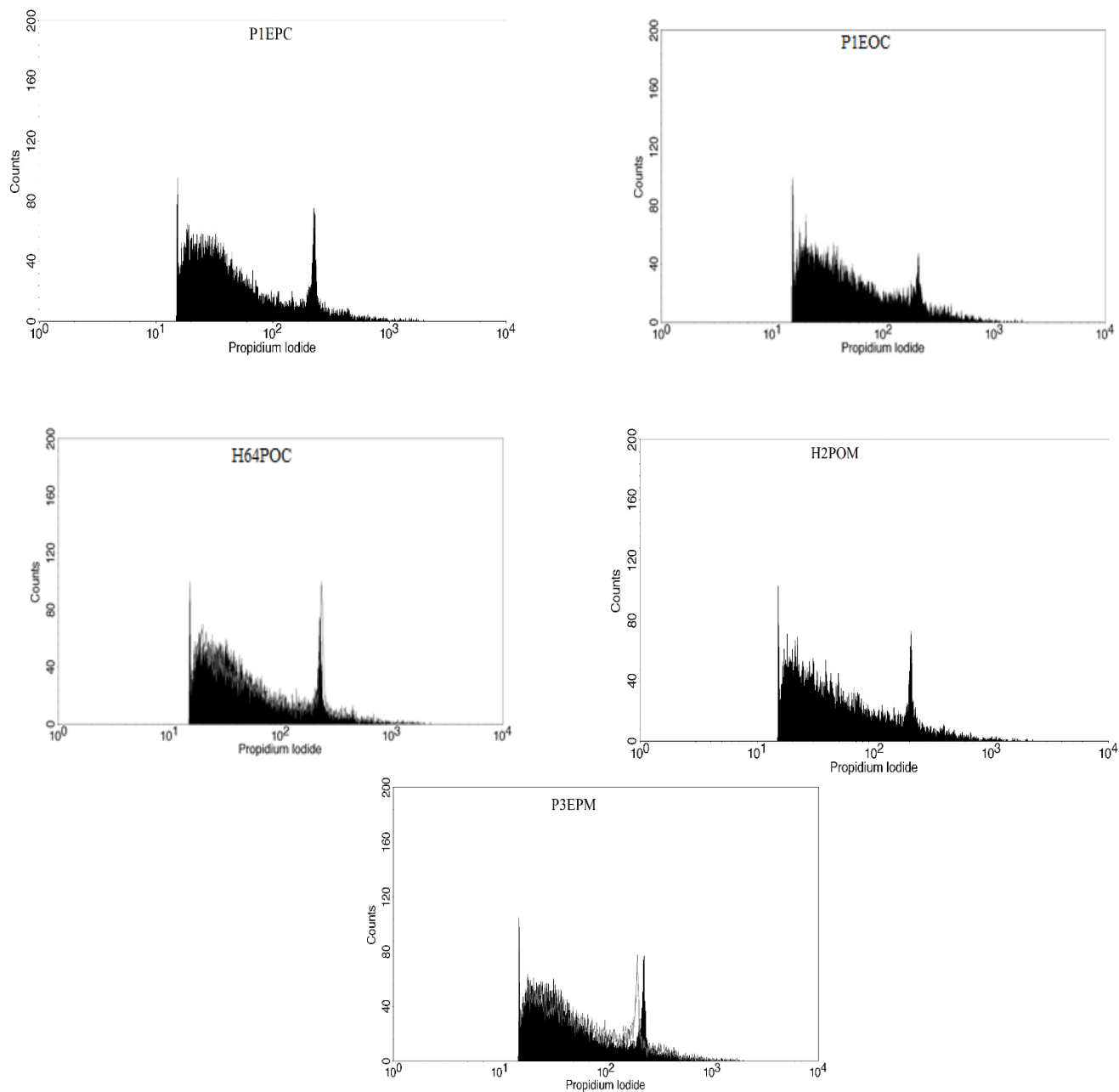


Figura 16. Histograma de citometria de fluxo em núcleos das plantas *E. precatória* (PIEPC) plantada no CERU, *E. oleracea*, (PIEOC) oriunda do CERU, Híbrido interespecífico (H64POC) oriundo do cacho da planta PIEOC, Híbrido interespecífico oriundo do plantio em Manacapuru e *E. precatória* (PIEPC) oriunda do plantio em Manacapuru.

