

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

**FLORESCIMENTO E VIABILIDADE DE PÓLEN DE
AÇAIZEIROS DO PARÁ NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

MACAULAY SOUZA DE ABREU

MANAUS – AM
2019

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

**FLORESCIMENTO E VIABILIDADE DE PÓLEN DE
AÇAIZEIROS DO PARÁ NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

MACAULAY SOUZA DE ABREU

Orientadora: Dra. Maria Teresa Gomes Lopes
Coorientadores: Dr. Ricardo Lopes
Dr. Marcelo Domingues Martins Raizer

MANAUS - AM
2019

Ficha Catalográfica

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

A162f Abreu, Macaulay Souza de
Florescimento e viabilidade de pólen de açazeiros do Pará na
Amazônia Ocidental / Macaulay Souza de Abreu. 2019
44 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes
Orientador: Ricardo Lopes
Coorientador: Marcelo Domingues Martins Raizer
Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Arecaceae. 2. genética vegetal. 3. melhoramento vegetal. 4.
Euterpe oleracea. I. Lopes, Maria Teresa Gomes II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

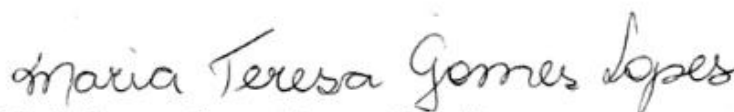
MACAULAY SOUZA DE ABREU

FLORESCIMENTO E VIABILIDADE DE PÓLEN DE AÇAIZEIROS DO PARÁ NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

Aprovada em 31 de julho de 2019

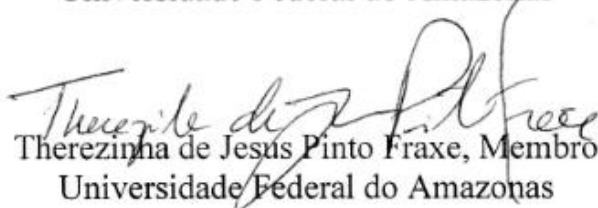
BANCA EXAMINADORA



Maria Teresa Gomes Lopes, Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Santiago Linorio Ferreyra Ramos, Membro
Universidade Federal do Amazonas



Therezinha de Jesus Pinto Fraxe, Membro
Universidade Federal do Amazonas

DEDICO
Aos meus pais José Rocha e Antônia Moreira.
E a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me conduzido até aqui, me sustentando e me capacitando, e por fazer compreender que tudo ocorre no seu tempo e a seu modo.

Aos meus pais, José Rocha e Antônia Moreira, ao meu irmão Christopher Souza, as minhas irmãs Valéria Moreira e Thayná Souza, meu sobrinho Benício Souza, a minha amiga Cristyana Pontes e todos os familiares e amigos por todo incentivo, apoio, amor e compreensão nessa fase da minha vida.

À Professora Maria Teresa Gomes Lopes, pela oportunidade, a qual me permitiu admirá-la e respeitá-la por todas as orientações, ensinamentos, paciência, dedicação em transmitir os conhecimentos, incentivos e por sempre confiar em mim para realização deste trabalho.

À minha eterna e querida mestra, Therezinha de Jesus Pinto Fraxe, a quem eu admiro como a melhor de todas as pessoas e a mais completa profissional em sabedoria sobre a Amazônia, uma intelectual e um exemplo de competência a ser seguido.

À Universidade Federal do Amazonas pela minha formação acadêmica desde a graduação, em especial Faculdade de Ciências Agrárias pela caminhada da graduação à obtenção do título de Mestre.

À Embrapa Amazônia Ocidental, aos pesquisadores Dr. Ricardo Lopes e Dr. Marcelo Domingues Raizer pelos ensinamentos e todo apoio incansável na realização de experimentos de laboratório e atividades de campo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

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

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos colegas de Laboratório: Jekiston, Marleson, Pamela, Dani, Cibele, Eduardo, Rosinha e Alex.

