

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



**“Florescimento e viabilidade do pólen de *Astrocaryum  
acaule* Mart. na Amazônia Ocidental”**

MANAUS - AM  
2020

JEKISTON DE SOUZA SILVA ANDRADE

**“Florescimento e viabilidade do pólen de *Astrocaryum  
acaule* Mart. na Amazônia Ocidental”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais - UFAM, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Florestais e Ambientais, área de concentração em Genética e Melhoramento Florestal.

ORIENTADORA: MARIA TERESA GOMES LOPES, Dra.

COORIENTADOR: RICARDO LOPES, Dr.

COORIENTADOR: MARCELO DOMINGUES MARTINS RAIZER. Dr.

MANAUS - AM

2020

### Ficha Catalográfica

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

A553f Andrade, Jekiston de Souza Silva  
Florescimento e viabilidade do pólen de *Astrocaryum acaule* Mart.  
na Amazônia Ocidental. / Jekiston de Souza Silva Andrade . 2020  
67 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes  
Coorientador: Ricardo Lopes  
Coorientador: Marcelo Domingues Martins Raizer  
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. hibridação. 2. polinização controlada. 3. armazenamento de  
pólen. 4. tucumã-í. 5. biologia floral. I. Lopes, Maria Teresa Gomes.  
II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais

JEKISTON DE SOUZA SILVA ANDRADE

FLORESCIMENTO E VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Astrocaryum acaule* Mart. NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

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 21 de outubro de 2020

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Drª. Maria Teresa Gomes Lopes  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Magno Sávio Ferreira Valente  
Instituto Federal do Amazonas

Profª. Drª. Ananda Virginia de Aguiar  
Embrapa Amazônia Ocidental



Documento assinado eletronicamente por **Maria Teresa Gomes Lopes, Professor do Magistério Superior**, em 21/10/2020, às 18:04, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mágnno Sávio Ferreira Valente, Usuário Externo**, em 21/10/2020, às 18:11, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ananda Virginia de Aguiar, Usuário Externo**, em 21/10/2020, às 20:29, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0343523** e o código CRC **CD8AF835**.



---

Av. General Rodrigo Octávio, 6200 - Bairro Coroado I Campus Universitário Senador Arthur Virgílio Filho, Setor Sul, Bloco FCA/ICB (Pós-Graduação), 2º andar - Telefone: (92) (92) 99128-6254  
CEP 69080-900 Manaus/AM - ppgcifa@ufam.edu.br

---

Referência: Processo nº 23105.036550/2020-46

SEI nº 0343523

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, por ser o único responsável desta e de qualquer conquista durante minha caminhada.*

*À minha família, por me dar suporte, apoio e por me dar a melhor orientação para traçar os caminhos dessa etapa.*

*À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de realização do mestrado.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais (PPGCIFA) em nome de todos professores (as) doutores (as) pela oportunidade e conhecimento fornecido.*

*Ao CNPq, pela concessão da bolsa para o desenvolvimento da pesquisa de mestrado;*

*À Professora Maria Teresa Gomes Lopes, pela oportunidade, orientação, apoio e incentivo nesta fase e por todo conhecimento compartilhado.*

*À Embrapa Amazônia Ocidental, por fornecer a estrutura para realização e desenvolvimento de experimentos de laboratório e atividades de campo, em nome do Dr. Ricardo Lopes e Dr. Marcelo Raizer, coorientadores e facilitadores dessa parceria.*

*À banca avaliadora pela disponibilidade em contribuir com esta pesquisa e pelas contribuições.*

*Aos colegas do Laboratório de Melhoramento Vegetal pelo apoio e contribuições no desenvolvimento da pesquisa.*

*E aos colegas que diretamente contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa: Pamela Harada, Marleson Tavares, Cibelle Azamora, Jennifer Tomaz, Macaulay Abreu e Alex Cysne.*

## RESUMO

A família Arecaceae possui grande diversidade e importância socioeconômica com espécies conhecidas por serem fornecedoras de produtos para diversos fins, como é o caso de *Astrocaryum acaule* Mart, palmeira amazônica que produz frutos consumidos pelas populações tradicionais da região. A caracterização da espécie quanto à biologia floral e viabilidade polínica gera conhecimentos que podem contribuir para a conservação e melhoramento genético da espécie. Os objetivos deste trabalho foram estudar o florescimento, viabilidade polínica e definir um método eficiente para coleta e armazenamento de pólen. Os eventos fenológicos foram acompanhados em 30 genótipos no período de 12 meses. Foi realizada a caracterização da biologia floral da espécie com acompanhamento dos eventos florais. Para o estudo da viabilidade polínica foi coletado pólen em inflorescências de cinco indivíduos da espécie. Foram testadas três soluções de corante para determinar a viabilidade polínica: Tetrazólio (0,1%), Cotton Blue (0,05 %) e Azul de Tripán (0,2 %) com avaliação do pólen por 360 dias. Foi determinado o meio de cultura ideal para a germinação do pólen e avaliada a germinação durante o mesmo período. As análises de fenologia e biologia floral foram expressas a partir de estatística descritiva e os dados de viabilidade polínica submetidos a análise de variância e ao teste Tukey quando houve diferença significativa, com o auxílio do Software Statistica. Os ciclos de floração anual ocorrem de junho a agosto e novembro a janeiro. Houve registro de frutificação em todos os meses, exceto em julho e agosto. A cronologia da antese ocorre no período de três dias seguidos com a fase feminina, intervalo entre fases e fase masculina. A espécie apresenta termogenia com variação de 3 °C da temperatura na inflorescência comparada com a temperatura ambiente. A viabilidade do pólen fresco foi considerada alta, sendo maior que 80% em todos os tratamentos. A maior porcentagem de germinação do pólen fresco ocorreu no meio de cultura com 100 g L<sup>-1</sup> de sacarose e adição de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (60,08%). Ao final do período de avaliação (360 dias), o pólen armazenado em temperaturas mais baixas (-20 °C e -80 °C) apresentaram maior viabilidade, com média superior a 60% pelo teste de Tetrazólio e 20% de germinação em meio de sacarose e cálcio desidratado. *A. acaule* tem dois ciclos anuais de floração e frutificação definidos, sendo os períodos de junho a agosto e novembro a janeiro os melhores para coleta do pólen e realização de cruzamentos. O corante Tetrazólio e o meio ágar com cálcio são os mais eficientes para análise da viabilidade e germinação de pólen. O pólen armazenado por 360 dias mantém maior viabilidade quando armazenado em baixas temperaturas.

**PALAVRAS-CHAVE:** hibridação, polinização controlada, armazenamento de pólen, tucumã-í, biologia floral.

## ABSTRACT

The Arecaceae family has great diversity and socioeconomic importance with species known to be suppliers of products for various purposes, such as *Astrocaryum acaule* Mart, an Amazonian palm tree that produces fruits consumed by the traditional populations of the region. The characterization of the specie in terms of floral biology and pollen viability generates knowledge that can contribute to the conservation and genetic improvement of the species. The objectives of this work were to study flowering, pollen viability and define an efficient method for collecting and storing pollen. Phenological events were monitored in 30 genotypes over a 12-month period. The characterization of the floral biology of the species was carried out with monitoring of floral events. For the study of pollen viability pollen was collected in inflorescences of five individuals of the species. Three dye solutions were tested to determine pollen viability: Tetrazolium (0.1%), Cotton Blue (0.05%) and Tripan Blue (0.2%) with pollen evaluation for 360 days. The ideal culture medium for pollen germination was determined and germination was evaluated during the same period. The analyzes of phenology and floral biology were expressed using descriptive statistics, and the pollen viability data submitted to analysis of variance and subjected to the Tukey test when there was a significant difference, with the help of the Statistica Software. The annual flowering cycles occur from June to August and November to January. There was a record of fruiting in all months, except in July and August. The anthesis chronology occurs in the period of three consecutive days with the female phase, interval between phases and the male phase. The species shows thermogenesis with a variation of 3 ° C in the temperature in the inflorescence compared to the ambient temperature. The viability of fresh pollen was considered high, being greater than 80% in all treatments. The highest percentage of germination of fresh pollen occurred in the culture medium with 100 g L<sup>-1</sup> of sucrose and addition of Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (60.08%). At the end of the evaluation period (360 days), pollen grains stored at lower temperatures (-20 ° C and -80 ° C) showed greater viability, with an average higher than 60% by the Tetrazolium test and 20% germination in sucrose and dehydrated calcium. *A. acaule* has two defined annual flowering and fruiting cycles, the periods from June to August and November to January being the best for collecting pollen and performing crosses. The Tetrazolium dye and the calcium agar medium are the most efficient for analyzing pollen viability and germination. Pollen stored for 360 days maintains greater viability when stored at low temperatures.

**KEYWORDS:** hybridization, controlled pollination, pollen storage, tucumã-í, floral biology.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **A)** População natural de *Astrocaryum acaule* existente na área de estudo. **B)** Indivíduo identificado para acompanhamento de avaliação. ....25
- Figura 2.** Medição de temperatura na inflorescência com o auxílio de um termômetro portátil. ....26
- Figura 3.** Morfometria de componentes florais de *A. acaule* **A)** Ráquillas. **B)** Inflorescência. **C)** Espatas e inflorescências. ....27
- Figura 4.** Lâminas preparadas para avaliação colorimétrica. **A)** Tetrazólio (0,1%). **B)** Cotton Blue (0,05 %). **C)** Azul de Tripán (0,2 %). ....28
- Figura 5.** Pólen armazenado para avaliação de viabilidade. ....30
- Figura 6.** Fenologia reprodutiva de *A. acaule* durante o período de 08/2019 a 07/2020. ....33
- Figura 7.** Dados de florescimento de *A. acaule* associados a precipitação do município de Manaus – AM (INMTE, 2020) durante o período de 08/2019 a 07/2020. ....34
- Figura 8.** Cachos e frutos secos de *A. acaule* .....35
- Figura 9.** Variabilidade morfológica de componentes florais de *A. acaule* **A)** Aspectos morfológicos da espata. **B)** Noção da amplitude de inflorescência e espata do maior e menor indivíduo avaliado. ....36
- Figura 10.** Componentes florais de *A. acaule* **A)** Espata e inflorescência aderidas em todo processo de floração. **B)** Disposição da inflorescência. **C)** Ráquillas da base, meio e ápice de inflorescências. **D)** Flores pistiladas localizadas na base das ráquillas. **E)** Flor pistilada. **F)** Flor estaminada. ....37
- Figura 11.** **A)** Espatas fechadas em indivíduo de *A. acaule* **B)** Processo de abertura longitudinal da espata. **C)** Espata no estágio final do processo de abertura. ....38
- Figura 12.** Sequência de eventos florais em *A. acaule* **A)** Flores pistiladas durante a fase feminina. **B)** Ráquillas com flores estaminadas abertas durante a fase

masculina. **C)** Espata recém aberta recebendo visitantes florais. **D)** Disposição de botões florais nas ráquila. **E)** Senescência das flores.....40

**Figura 13.** Termogenia de *A. acaule* durante a sequencia de eventos florais. ....42

**Figura 14.** Visitantes florais de *A. acaule* durante antese. **A, B e C)** Ordem Coleóptera. **D, E, F, G e H)** Ordem Hymenoptera.....43

**Figura 15.** Pólen de *A. acaule* **A)** Coloração com Tetrazólio (0,1%). **B)** Coloração com Azul de Tripán (0,2%). **C)** Coloração com Cotton Blue (0,05%).....44

**Figura 16.** Pólens de *A. acaule* germinados em meio sacarose + cálcio desidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).....48

**Figura 17.** Regressão linear de viabilidade dos grãos de pólen de *A. acaule* obtida com o uso de Tetrazólio (0,1%) nos 5 períodos de avaliação (0, 30, 90, 180 e 360 dias). **A)** Temperatura de -20 °C. **B)** Temperatura de -80 °C.....53

**Figura 18.** Regressão linear de germinação de *A. acaule* obtida com meio em ágar + ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) nos 5 períodos de avaliação (0, 30, 90, 180 e 360 dias). **A)** Temperatura de 3 °C **B)** Temperatura de -20 °C. **C)** Temperatura de -80 °C. . **Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Eventos da reprodução de *A. acaule* durante o período de 1 ano. Registros no período de 08/19 a 07/20. ....32
- Tabela 2.** Sequencia e cronologia de eventos florais de *A. acaule* .....39
- Tabela 3.** Parâmetros comparativos de biologia floral entre palmeiras do gênero *Astrocaryum*. ....41
- Tabela 4.** Parâmetros comparativos de termogenia entre palmeiras do gênero *Astrocaryum*. ....44
- Tabela 5.** Testes colorimétricos e médias de pólen no primeiro dia da antese em cinco indivíduos de *A. acaule* coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental. ....44
- Tabela 6.** Testes colorimétricos e médias de pólen no segundo dia da antese em cinco indivíduos de *A. acaule* coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental. ....45
- Tabela 7.** Testes colorimétricos durante os dias de eventos fenológicos em cinco indivíduos de *A. acaule* coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental. ....46
- Tabela 8.** Germinação de pólen de *A. acaule* em diferentes meios de cultura, de cinco indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental. ....48
- Tabela 9.** Médias colorimétricas de pólen de *A. acaule* após um mês de armazenamento, em diferentes temperaturas, de indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental. ....50
- Tabela 10.** Médias colorimétricas de pólen de *A. acaule* após três meses de armazenamento, em diferentes temperaturas, de indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental. ....50
- Tabela 11.** Médias colorimétricas de pólen de *A. acaule* após seis meses de armazenamento, em diferentes temperaturas, de indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental. ....51

**Tabela 12.** Médias colorimétricas de pólen de *A. acaule* após 1 (um) ano de armazenamento, em diferentes temperaturas, de indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental. ....51

**Tabela 13.** Análise do desdobramento da interação métodos colorimétricos x tempo de armazenamento para os valores da viabilidade polínica de *A. acaule* .....52

**Tabela 14.** Médias de germinação de pólen de *A. acaule* após um, três, seis e doze meses de armazenamento, em diferentes temperaturas, de indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental.....55

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1) Introdução .....   | 15 |
| 2) Objetivos .....  | 17 |
| 2.1. Objetivo geral .....   | 17 |
| 2.2. Objetivos específicos .....  | 17 |
| 3) Referencial teórico .....  | 18 |
| 3.1. Arecaceae .....  | 18 |
| 3.2. <i>Astrocaryum acaule</i> .....  | 19 |
| 3.2.1. Características gerais da espécie .....  | 19 |
| 3.2.2. Ecologia do tucumã-í .....   | 19 |
| 3.2.3. Morfologia floral.....   | 20 |
| 3.2.4. Termogênese .....  | 20 |
| 3.2.5. Polinização.....   | 21 |
| 3.2.6. Sistema reprodutivo e Florescimento .....  | 21 |
| 3.3. O grão de pólen .....  | 22 |
| 3.4. Viabilidade polínica .....   | 22 |
| 4) Material e Métodos.....  | 24 |
| 4.1. Área de estudo.....  | 24 |
| 4.2. Estudo dos eventos fenológicos.....  | 24 |
| 4.3. Floração, antese, liberação do pólen e termogênese.....  | 25 |
| 4.4. Componentes florais .....  | 26 |
| 4.5. Estudos de viabilidade polínica .....  | 27 |
| 4.5.1. Viabilidade do pólen fresco de <i>A. acaule</i> pelos métodos colorimétricos ..                      | 27 |
| 4.5.2. Germinação <i>in vitro</i> do pólen de <i>A. acaule</i> .....  | 29 |
| 4.5.2 Obtenção, armazenamento, beneficiamento do pólen e estudo da<br>viabilidade do pólen armazenado ..... | 30 |
| 5) Resultados e Discussão.....  | 32 |
| 5.1. Eventos fenológicos da espécie .....   | 32 |
| 5.2. Biologia Floral .....  | 36 |
| 5.2.1. Morfologia floral.....   | 36 |
| 5.2.2. Sequência dos eventos florais .....  | 38 |
| 5.2.3. Termogênese .....  | 42 |
| 5.3. Viabilidade de pólen fresco .....  | 44 |
| 5.3.1. Teste Colorimétrico .....  | 44 |
| 5.4.2. Germinação <i>in vitro</i> .....   | 47 |

|  |    |
|--|----|
| 5.5. Viabilidade de pólen armazenado ..... | 50 |
| 5.5.1. Teste Colorimétrico .....           | 50 |
| 5.5.2. Germinação <i>in vitro</i> .....    | 54 |
| 6) Conclusões .....                        | 58 |
| 7) Referências Bibliográficas.....         | 59 |

## 1) Introdução

Devido à grande biodiversidade, muitas espécies no Brasil, ainda não foram descobertas ou são pouco estudadas. Considerando tamanha diversidade biológica na Floresta Amazônica, encontra-se a Família Arecaceae, em que suas espécies são vulgarmente chamadas de “palmeiras” (LORENZI et al., 1996). Essa família é bastante conhecida devido suas espécies serem fornecedoras de alimentos, gorduras, óleos, ceras, essências e bálsamos. Existe, ainda, um grande uso desta família no paisagismo, por sua grande diversidade com relação ao tamanho e forma das folhas e pela aparência dos seus estipes (LORENZI et al., 1996; LEVERMANN, 2014; SOARES et al., 2014).