6 CONCLUSÕES

As fases fenológicas de floração e frutificação de *E. precatoria* ocorrem durante todos os meses do ano, mas não de forma regular.

O melhor período para coleta do pólen, bem como, para realização de cruzamentos, em *E. precatoria* são de agosto a dezembro, quando ocorre maior frequência de inflorescências em fase de floração.

A germinação in vitro do pólen de *E. precatoria* em meio ágar é estimulada pelo cálcio, enquanto o boro parece ser um fator limitante a germinação.

Os métodos colorimétricos usando os corantes Cotton Blue e Sal de Tetrazólio são adequados para análise da viabilidade de pólen de *E. precatória*.

Recomenda-se o armazenamento de pólen de *E. precatoria* em temperatura de -20 °C, condições em que se mantem viável pelo menos por 180 dias.

A temperatura e o período de embebição em água quente favorece a emergência das plântulas. Contudo, para *E. oleracea*, a emergência de plântulas é mais rápida em comparação à *E. precatoria* e ao híbrido interespecífico. Os híbridos interespecíficos entre *E. precatoria* e *E. oleracea* apresentam valores intermediários quanto a velocidade de emergência de plântulas, entretanto, apresenta uma menor porcentagem de emergência.

O conteúdo médio de DNA nuclear de *E. precatoria* é superior ao da espécie *E. oleracea*, enquanto nos híbridos interespecíficos *E. precatoria* x *E. oleracea* podem apresentar valores superiores e intermediário entre as espécies genitoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.R.P.; DEMATTÊ, M.E.S.P. Palmeiras: Características Botânicas e Evolução. Campinas – SP, Brasil, Fundação Cargill, 129 p., 1987.

ALEXANDER L.W. Optimizing pollen germination and pollen viability estimates for *Hydrangea macrophylla*, *Dichroa febrifuga*, and their hybrids. *Scientia Horticulturae*, v. 246, p. 244-250, 2019.

ARONNE, V.D. MICCO, M. Scala Effects of relative humidity and temperature conditions on pollen fluorochromatic reaction of *Rosmarinus officinalis*, L. (Lamiaceae). *Protoplasma*, v.228, pp. 127-130, 2006.

BATISTA, G.S. Morfologia e germinação de sementes de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc (Arecaceae). Dissertação de Mestrado. Jabocatibal, São Paulo, julho de 2009.

BAYMA, A.M.M., WADT, L.H.O.; SA, C.P.; BALZON, T.A. SOUSA, M.M.M. Custo e Rentabilidade da Atividade de Extração de Açaí em Áreas de Baixio na Reserva Extrativista Chico Mendes, Seringais Porvir, Filipinas, Etelvi, no Acre. Comunicado Técnico 170. EMBRAPA, Rio Branco, AC. Dezembro, 2008.

BENNET, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, Bristol, v.76, p.113-176, 1995.

BORGES, E.E.L. Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes florestais nativas durante a embebição. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 107p., 2003.

BORGES, E.E. de L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B. de; PIÑARODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES, p.83-135, 1993.

BOVI, M.L.A; GODOY JUNIOR, G.; SAES, L.A. Pesquisas com os gêneros *Euterpe* e *Bactris* no Instituto Agrônomo da Campinas. 1-43p. In: Encontro Nacional de

Pesquisadores em Palmito, 1, Curitiba, PR, 1987. Anais..., Curitiba, PR. EMBRAPA - CNPF. Documentos, 19, 1988.

BOVI, M.L.A.; CARDOSO, M. Germinação de sementes de açaizeiro. I. *Bragantia*, Campinas, 35:CI-XCVIXIV, n. 18, 1976.

BHERING, L.L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.17, p.187-190, 2017.

BREWBAKER, J.L.; KWACK, B.H. The calcium ion and substance influencing pollen growth. In: *Pollen Physiology and Fertilization*, edited by Linskens HF (North-Holland publishing, Amsterdam). p.143-151, 1963.