RESUMO

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), da família Arecaceae, é uma palmeira perene apreciada pela população amazônica e sua principal importância é o uso dos frutos que são processados e consumidos na bebida denominada “açai”. O produto encontra-se em expansão no mercado nacional e entre as fruteiras nativas é considerada com maior potencial de atingir o mercado internacional. Grande parte da produção de açai ainda é oriunda do extrativismo e não oferece produto de qualidade. A obtenção de informações básicas ainda são necessárias para a domesticação e o melhoramento genético da espécie visando a obtenção de cultivares para o plantio. O objetivo do presente trabalho foi estudar o florescimento e definir um método eficiente para análise da viabilidade de pólen de *Euterpe oleracea*. O estudo da biologia reprodutiva e viabilidade polínica foi realizado em plantas de açaizeiro do Pará da área experimental da sede (Manaus - AM) e da Estação Experimental do Rio Urubú (Rio Preto da Eva – AM) da Embrapa Amazônia Ocidental. Foram realizadas observação de emissão de inflorescências, frutificação no campo e análise de viabilidade de pólen e germinação no laboratório. Para descrições para frutificação, floração e análise de pólen foram utilizadas máquina digital e microscópio estereoscópio. Para a avaliação da viabilidade de pólen foram testados três métodos colorimétricos: Tetrazólio (0,1%), Cotton Blue (0,05 %) e Azul de Triphan (0,2 %), sendo que para cada amostra foram feitas lâminas das três soluções de corantes com 3 repetições de três genótipos. A porcentagem de pólen viável foi obtida calculando o número de grãos de pólen viáveis dividido pelo número de grãos de pólen contados e multiplicado por 100, sendo contados 200 grãos de pólen/lâmina. Os resultados foram analisados por meio da análise de variância e posteriormente realizado o teste de Tukey. Acompanhou-se também a viabilidade de pólen de uma inflorescência ao longo de dez dias consecutivos e a viabilidade de pólen fresco e após armazenamento por um mês e também realizado o estudo da germinação de pólen por meio de cultivo in vitro. As análises foram realizadas no software Genes. Os resultados mostraram que para *E. oleracea*, na Amazônia Ocidental, os eventos de floração foram mais frequentes no período mais chuvoso, enquanto os de frutificação, no período menos chuvoso. Todos corantes permitiram diferenciação entre os grãos de pólen viáveis dos inviáveis em *E. oleracea*, porém Cotton blue (0,05 %) e Tetrazólio (0,1%) apresentaram maior contraste no momento da contagem do número de pólenes viáveis comparado ao Azul de Triphan (0,2 %). Os corantes Cotton blue (0,05 %) e Tetrazólio (0,1%) são capazes de distinguir os pólenes viáveis dos inviáveis em *E. oleracea* por apresentar taxa

percentual de viabilidade acima de 70%, sendo este percentual considerado satisfatório para programas de melhoramento. Entre os corantes avaliados recomenda-se o corante Cotton blue (0,05 %) para monitoramento de viabilidade de pólen em *E. oleracea* devido associação de resultados de análise de porcentagem de viabilidade de pólen e maior qualidade no poder de discriminação do contraste de pólen viáveis e inviáveis. A conservação e manutenção da viabilidade do pólen de genótipos de *E. oleracea* pode ser realizada in vitro à -20 °C por pelo menos 30 dias.

Palavras-chave: Arecaceae, genética vegetal, melhoramento vegetal.

ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), Arecaceae family, is a perennial palm appreciated by the Amazonian population. Its main importance is the use of the fruit that is processed and consumed in the drink called açaí. The product is expanding in the national market and among the native fruit trees is considered to have great potential to reach international markets. Much of the production of açaí still comes from extractivism which does not offer quality products. Obtaining basic information is still necessary for the domestication and genetic improvement of the species in order to obtain cultivars for planting. The objective of this research was to study flowering and to define an efficient method of analyzing the viability of *Euterpe oleracea* pollen. The study of reproductive biology and pollen viability was carried out on açaí plants from the experimental area of the headquarters (Manaus, Amazonas) and the Experimental Station of Rio Urubú (Rio Preto da Eva, Amazonas) of Embrapa Amazônia Occidental. Observations of inflorescence emission and fruiting in the field and analysis of the viability of pollen and germination were carried out in the laboratory. For descriptions for fruiting, flowering and pollen analysis were conducted using digital machines and stereoscopic microscopes. For the evaluation of the viability of pollen, three colorimetric methods were tested; Tetrazolium (0.1%), Cotton Blue (0.05%) and Triphan Blue (0.2%); three dye solutions with 3 replicates of three genotypes. The percentage of viable pollen was obtained by calculating the number of viable grains divided by the number of grains counted and then multiplied by 100, counting 200 grains / blade. The results were compiled through analysis of variance and later applying the Tukey Range test. Pollen viability of an inflorescence was also monitored over ten consecutive days. Additionally, the viability of fresh pollen after storage for one month was also studied. Pollen germination was studied through in vitro culture as well. The analyses were performed in the Genes software. The results showed that for *E. oleracea*, in Western Amazônia, flowering events were more frequent during the rainy season, while fruiting was prevalent in less rainy periods. All dyes allowed for the differentiation between the viable pollen grains of those not viable in *E. oleracea*. However, Cotton blue (0.05%) and Tetrazolium (0.1%) presented higher contrasts at the time of counting the number of viable pollen when compared to the Blue Triphan (0.2%), Cotton blue (0.05%) and Tetrazolium (0.1%). Furthermore, they were able to distinguish viable pollens from those not viable in *E. oleracea* because they presented a percentage viability rate above 70%. This percentage is considered

satisfactory for improvement. Among the evaluated dyes, Cotton blue (0.05%) is recommended for pollen viability monitoring in *E. oleracea*. This is due to the association of the pollen viability percentage analysis results with higher qualities in the pollen contrast discrimination power making them feasible and unviable. The conservation and maintenance of pollen viability of *E. oleracea* genotypes can be performed in vitro at -20 ° C for at least 30 days.