A família Arecaceae está distribuída no Brasil com cerca de 47 gêneros e 296 espécies, sendo o terceiro país do mundo considerando a diversidade de suas espécies; destacando o gênero *Astrocaryum* que possui 24 espécies nativas na Amazônia (FLORA DO BRASIL, 2020), sendo o terceiro gênero mais diversificado, depois de *Geonoma* e *Bactris*. Esse gênero recebe destaque tendo em vista suas potencialidades econômicas pela utilização dos frutos, fibras extraídas e de suas folhas (MARINHO; CASTRO, 2002) como é o caso de *Astrocaryum acaule* Mart. e *Astrocaryum aculeatum* Meyer, em que os frutos são consumidos por populações tradicionais na Amazônia, principalmente a polpa na forma fresca (RIBEIRO et al., 1999; REVILLA, 2000; MILLER, 2013). Na Região Norte, a partir dos anos 90, estabelecimentos comerciais começaram a comercializar sanduíches e tapiocas, além de doces e sorvetes derivados da polpa dos frutos *A. aculeatum* (REVILLA, 2000; YUYAMA et al., 2008).

*Astrocaryum acaule*, espécie conhecida no Amazonas como tucumã-í, é uma palmeira, frequentemente, encontrada no sub-bosque de terra firme da Amazônia, sendo seu habitat natural a região da Bacia do Amazonas, especialmente, no alto Rio Negro (RIBEIRO et al., 1999). Está, frequentemente, presente em áreas perturbadas (HENDERSON et al., 1995). Seus frutos são comumente consumidos na região pelas populações tradicionais, contendo altas concentrações calóricas (RIBEIRO et al., 1999). Apesar do possível potencial para produção sustentável de produtos decorativos, têxteis e domésticos a partir das fibras, poucos estudos são encontrados para esta espécie (SOUZA et al., 2004).

É essencial o conhecimento sobre a biologia floral de qualquer espécie para subvenção de todas as etapas de melhoramento genético, manejo, domesticação, relações com o ambiente e mecanismos de polinização (OLIVEIRA et al., 2003). O estudo sobre florescimento também é primordial para que a polinização controlada e/ou hibridação interespecífica tenha sucesso nas espécies a partir dos cruzamentos com o armazenamento de pólen e viabilidade polínica (BIONDO; BATTISTIN, 2001).

Os estudos que envolvem a viabilidade polínica de espécies são imprescindíveis, pois trazem um maior entendimento da biologia reprodutiva da espécie que podem ser aplicadas, principalmente, para o avanço no melhoramento genético (OLIVEIRA et al., 2009). Em outras palmeiras, se faz necessário a realização de polinizações controladas com a utilização de grãos de pólen com armazenamento sob baixas temperaturas para se ter sucesso nas hibridações, como acontece com espécies do gênero *Euterpe* (KARUN; SAJINI, 2010; MOURA et al., 2015; TAVARES, 2020).

Pesquisas sobre conservação e viabilidade de grãos de pólen em palmeiras, vem sendo realizadas com enfoque na produção de híbridos, a partir do pólen fresco e conservado sob baixas temperaturas (LÉDO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2001; SOUSA et al., 2010; TAVARES, 2020). A viabilidade do pólen é influenciada pela temperatura e umidade relativa do ar em função da dessecação do pólen, fatores genéticos e fisiológicos, além de que o pólen permanece viável por mais tempo em baixa temperatura (GANESHAN et al., 2008).

Desta forma, este estudo propõe definir a viabilidade dos grãos de pólen em *A. acaule* e a variação para características com relação a condições ambientais; além de informar o período adequado para coleta de pólen, tempo ótimo de armazenamento e conhecimento sobre os eventos fenológicos. Os resultados fornecerão informações para viabilizar a uso da espécie como doadora de genes em programas de obtenção de híbridos. Trabalhos de biologia de reprodução em *A. acaule* pode proporcionar avanços para a realização da hibridação interespecífica com *A. aculeatum* buscando a complementariedade para caracteres desejáveis em programas de melhoramento e conservação da espécie.



## **2) Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Determinar as fenofases reprodutivas da espécie e definir uma metodologia eficiente para coleta e armazenamento de pólen de *A. acaule*.

### **2.2. Objetivos específicos**

2.2.1. Determinar o período dos eventos fenológicos relacionados a floração e frutificação de *A. acaule*;

2.2.2. Descrever e registrar biologia floral da espécie;

2.2.3. Determinar a porcentagem de germinação do pólen fresco da espécie;

2.2.4. Estimar a viabilidade polínica após armazenamento do pólen *in vitro* da espécie.

### **3) Referencial teórico**

#### **3.1. Arecaceae**

A Floresta Amazônica é caracterizada pela alta diversidade biológica (RIBEIRO et al., 1999). Nessa tamanha diversidade, destaca-se um grupo popularmente conhecido como “palmeiras”, onde se enquadram plantas da família Arecaceae, muito conhecidas por fornecerem produtos provenientes de suas plantas, como alimentos, óleos, gorduras, essências, ceras, bálsamos e resina, além do potencial paisagístico (SANTELLI et al., 2006; DRANSFIELD et al., 2008).

A família Arecaceae, descrita anteriormente como Palmae é considerada um dos grupos mais antigos da terra sendo a única família da ordem Arecales (LORENZI et al., 2004) e faz parte de uma das maiores famílias de plantas do mundo, além de ser o segundo grupo das monocotiledôneas em importância econômica (RIBEIRO et al., 1999; ELIAS et al., 2015; ELIAS et al.; 2017) estando dividida em cinco subfamílias: Calamoideae, Nypoideae, Coryphoidae, Ceroxyloideae, Arecoideae, sendo que cada subfamília é composta por tribos e subtribos (DRANSFIELD et al., 2008).

É representada mundialmente por cerca de 2.522 a 2.700 espécies, reunidas em 240 a 252 gêneros (LORENZI et al., 2010; FLORA DO BRASIL, 2020). No Brasil, existem 47 gêneros e 296 espécies descritas (LEITMAN et al., 2013; FLORA DO BRASIL, 2020). Desse total, a região amazônica concentra 34 gêneros e 190 espécies (FLORA DO BRASIL, 2020). Almeida e Silva (1997) estimam que cerca de 40% da família Arecaceae é utilizada na região amazônica de alguma forma pelas comunidades locais, principalmente para fins de alimentação, habitação, medicina popular, ornamentação e confecção de artesanatos (SANTELLI et al., 2006).

Essa família apresenta espécies em sua maioria lenhosas (LORENZI et al., 2004), morfologia bastante variada e desenvolvimento caracterizado quanto à forma e aspecto (RIBEIRO et al., 1999). Suas raízes são cilíndricas, com distribuição subterrânea, sendo uma raiz principal distinguível. O caule é conhecido como estirpe e pode ser solitário ou múltiplo. As folhas possuem uma grande diversidade quanto ao tamanho, forma e divisão. As flores, geralmente, são consideradas pouco atraentes por serem muito pequenas e por não serem vistosas e coloridas (LORENZI et al., 2004). Os frutos das palmeiras são muito variáveis,

devido suas inúmeras características, que vão desde a cor, tamanho, forma, até sua textura. As sementes e frutos da maioria das palmeiras estão disponíveis o ano todo (BODMER; WARD, 2006) formados, basicamente por: epicarpo, mesocarpo e endocarpo (HARMS; DALLING, 2000) ricos em energia (BODMER; WARD, 2006) e utilizados como recursos para a sobrevivência de artrópodes, aves, roedores e outros animais (HARMS; DALLING, 2000).

### **3.2. *Astrocaryum acaule***

#### **3.2.1. Características gerais da espécie**

*A. acaule* é popularmente conhecida no Brasil, como tucumã-í (HENDERSON, 1995), tucumã-í da terra firme e tucumã-í da várzea (KAHN; MILLÁN, 1992). Existem vernáculos para a espécie, na Venezuela é conhecida como corozo e na Colômbia é conhecida como espina (HENDERSON, 1995). Integrada à subfamília Arecoideae e tribo Cocoeae (KAHN; MILLÁN, 1992).

Henderson et al. (1995) mostram que a espécie está distribuída principalmente no Brasil, porém, há ocorrência registrada na Guiana, Venezuela e Colômbia. No Brasil, existe maior ocorrência nos estados do Amazonas, Rondônia e Pará, sendo que no Amazonas, há grandes populações encontradas, facilmente, no baixo Rio Negro, ilhas fluviais, savanas, áreas degradadas, margens de estradas e baixios de floresta tropical úmida, com preferência por solos arenosos.

Palmeira caracterizada com estirpe solitária e subterrânea, raramente medindo acima de 1 metro, variando entre 5 a 9 folhas por indivíduo. Os frutos são consumidos por populações tradicionais amazônicas (HENDERSON et al., 1995), também, são utilizados como isca de peixe (KAHN; MILLÁN, 1992) e altamente apreciados por pequenos roedores, além da fauna em geral; as folhas oferecem fibras utilizadas por indígenas para diversos fins (LORENZI et al., 1996).

#### **3.2.2. Ecologia do tucumã-í**

Embora esteja distribuída comumente em áreas perturbadas, devido a dispersão do homem, as populações têm preferência aos solos arenosos e em áreas de baixio com solo encharcado para seu crescimento e desenvolvimento. Os

indivíduos maiores estão distribuídos nas populações em que o solo permanece maior tempo encharcado. Nas populações dessas áreas, ainda é possível notar que as folhas e espinhos são maiores e o pecíolo mais grosso que o encontrado comumente (ARAÚJO, 2005).

Os indivíduos em áreas abertas têm maior crescimento, pecíolo com coloração cinza e espinhos maiores, diferentemente de indivíduos localizados em áreas mais sombreadas, em que, o pecíolo apresenta coloração avermelhada e os espinhos, em sua grande maioria, são menores (ARAÚJO, 2005). Com relação às interações ecológicas, KÜCHMEISTER (1998) registrou uma grande variedade de insetos em todos os estágios da inflorescência.

### **3.2.3. Morfologia floral**

As inflorescências são interfolares, formando espigas retas, protegidas por brácteas, do tipo espatas, de coloração marrom, cercada de espinhos enegrecidos que ao se estenderem deixam cicatrizes. O eixo principal da inflorescência, denominada ráquis, termina em uma espiga de flores pistiladas, suportando as ráquias (ARAÚJO, 2005).

As flores pistiladas ficam na base, com 2 ou 3 flores por ráquila, intercaladas ou ladeadas por flores estaminadas. As flores masculinas estão distribuídas, em média, de 250 flores por ráquila, sendo mais numerosas que as flores femininas, constituídas de três sépalas, três pétalas, anteras e deiscência rimosa (ARAÚJO, 2005).

As flores pistiladas, apesar de em menor número, são maiores que as estaminadas, possuindo três sépalas pequenas e três pétalas maiores formando uma cúpula que cobre o ovário. Há alguns espinhos pequenos e cera cobrindo a superfície externa das pétalas vestigiais (ARAÚJO, 2005).

Para o processo de formação dos frutos, são considerados desde o início do lançamento de espata, sua abertura, antese, deiscência até a formação dos frutos. Da formação até o amadurecimento dos frutos, o tempo varia de 140 a 160 dias, sendo acrescidos, em média, mais 20 dias para a dispersão (ARAÚJO, 2005).

### **3.2.4. Termogênese**

Muitas espécies tem o odor como principal modo de atração de insetos coleópteros nas flores. Essa produção de calor pelas flores é conhecida como termogênese, onde a elevação da temperatura nas flores intensifica a volatilização do odor (KUCHMEISTER et al., 1998). O odor das flores, intensificado pelo processo de termogênese, atraem os insetos que encontram nas flores alimento, proteção e local para reprodução (OLIVEIRA, 2012).

Palmeiras do gênero *Astrocaryum*, bem como algumas outras espécies da família Arecaceae emitem forte odor que é intensificado pela termogênese. Este fenômeno altera a temperatura nas inflorescências, causado pela grande concentração de flores, gerando a volatilização de substâncias químicas e alta atividade fisiológica, considerando como fator primordial para a atração de insetos o odor (KUCHMEISTER et al., 1998).

### **3.2.5. Polinização**

As flores de *A. acaule* produz forte odor após o início da antese, ocorrendo ainda com as flores fechadas e indo até o início da senescência das flores. As flores femininas produzem um odor adocicado e desagradável e o odor das flores masculinas se assemelha ao odor de trigo envelhecido (KÜCHMEISTER et al., 1998).

Há uma grande visitação de insetos que podem ser observados durante toda antese. Eles são atraídos pelo odor produzido pelas flores desde a abertura da espata até a deiscência de flores. Dentre os visitantes, destaca-se a presença de coleópteros que possuem sua quantidade intensificada com o aumento da temperatura no período noturno. As abelhas também podem ser vistas durante o dia, porém, no segundo dia, sua ocorrência se intensifica na inflorescência (KÜCHMEISTER et al., 1998).

### **3.2.6. Sistema reprodutivo e Florescimento**

São registrados pelo menos dois ciclos anuais para a espécie, sugerindo que a espécie pode apresentar ciclos reprodutivos correlacionados a precipitação local. É possível encontrar entre novembro e março, floração e frutificação acontecendo

comitantemente, sendo janeiro, o melhor mês para encontrar indivíduos com espatas fechadas, até frutos maduros (KUSHMEISTER, 1998; ARAÚJO, 2005).

A dispersão de sementes foi registrada por Araújo (2005) entre os meses de fevereiro e maio. O lançamento de espatas e o período de florescimento coincidem com os meses de menor precipitação. As flores em antese são mais comuns em períodos de temperatura mais elevada e o processo de frutificação e dispersão é recorrente nos meses em que há maior precipitação.

### **3.3. O grão de pólen**

O grão de pólen abriga o gametófito masculino de vegetais superiores (MOORE; WEBB, 1978), estabelecendo um elo de geração em geração e assegurando a perpetuação das espécies. A fecundação do gameta masculino e gameta feminino realiza a reprodução sexual, caracterizando o início da polinização (KRICHEVSKY et al., 2007). O grão de pólen é formado dentro das anteras, e compreende dois eventos: a microsporogênese e a microgametogênese (HORNER; PALMER, 1995).

Na microsporogênese, o grão de pólen presente nos sacos polínicos sofre meiose e dá origem a formação de um micrósporo haploide (RODRIGUES et al., 2004). No processo de microgametogênese, o micrósporo sofre uma divisão mitótica, que resulta no núcleo reprodutivo e núcleo germinativo. Logo após a divisão ocorre uma segunda divisão mitótica envolvendo núcleo germinativo. Esta divisão dá origem às células espermáticas (SANTOS; ZANETTINI, 2002).

Os grãos de pólen podem variar de 15 a 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro com relação ao seu tamanho e forma em angiospermas e gimnospermas (RAYNOR et al., 1966). Características morfológicas, como: aberturas e estruturas são de suma importância para identificação dos grãos de pólen (ERDTMAN, 1986) e as análises de morfologia polínica são imprescindíveis para diferentes ciências (CANCELI et al., 2006).

### **3.4. Viabilidade polínica**

A viabilidade polínica é uma medida bastante utilizada para monitorar o pólen armazenado, tal medida pode garantir a fecundação, tornando possível também o cruzamento entre genótipos de interesse, de acordo com a finalidade do cruzamento. Estudos sobre viabilidade polínica fornecem subsídios cruciais para o processo de hibridação nos programas de melhoramento. (FERREIRA et al., 2007). A viabilidade do pólen pode ser determinada através de métodos diretos (PIO et al., 2007) e indiretos (FERREIRA et al., 2007).

Dentro dos métodos diretos, encontra-se a germinação *in vitro*, onde o meio de cultura induz a germinação do tubo polínico simulando condições favoráveis ao pólen. Uma das grandes limitações é que a necessidade e complexidade das espécies são altas, o que requer meios de culturas específicos de acordo com as exigências da espécie para se obter boa germinação (FERREIRA et al., 2007). Como método indireto, tem-se o uso de corantes para trazer uma estimativa de grãos de pólen viáveis, permitindo obter melhor entendimento sobre a integridade das estruturas (MENCK et al., 1990).