BRONSTEIN, J.L.; ALARCÓN, R.; GEBER, M. The evolution of plant-insect mutualism. *New Phytologist*, v.172, p. 412-428, 2006.

BROSCHAT, T.K. Palm seed propagation. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.360, p.141-147, 1994.

CABRAL, J. C.; ROSSI, A. A. B.; KLEIN, M. E.; VIERA, F. S.; GIUSTINA, L. D. Estimativa da viabilidade polínica em acessos de *Theobroma cacao* L. baseada em testes colorimétricos. *Enciclopédia Biosfera*, v.9, n.17, p.2780-2788, 2013.

CAVALCANTE, P. Frutas comestíveis da Amazônia. 7. ed. Belém: CEJUP, 282 p., 2010.

CALZAVARA, B.B.G. As possibilidades do açaizeiro no estuário amazônico. *Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará*, Belém, n. 5, p. 1-103, 1972.

CASTRO, A.O extrativismo do açaí no Amazonas. In: RELATÓ- RIO de resultados do projeto de pesquisa: extrativismo na Amazônia Central, viabilidade e desenvolvimento. Manaus: INPA-CNPq/ ORSTOM, p.779-782, 1992.

CHIA, G.S.; LOPES, R.; CUNHA, R.N.V., ROCHA, R.N.C. Germinação *in vitro* de pólen de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. *Ciência Rural*, v.39, n.5, p.1569-1571; 2009.

CYSNE, A.Q.; LIMA, W.A. A.; KRUG, C.; GOMES, F.B. Teste de Viabilidade Polínica em Dendezeiro: Uma Nova Proposta. EMBRAPA, Comunicado Técnico 116, Dezembro, 2015 Manaus, AM.

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

DERIN, K.; ETI, S. Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, v.25, p.169-173, 1999.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, v.38, p.285-302, 1997.

DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVAK, F.J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa accuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, 1994.

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis*, v.2, p.143-154, 1991.

DRANSFIELD, J., UHL, N.W., ASMUSSEN, C.B., BAKER, W.J., HARLEY, M.M., LEWIS, C.E. *Genera Palmarum: Evolution and Classification of Palms*. Kew Publishing Royal Botanic Gardens, Londres, UK, 2008.

DORNELES, L.L.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J.; PADILHA, M.T.S. Biologia da polinização do açazeiro-do-sul *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) e associação com abelhas sociais (Apidae: Apini) em sistema agroflorestral na Ilha de Santa Catarina. *Revista Iheringia*, v.68, n.1, p.47-57, 2013.

EQUIPE ESTATCAMP (2014). Software Action. Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil. URL <http://www.portalaction.com.br/>.

FRESCURA, V.D.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; CANTODOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different staining methods. Biocell, v.36, n.3, p.143-145, 2012.

FERREIRA, E. Açaí: *Euterpe precatoria* Mart. In: SHANLEY, Patrícia. Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica. Belém: CIFOR, Imazon, 2005.

FERREIRA, C.A.; PINHO, E.V.R.V.; ALVIM, P.O.; ANDRADE, V.; SILVA, T.T.A.; CARDOSO, D.L. Conservação e determinação da viabilidade de Grão de Pólen de Milho. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.6, n.2, p.159-173, 2007.

FISCH, S.T.V.; NOGUEIRA, L. R.; MANTOVANI, W. Fenologia Reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart na mata Atlântica. Revista Biociência, Taubaté, v.6, p.31-37, 2000.

FONSECA, M.E. Westgate Relationship between desiccation and viability of maize pollen. Field Crop Res., v.94, p.114-125, 2005.

KAHN, F.; GRANVILLE, J. Palms in forest ecosystems of Amazonia. Ecological Studies, New York, n.95, 226p. 1992.

KELLY, J. K.; RASCH, A.; KALISZ, S. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. American Journal of Botany, Lancaster, v. 89, n.6, p.1021- 1023, 2002.

GARCÍA, A. Documento Fenología reproductiva de tres especies de palmas amazónicas en el centro de formación el trueno proyecto: Investigación, innovación y alternativas tecnológicas de Aprovechamiento sostenible de los recursos naturales renovables y el medio ambiente amazónico. Programa: Sostenibilidad e intervención. Instituto "SINCHI", 2011.