Keywords: Arecaceae, plant genetic, plant breeding.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área de acompanhamento usada para o estudo de florescimento de <i>Euterpe oleracea</i> no Campo Experimental do Rio Urubu, Rio Preto da Eva, Amazonas.	23
Figura 2 - Estrutura de andaime usada para coleta de inflorescências de <i>Euterpe oleracea</i> no Campo Experimental da Sede na Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus - AM.....	25
Figura 3 - Preparo de lâminas com pólen de <i>Euterpe oleracea</i> para teste colorimétrico com a solução Tetrazólio (0,1%).....	25
Figura 4 - Preparo de lâminas com pólen de <i>Euterpe oleracea</i> para teste colorimétrico com a solução Cotton Blue (0,05%).	26
Figura 5 - Preparo de lâminas com pólen de <i>Euterpe oleracea</i> para teste colorimétrico com a solução Azul de Tripán (0,2%).....	26
Figura 6 - Preparo de placa com meio para germinação de pólen.....	28
Figura 7 - (a) Espata fechada. (b) Inflorescência recém aberta (c) Inflorescência com flores masculinas abertas.	29
Figura 8 - (a) Ráquila com flor feminina. (b) Cacho com frutos verdes em formação (c) Cacho com fruto próximo ao ponto de colheita.....	29
Figura 9 - Porcentagem de ocorrência de eventos fenológicos de 27 indivíduos de <i>Euterpe oleracea</i> no decorrer de 12 meses entre 15 de maio de 2018 e 14 de abril de 2019. Inf. fechada = inflorescências fechadas. Inf. aberta = inflorescências abertas.....	30
Figura 10 - (a) Lâmina com pólenes viáveis corados em vermelho escuro com tetrazólio (0,1 %) e inviáveis em vermelho claro. (b) Lâmina com pólenes viáveis corados em azul escuro com Cotton blue (0,05 %) e inviáveis em azul claro. (c) Lâmina com pólenes inviáveis corados em azul escuro com Azul de Tripán (0,2 %) e viáveis em azul claro.	33
Figura 11 - Porcentagem de viabilidade de pólen de uma inflorescência de um indivíduo avaliada no decorrer de 10 dias consecutivos. TZ: Tetrazólio 0,1%. CT: Cotton Blue 0,05%.34	
Figura 12 - Regressão linear de viabilidade de pólen de uma inflorescência de um único indivíduo avaliada no decorrer de 10 dias consecutivos pelo método colorimétrico Tetrazólio.	35
Figura 13 - Regressão linear de viabilidade de pólen de uma inflorescência de um único indivíduo avaliada no decorrer de 10 dias consecutivos pelo método colorimétrico com Cotton Blue.....	35
Figura 14 - Viabilidade de pólen a partir do método de germinação sem utilização de cálcio.37	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de ocorrência de eventos fenológicos de 27 indivíduos de Euterpe oleracea no decorrer de 12 meses entre 15 de maio de 2018 e 14 de abril de 2019. Inf. fechada = inflorescências fechadas. Inf. aberta = inflorescências abertas.	30
Tabela 2 - Análise de variância de porcentagem de pólen viável utilizando três soluções para estudo de viabilidade colorimétrica (Tetrazólio 0,1 %, Cotton Blue 0,05 % e Azul de Tripán 0,2 %) em três inflorescências de Euterpe oleracea.	31
Tabela 3 - Comparação da porcentagem de pólen viável utilizando três soluções colorimétricas em três inflorescências de três genótipos diferentes de Euterpe oleracea.	32
Tabela 4 - Porcentagem de viabilidade de pólen de uma inflorescência de um único indivíduo avaliada durante o período de 10 dias consecutivos. TZ: Tetrazólio 0,1 %. CT: Cotton Blue 0,05 %.....	34
Tabela 5 - Comparação da porcentagem de pólenes viáveis as 0 e 30 dias de armazenamento in vitro a 20°C em 4 indivíduos de Euterpe oleracea e três repetições, utilizando o método colorimétrico Cotton Blue 0,05 %.....	36
Tabela 6 - Porcentagem (%) de pólenes viáveis aos 0 e 30 dias de armazenamento in vitro a -20 °C em 4 indivíduos de Euterpe oleracea e três repetições, utilizando método colorimétrico Cotton Blue 0,05 %	36
Tabela 7 - Comparação da porcentagem de pólen viável utilizando três tratamentos com três inflorescências de três genótipos diferentes de Euterpe oleracea. Tratamentos: Cotton Blue (0,05%), Meio de cultura com CaCl ₂ e Meio de cultura sem CaCl ₂	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	Areacaceae.....	17
3.2	<i>Euterpe oleracea</i>	18
3.2.1	Características gerais da espécie.....	18
3.2.2	Ecologia de <i>Euterpe oleracea</i>	19
3.2.3	Sistema reprodutivo de <i>Euterpe oleracea</i>	19
3.3	O grão de pólen	20
3.4	Viabilidade polínica.....	21
3.5	Germinação in vitro.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	Material vegetal e área experimental.....	23
4.2	Estudo dos eventos fenológicos: floração, antese e formação do fruto.....	23
4.3	Viabilidade polínica.....	24
4.3.1	Estudo de métodos colorimétricos	24
4.3.2	Estudo de viabilidade de pólen durante o período de antese da flor masculina.....	27
4.3.3	Estudo de viabilidade de pólen armazenado	27
4.3.4	Estudo de germinação de pólen.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	Estudo dos eventos fenológicos: floração, antese e formação do fruto.....	29
5.2	Viabilidade polínica.....	30
5.2.1	Estudo de métodos colorimétricos	30
5.2.2	Estudo de viabilidade de pólen durante o período de antese da flor masculina.....	33
5.2.3	Estudo de viabilidade de pólen armazenado	35
5.2.4	Estudo de germinação de pólen.....	37
6	CONCLUSÃO.....	39
7	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia e que ocorre em grandes extensões na região Norte do Brasil. Pertencente à família Arecaceae, a espécie tem alcançado ampla aplicabilidade em diversos setores da agroindústria, podendo ser utilizada como planta ornamental no paisagismo, na construção rústica de casas e pontes, como vermífugo e anti-diarréico, na produção de celulose, na alimentação através da polpa processada e palmito, na confecção de bijóias e como ração animal, dentre outras aplicações (FREITAS, 2014). No entanto, seu grande destaque é no fornecimento de frutos e palmito (OLIVEIRA, 2007), tendo grande consumo de açaí na fabricação de sucos, doces e sorvetes (NODA, 2012).