Existem muitas complexidades quanto ao estudo da viabilidade polínica, pois, técnicas inadequadas de coleta, transporte, extração e armazenamento de pólen podem trazer danos à estrutura do pólen, comprometendo sua viabilidade e dificultando possível produção de híbridos (MENCK et al., 1990; SIREGAR, 2000). Para assegurar maior longevidade, o pólen deve ser armazenado em baixas temperaturas e teor de umidade reduzido (PIO et al., 2007).

## **4) Material e Métodos**

### **4.1. Área de estudo**

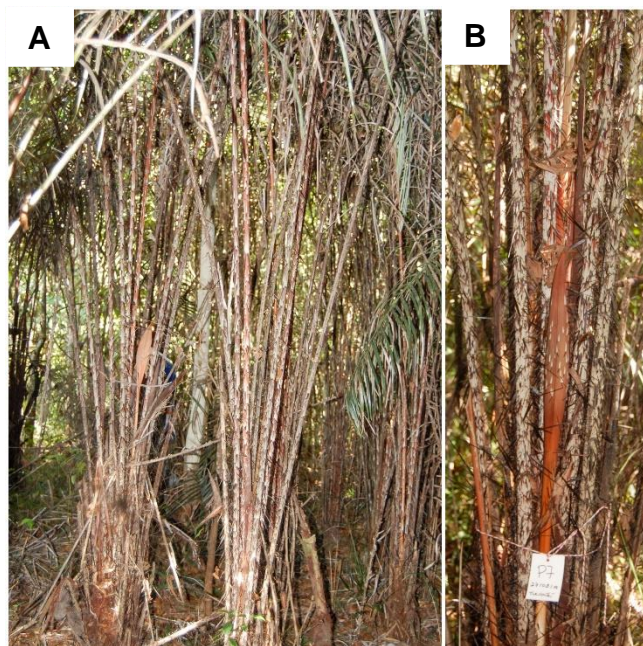
Os estudos foram conduzidos em duas unidades experimentais, uma na Embrapa Amazônia Ocidental - EMBRAPA e a outra na área de Floresta do Campus da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. A coleta de dados para avaliação do pólen fresco e armazenamento *in vitro* ocorreu no Campo Experimental do Rio Urubu (CERU), localizado no município de Rio Preto da Eva - AM, aproximadamente 62 km de Manaus, entre as coordenadas geográficas de latitude 2°26'49.70" S, longitude 59°33'43" O. O estudo da biologia reprodutiva e testes de viabilidade do pólen fresco e armazenado foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Campo Experimental da Sede (CES) da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no município de Manaus - AM, entre as coordenadas geográficas de latitude 2°53'29,14" S, longitude 59°58'39,90" O. A avaliação de estudos fenológicos de *A. acaule* ocorreu em um trecho de floresta de baixo da UFAM, localizada na zona leste da cidade de Manaus, entre as coordenadas geográficas de latitude 3°07'.50" S, longitude 59°57.00" O, onde ocorre densa população da espécie.

### **4.2. Estudo dos eventos fenológicos**

Os eventos fenológicos foram caracterizados a partir da observação em campo da ocorrência das inflorescências e, posteriormente em laboratório. Essa caracterização teve como base o referencial de literatura desenvolvido por Henderson (1995) e Dransfield (1987). Utilizando-se para determinação de eventos fenológicos, máquina fotográfica digital e microscópio estereoscópio.

Foram acompanhados 30 indivíduos de *A. acaule* para os registros fenológicos (Figura 1). A presença de evento reprodutivo foi o principal parâmetro escolhido para a seleção e marcação dos indivíduos que passaram a ser acompanhados.





**Figura 1. A)** População natural de *A. acaule* existente na área de estudo. **B)** Indivíduo identificado para acompanhamento de eventos fenológicos.

Foram realizadas duas avaliações fenológicas mensalmente em um período de 12 meses, com exceção dos meses de abril/2020, maio/2020 e junho/2020, em que ocorreu 1 (uma) avaliação mensal. Foram acompanhadas duas fenofases: floração - desde a visualização das espatas fechadas, inflorescência (pré-antese, antese e pós-antese) até a queda das flores; frutificação - subdividida em cachos verdes, cachos maduros e cachos secos.

Os dados obtidos pela coleta foram expressos em porcentagens e analisados a partir de estatística descritiva no Software Statistica (HILBE, 2007), onde foram calculados os valores envolvendo a média, os valores mínimo e máximo e o coeficiente de variação (CV).

#### **4.3. Floração, antese, liberação do pólen e termogênese**

O tempo de floração foi acompanhado, diariamente, em 10 indivíduos da espécie a partir de uma inflorescência por indivíduo. Sendo observada, diariamente, em cada bráctea, a sucessão dos eventos de floração, como: o tempo utilizado pela bráctea até o início da antese das flores femininas, duração da fase masculina, a existência ou não de intervalo entre as fases de floração e a duração da fase

masculina, expressos em dias. A floração total encontrada, envolveu o somatório das fases feminina e masculina, como também o intervalo de fases.

A avaliação da termogênese ocorreu em cinco indivíduos no período de floração total, em que eram medidos a temperatura ambiente e temperatura na inflorescência a cada duas horas, com o auxílio de um termômetro portátil Minitherm HI 8751 (Figura 2).



**Figura 2.** Medição de temperatura na inflorescência com o auxílio de um termômetro portátil.

Os dados obtidos pela coleta foram processados e analisados a partir de estatística descritiva no Software Statistica (HILBE, 2007), onde foram calculados os valores envolvendo a média, os valores mínimo e máximo e o coeficiente de variação (CV).

#### **4.4. Características florais**

As características florais foram ilustradas e descritas a partir da coleta das espatas, inflorescências e flores de 10 indivíduos, para posterior mensuração, com o auxílio de fita métrica e paquímetro (Figura 3) de todos os componentes florais. Esses foram ilustrados, descritos e analisados de acordo com a estatística descritiva (HILBE, 2007).



**Figura 3.** Morfometria de componentes florais de *A. acaule*. **A)** Ráquilas. **B)** Inflorescência. **C)** Espatas e inflorescências.

#### 4.5. Estudos de viabilidade polínica

##### 4.5.1. Viabilidade do pólen fresco de *A. acaule* pelos métodos colorimétricos

Para a avaliar a viabilidade polínica foram testadas três soluções de corantes: Tetrazólio (0,1%) (LAKON, 1949), Cotton Blue (0,05 %) (NICOLSON, 1959) e Azul de Tripán (0,2 %) (HAYMAN, 1970). A visualização do padrão de coloração em microscópio estereoscópico foi baseada na metodologia de Cysne et al. (2015).

A coleta de material foi realizada em todos os dias da antese, sendo selecionadas cinco indivíduos da espécie, retirada uma ráquilla de cada indivíduo e preparada uma amostra (quatro anteras) em cada lâmina, totalizando 3 lâminas por método.

Após cobertas, as lâminas com as anteras foram maceradas com atrito por leve compressão da lamínula para liberação dos grãos de pólen. Posteriormente foram retirados os resíduos das anteras e acrescentado uma gota de solução do corante de cada método colorimétrico homogeneizando-a e cobrindo novamente com a lamínula e identificando cada uma das lâminas (Figura 4).

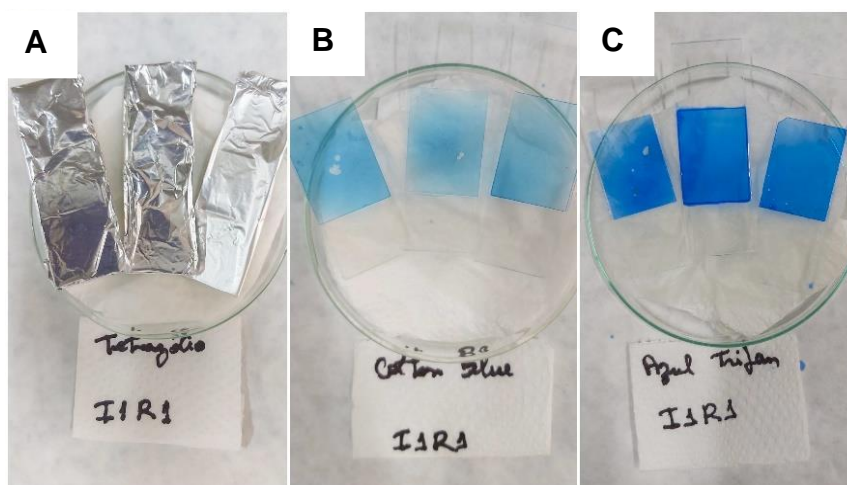
As lâminas preparadas com a solução de Tetrazólio (0,1%) foram cobertas com papel alumínio e colocadas dentro de uma incubadora biológica (B.O.D.) por

2 horas, em temperatura de  $37 \pm 3$  °C, em câmara úmida (placa de Petri com papel umedecido) (Figura 4A). Essa técnica permite que os grãos de pólen viáveis sejam corados em tons de rosa e os não viáveis fiquem incolores, pois o pólen fica corado devido a plena atividade enzimática dos tecidos vivos.

As lâminas com teste de coloração Cotton Blue (0,05 %) foram colocadas dentro de uma incubadora biológica (B.O.D.) por 30 minutos, em temperatura de  $37 \pm 3$  °C, em câmara úmida (placa de Petri com papel umedecido) (Figura 4B). Os grãos de pólen viáveis foram corados de azul e não viáveis, incolores, pois o pólen fica corado devido a plena atividade enzimática dos tecidos vivos.

As lâminas com o teste colorimétrico Azul de Tripán (0,2%) foram colocadas em câmara úmida (placa de Petri com papel umedecido) e deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos (Figura 4C). Os grãos de pólen corados em azul foram considerados inviáveis e os pouco corados, ou não corados, considerados viáveis, pois essa técnica permite a coloração do tecido morto do grão de pólen.

As lâminas foram avaliadas em estereomicroscópio Leica S8 APO, equipado com microcâmara (Nikon Digital Sight DS-Fi1) para digitalização das imagens. Foram contados 200 grãos por lâmina. A porcentagem de pólen viável foi obtida calculando o número de grãos viáveis dividido pelo número de grãos contados e multiplicado por 100.



**Figura 4.** Lâminas preparadas para avaliação colorimétrica. **A)** Tetrazólio (0,1%). **B)** Cotton Blue (0,05 %). **C)** Azul de Tripán (0,2 %).

O delineamento experimental e estatístico utilizado para o método colorimétrico do pólen fresco foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial 3 (corantes) x 5 (genótipos), totalizando quatro repetições por lâmina para cada dia de antese avaliada, sendo a unidade experimental, uma lâmina. 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 software Estatística (HILBE, 2007).

#### **4.5.2. Germinação *in vitro* do pólen de *A. acaule***

Para a germinação do pólen *in vitro* foram testados três meios de cultura utilizando meio ágar ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), um preparado com  $50 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, o segundo com os mesmos componentes adicionando  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e o terceiro adicionando  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Os tratamentos foram definidos a partir de resultados obtidos em estudos realizados com pólen a partir de outras espécies (SOUSA, et al., 2010; MOURA, 2015; MENDEZ; ACMA, 2018; ABREU, 2019; TAVARES, 2020).

Com o auxílio de um Becker, o meio de cultura foi preparado com adição dos componentes de acordo com as concentrações de cada meio, sendo a solução aquecida em forno microondas até a dissolução completa dos componentes. Em cada tratamento foi utilizado 60 mL de meio, sendo dividido 20 mL em cada placa de Petri, totalizando três placas por tratamento. Após o resfriamento e solidificação do meio de cultura em placa petri, o pólen foi aspergido sobre o meio com auxílio de uma alça de drigalski, e em seguida, incubado em B.O.D à temperatura de  $37 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante o período de 4 horas.

Após a incubação, foi contabilizado o número de pólenes germinados com o auxílio de estereomicroscópio Leica S8 APO. Considerando grão de pólen germinado quando o tubo polínico alcançou comprimento igual ou maior ao diâmetro do pólen (CYSNE et al., 2015). As placas de petri foram divididas em quatro campos e, em cada campo de maneira aleatória foram contabilizados 100 grãos de pólen (germinados e não germinados), totalizando 400 grãos de pólen por placa, evitando contabilizar as bordaduras, onde há menor concentração de pólen.

O delineamento experimental e estatístico utilizado para o método de germinação do pólen fresco foi o inteiramente casualizado com três tratamentos (meio de cultura) e 4 repetições, sendo a unidade experimental, uma placa de petri. Os dados da viabilidade de germinação polínica foram submetidos à análise de variância no software Estatística (HILBE, 2007) e quando observada diferença significativa entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

#### 4.5.2 Obtenção, armazenamento, beneficiamento do pólen e estudo da viabilidade do pólen armazenado

Foi coletado uma inflorescência de cinco indivíduos durante a antese de flores masculinas, colocadas em sacos e transportadas ao laboratório para armazenamento e testes de viabilidade do pólen armazenado. As inflorescências foram colocadas em bandejas de alumínio e em seguida, levadas para estufa para retirada da umidade durante 24 horas a  $37 \pm 3$  °C. Após esse período, todas as flores foram retiradas para uma leve compressão para liberação do pólen. O material foi colocado sob peneira para separar resíduos e pólen.

Os grãos de pólen foram também armazenados em eppendorfs hermeticamente fechados, para utilização de uma amostra por período de armazenamento (Figura 5). Foram considerados três temperaturas: geladeira a 3° C, freezer a -20° C e ultra-freezer a -80° C e quatro períodos de armazenamento: um, três, seis e doze meses de conservação.



Figura 5. Pólen armazenado para avaliação de viabilidade.

Quando feita a análise para os testes de viabilidade, os grãos de pólen armazenados foram colocados para hidratar em câmara úmida por duas horas à 37° C e, após a hidratação, foram adotadas as mesmas metodologias aplicadas para pólen fresco, tanto para os métodos colorimétricos, como para germinação *in vitro*, com adaptações, permanecendo os testes colorimétricos utilizando corante Tetrazólio e Azul de Tripán e para avaliação de germinação com dosagem de 300 mg L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O.

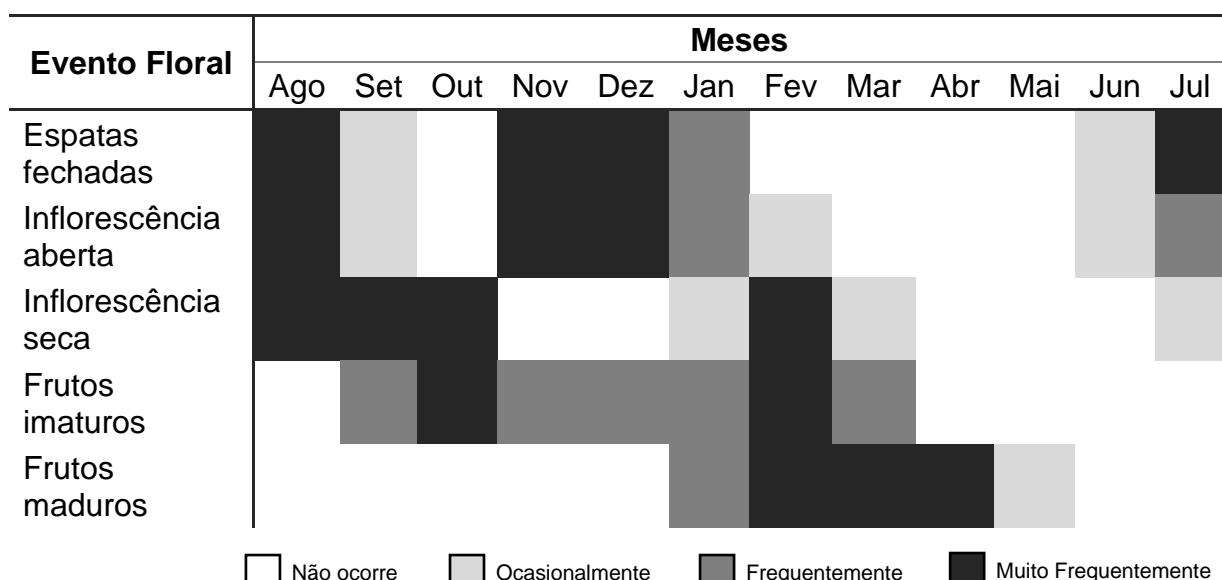
O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 3x3x5 com três métodos colorimétricos, três temperaturas de armazenamento e cinco períodos de avaliação, para análise do método colorimétrico, e arranjo fatorial 3x5 para germinação *in vitro* (três temperaturas de armazenamento e cinco períodos de avaliação), com três repetições para cada método. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando houve diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de teste t (t, p<0,05) no software Statistica (HILBE, 2007).