GALETTA, G.J. Pollen and Seed Management. In: MOORE, J.N.; JANIK, J. (Ed.). Methods in fruit Breeding. Indiana: Purdne Universitz Press, p.23-47, 1983.

GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.R.; MADDOX, J.M.; AYRES, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science*, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, 1983.

GALBRAITH, D.W.; LAMBERT, G.M.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Current Protocols in Cytometry*. New York: John Wiley, 365 p. May/2001.

GANESHAN, S.; RAJASEKHARAN, P.E.; SHASHIKUMAR, S.; DECRUZE, W. Cryopreservation of pollen. In: REED, B.M. (Ed.). *Plant cryopreservation: a practical guide*. New York: Springer, p. 443-447, 2008.

GAMA, M.A.M. Estudos comparativos da biologia reprodutiva de *Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe precatoria* Mart. (Arecaceae), na região de Manaus-AM. Dissertação de Mestrado. Manaus, Amazonas, 2004.

HENDERSON, A.; SCARIOT, A. A flora da Reserva Ducke, I: Palmae (Arecaceae). *Acta Amazonica*, Manaus, v.23, n.4, p.349-369, 1993.

HENDERSON, A. *The palms of the Amazon*. New York: Oxford University Press, 362p., 1995.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. *Field guide to the palms of the Americas*. Oxford University Press, New York, NY, US, 1995.

HOEKSTRA, F.A.; BRUINSMA, J. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. *Plant Physiology*, v.34, p.221-225, 1975.

HOLDAWAY-CLARKE, T.L.; WEDDLE, N.M.; KIM, S.; ROBI, A.; PARRIS, C.; KUNKEL, J.G.; HEPLER, P. K. Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. *Journal of Experimental Botany*, v. 54, n.380, p. 65-72, 2003.

HOMMA, A. K. O.; NICOLI, C. M. L.; MENEZES, A. J. E. A.; MATOS, G. B.; CARVALHO, J. E. U.; NOGUEIRA, O. L. Custo operacional de açazeiro irrigado no nordeste paraense. 1. ed. Belém, Pará: Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 255. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Banco de dados agregados: Sistema IBGE de recuperação automático (SIDRA). Obtido de <http://www.sidra.ibge.gov.br> . Acesso em 19 de abril de 2019.

INMET- Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. Acesso em 12 de maio de 2020.

IUCN - International Union for the Conservation of Nature. Palms: Their Conservation and Sustained Utilization. Cambridge: IUCN/SSC Palm Specialist Group, 116p, 1996.

JARDIM, M.A.G.; KAGEYAMA, P.Y. Fenologia da floração e frutificação em população natural de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), no estuário amazônico. IPEF, Piracicaba, n. 47, p. 62-65, 1994.

JESUS, R.L.; OLIVEIRA, M.S.P. Monitoramento fenológico do açai-do-amazonas (*Euterpe precatoria* MART.) nas condições de Belém, PA. 18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA.

KAHN, F.; HENDERSON, A. An Overview of the Palm of the Várzea in the Amazon Region. In: Várzea diversity, development, and conservation of Amazonia's whitewater floodplains. (PADOCH, C.; AYRES, J.M.; PINEDO-VASQUEZ, M.; HENDERSON, H. eds.) The New York Botanical Garden Press, 1999.

KÜCHMEISTER, H.; GOTTSBERGER, I. S.; GOTTSBERGER, G. Flowering, pollination, nectar standing crop, and nectaries of *Euterpe precatoria* (Arecaceae) an Amazonian rain forest palm. Plant Systematic Evolution, v.206, p. 71-97, 1997.