O aumento da demanda no mercado e o bom preço pago pelos frutos do açazeiro têm despertado interesse dos agricultores da região norte para o cultivo da espécie, mas a produção ainda é basicamente extrativista. Embora, exista uma cultivar de açaí disponível para o plantio, BRS Pará que foi desenvolvida para a Amazônia Oriental, ainda são necessários incentivos à cadeia do produto relacionados ao processamento e comercialização, assim como avanços no melhoramento da espécie visando desenvolvimentos de novas cultivares que possam explorar melhor a variabilidade existente na espécie e proporcionar opção de variedades para plantios em outras condições climáticas como a Amazônia Ocidental. Para o estabelecimento de plantios comerciais não é recomendado plantar uma única variedade em extensas áreas devido a vulnerabilidade genética dos cultivos.

Por ser uma espécie alógama, as plantas de *E. oleracea* normalmente apresentam grande variação para os mais diversos caracteres de interesse, como precocidade, produtividade de frutos, rendimento de polpa e época de produção. Estas características proporcionam grandes desafios para programas de melhoramento genético da cultura, uma vez que os progressos seletivos são naturalmente demorados em razão de tratar-se de uma planta perene e ter como principal forma de propagação o uso de sementes recalcitrantes (NOGUEIRA et al., 2005).

A avaliação de genótipos de populações naturais de açazeiro revelou a existência de grande variabilidade genética dentro das populações favorecendo a possibilidade de seleção e sucesso no melhoramento genético dessa palmeira (FARIAS NETO et al., 2008; YOKOMIZO et al., 2010). Embora as pesquisas em Arecaceae tenham avançado nas últimas décadas, a maioria dos trabalhos realizados sobre florescimento e viabilidade de pólen excluem esta família (LIMA et al., 2003; ROCHA & SILVA, 2005).

Estudos sobre a viabilidade polínica constituem-se em um dos fatores de maior importância no entendimento da biologia reprodutiva e avanço no melhoramento genético do

açazeiro, pois para se obter sucesso nas hibridações entre e dentro das espécies do gênero *Euterpe* se faz necessário a realização de polinizações controladas (OLIVEIRA et al., 2009). Neste sentido, estudos de viabilidade polínica como os que já foram realizadas em algumas palmeiras (KARUN et al., 2006; SOUSA et al., 2010; KARUN & SAJINI, 2010; MOURA, 2015) podem auxiliar na obtenção de híbridos intra e interespecíficos, com vista a complementar características desejáveis entre indivíduos superiores e permitir avanços em programas de melhoramento.

As pesquisas voltadas ao estudo de florescimento masculino e viabilidade dos grãos de pólen são necessárias para orientar o período de fertilidade masculina para realizar as polinizações controladas. As informações geradas neste tipo de estudo permitem a avaliação quantitativa e qualitativa dos gametas a serem utilizados na polinização visando o sucesso na fecundação.