## 5) Resultados e Discussão

### 5.1. Eventos fenológicos da espécie

*Astrocaryum acaule* é uma espécie que apresentou dois eventos de floração por ano, de acordo com o presente estudo. O primeiro ciclo ocorre de junho a agosto, onde para este estudo, todos os indivíduos monitorados floresceram (n=30). O segundo evento ocorreu de novembro a janeiro, onde 96,7% dos indivíduos avaliados floresceram. O período com maior ocorrência de inflorescências abertas foi registrado no mês de dezembro. Em fevereiro e outubro, foram registrados os maiores índices de infrutescências verdes e, no período de fevereiro a abril, o pico de frutos maduros (Tabela 1).

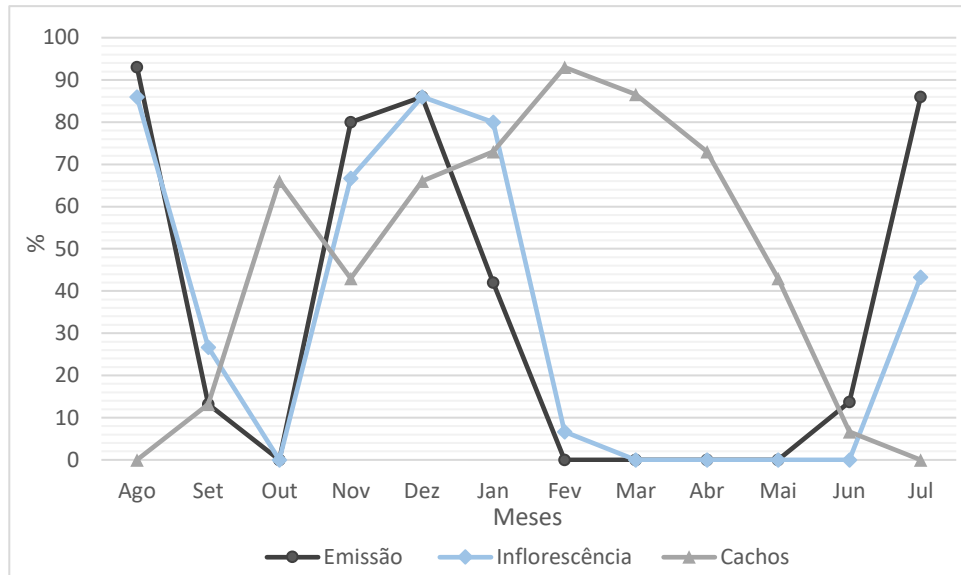
**Tabela 1.** Eventos da reprodução de *A. acaule* durante o período de 1 ano. Registros no período de 08/19 a 07/20.



O primeiro ciclo se inicia com a ocorrência de espatas fechadas entre os meses de junho e agosto e se encerra entre os meses de janeiro e abril com a ocorrência de frutos maduros em dispersão. As espatas fechadas do segundo ciclo são encontradas de novembro a janeiro e os frutos maduros, deste ciclo, ocorrem entre os meses de março a maio. É possível encontrar fases dos dois ciclos ocorrendo, simultaneamente, entre os meses de novembro e fevereiro. O mês de janeiro é o momento mais propício para encontrar todas as fases dos eventos fenológicos. Houve frutificação durante todo período de monitoramento, exceto nos

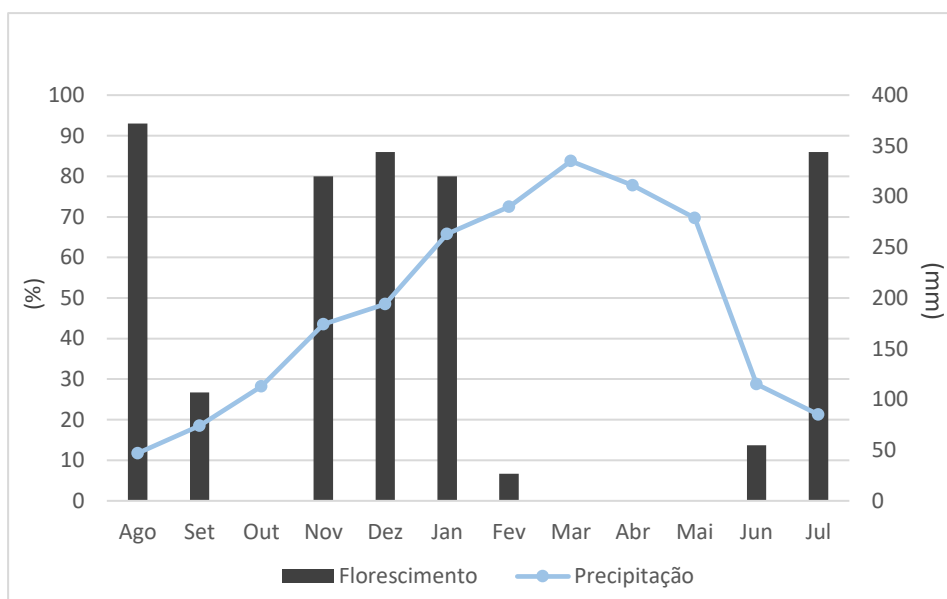


meses de julho e agosto (Figura 6). Um estudo realizado na Reserva Duque mostrou que os dois ciclos de *A. acaule* têm relação com a precipitação e temperatura do município de Manaus (KÜCHMEISTER, 1998).



**Figura 6.** Fenologia reprodutiva de *A. acaule*. durante o período de 08/2019 a 07/2020.

O início do ciclo, considerando desde a ocorrência de espatas fechadas até espatas em pós antese ocorre nos meses em que a precipitação é menor e o fim do ciclo, em períodos de maior precipitação. As espatas com flores abertas ocorrem em períodos de temperatura mais elevada na região, sugerindo que a presença de espatas pode ocorrer continuamente entre os meses de junho a janeiro (Figura 7).



**Figura 7.** Dados de florescimento de *A. acaule*, associados a precipitação do município de Manaus – AM (INMTE, 2020) durante o período de 08/2019 a 07/2020.

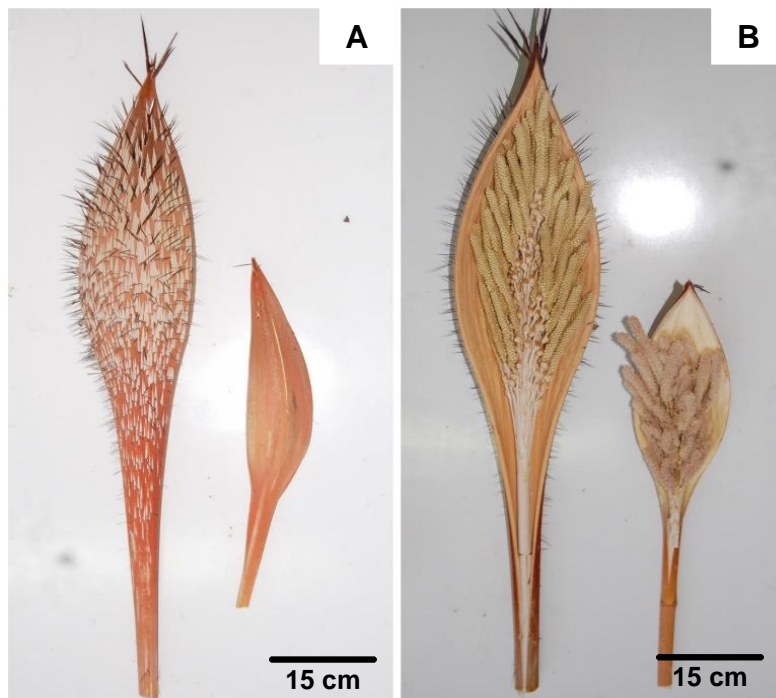
Estudos realizados com *A. aculeatum* (GENTIL 2005; LEITÃO, 2008; VASCONCELOS, 2010) mostraram que são encontradas inflorescências entre os meses de julho e janeiro, revelando cenário parecido com a dinâmica de floração encontrado para *A. acaule* neste estudo. Adicionalmente, estudos da fenologia de *A. aculeatum*, espécie do mesmo gênero, revelou que o florescimento coincide com o período de outras espécies do gênero (*A. sciophilum*, *A. gynacathum* e *A. murumuru*), sugerindo que polinizadores do gênero *Astrocaryum* procurem palmeiras de outros gêneros para se alimentar do pólen em período em que não há floração das espécies do gênero (BACELAR-LIMA, 2004). A coincidência de florescimento e a presença de polinizadores naturais comuns entre as espécies de *Astrocaryum* evidenciam a possibilidade de hibridação interespecífica natural no gênero que precisa ser investigada adequadamente.

Dos 30 indivíduos avaliados, todos apresentaram ocorrência do sistema reprodutivo nos dois ciclos anuais, exceto 1 (um) indivíduo que apresentou ocorrência somente no primeiro ciclo. Quatro indivíduos lançaram até três espatas no mesmo ciclo. Os outros indivíduos avaliados tiveram entre uma e duas espatas lançadas por ciclo. Todos os indivíduos apresentaram formação de frutos, porém a maioria dos frutos secaram antes do período de dispersão. Insetos e larvas da ordem Diptera podem estar associados ao ataque dos frutos de indivíduos de *A. acaule* (KÜCHMEISTER, 1998), o que justificaria a ocorrência de cachos secos em decorrência do ataque de insetos (Figura 8).



**Figura 8.** Cachos e frutos secos de *A. acaule*.

Os indivíduos avaliados apresentaram variações consideráveis quanto às características morfológicas (Figura 9), que variaram desde o tamanho da estirpe até à forma dos componentes florais, como as espatas e inflorescências. As espatas apresentaram comprimento médio de 40,3 cm ( $n= 5$ ;  $\text{min}= 18,9$ ;  $\text{max}= 64,3$ ;  $\text{dp}= 15,6$ ) e largura média de 11,8 cm ( $n= 5$ ;  $\text{min}= 9,3$ ;  $\text{max}= 16,1$ ;  $\text{dp}= 2,48$ ). Araújo (2005) mostrou que espatas de *A. acaule* quando abertas medem aproximadamente comprimento médio de 59,7 cm e largura média de 13,2 cm, o que demonstra variabilidade consequentemente no tamanho das inflorescências e na quantidade de frutos.



**Figura 9.** Variabilidade morfológica de componentes florais de *A. acaule*. **A)** Aspectos morfológicos da espata. **B)** Noção da amplitude de inflorescência e espata do maior e menor indivíduo avaliado.

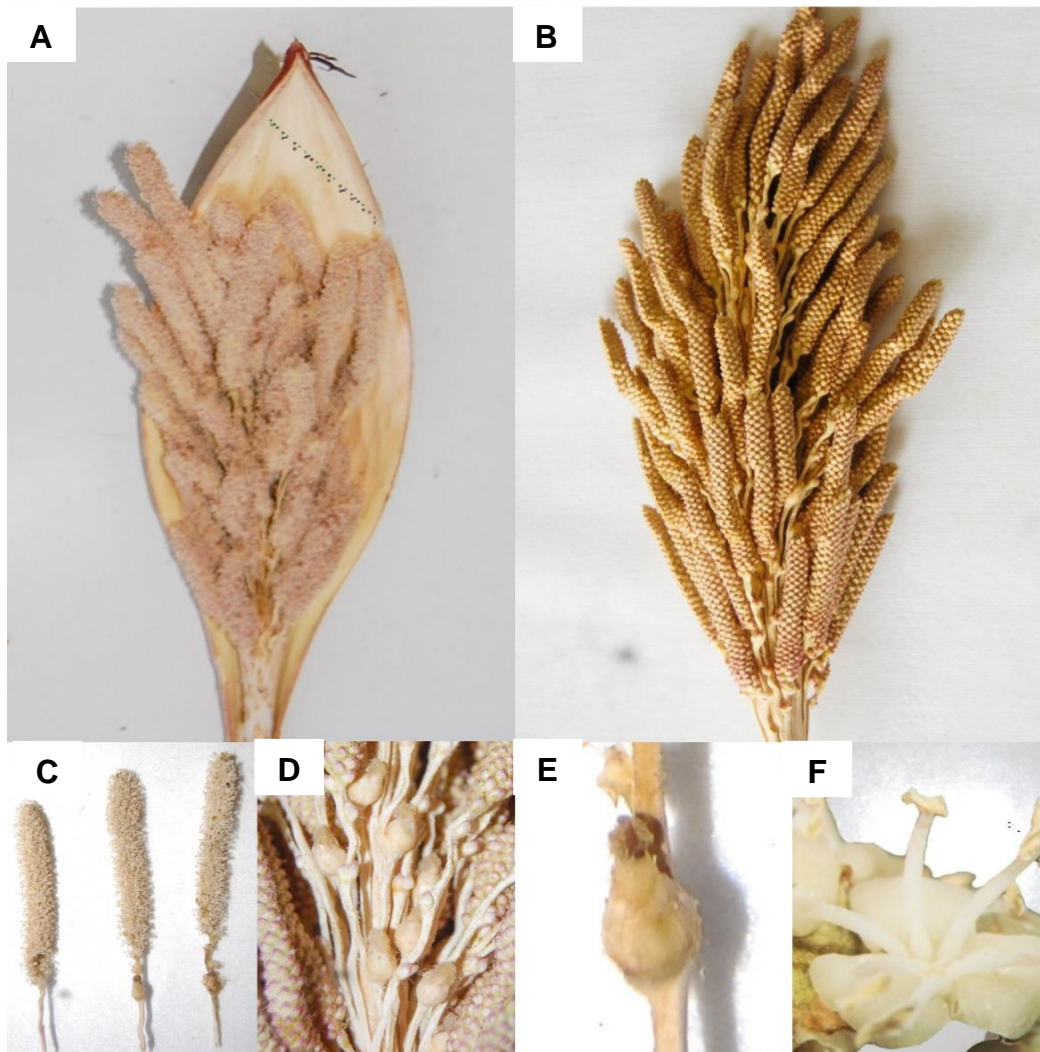
As variações quanto à morfologia da espécie, como as encontradas no presente trabalho, podem estar relacionadas às diferenças com relação à quantidade de luz obtida pelos indivíduos de populações e à textura dos solos higromórficos, onde comumente são encontradas populações de tucumâ-í (KAHN; MILLÁN, 1992). As variações de morfologia são comuns em espécies de palmeiras, tendo em vista, que a distribuição dos indivíduos em ambientes complexos e com variações espaciais, podem contribuir para a criação de micro-ambientes com diferença na disponibilidade de recursos, como luminosidade, nutrientes, dentre outros (SYENNING, 2001).

## 5.2. Biologia Floral

### 5.2.1. Morfologia floral

A inflorescência de *A. acaule* (Figura 10 A e B) é pedunculada, interfoliar e apresenta tamanho médio de 24,6 cm (n=10). Essas são envolvidas por bráctea do tipo espata, provida de espinhos em toda superfície externa protegendo a inflorescência durante todo processo reprodutivo (Figura 9). As inflorescências tem em média 58 ráquias (n=10) com comprimento variando em 17,3 cm e 34,2 cm

(Figura 10C). As flores unissexuadas se dispõem em ráquulas, sendo na base das ráquulas de um a três flores pistiladas (Figura 10D e E), estimando 58 a 174 flores pistiladas por inflorescência. As flores estaminadas são numerosas em cada ráquila, com média de 213 flores por ráquila, estimadas em 12.586 flores por inflorescência, ocupando cerca de 2/4 de cada ráquila. As flores estaminadas são constituídas de três pétalas, três sépalos e seis estames (Figura 10F).

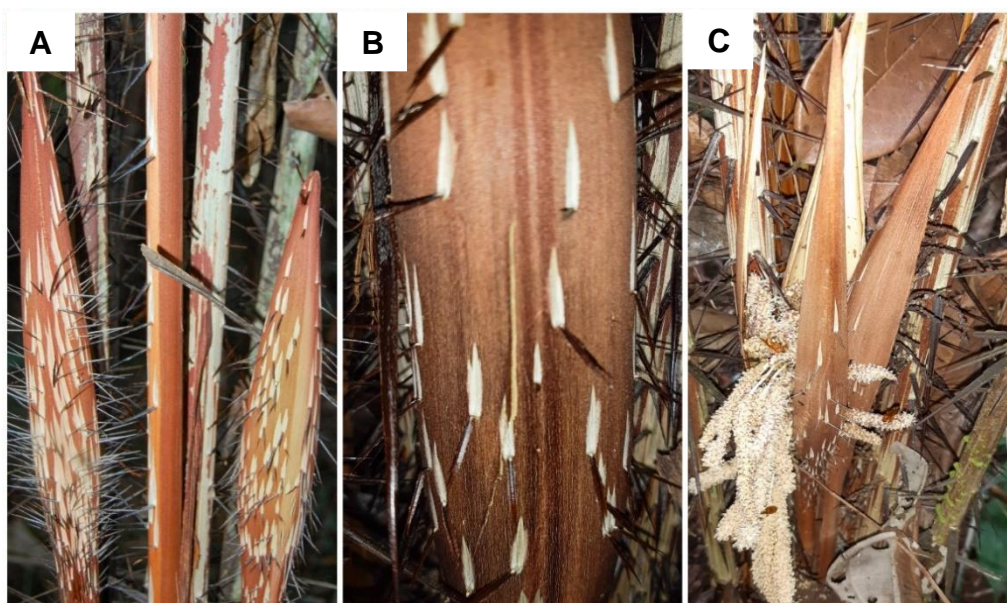


**Figura 10.** Componentes florais de *A. acaule*. **A)** Espata e inflorescência aderidas em todo processo de floração. **B)** Disposição da inflorescência. **C)** Ráquulas da base, meio e ápice de inflorescências. **D)** Flores pistiladas localizadas na base das ráquulas. **E)** Flor. **F)** Flor.