- LABOURIAU, L.G. A germinação das sementes. Washington: OEA. 174p, 1983.
- LÉDO, A.S.; MACHADO, C.A.; MOURA, C.R.F.; RAMOS, S.R.R.; RIBEIRO, F.E.; SOUZA, F.V.D. Procedimentos para a Conservação e Viabilidade de Grãos de Pólen de Coqueiro-gigante-do-Brasil-Praia-do Forte. Comunicado Técnico 133, EMBRAPA. \Dezembro, Aracaju, SE, 2013.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. de; MEDEIROS-COSTA, J.T. de; CERQUEIRA, L.S.C. de; BEHR, N. Palmeiras do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum, 1996.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. de.; COSTA, J.T. de M.; CERQUEIRA, L.S.C. de.; FERREIRA, E. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2004.
- MARCUS, J.; BANKS, K. A practical guide to germinate palm seeds. Palms, v.43 n.2, p.56-59, 1999.
- MARIE, D., BROWN, S.C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. Biology of the cell, n.79, p. 41-51, 1993.
- MENCK, A.L.M.; ODA, S.; MARCHZ, E.L.; KOVALSKI, M.E. Influência do sistema de coleta de botões florais na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. IPEF, Piracicaba, n. 43/44, p. 20-23, jan./dez. 1990.
- MENDEZ, N.P., ACMA, F.M. In vitro Studies of a Philippine Endemic Ginger Species. Journal of Tropical Life Science, v.8, n.3, p.303-310, 2018.
- MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C.R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M.N.S. Amazon palm fruit (p. 120). MCT/INPA. Manaus, 2001.
- MARYAM; JASKANI M. J.; NAQVI S. A. Storage and Viability Assessment of Date Palm Pollen. Methods Mol Biol. v.1638, p.3-13, 2017.

NAZÁRIO, P. Tratamentos pré-germinativos visando minimizar a dormência em sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. MEY.). Dissertação de Mestrado, INPA/UFAM, 2006.

OUYANG, Y.; XU, Z.; FAN, E.; LI, Y.; ZHANG, L. Effect of nitrogen dioxide and sulfur dioxide on viability and morphology of oak pollen. *International Forum of Allergy & Rhinology*, v,6, n.1, January, 2016.

ODETOLA, J.A. Studies on seed dormancy, viability and germination in ornamental palms. *Principes*, v.31, n.1, p.24-31, 1987.

OLIVEIRA, M. S. P.; COUTURIER, G.; BESERRA, P. Biologia da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) Em Belém, Pará, Brasil. *Acta bot. bras.* 17(3): 343-353. 2003.

OLIVEIRA, M.S.P.; NAVEGANTES, P.C.A.; COSTA, L.R. de J. Obtenção de pólen e polinização controlada em espécies do gênero *Euterpe*. EMBRAPA, DOCUMENTOS 450, ISSN 1983-0513, Belém/PA, Dezembro / 2019.

OLIVEIRA, M. do S.P. de; CARVALHO, J.E.U. de; NASCIMENTO, W.M.O. do. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Jaboticabal: Funep, 2000. 52 p. il. (Funep. Frutas Nativas, 7).

OLIVEIRA, M. do S.; PADILHA, M.M.M.; KALUME, M.A. de A. Viabilidade de pólen in vivo e in vitro em genótipos de açaizeiro. *Acta Botanica Brasílica*, Feira de Santana, v.15, n.1, p.27-33, 2001.

OLIVEIRA, L.C.; GOULART, J.C; RODRIGUES, M.S.; TORRES, G.A. Viabilidade polínica de *Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe precatoria* Mart. XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 27 de setembro a 01 de outubro de 2010.

OLIVEIRA, A.C.L. Citometria de fluxo e redes neurais artificiais em variedades de bananeira, figueira, macieira, e pessegueiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, 2011.

OLIVEIRA, M. do S.P. de; FARIAS NETO, J.T. de; PENA, R. da. S. Açai: técnicas de cultivo e processamento. Semana da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria / VII Flor Pará. Instituto de Desenvolvimento da Fruticultura e Agroindústria – Frutal. Junho, 2007. Belém – Pará.

PAGLIARUSSI, M.S.A. cadeia produtiva agroindustrial do açaí: estudo da cadeia e proposta de um modelo matemático. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2010.

PEREIRA, R.C.; DAVIDE, L.C.; RAMALHO, M.A.; ANDRADE, H.B. Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *Eucalyptus*. Cerne, v. 8, n. 2, p. 60- 69, 2002.