Não há um protocolo universal para determinar a viabilidade polínica aplicável a todas as espécies vegetais e estudos são necessários para cada espécie em particular. No entanto, dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se os métodos colorimétricos (método indireto) e o método germinação in vitro com meio de cultura (método direto). Os métodos colorimétricos são práticos e geral de grande praticidade quando comparados ao método de capacidade germinativa in vitro em, meio de cultura, mas em geral resultam em uma superestimação da viabilidade polínica, além de não fornecerem informações sobre a capacidade germinativa do tubo polínico. A germinação em meio de cultivo, in vitro, é considerada uma técnica de maior confiabilidade embora pode subestimar a viabilidade polínica pois é difícil reproduzir integralmente as condições do estigma. A germinação in vitro avalia a capacidade do pólen de emitir o seu tubo polínico para iniciar o processo de transferência do material genético do gameta masculino para o gameta feminino, visando consolidar a fecundação.

Algumas pesquisas já demonstraram a presença de alta viabilidade dos grãos de pólen em indivíduos de açazeiro na Amazônia Oriental (OLIVEIRA et al., 2001), contudo, esta pesquisa foi realizada para analisar a ocorrência de variações para caracteres relacionados a viabilidade polínica variando genótipos e condições ambientais, portanto obteve-se resultados que serão uma referência pioneira para a região da Amazônia Ocidental. Além disso, informações sobre o período ideal de coleta de pólen e tempo de armazenamento, aliado aos conhecimentos sobre eventos fenológicos relacionados a floração e frutificação em *E. oleracea* foram também resultados relevantes do presente trabalho, que oferecerão subsídios para futuros trabalhos de hibridação na espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o florescimento e definir um método eficiente para análise da viabilidade de pólen de *Euterpe oleracea*.

2.2 Objetivos específicos

Estudar os eventos fenológicos relacionados a floração e frutificação de *E. oleracea*;
Identificar o período de florescimento, a cronologia da antese e período de liberação de pólen;
Estudar a viabilidade polínica no momento da coleta de pólen;
Estudar a viabilidade polínica após armazenamento do pólen in vitro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Areaceae

As palmeiras são plantas monocotiledôneas que pertencem a família Areaceae. São plantas típicas de regiões tropicais, mas se encontram espalhadas nos mais diferentes ecossistemas, mostrando estruturas para adaptações específicas a cada meio. Parecem desenvolver-se melhor nas florestas com alta temperatura e alta precipitação e são características também de ilhas (ALVES & DEMATTÊ, 1987).

A família Areaceae é subdividida em cinco subfamílias: Arecoideae Calamoideae, Ceroxyloideae, Coryphoidae e Nypoideae (DRANSFIELD et al., 2008) e possui aproximadamente 2.600 espécies e mais de 240 gêneros (LORENZI et al., 2004). No Brasil, existem cerca de 500 tipos diferentes de espécies de palmeiras nativas (BATISTA, 2009).

As palmeiras apresentam um desenvolvimento característico em cada espécie quanto ao formato e aspecto. Não possui uma raiz principal, sendo todas as raízes semelhantes, subterrâneas, cilíndricas e fasciculadas. O caule recebe o nome de estipe e pode possuir um só caule simples ou possuir múltiplos caules, com perfilhamento na forma de uma touceira. Existem palmeiras em que as folhas saem diretamente do solo e nesse caso são de aparência acaule. Suas folhas são diversificadas quanto ao tamanho, formato e disposição nas plantas. As folhas das palmeiras são vistosas e por isso as plantas são usadas em projetos de arborização. Os frutos apresentam grande variabilidade de cor, textura, formato, tamanho, composição nutricional (LORENZI et al., 2004) e são formados basicamente pelas camadas: epicarpo, mesocarpo e endocarpo, sendo o endocarpo duro, lenhoso e com forte aderência às sementes (HENDERSON, 2002).

As palmeiras apresentam uma arquitetura comum e de fácil reconhecimento, com caule do tipo estipe, sem ramificações. O caule pode atingir desde poucos milímetros em altura de 0,5 a 50 m, podem ter folhas muito diversas tanto em relação ao tamanho, como forma, intensidade de cor e divisão (HENDERSON et al. 1995; HENDERSON, 1995; LORENZI et al. 2004).

As suas flores são organizadas em inflorescências do tipo espiga, racemosas ou em panícula, e estas são protegidas pela espata. As flores na maioria das espécies, são pouco atraentes devido ao seu tamanho reduzido e coloração pouco vistosa. No entanto, uma característica muito especial das palmeiras é que a flores possuem termogênese (produzem calor) viabilizando que os compostos odoríferos das flores realizem atração de seus polinizadores (RIBEIRO et al. 1999).

3.2 *Euterpe oleracea*

3.2.1 Características gerais da espécie

O açazeiro do Pará, *Euterpe oleracea*, é uma espécie nativa da Amazônia com maior ocorrência nos estados da Amazônia Ocidental. A espécie é principalmente utilizada para produção de frutos ou palmito. O Estado do Pará é o principal produtor e consumidor, e a produção é resultante, em geral do extrativismo, de populações naturais de áreas de várzeas. Na última estimativa do IBGE (2017), a maior parte da produção nacional de frutos de açaí foi de 219.885 toneladas de frutos, sendo a região norte produtora de 91,66%, seguida do nordeste com 8,34%. Ressalta-se que o Pará foi responsável por 64,5%, sendo predominantemente sua produção de *E. oleracea* e o Amazonas foi responsável por 22,97% com produção predominante de *E. precatória* (IBGE, 2017).