Araújo (2005) estudando a morfologia e inflorescência das flores na espécie, também mostrou que as inflorescências surgem da região interfoliar por espatas cobertas de espinhos. O autor mostrou que um eixo principal da inflorescência dá suporte às ráquias, onde estão distribuídas as flores pistiladas (base), em número de dois ou três, e de flores estaminadas, essas em maior número (2/4 de cada ráquila). Tanto as flores pistiladas quanto as estaminadas são constituídas de três sépalas e três pétalas. Outros estudos no gênero, avaliando a morfologia floral de *A. aculeatum*, mostraram componentes florais com dimensões muito maiores, quando comparados a *A. acaule*, ráquis com 1,4 a 6,4 m de comprimento, inflorescências interfoliares chegando até 2 m de comprimento, estimativa de 432 ráquias com flores unissexuais, sendo de 500 a 1.200 flores pistiladas e cerca de 190.000 a 260.000 flores estaminadas.

### 5.2.2. Sequência dos eventos florais

A cronologia da antese ocorre no período de três dias seguidos. A espata desenvolve-se até se tornar intumescida (Figura 11A), gerando uma fenda longitudinal (Figura 11B), onde ocorre a sua abertura (Figura 11C). Em cinco indivíduos foi acompanhado a abertura de espata onde os registros ocorreram entre às 10:00 e 16:00 horas. A espata permaneceu ligada à inflorescência durante toda antese.



**Figura 11. A)** Espatas fechadas em indivíduo de *A. acaule*. **B)** Processo de abertura longitudinal da espata. **C)** Espata no estágio final do processo de abertura.

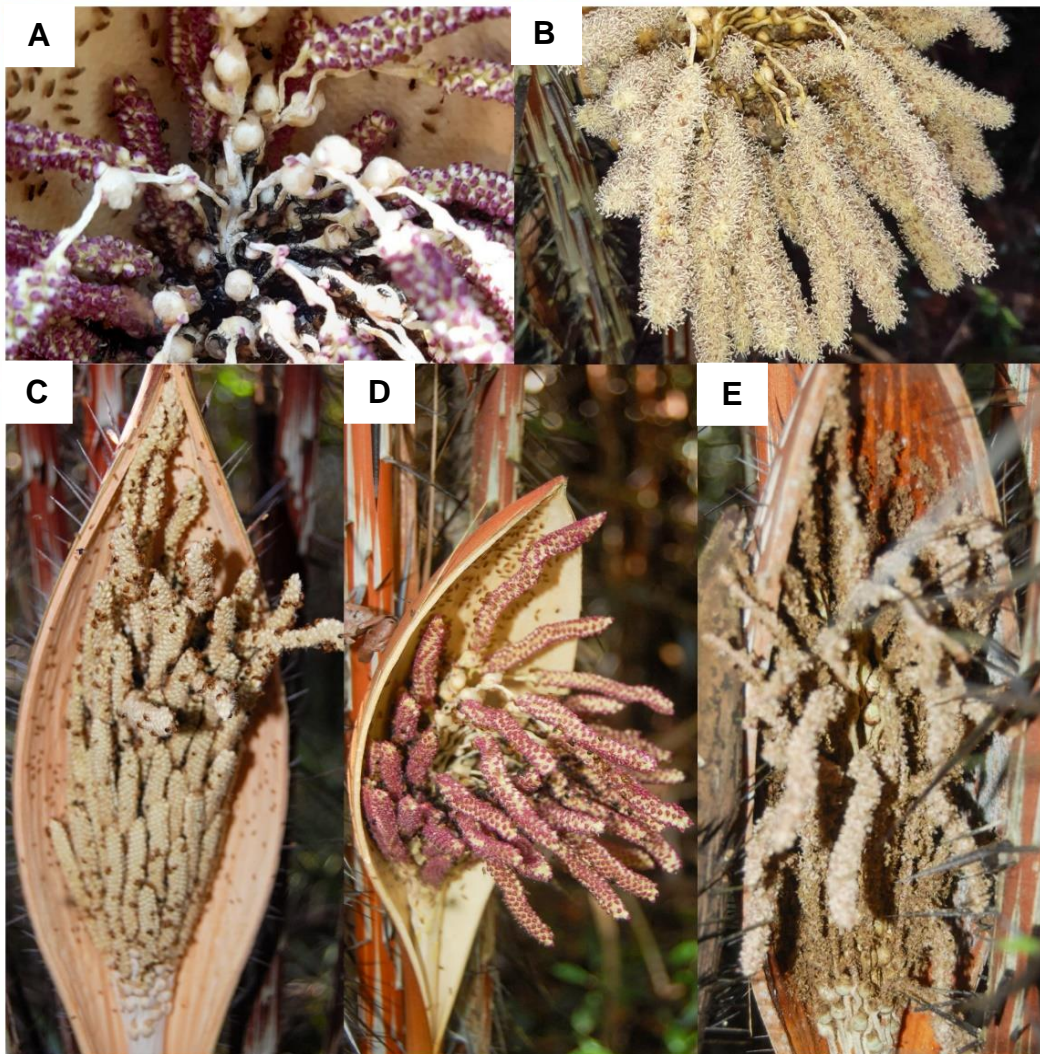
No mesmo dia da abertura da espata, inicia-se a fase feminina na inflorescência. As flores pistiladas apresentam coloração creme e três estigmas dispostas na base das ráquila. Os registros mostraram que a fase feminina se inicia entre às 18:00 e 20:00 horas e as flores ficam abertas até o amanhecer (6:00 e 7:00 horas), totalizando cerca de 12 horas de fase feminina. Após isto, o estigma das flores pistiladas resseca, deixando as flores com coloração em tom marrom.

Há um intervalo de aproximadamente 12 horas entre as fases feminina e masculina, onde é possível notar a presença de insetos nos botões florais e na espata durante todo o dia (Figura 12C). No segundo dia de antese, ocorre o início da fase masculina (Figura 12B), onde todas as flores estaminadas se abrem simultaneamente entre às 18:00 e 22:00 horas. O pólen começa a ser liberado entre duas e três horas após o início de abertura das flores. As flores continuam durante toda fase recebendo a visita de insetos (Figura 14), principalmente os coleópteros.

A fase masculina ocorre até o amanhecer do terceiro dia dos eventos de antese quando, enfim, começa a senescência das flores entre 18:00 e 20:00 horas, totalizando entre 12 e 15 horas de fase masculina, sendo gerado um forte odor durante toda fase. Nesse momento, parte das flores ficam com um tom envelhecido e parte delas começa a cair (Figura 12E). Boa parte das flores só começa a cair com o passar dos dias. A Tabela 2 mostra a cronologia da antese e sequência dos eventos florais da espécie.

**Tabela 2.** Sequência e cronologia de eventos florais de *A. acaule*.

| EVENTOS / DIA                 | 1° DIA |   |    |    | 2° DIA |   |    |    | 3° DIA |   |    |    |    |
|-------------------------------|--------|---|----|----|--------|---|----|----|--------|---|----|----|----|
|                               | 0      | 6 | 12 | 18 | 0      | 6 | 12 | 18 | 0      | 6 | 12 | 18 | 24 |
| <b>Fase Feminina</b>          |        |   |    |    |        |   |    |    |        |   |    |    |    |
| <b>Intervalo de Fases</b>     |        |   |    |    |        |   |    |    |        |   |    |    |    |
| <b>Fase Masculina</b>         |        |   |    |    |        |   |    |    |        |   |    |    |    |
| <b>Odor</b>                   |        |   |    |    |        |   |    |    |        |   |    |    |    |
| <b>Senescência das flores</b> |        |   |    |    |        |   |    |    |        |   |    |    |    |



**Figura 12.** Sequência de eventos florais em *A. acaule*. **A)** Flores pistiladas durante a fase feminina. **B)** Ráquias com flores estaminadas abertas durante a fase masculina. **C)** Espata recém aberta recebendo visitantes florais. **D)** Disposição de botões floais nas ráquila. **E)** Senescência das flores.

Comportamentos semelhantes de biologia floral e cronologia da antese foram encontrados em outras espécies do gênero *Astrocaryum* (Tabela 3). As espécies desse gênero são monóicas, com inflorescências bissexuais, protoginia e a cronologia da antese ocorre, aproximadamente, ao longo de três dias, com fase estaminada noturna. Algumas diferenças também são encontradas. Em *A. aculeatum* e *A. vulgare* (BACELLAR-LIMA, 2006; OLIVEIRA et al., 2003), por exemplo, há sobreposição de fases, o que não ocorre em *A. gynacanthum* (KUCHMEISTER et al., 1998), *A. Mexicanum* (Burguez et al., 1987) e em *A. acaule*, neste estudo.

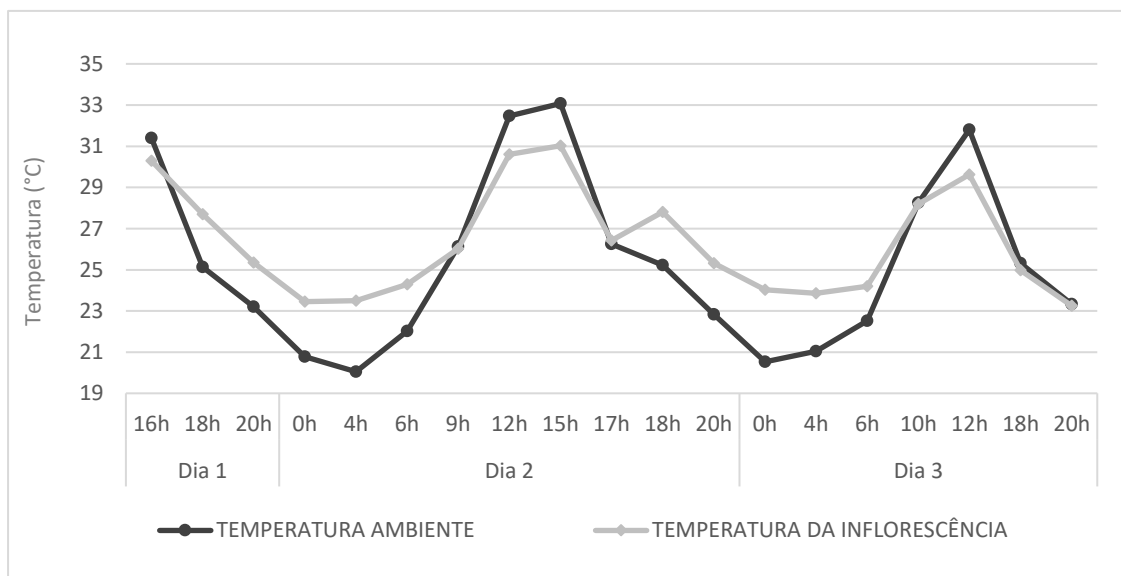


**Tabela 3.** Resultados de biologia floral de espécies do gênero *Astrocaryum* comparadas à *A. acaule*.

| <b>Características</b>          | <i>A. mexicanum</i><br>(Burquez et al. 1987) | <i>A. gynacanthum</i><br>(Kukmeister et al. 1998) | <i>A. vulgare</i><br>(Oliveira et al. 2003) | <i>A. aculeatum</i><br>(Bacelar-Lima, 2006) | <i>A. acaule</i><br>(No presente estudo) |
|---------------------------------|--|---|---|---|--|
| <b>Cronologia da antese</b>     | 2 dias                                       | 3 dias  | 3 dias                                      | 3 dias                                      | 3 dias                                   |
| <b>Fase feminina</b>            | Noturna/Alvorecer                            | Diurna  | Diurna                                      | Noturna/Alvorecer                           | Noturna                                  |
| <b>Fase masculina</b>           | Noturna                                      | Noturna   | Noturna                                     | Noturna                                     | Noturna                                  |
| <b>Intervalo entre as fases</b> | 15 horas<br>(aproximadamente)                | 24 horas<br>(aproximadamente)                     | 24 – 36 horas<br>(aproximadamente)          | 12 horas<br>(aproximadamente)               | 12 – 15 horas<br>(aproximadamente)       |
| <b>Sobreposição de fases</b>    | Não  | Não   | Sim   | Sim   | Não                                      |
| <b>Monoiccia</b>                | Sim  | Sim   | Sim   | Sim   | Sim                                      |
| <b>Protoginia</b>               | Sim  | Sim   | Sim   | Sim   | Sim                                      |

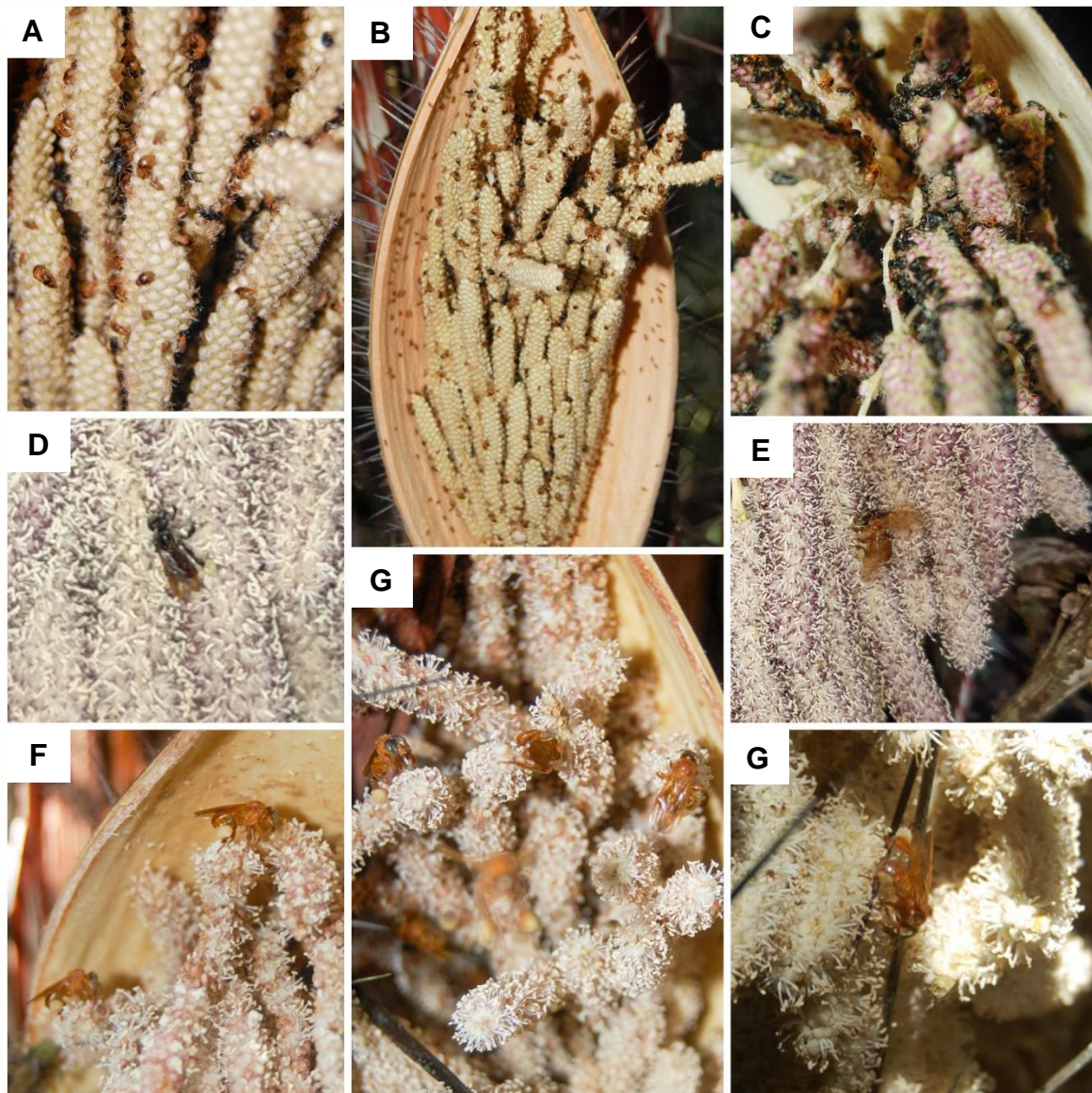
### 5.2.3. Termogênese

Foi verificada a termogênese na espécie durante os três dias que ocorrem a antese na inflorescência. Os cinco indivíduos acompanhados apontaram aumento da temperatura nas inflorescências de 2° C a 3,4° C com relação a temperatura ambiente (Figura 13). As variações de temperatura aconteceram no período noturno nas duas primeiras noites da antese, sendo que as maiores diferenças de temperatura foram observadas entre às 18:00 e 06:00 horas da manhã.