PIO, L.A.; RAMOS, D.J.; PASCAL, M.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. Ciência e Agrotecnologia, v.31, p.147-153, 2007.

PIVETTA, K.F.L.; BARBOSA, J.G., ARAÚJO, E.F. Propagação de palmeiras e strelitzia. In: BARBOSA, J.G.; LOPES, L.C. Propagação de Plantas Ornamentais. Viçosa: UFV, p. 43-70. 2007.

RADFORD, A.E, DICKISON, W.C, MASSEY, J.R., BELL, C.R. Vascular Plant Systematics. New York: Harper & Row Publishers, 1974. 891p.

REJÓN, J.D.; SUÁREZ, C.G.; ALCHÉ, J.D.; CASTRO, A.J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I. Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea europaea* L.). Polen, v.20, p. 61-72, 2010.

RIBEIRO, J.E.L.S., HOPKINS, M.J.G., VICENTINI, A., SOTHERS, C.A., COSTA, M.A.S., BRITO, J.M., SOUZA, M.A.D., MARTINS, L.H.P., LOHMANN, L.G., ASSUNÇÃO, P.A.C.L., PEREIRA, E.C., SILVA, C.F., MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, BR, 1999.

ROGEZ, H. Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação. Belém: UFPA, 2000. 313p.

RÖSER, M.; JOHNSON, M.A.T.; HANSON, L. Nuclear DNA Amounts in Palms (Arecaceae). *Botanica Acta*, Stuttgart, v.110, n.1, p.79-89, 1997.

SANTOS, J.A. dos; NASCIMENTO, T.B.do. Efeito do substrato e profundidade de semeadura na emergência e crescimento de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 21, n.3, p.258-261, dez.1999.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Boletim: Produtos à base de açaí brasileiro já agregam versões em diferentes setores. SEBRAE, 2015, 9p.

SHIVANNA K.R.; JOHRI B.M. *The Angiosperm Pollen Structure and Function* (Willey Eastern Ltd. New Delhi), 1989.

SNUSTAD, P.D.; SIMMONS, M J. Inheritance of complex traits. *Principles of Genetics* (Snustad, P D and Simmons, M J eds.). John Wiley & Sons, New York. p. 91-115, 2000.

SOARES, T.L.; SILVA, S.O.; COSTA, M.A.P.C.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SOUZA, A.S.; LINO, L.S. M.; SOUZA, E.H.; JESUS, O.N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.8, p.111-118, 2008.

SOUSA, A.S.; SANTOS, M.G.M.; PELACANI, C.R.; SANTOS, F.A.R. Testing culture media for pollen germination of *Elaeis guineenses* Jacq. (oil palm, Arecaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.182, n.2, p.536-542, 2016.

SOUSA, V.A.; SCHEMBERG, E.A.; AGUIAR, A.V. Germinação in vitro do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). *Scientia Forestalis*, Piracicaba, v.38, n.86, p.147-151, 2010.

SOUZA M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo. *Ciência Agrotécnica*, Lavras. v.26, n.6, p.1209-1217, 2002.

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

SUNILKUMAR, K.; MATHUR, R.K.; SPARJAN BABU, D.S. Differential pollen longevity in Dura and Pisifera oil palm (*Elaeis guineensis*) fruit types at storage temperatures. Indian Journal of Agricultural Sciences v.87, n.7, p.893-8, 2017.

TOMLINSON, P.B. The structural biology of palms. Oxford: Clarendon Press, 460 p., 1990.

UHL, N.W.; DRANSFIELD, J. *Genera palmarum*. A Classification of Palms Based on the Work of Harold E. Moore, Jr. Lawrence: Allen Press, 610 p., 1987.

VAN SCHAIK, C.P.; TERBORGH, J.W.; WRIGHT, S.J. The phenology of Tropical Forests: Adaptive significance and consequences for primary consumers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 353-377, 1993.

WYSE JACKSON, P.S.; CRONK, Q.C.B.; PARNELL, J.A.N. Notes on a critically endangered palm from Mauritius, *Hyophorbe amaricaulis* Mart.. Botanic Gardens Conservation News, v1, n.6, p. 24-2, 1990.