Euterpe oleracea ocorre em toda a Amazônia juntamente com outras 180 espécies de palmeiras, mas sua presença é marcante em regiões alagadas e de várzea. A colheita dos frutos se faz ao longo de todo o ano, com pico de produção entre maio e junho. Os frutos são muito apreciados e deles preparam-se o “Smoothie” de açaí e outros subprodutos. O seu palmito é comestível e pode ser usado para o preparo de conservas e ser consumido in natura (ALTMAN, 1958; CAMPOS et al., 1951; OLIVEIRA et al., 1998).

O fruto de *Euterpe oleracea* é hoje o produto de maior interesse dos açazeiros e caracteriza-se como uma drupa globosa, com peso médio de 1,5 g e diâmetro com variação entre 1 a 2 cm. A semente possui um endosperma grande e embrião pequeno (HENDERSON & GALEANO, 1996).

Os açazeiros do Pará encontram-se amplamente distribuídos na Amazônia Oriental, com ocorrência marcante na região ao longo do rio Amazonas, que é a área relatada como centro de origem da espécie, onde são encontradas extensas populações naturais em áreas de alagamento ou sujeitas à inundações temporárias. É encontrado com menor frequência em áreas alagadas ao longo do ano ou de terra firme (CAVALCANTE, 1991; CALZAVARA, 1972).

A região do rio Amazonas também é considerado o centro de diversidade genética de *Euterpe oleracea*, pois nessa região são encontradas várias e extensas populações com variabilidade acentuada de caracteres fenotípicos entre e dentro delas que são fonte de variabilidade para melhoramento genético e sementes para produção de mudas da espécie (OLIVEIRA 1995).

No território brasileiro, o nome vulgar de *Euterpe oleracea* é açaí, no entanto outros nome são encontrados na região norte, principalmente para destacar a sua origem, como: açaí

do baixo Amazonas e açaí do Pará. Outro nome vulgar encontrado é açaí de touceira devido ao perfilhamento da espécie e para distingui-lo de *Euterpe precatoria* (açaí verdadeiro, de único estipe) (CALZAVARA, 1972; VILLACHICA et al., 1996).

3.2.2 Ecologia de *Euterpe oleracea*

Na maior parte da área de dispersão de *Euterpe oleracea*, em várzea próxima a rios, a espécie é abundante e dominante (LIMA, 1956). A espécie tem capacidade adaptativa de sobrevivência em região de solos alagados com baixa quantidade de oxigênio, principalmente devido a presença de estruturas anatômicas como: raízes que emergem acima da superfície do solo, lenticelas (ANDERSON, 1986) e aerênquimas (MENEZES NETO, 1994). Adicionalmente, a semente possui capacidade de viver na ausência de oxigênio até 20 dias, sem prejuízo a germinação e formação de mudas (MENEZES NETO, 1994)

O fato das sementes não perder viabilidade por dias em ambiente alagado e das plântulas reduzir ou paralisar o crescimento em ambiente sem oxigênio, pode explicar a redução do número de plantas e de populações da espécie em áreas alagadas todos os meses do ano, pois essa situação ecológica de alagamento permanente não é favorável para a espécie. Para que populações estabeleçam nesses locais é necessário que a lâmina de água seja reduzida em algum momento do ano para permitir a germinação e o desenvolvimento de plântulas. Algumas situações como presença de restos de árvores resultantes de queda, podem proporcionar ambientes elevados com maior oxigenação para as sementes, permitindo o acúmulo de nutrientes e detritos que podem possibilitar a germinação e o estabelecimentos de plantas (CALZAVARA, 1972).

3.2.3 Sistema reprodutivo de *Euterpe oleracea*

Trabalhos de campo e análises morfológicas continuam a revelar mais gêneros e tem refinado a classificação das palmeiras. O conhecimento de processos relacionados ao sistema reprodutivo de muitas palmeiras ainda é escasso. Para *Euterpe oleracea* observou-se que é uma espécie monoica e que apresenta inflorescência com flores masculinas e femininas separadas (OLIVEIRA et al., 2000).

Para obtenção de plantio de açaizeiros, o agricultor realiza a propagação via semente, por propagação sexuada. A semente possui formato de esfera e é exposta após removido o epicarpo e o mesocarpo do fruto (CARVALHO et al. 1998). Informações adicionais sobre a

forma como os gametas se unem em *Euterpe oleracea* para a formação da semente ainda não são disponíveis na literatura.

Henderson (2004, 2006) relatam que regiões onde ocorrem híbridos naturais são comuns em palmeiras. Para que a hibridação inter e interespecífica tenha sucesso é essencial conhecer sobre o florescimento das espécies a serem cruzadas e realizar estudos sobre armazenamento e viabilidade do pólen. Estudos sobre a viabilidade de pólen se constituem em um dos fatores de grande relevância no entendimento da biologia reprodutiva e são essenciais para avanços no melhoramento genético de uma espécie, pois mostra a potencialidade do gameta masculino quanto a eficiência na fecundação e posterior fertilização (BIONDO & BATTISTIN, 2001).