**Figura 13.** Termogênese de *A. acaule*. durante a sequência de eventos florais.

Durante toda antese, foi observado um forte odor, intensificando-se durante os períodos em que houve registro do aumento da temperatura na inflorescência quando comparada à temperatura do ambiente. Em todo período de antese houve presença de insetos da ordem Coleóptera (Figura 14A, B e C), porém nos momentos de maior registro de variação na temperatura, ou seja, no período noturno, a presença desses insetos foi intensificada. Também foram encontrados visitantes florais de Hymenoptera (Figura 14D, E, F e G) nas inflorescências no período diurno.



**Figura 14.** Visitantes florais de *A. acaule*. durante antese. **A, B e C)** Ordem Coleóptera. **D, E, F, G e H)** Ordem Hymenoptera.

Em estudos de avaliação de termogenia em outras três espécies de *Astrocaryum* foi encontrado variação de temperatura durante os eventos de antese. Em *A. aculeatum* (BACELLAR-LIMA, 2004) e *A. gynacanthum* (KUCHMEISTER et al., 1998) a variação de temperatura chegou a 6° C, e o maior registro de aumento de temperatura ocorreu em *A. mexicanum* (BURQUEZ et al., 1987) com variação de 13,8° C.

**Tabela 4.** Parâmetros comparativos de termogenia entre palmeiras do gênero *Astrocaryum*.

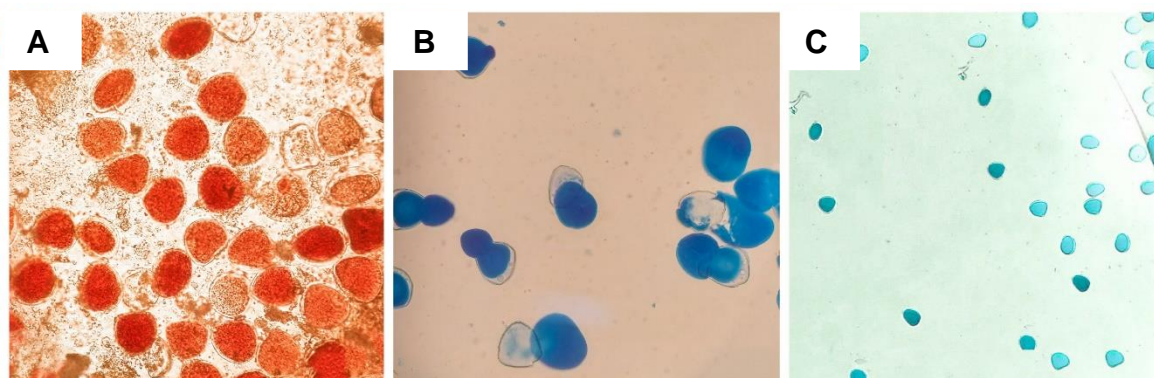
| <i>Espécie</i>                                    | <i>Termogênese</i> | <i>Diferença de Temperatura (Espata x Ambiente)</i> |
|---|--------------------|---|
| <i>A. mexicanum</i><br>(Burquez et al. 1987)      | Sim                | 13 °C   |
| <i>A. gynacanthum</i><br>(Kukmeister et al. 1998) | Sim                | 6 °C  |
| <i>A. aculeatum</i><br>(Bacelar-Lima, 2004)       | Sim                | 6 °C  |
| <i>A. acaule</i><br>(No presente estudo)          | Sim                | 3 °C  |

### 5.3. Viabilidade de pólen fresco

#### 5.3.1. Teste Colorimétrico

A análise variância de viabilidade polínica mostrou que houve diferença significativa entre os corantes testados, onde os métodos de coloração Tetrazólio (0,1%) (Figura 15A) e Azul Tripán (0,2%) (Tabela 5 e Figura 15B) mostraram viabilidade polínica de 76,87% e 76,07%, respectivamente, sendo os mais eficientes. O corante Cotton Blue (0,05%) (Figura 15C) foi o menos eficiente, representando 62,53% de pólen corado no primeiro dia de antese da espécie. Não houve diferença entre os genótipos avaliados.

**Tabela 5.** Testes colorimétricos e médias de pólen no primeiro dia de antese em cinco indivíduos de *A. acaule* coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental.



**Figura 15.** Pólen de *A. acaule*. **A)** Coloração com Tetrazólio (0,1%). **B)** Coloração com Azul de Tripán (0,2%). **C)** Coloração com Cotton Blue (0,05%).

| Método colorimétrico                 | Média de pólen viável (%) – 1° dia de antese |         |         |      |         | Eficiência do método |
|--------------------------------------|--|---------|---------|------|---------|----------------------|
|                                      | G1   | G2      | G3      | G4   | G5      |                      |
| <b>Tetrazólio (0,1%)</b>             | 74,5   | 77,5    | 76,5    | 73,5 | 78,36   | 76,87 A              |
| <b>Azul de Tripan (0,2%)</b>         | 74,03  | 83,66   | 76,34   | 81   | 69,34   | 76,07 A              |
| <b>Cotton Blue (0,05%)</b>           | 58   | 52      | 61      | 71   | 70,67   | 62,53 B              |
| <b>Desempenho por genótipo Média</b> | 66,02 a                                      | 67,83 a | 68,67 a | 76 a | 70,01 a |                      |

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

No segundo dia de antese, os resultados da análise de variância como mostra na Tabela 6, mostram viabilidade maior que 80% com os corantes testados, não apresentando diferença na eficiência entre os tratamentos testados. Todos genótipos apontaram desempenho similar, mostrando que para este estudo o genótipo não apresentou influência sobre as análises de viabilidade.

**Tabela 6.** Testes colorimétricos e médias de pólen no segundo dia da antese em cinco indivíduos de *A. acule* coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental.

| Método colorimétrico           | Média de pólen viável (%) – 2° dia de antese |         |         |         |         | Eficiência do método |
|--------------------------------|--|---------|---------|---------|---------|----------------------|
|                                | G1   | G2      | G3      | G4      | G5      |                      |
| <b>Tetrazólio (0,1%)</b>       | 89,50  | 90,34   | 90,00   | 87,67   | 92,17   | 89,94 A              |
| <b>Azul de Tripan (0,2%)</b>   | 90,67  | 86,00   | 87,34   | 90,34   | 87,50   | 88,37 A              |
| <b>Cotton Blue (0,05%)</b>     | 79,67  | 78,84   | 86,17   | 87,34   | 76,00   | 81,60 A              |
| <b>Desempenho por genótipo</b> | 85,17 a                                      | 82,42 a | 86,76 a | 88,84 a | 81,75 a |                      |

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Comparando as análises colorimétricas quanto a viabilidade polínica durante a cronologia da antese (Tabela 7), é possível notar que o segundo dia de antese se mostrou o mais adequado para viabilidade do pólen fresco a partir de métodos colorimétricos. O corante Tetrazólio (0,1%) no segundo dia obteve índice de 89,94% de pólenes viáveis, mesmo com maior porcentagem, todos os valores encontrados não diferem entre si, exceto o teste com Cotton Blue (0,05%) com aplicação no primeiro dia, o menos eficiente (62,53%).

**Tabela 7.** Testes colorimétricos durante os dias de eventos fenológicos em cinco indivíduos de *A. acaule* coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental.

| Método colorimétrico  | Dia     |         |
|-----------------------|---------|---------|
|                       | 1       | 2       |
| Tetrazólio (0,1%)     | 76,87 a | 89,94 a |
| Azul de Tripan (0,2%) | 76,07 a | 88,37 a |
| Cotton Blue (0,05%)   | 62,53 b | 81,60 a |
| Média                 | 71,83 B | 86,64 A |

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Ressalta-se que o método Azul Tripan (0,2%) realiza a coloração de pólen inviáveis e na análise de um campo ótico, a porcentagem de viabilidade polínica foi calculada considerando-se a relação de pólen que não apresentaram coloração azul escuro, do número de pólen total (corados e não corados). Visualmente essa metodologia Azul (Tripan - 0,2%) permitiu uma clara discriminação entre os tipos de pólen, assim como Tetrazólio (0,1%), o qual por outro lado cora somente pólen viáveis.

Segundo Menck et al. (1990), um método colorimétrico eficiente para avaliar a viabilidade de pólen, permite relacionar as estruturas do gameta masculino de acordo com cada corante e que a escolha do método colorimétrico mais eficiente não pode ser tomada somente de forma quantitativa. Os autores ressaltam que o corante mais eficaz vai identificar maior contraste entre o pólen viável e inviável foram os métodos Azul de Tripan (0,2%) e Tetrazólio (0,1%). Esses corantes também podem ser considerados adequados para discriminar a viabilidade de pólen em *A. acaule*.

O corante Cotton Blue (0,05%) não se mostrou adequado para estudos em pólen de *A. acaule*. Abreu (2019) estudando a viabilidade polínica de *E. oleracea*, espécie também pertencente à família das palmeiras, mostrou a existência de diferença quanto ao poder discriminatório das metodologias usando os mesmos métodos de coloração aos do presente trabalho. Para esse autor Cotton Blue (0,05%) foi a metodologia mais eficiente para estudo de viabilidade polínica em *E. oleracea*. O autor sugeriu também que o método de teste colorimétrico e diferentes genótipos influenciam nos resultados. Os resultados de viabilidade polínica para *E.*

*oleracea* variaram de 64,01% (Azul de Tripan 0,2%) a 93,49% (Cotton Blue 0,05%) do pólen fresco (ABREU, 2019).

Oliveira et al. (2001) estudaram a viabilidade polínica de *E. oleracea* com o uso de Cotton Blue (0,05%) e verificaram altos valores de porcentagem de viabilidade do pólen fresco. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho para pólen de segundo dia do florescimento de *A. acaule* com os métodos de coloração Tetrazólio (0,1%) (89,94%) e Azul de Tripan (0,2) (88,37%). Oliveira et al. (2001) avaliaram tanto a viabilidade do botão floral que variou de 73,6% a 94,8%; como para as flores recém-abertas, que apresentaram valores de 85,6% e 98,3% de grãos de pólen viáveis.

Para a espécie *E. guianensis* Jacq., a viabilidade polínica utilizando o Azul de Tripan, apresentou porcentagens que variaram de 81% a 91%, com média de 87,8% (SOUZA, 2016). Mesmo com tal variação, as taxas de viabilidade polínica não apresentaram diferença significativa entre as amostras em teste estatístico, diferindo dos resultados encontrados para *A. acaule*.

#### **5.4.2. Germinação *in vitro***

Para germinação do pólen fresco (Figura 16) o único meio de cultura com dados representativos foi o meio utilizando  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  com 60,08% do pólen germinado. Os meios em  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e em ágar registraram índices muito baixos (0,7% e 8,02%) para germinação (Tabela 8). Os resultados *in vitro* na literatura são poucos para esta espécie, portanto estudos mais específicos com diferentes concentrações para estes meios são necessários.



**Figura 16.** Pólen de *A. acaule* germinados em meio sacarose + cálcio desidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

**Tabela 8.** Germinação de pólen de *A. acaule* em diferentes meios de cultura, de cinco indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental.

| Meio de Germinação                                   | Média de pólen fresco germinado (%) |         |         |         |        | Eficiência do meio |
|--|-------------------------------------|---------|---------|---------|--------|--------------------|
|  | G1                                  | G2      | G3      | G4      | G5     |                    |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 60,33                               | 58,75   | 68      | 53,25   | 60,05  | 60,08 A            |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                              | 0,42                                | 0,7     | 2       | 0,75    | 0      | 0,07 B             |
| Sacarose   | 6                                   | 1,5     | 10,33   | 9,75    | 12,56  | 8,02 B             |
| <b>Desempenho por genótipo</b>                       | 22,25 a                             | 20,23 a | 26,78 a | 21,25 a | 24,2 a |                    |

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Em outros trabalhos com a utilização de palmeiras são encontrados diferentes métodos para contagem de pólen. Oliveira et al. (2001) utilizaram a contagem de 500 grãos em genótipos de *E. oleracea* e em *E. guianensis* Jacq, Sousa et al. (2016) contabilizaram apenas 100 grãos para cada repetição do experimento. Para *S. romanzoffiana* Cham, Sousa et al. (2010) contabilizaram 200 grãos de pólen.



Assim como para a germinação *in vitro* de *A. acaule*, Abreu (2019) encontrou maior eficiência com o uso do meio de cultura com cálcio (média de 69,48%) mostrando ser mais eficiente quando comparado ao meio sem cálcio (média de 19,54%) para a germinação *in vitro* de *E. oleracea*. Moura et al. (2015) encontraram eficiência parecida para *C. nucifera* (66,87%). Outros estudos registraram valores de germinação *in vitro* para caiué de 73,1% e para dendê 84,8% (CHIA et al., 2009), variando entre 53,4% a 75,8% para germinação do dendezeiro (CYSNE, 2015).

Estudos de germinação *in vitro* como os realizados para *A. acaule* são complexos, pois existem variações intrínsecas da espécie com relação às condições ambientais, de processamento e de conservação do pólen após retirada das anteras. Pio et al (2007) sugeriram que o excesso e/ou deficiência dos constituintes do meio, associado à temperatura e umidade, podem causar o aumento da pressão osmótica e a redução na resistência da parede celular, o que resulta no rompimento dos grãos de pólen, impossibilitando sua germinação.

O acréscimo do cátion de cálcio como o efetivado para *A. acaule* contribui para a polarização do citoesqueleto e das fibras de actina, no crescimento na região central no sentido apical do tubo polínico e na movimentação de organelas a partir de fibras de miosina (KIRKBY; RÖMHELD, 2007; CAI et al., 2015). Esse componente atua no intumescimento do tubo polínico, proporcionando sua ruptura e liberação das células espermáticas para fecundação, e também atua positivamente, no indicativo do vigor de germinação polínica para estudos de biologia reprodutiva (HEPLER; WINSHIP, 2015).

O teste de coloração com Tetrázólio (0,1%) forneceu a melhor estimativa para viabilidade do pólen fresco (89,94%), superando a germinação com meio de cultura utilizando cloreto de cálcio desidratado (60,08%), No entanto, vale ressaltar que os corantes superestimam a viabilidade do grão de pólen, tendo em vista que essa metodologia aponta pólenes viáveis e não, necessariamente, germinados. Por outro lado, a germinação *in vitro* subestima, devido não fornecer as condições naturais do estigma, as quais o pólen teria de fato para germinação. Os dois métodos, enfim, podem se complementar para aplicações deste tipo estudo.

## 5.5. Viabilidade de pólen armazenado

### 5.5.1. Teste Colorimétrico

O corante Tetrazólio apresentou os melhores índices (Tabela 9) para a avaliação de um mês do pólen germinado em todas as temperaturas avaliadas (78,95%, 88,67% e 87,71%) e o corante Azul de Tripan, os menores índices, 3° C (66,54%) e -20° C (66,92%). Após um mês de armazenamento, o corante com Tetrazólio se mostrou mais eficiente com relação ao corante Azul de Tripan. O pólen armazenado em temperaturas mais baixas obteve melhor rendimento para os dois métodos colorimétricos, sendo a temperatura de -80 °C a mais eficiente para os dois corantes. Mesmo com diferença significativa, todos os métodos apresentaram viabilidade maior que 60%.

**Tabela 9.** Médias colorimétricas de pólen de *A. acaule* após um mês de armazenamento, em diferentes temperaturas, de indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental.

| Método colorimétrico              | Temperatura (°C) |         |         |
|-----------------------------------|------------------|---------|---------|
|                                   | 3 °C             | -20 °C  | -80 °C  |
| <b>Tetrazólio (0,1%)</b>          | 78,95 a          | 88,67 a | 87,71 a |
| <b>Azul de Tripan (0,2%)</b>      | 66,54 b          | 66,92 b | 75,04 a |
| <b>Média por temperatura (°C)</b> | 72,75 A          | 77,79 A | 81,38 A |

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Após armazenamento de três meses, o pólen com a utilização do corante Tetrazólio apresentou maior viabilidade polínica, ressaltando que em temperaturas mais baixas, a viabilidade foi maior que 79%. O corante Azul de Tripan em temperatura 3° C, mostrou a menor viabilidade para esta avaliação com 58,79% (Tabela 10).

**Tabela 10.** Médias colorimétricas de pólen de *A. acaule* após três meses de armazenamento, em diferentes temperaturas, de indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental.

| Método colorimétrico              | Temperatura (°C) |         |         |
|-----------------------------------|------------------|---------|---------|
|                                   | 3 °C             | -20 °C  | -80 °C  |
| <b>Tetrazólio (0,1%)</b>          | 71,29 ab         | 82,38 a | 79,88 a |
| <b>Azul de Tripan (0,2%)</b>      | 58,79 c          | 69,17 b | 66,32 b |
| <b>Média por temperatura (°C)</b> | 65,04 B          | 75,77 A | 73,10 A |

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

O corante Tetrazólio apresentou os melhores índices para a avaliação de seis meses do pólen germinado (Tabela 11) em -80° C (78,33%) e -20° C (72,58%) e o corante Azul de Tripan, o menor índice em 3° C (62,29%). Mesmo após seis meses, o teste aponta viabilidade polínica maior que 60%. Para este tudo, também é possível observar que o pólen armazenado em baixas temperaturas tende a apresentar melhores índices de viabilidade com o passar do tempo.

**Tabela 11.** Médias colorimétricas de pólen de *A. acaule* após seis meses de armazenamento, em diferentes temperaturas, de indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental.

| Método colorimétrico              | Temperatura (°C) |          |         |
|-----------------------------------|------------------|----------|---------|
|                                   | 3 °C             | -20 °C   | -80 °C  |
| <b>Tetrazólio (0,1%)</b>          | 69,58 b          | 72,58 ab | 78,33 a |
| <b>Azul de Tripan (0,2%)</b>      | 62,29 b          | 68,13 b  | 67,33 b |
| <b>Média por temperatura (°C)</b> | 65,94 A          | 70,35 A  | 72,83 A |

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Após 360 dias completos do armazenamento do pólen, a avaliação do método colorimétrico apontou melhor eficiência do corante Tetrazólio (0,1%) em todas as temperaturas, embora o armazenamento em temperaturas mais baixas tornou a viabilidade mais eficiente. O corante Azul de Tripan (0,2%) à 3 °C, apresentou baixa viabilidade, sendo a primeira avaliação do estudo para o teste colorimétrico abaixo de 50% dos pólenes viáveis (38,23%) (Tabela 12).

**Tabela 12.** Médias colorimétricas de pólen de *A. acaule* após 1 (um) ano de armazenamento, em diferentes temperaturas, de indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental.

| Método colorimétrico              | Temperatura (°C) |          |          |
|-----------------------------------|------------------|----------|----------|
|                                   | 3 °C             | -20 °C   | -80 °C   |
| <b>Tetrazólio (0,1%)</b>          | 59,13 a          | 65,21 a  | 63,37 a  |
| <b>Azul de Tripan (0,2%)</b>      | 38,23 c          | 50,73 bc | 51,98 bc |
| <b>Média por temperatura (°C)</b> | 48,68 B          | 57,97 A  | 57,68 A  |

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

O pólen armazenado apontou diferenças significativas entre os métodos colorimétricos, tempo de armazenamento e temperatura, bem como as interações entre os parâmetros. Comparando as médias da viabilidade do pólen avaliada pelos

dois corantes e o tempo de armazenamento foi realizado o teste de médias e análise de regressão (Tabela 13). Para interação tempo de armazenamento x métodos colorimétricos o coeficiente de variação (4,27%) indica alta precisão do experimento.

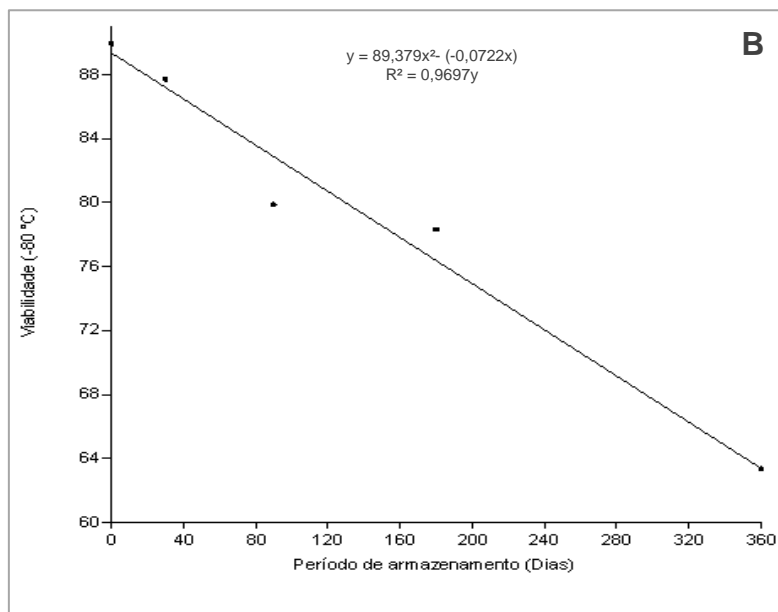
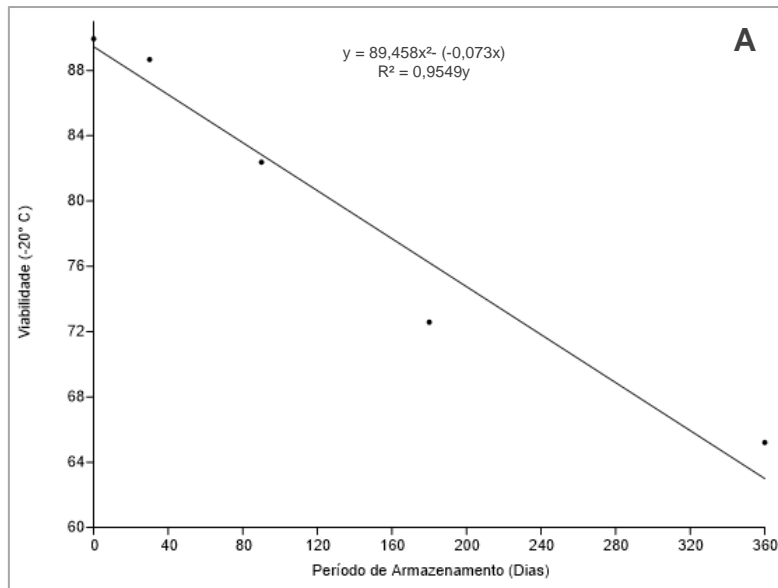
Embora os corantes com Tetrazólio (0,2%) e Azul de Tripán (0,1%) tenham apresentado maior eficiência de viabilidade para o pólen fresco quando comparados com o corante Cotton Blue (0,05%), para o pólen avaliado a partir dos primeiros 30 dias de armazenado, todos os períodos de armazenamento mostraram maior viabilidade polínica utilizando Tetrazólio quando comparado com Cotton Blue. Até 180 dias de avaliação não houve variação significativa para o corante para o parâmetro de período de armazenamento (Tabela 13).

**Tabela 13.** Análise do desdobramento da interação métodos colorimétricos x tempo de armazenamento para os valores da viabilidade polínica de *A. acaule*

| Tempo de armazenamento (dias) | Método Colorimétrico |                        |
|-------------------------------|----------------------|------------------------|
|                               | Tetrazólio (0,1%)    | Azul de Tripán (0,2 %) |
| 0                             | 89,84 a A            | 88,37 a A              |
| 30                            | 85,11 a A            | 69,5 a B               |
| 90                            | 77,85 a A            | 64,76 b B              |
| 180                           | 73,49 a A            | 65,92 b B              |
| 360                           | 62,75 b B            | 46,98 c C              |

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

A análise de regressão da interação para o método com Tetrazólio (0,1%), sendo este o método mais eficiente para viabilidade de pólen da espécie, mostrou que houve uma redução significativa e gradual na viabilidade do pólen armazenado no período de 360 dias (Figura 17). Nos primeiros 180 dias essa redução foi menor quando comparada com a avaliação de 360 dias em que houve uma redução significativa dos percentuais de viabilidade para as duas temperaturas representadas (-20 °C e -80 °C) (Figura 17 A e B).



**Figura 17.** Regressão linear de viabilidade dos grãos de pólen de *A. acaule*, obtida com o uso de Tetrazólio (0,1%) nos 5 períodos de avaliação (0, 30, 90, 180 e 360 dias). **A)** Temperatura de -20 °C. **B)** Temperatura de -80 °C.

Oliveira et al. (2001) relatou para a viabilidade de pólen *in vitro* de genótipos de *E. oleracea*, avaliada no mesmo intervalo de tempo do presente estudo, que houve uma redução com o aumento do tempo de conservação, mas, esta diminuição não foi drástica. Sendo encontrados valores médios para: um mês (79,6%), três meses (77,4%), seis meses (74,1%) e, doze meses (61,3%), para o pólen armazenado. Resultados semelhantes foram obtidos em pólen armazenado de outras palmeiras (EKARATNE; SENATHIRAJAH 1983; Miranda 1986). Porém,

ROGNON; NUCÉ DE LAMOTHE (1978) encontraram 40% de viabilidade para pólen armazenado de coqueiro.

### **5.5.2. Germinação *in vitro***

Após um mês de armazenamento, os testes foram conduzidos utilizando o método mais eficiente para germinação do pólen fresco, sugerindo que não há variação de germinação entre as temperaturas estudadas, embora à 3 °C a germinação do pólen tenha se estabelecido abaixo de 50%. Resultados semelhantes com relação a diferença significativa de temperatura ocorreu na avaliação de três meses, porém, em todas as temperaturas, a germinação permaneceu abaixo de 50%, variando entre 35,10% a 49,65%, em 3 °C a -80 °C, respectivamente.

Houve maior índice de germinação do pólen em temperaturas mais baixas (-20 °C e -80 °C), sendo a variação entre 31,63% a 39,49%. O pólen armazenado na temperatura de 3 °C apresentou valores abaixo de 20% de germinação após 360 dias de armazenamento. Após três meses de armazenamento houve redução significativa na germinação do pólen para todas as temperaturas, mostrando que até três meses de armazenado, o pólen pode expressar melhor germinação.

Após 360 dias de armazenamento, o pólen teve redução significativa quanto sua germinação quando comparado aos demais períodos. Não houve germinação no estudos à 3° C, porém, apesar da germinação baixa, o pólen armazenado à -20 °C e -80° C, apresentou viabilidade por volta de 20%, sendo estas, as melhores temperaturas consideradas para germinação do pólen armazenado para o período total de avaliação (Tabela 14).

Para interação de parâmetros de germinação, foram comparadas as médias de germinação de acordo com o meio adotado para avaliação do pólen armazenado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) x tempo de armazenamento x temperatura. Para interação do meio de germinação x tempo de armazenamento, o coeficiente de variação de 6,81% indica alta precisão do experimento.

Para o primeiro mês de avaliação não houve variação significativa entre meio de germinação x temperaturas avaliadas. Até três meses de avaliação, não houve diferença significativa de germinação para temperaturas mais baixas (-20 °C e -80 °C), porém, após seis meses de avaliação todas porcentagens para este parâmetro

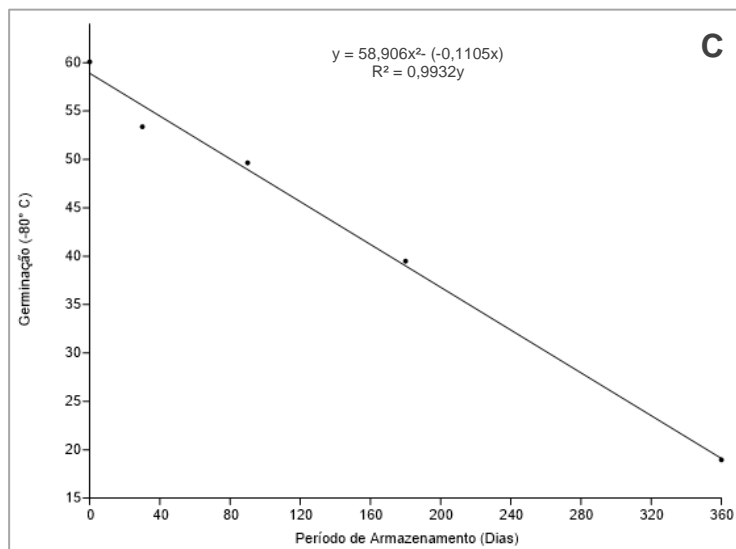
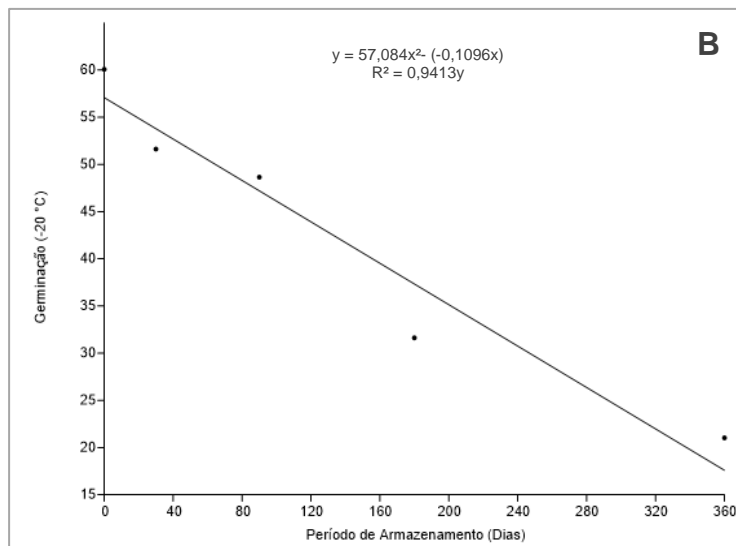
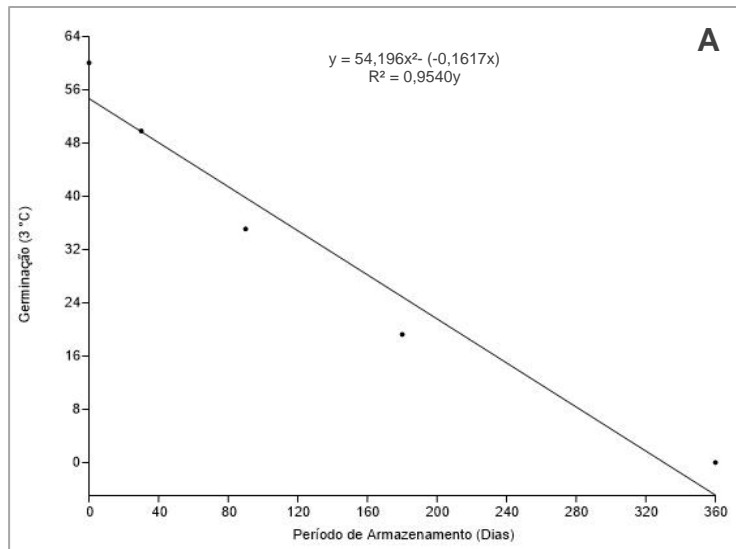
ficaram abaixo de 40% e após o final do experimento, menos de 22% do pólen armazenado germinou nas temperaturas mais baixas. Na temperatura de 3 °C após 360 dias de armazenamento não houve germinação do pólen, indicando que o pólen fica com condições mais favoráveis para germinação com o passar do tempo em temperaturas mais baixas.

**Tabela 14.** Médias de germinação de pólen de *A. acaule* após um, três, seis e doze meses de armazenamento, em diferentes temperaturas, de indivíduos coletados no campo experimental do Rio Urubu da Embrapa Amazônia Ocidental.

| Meio de germinação                                   | Média de pólen germinado (%) – 1 mês    |           |           |
|--|---|-----------|-----------|
|  | 3 °C                                    | -20 °C    | -80 °C    |
| Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O | 49,83 a A                               | 51,63 a A | 53,38 a A |
|  | Média de pólen germinado (%) – 3 meses  |           |           |
|  | 3 °C                                    | -20 °C    | -80 °C    |
|  | 35,10 ab B                              | 48,65 a A | 49,65 a A |
|  | Média de pólen germinado (%) – 6 meses  |           |           |
|  | 3 °C                                    | -20 °C    | -80 °C    |
|  | 19,25 c C                               | 31,63 b B | 39,49 a B |
|  | Média de pólen germinado (%) – 12 meses |           |           |
|  | 3 °C                                    | -20 °C    | -80 °C    |
|  | -                                       | 21,03 c B | 18,96 c C |

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

A análise de regressão da interação entre o período de armazenamento e temperaturas de armazenamento demonstrou que houve uma redução gradativa e significativa da germinação *in vitro* do pólen armazenado durante o período de 36 dias (Figura 18). Nos primeiros 180 dias de avaliação, a viabilidade a germinação alcançou bons índices de germinação para pólen armazenado. Nos próximos 180 dias e 360 dias houve uma redução significativa dos percentuais de viabilidade, sendo este o intervalo de tempo com maior redução de germinação.