3.3 O grão de pólen

O grão de pólen é o gameta masculino dos vegetais superiores (MOORE & WEBB, 1978), sendo responsável pela transferência dos genes do genitor masculino para seu descendente, portanto, participa do processo de reprodução das plantas. A reprodução sexual é realizada a partir da fecundação do gameta masculino com o gameta feminino (o óvulo). Krichevsky et al. (2007) caracteriza o início do processo de polinização, sendo o momento em que o grão de pólen toca o estigma da flor. Sendo o processo de polinização realizado por agentes bióticos ou abióticos.

O grão de pólen é formado dentro das anteras, nos eventos sequenciais e independentes, a microsporogênese e a microgametogênese (HORNER & PALMER, 1995). Os autores também relatam que controle genético da pré meiose, da meiose e da pós meiose na formação do grão de pólen é realizada por vários genes e podem ocorrer anormalidades ou aberrações dependendo da extensão da alteração durante o processo de microsporogênese e microgametogênese resultando em gametas sem atividade, anormais ou inviáveis.

O processo da microsporogênese começa com a meiose e termina com a formação de um micrósporo haplóide, contendo uma cópia completa do genoma, com metade do conteúdo genético da célula original (TOURAEV et al., 1997).

A germinação do grão de pólen ocorre no estigma do aparelho feminino e mostra-se pelo aparecimento do tubo polínico que permite que ocorra a transferência do material genético do grão de pólen para o núcleo do gameta feminino (CRESTI et al., 1992, DAFNI & FIRMAGE, 2000).

3.4 Viabilidade polínica

Estudo de germinação e viabilidade do grão de pólen são úteis ao melhoramento e conservação de plantas, e também em estudos básicos para a compreensão do processo de fecundação (KHAN & PERVEEN, 2006). Os programas de melhoramento genético por meio de polinização controlada realizam a manipulação genética visando a obtenção de cultivares superiores. Para o sucesso dos programas de melhoramento, são necessários a seleção de genitores superiores polinizadores, o isolamento e a conservação do pólen para os cruzamentos controlados que são afetados diretamente pela viabilidade do pólen (TECHIO et al., 2006).

Anormalidades na germinação do grão de pólen podem impedir a fertilização do óvulo, sem sucesso no resultado da polinização (DAFNI, 1992). Para testar a viabilidade de pólen deve-se realizar o cruzamento controlado e, posteriormente, analisar o vingamento de frutos. No entanto, isso levaria tempo no campo do início ao fim da fase reprodutiva, e para facilitar e agilizar trabalhos de melhoramento, métodos diretos e indiretos podem ser utilizados, sendo o direto a germinação do pólen em meio de cultura, simulando as condições do estigma e o indireto fundamentam-se com a reação (DAFNI, 1992; KARAKAYA, 2011).

Os métodos colorimétricos variam a expressão de acordo com o corante químico específico utilizado. Ocorre uma reação do corante com componentes celulares existentes no grão de pólen. A expressão do corante varia de acordo com o genótipo da espécie e entre espécies. Dentre esses testes, destacam-se carmin acético e a solução tripla de Alexander (ALEXANDER, 1969), Tetrazólio (LAKON, 1949), Lactophenol cotton blue (NICOLSON, 1959) e Azul de Triphan ou “Trypan blue” (HAYMAN, 1970).

A viabilidade dos métodos colorimétricos é, em geral, superestimada, mas estes são procedimentos rápidos, práticos e de grande simplicidade. No entanto, para a informação com maior precisão sobre viabilidade é importante usar o método de germinação de pólen *in vitro* em meio de cultivo que aproxima mais do ambiente do estigma onde ocorre a germinação (TECHIO et al., 2006). Esse tipo de teste é considerado um dos mais eficientes para quantificar a viabilidade polínica, por ser uma simulação *in vitro* mais próxima do que acontece na natureza (DAFNI, 1992), no entanto eles subestimam a viabilidade de germinação porque condições idênticas às do estigma é difícil de ser reproduzida *in vitro*.

3.5 Germinação *in vitro*

A análise da viabilidade germinativa *in vitro* procura reproduzir as condições naturais do estigma, nas quais o gameta masculino germina naturalmente, contendo umidade, açúcares

e aminoácidos, que permitem promover a germinação do tubo polínico. O meio de cultivo para germinação do pólen deve ser ajustado para cada espécie e mesmo assim pode haver variação para resultados entre genótipos de uma mesma espécie. A germinação do tubo polínico depende da umidade, da temperatura e do meio de cultivo. No entanto, para muitas espécies, as baixas temperaturas e umidade favorece a conservação do pólen por longo tempo.