**Figura 18.** Regressão linear de germinação de *A. acaule* obtida com meio em ágar +  $(Ca(NO_3)_2 \cdot 2H_2O)$  nos 5 períodos de avaliação (0, 30, 90, 180 e 360 dias). **A)** Temperatura de 3 °C **B)** Temperatura de -20 °C. **C)** Temperatura de -80 °C.



Estudos conduzidos buscam estabelecer e padronizar condições ambientais e meios de cultura ideais para avaliar viabilidade polínica em muitas espécies (NUNES et al., 2001; WONG CHEUNG; WU, 2003). Geralmente, em palmeiras, os meios de cultura utilizados são à base de água e açúcar, pois, o açúcar é um componente que promove o equilíbrio osmótico entre pólen e meio e lhe prover energia para um melhor desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY; LINSKENS, 1974). O sucesso da germinação *in vitro* de grãos de pólen depende de muitos fatores endógenos e exógenos, como: o estado nutricional das plantas, horário e método de coleta dos grãos de pólen, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e composição do meio de cultura (SOUZA et al., 2016), o que revela a complexidade desse tipo de estudo.

Estudos de geminação *in vitro* de pólen armazenado ainda são muito escassos em espécies de palmeiras e os avanços do presente trabalho são inovadores para a espécie *A. acaule*. Chia et al. (2009) avaliaram o percentual de germinação de pólen de híbridos interespecíficos de dendezeiro e caiaué (54,8-58,3%), do caiaué (73,1%), e dendezeiro (84,8%). Apesar do dendezeiro expressar a maior taxa, a germinação de pólen de genótipos de híbridos interespecíficos foi considerada satisfatória para o sucesso de cruzamentos controlados, nos programas de melhoramento interespecífico entre as espécies caiaué e dendezeiro (CHIA et al., 2009). Souza et al. (2016) estudando a viabilidade polínica do dendezeiro, encontraram germinação expressiva (78-97%), enquanto as taxas de germinação foram, em sua maioria, baixas (37,8%-74,6%), assumindo comportamento inversamente proporcional.

## 6) Conclusões

*A. acaule* apresenta dois ciclos anuais de floração na região de Manaus - AM, sendo o primeiro de junho a agosto e o segundo de novembro a janeiro. São encontrados frutos o ano inteiro, exceto nos meses de julho e agosto.

A cronologia da antese de *A. acaule* na região de Rio Preto da Eva – AM ocorre no período de três dias seguidos, com sequência noturna de eventos florais. Ocorrendo primeiramente a fase pistilada, o intervalo entre fases e a fase estaminada, seguida de senescência das flores.

A espécie apresenta termogenia na região de Rio Preto da Eva - AM, indicando produção e intensificação de calor pelas flores, volatilizando o odor responsável pela de atração de insetos, sendo os coleópteros, os principais visitantes e possíveis polinizadores da espécie.

Os meses ideais para coleta do pólen e realização de cruzamentos em *A. acaule* na região de Manaus - AM são aqueles em que há maior frequência de inflorescências em fase de floração, portanto, os meses de junho e agosto; e novembro a janeiro.

Os corantes Tetrazólio e Azul Tripán são os mais adequados para avaliação da viabilidade do pólen fresco na região de Rio Preto da Eva - AM. Para análise da viabilidade de pólen armazenado, o corante Tetrazólio é o mais indicado para espécie.

O meio ágar com adição de cálcio desidratado é o mais adequado para avaliação de germinação, considerando desde o pólen fresco até 360 dias de análise em genótipos da região de Rio Preto da Eva - AM. Meios somente com sacarose e concentrações de boro são limitantes para germinação de *A. acaule*.

Temperaturas mais baixas (-20 °C e -80 °C) fornecem melhores condições para que o pólen armazenado se mantenha mais viável por um período mais longo de tempo (360 dias).

## 7) Referências Bibliográficas

ABREU, de S. M. 2019. Florescimento e viabilidade de pólen açazeiros do Pará na Amazônia Ocidental. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus, Amazonas. 44p.

ALMEIDA, S. S.; SILVA, P. J. D. 1997. As palmeiras: aspectos botânicos, ecológicos e econômicos. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. p. 235-251.

ARAÚJO, M. G. P. 2005. Morfo-anatomia e desenvolvimento dos frutos e sementes de Três espécies da subfamília Arecoideae (Arecaceae). Tese de Doutorado. INPA. Manaus, Amazonas. 204p.

BACELAR-LIMA, C. G. 2004. Polinização e sistema reprodutivo da palmeira *Astrocaryum aculeatum* Meyer na região de Manaus, Amazonas. Dissertação de Mestrado. INPA-UFAM. Manaus, Amazonas. 85p.

BACELAR-LIMA, C. G.; MENDONÇA, M. S.; BARBOSA, T. C. 2006. Morfologia floral de uma população de tucumã, *Astrocaryum aculeatum* G. Mey. (Arecaceae) na Amazônia Central. Manaus: Acta Amazônica. p. 407-412.

BIONDO, E.; BATTISTIN, A. 2001. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G.Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae – Faboideae), nativas na Região Sul do Brasil. Bioikos. p.39-44.

BODMER, R. E.; WARD, D. 2006. Frugivory in large mammalian herbivores. In Large Herbivores ecology, ecosystem dynamics and conservation (K. Danell, P. Duncan, R. Berstrom & J. Pastor, eds). Cambridge: Cambridge University Press. p. 232-260.

BUGUEZ, A.; SARUKHÁN, K. J.; PEDROZA, A. L. 1987. Floral biology of a primary rain forest palm, *Astrocaryum mexicanum* Liebm. Botanical Journal of the Linnean Society, 94:407-19.

CAI, Z.; WANG, B.; XU M.; ZHANG, H.; HE, X.; ZHANG, L.; GAO, S. 2015. Intensified soil acidification from chemical N fertilization and prevention by manure in an 18-year field experiment in the red soil of Southern. China. *J Soils Sediments* p. 260-270.

CANCELI, R. R.; SCHNEIDER, A. A.; BAUERMANN, S. G. 2006. Morfologia polínica do gênero *Pluchea* Cass. (Asteraceae), no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Paleontologia*, p. 149-156.

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

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

COSTA, J. A.; DUARTE, A. P. 2002. Metodologia para manejo comunitário da palmeira tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) na terra indígena apurinã, Amazônia Ocidental: um modelo replicável para conservação da biodiversidade e geração de renda em áreas extrativistas. Belém: Center for International Forestry Research (CIFOR) e Embrapa Amazônia Oriental, p. 307–318.

DRANSFIELD, J.; UHL, N. W.; ASMUSSEN, C. B.; BAKER, W. J.; HARLEY, M. M.; LEWIS, C. E. 2005. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. *Kew Bulletin*: v. 60, p. 559-569.

DRANSFIELD, J. 2008. *Genera Palmarum: Evolution and Classification of Palms*. Kew: Kew Publishing. Royal Botanic Gardens.

ELIAS, G. A.; CORREA, P. F.; CITADINI-ZANETTE, V.; SANTOS, R. 2015. Arecaceae: análise bibliométrica das espécies nativas do estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciência e Natura* 2015; 37(1): p. 85-92.

ELIAS, G. A.; SOARES, K. P.; BORTOLUZZI, R. L. C.; SANTOS, R. 2018. Palmeiras (Arecaceae) em Santa Catarina, Sul do Brasil. *Iheringia*: 73(2): p. 88-107.

EKARATNE, S. N. R.; SENATHIRAJAH, S. 1983. Viability and storage of pollen of the oil palm *Elaeis guinensis* Jacq. *Ann. Bot. Paris*: 51, p. 661-668.

ERDTMAN, G. 1986. Pollen morphology and plant taxonomy: an introduction to palynology. Almqvist e Wiksell, Stockholm, Sweden. 553p.

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

FLORA DO BRASIL. 2020. *Astrocaryum in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Acesso em: 01 jun. 2020.

HEPLER, P. K.; WINSHIP, L. 2015. The pollen tube clear zone: Clues to the mechanism of polarized growth. *Journal of Integrative Plant Biology*: v.57, p.79-92.

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

GENTIL, D. F. O.; FERREIRA, S. A. N. 2005. Morfologia da plântula em desenvolvimento de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae). *Acta Amazonica*. p. 337-342.

HARMS, K. E.; J. W. DALLING. 2000. A bruchid beetle and a viable seedling from a single diaspore of *Attalea butyracea*. *Journal of Tropical Ecology*. p. 319-325.

HAYMAN, D. S. 1970. Endogone spore numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. Transactions of the British Mycological Society: v.54, p.53-63.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNALI, R. 1995. Field guide to the palms of the Americas. New Jersey: Princeton University Press. 352p.

HILBE, J. 2007. STATISTICA 7 An Overview. The American Statistician: 61:1, p.91-94.

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. 2020. BDMEP - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. Acesso em 25 ago. 2020.

KAHN, F.; MILLÁN, B. 1992. *Astrocaryum* (Palmae) in Amazonia: a preliminary treatment. Bulletin l'Institut Français, p. 459-531.

KARUN, A.; SAJINI, K. K. 2010. Cryopreservation of coconut zygotic embryos and pollen. Kasaragod: Central Plantation Crops Research Institute. 17p.

KIRKBY, E. A.; RÖMHELD, V. 2007. Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções absorção e mobilidade. Encarte técnico: Informações Agronômicas, International Plant Nutrition Institute. 24p.

KRICHEVSKY, A.; KOZLOVSKY, S. V.; TIAN, G. W.; CHEN, M. H.; ZALTSMAN, A.; CITOVSKY, V. 2007. How pollen tubes grow. Developmental Biology: v.303, p.405-420.

KUCHMEISTER, H. et al. 1998. Reproductions biologie neotropischer Palmen eines Terra firme Waldes im brasilian ischen Amazonas gebiet. Tese de Doutorado. Justus-Liebig-Universitat, Giessen.

LAKON, G. 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiology*, Bethesda: v.24, p.389-394.

LÉDO, A. S. 2013. Procedimentos para a Conservação e Viabilidade de Grãos de Pólen de Coqueiro-gigante-do-Brasil-Praia-do Forte. Comunicado Técnico 133, EMBRAPA. Aracaju, Sergipe.

LEITÃO, A. M. 2008. Caracterização morfológica e físico-química de frutos e sementes de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae), de uma floresta secundária. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). INPA-UFAM. Manaus, Amazonas. 91p.

LEITMAN, P.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L.; MARTINS, R. C. 2013. Arecaceae. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

LEVERMANN, R. A.; SOUZA, J. P. M. 2014. Óleo de palma: O crescimento da indústria global. *Agroanalysis*.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; MEIDEIROS-COSTA, J. T. 1996. Palmeiras do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, São Paulo. Ed. Plantarum. 306p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. D.; COSTA, J. D. M.; CERQUEIRA, L. D.; FERREIRA, E. 2004. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. Nova Odessa, São Paulo. 44p.

LORENZI, H. 2010. Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras). Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum.

MARINHO, H. A.; CASTRO, J. S. 2002. Carotenóides e valor de pró-vitamina A em frutos da região amazônica: pajurá, piquiá, tucumã e umari. Belém: Anais – Congresso Brasileiro de Fruticultura.

MENCK, A. L. M.; ODA, S.; MARCHZ, E. L.; KOVALSKI, M. E. 1990, Influência do sistema de coleta de botões florais na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. IPEF, Piracicaba, São Paulo: n. 43/44, p.20-23.

MENDEZ, N. P.; ACMA, F. M. 2018. *In vitro* Studies of a Philippine Endemic Ginger Species. Journal of Tropical Life Science: v.8, p.303-310.

MILLER, W. M. P.; CRUZ, F. G. G.; DAS CHAGAS, E. O; SILVA, A. F.; ASSANTE, R. T. 2013. Farinha do resíduo de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) na alimentação de poedeiras. Revista Acadêmica: Ciência Animal: v.11, p.105-114.

MIRANDA, I. P. A. 1986. Morfologia e aspectos práticos de germinação e do armazenamento do pólen de pupunha *Bactris gasipaes* H.B.K (Arecaceae). Dissertação de Mestrado. INPA-FUA. Manaus, Amazonas. 85p.

MOURA, C. R. F.; MACHADO, C. A.; LEDO, A. S. 2015 Germinação *in vitro* e viabilidade de grãos de pólen de acessos de coqueiro. Revista Ciência Agronômica. p.421-427.

NICOLSON, T. H. 1959. Mycorrhiza in the Gramineae .I. Vesicular-arbuscular endophytes, with special reference to the external phase. Transactions of the British Mycological Society. p.421-438.

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

OLIVEIRA, M. S. P. et al. 2003. Biologia da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* mart.) Em Belém, Pará, Brasil. Acta Botânica Brasileira. p. 343-353.

OLIVEIRA, M. S. P.; MOCHIUTTI, S.; FARIAS NETO, J. T. 2009. Domesticação e melhoramento do açaizeiro: espécies amazônicas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Anais. p. 207-235.



OLIVEIRA, D. M.; CLEMENTE, E.; COSTA, J. M. C. Hygroscopic behavior and degree of caking of grugru palm (*Acrocomia aculeata*) powder. *Journal of Food Science and Technology*, v.1, p.1-7, 2012.

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

RAYNOR, G. S.; COHEN, L. A.; HAYES, J.; OGDEN, E. 1966. Dyed pollen grains and spores as tracers in dispersion and deposition studies. *Journal of applied meteorology*: v. 5, p.728-729.

REVILLA, J. 2000. Plantas da Amazônia: oportunidade econômica e sustentável. 1a ed. Programa de desenvolvimento empresarial e tecnológico, Manaus, AM. 405p.

RIBEIRO, J. E. L.; HOPKINS, J. J. P.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S. 1999. Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das 72 Plantas Vasculares de uma floresta de Terra-firme na Amazônia Central. INPA. Manaus, Amazonas.

RODRIGUES, L. R.; DE OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. 2004. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. *Revista Brasileira de Biociências/Brazilian Journal of Biosciences - Porto Alegre*: v. 2, p.159-167.

ROGNON, F.; NUCE, de L. M. 1978. Récolte et conditionnement du pollen pour la pollinisation des champs semenciers de cocotiers. *Oléagineux*, Paris: v. 33, p.17-21.

SANTOS, E. K.; ZANETTINI, M. H. B. 2002. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. *Ciência Rural*, Santa Maria: v. 32, p.165-173.

SANTELLI, P.; CALBO, M. E. R.; CALBO, A. G. 2006. Fisiologia pós-colheita de frutos da palmeira *Syagrus oleracea* Mart. (Arecaceae). Acta Botânica Brasileira. p.523-528.

SIREGAR, F. 2000. Cytotoxicity of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) latex on fibroblast. Med J Indones: v.9, p.253-255.

SOARES, K. P.; LONGHI, S. J.; NETO, L. W.; ASSIS, L. C. 2014. Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Rodriguésia; v. 65, p.113-139.

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

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

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. 2005. Botânica sistemática. São Paulo: Instituto Plantarum. 640 p.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. 1974. Pollen. Biology, biochemistry, management. Springer. Berlin, Heidelberg.

SYENNING, J. C. 2001. On the role of microenvironmental heterogeneity in the ecology and diversification of Neotropical rain-forest palms (Arecaceae). p.1-53.

TAVARES, S. M. 2020. Fenologia, viabilidade do pólen, emergência de semente e conteúdo de DNA nuclear de açazeiros (*Euterpe* spp.)". Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus, Amazonas. 66p.

VASCONCELOS, B. E. C. 2010. Avaliação das características físicas, químicas e nutricionais dos óleos do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* e *Astrocaryum vulgare*)

obtidos com CO<sub>2</sub> pressurizado. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém. 113p.

WONG, K. H.; CHEUNG, P. C. K.; WU, J. Z. 2003. Biochemical and microstructural characteristics of insoluble and soluble dietary fiber prepared from mushroom sclerotia of *Plerotus tuber-regium*, *Polyporus rhinoceros*, and *Wolfiporia cocos*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: v.51, p.7197-7202.

YUYAMA, L. K. O.; MAEDA, R. N.; PANTOJA, L.; AGUIAR, J. P. L.; MARINHO, H. A. 2008. Processamento e avaliação da vida-de-prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) Meyer desidratado e pulverizado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. p.408-412.