O estresse da temperatura, alterações abruptas sofridas durante o desenvolvimento do gameta, da polinização, do desenvolvimento do zigoto e do desenvolvimento do embrião, reduz o número de sementes (HEDHLY et al., 2008). No processo de cruzamento, um dos estádios mais suscetíveis a temperaturas altas é a polinização.

As espécies vegetais também além de possuir exigências de temperatura para a germinação do pólen, exigem também meio de cultura e tempo de incubação adequados. A viabilidade do pólen também é influenciada pelo genótipo, pelo estágio de florescimento, pelo horário da coleta do pólen e pelas condições de armazenamento. O meio básico usado nos testes de germinação é constituído de açúcar e de ácido bórico, podendo também ainda combinar com outros nutrientes (GALLETTA, 1983). Quantidades adequadas de boro estimulam o crescimento do tubo polínico e reduz a probabilidade do rompimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e área experimental

O estudo da biologia reprodutiva e viabilidade polínica foi realizado em plantas de açaizeiro do Pará cultivadas no campo experimental da sede (CES) da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus - AM), entre as coordenadas geográficas 2°53'29,14"S e 59°58'39,90"O e em plantas da cultivar BRS Pará plantadas no Campo Experimental do Rio Urubu (CERU) (Rio Preto da Eva - AM), entre as coordenadas geográficas são latitude 2°26'49.70" S, longitude 59°33'43.50" O.

4.2 Estudo dos eventos fenológicos: floração, antese e formação do fruto.

Estes eventos foram caracterizados nas inflorescências por meio de observações no campo e no laboratório. As descrições foram baseadas nas literaturas de Henderson et al. (1995) e Uhl e Dransfield (1987), utilizando-se máquina digital e microscópio estereoscópio. No CERU foram avaliados 27 indivíduos durante um ano, entre os meses maio de 2018 à maio de 2019, com registro quinzenal dos eventos fenológicos Com registro do número de inflorescências emitidas, , número de inflorescências fechadas com o respectivo ângulo de inserção no perfilho (30°, 45°, 70° e 90°) e abertas, estas, divididas em inflorescências em pré-antese, antese, pós-antese e secas.



Figura 1 - Área de acompanhamento usada para o estudo de florescimento de *Euterpe oleracea* no Campo Experimental do Rio Urubu, Rio Preto da Eva, Amazonas.

Os dados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva no programa Genes (UFV), envolvendo a média, os valores mínimo e máximo e o coeficiente de variação (CV) e realizado análise gráfica no Programa Excel.

4.3 Viabilidade polínica

4.3.1 Estudo de métodos colorimétricos

Para a avaliação da viabilidade polínica foram utilizadas plantas cultivadas no CES e as análises realizadas no laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus - AM. A coleta de material foi realizada entre 9:30 horas e 11:00 horas e amostradas três inflorescência de diferentes indivíduos, sendo coletada uma ráquila por inflorescência, levada imediatamente para o laboratório para retiradas das anteras e análise de viabilidade do pólen. Para acessas as inflorescência foi utilizado andaime (Figura 2). De cada ráquila foram analisadas três lâminas de pólen, montadas utilizando quatro anteras de flores abertas, que após depositadas nas lâminas foram cobertas com a lamínula e maceradas com atrito por leve compressão da lamínula para liberação dos grãos de pólen. Posteriormente foram retirados os resíduos das anteras e acrescentada uma gota de solução do corante, mexendo-se até a homogeneização. O conjunto lâmina/lamínula foi fechado para visualizar o padrão de coloração em microscópio estereoscópico (CYSNE et al., 2015). Este procedimento foi testado com três soluções de corantes, Tetrazólio (0,1%) (LAKON, 1949), Cotton Blue (0,05 %) (NICOLSON, 1959) e Azul de Tripán (0,2 %) (HAYMAN, 1970).



Figura 2 - Estrutura de andaime usada para coleta de inflorescências de *Euterpe oleracea* no Campo Experimental da Sede na Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus - AM.

No tratamento com Tetrazólio (0,1%), após a homogeneização, as lâminas com a solução e pólen foram cobertas com papel alumínio (Figura 3), colocadas em câmara úmida (placa de Petri com papel umedecido) e, em seguida, em uma BOD por 2 horas de incubação com temperatura $\pm 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa técnica permitir corar tecido vivo em plena atividade enzimática e considera como viáveis os grãos de pólen corados de rosa e não viáveis os incolores.



Figura 3 - Preparo de lâminas com pólen de *Euterpe oleracea* para teste colorimétrico com a solução Tetrazólio (0,1%).

As lâminas com teste de coloração Cotton Blue (0,05 %) foram colocadas em câmara úmida em placas de Petri contendo papel umidecido em água destilada (Figura 4) e, em seguida, em uma BOD por 30 min de incubação com temperatura $\pm 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (RADFORD et al., 1974). Essa técnica permite corar tecido vivo em plena atividade enzimática e foi considerado como viáveis os grãos de pólen corados de azul e não viáveis os incolores.

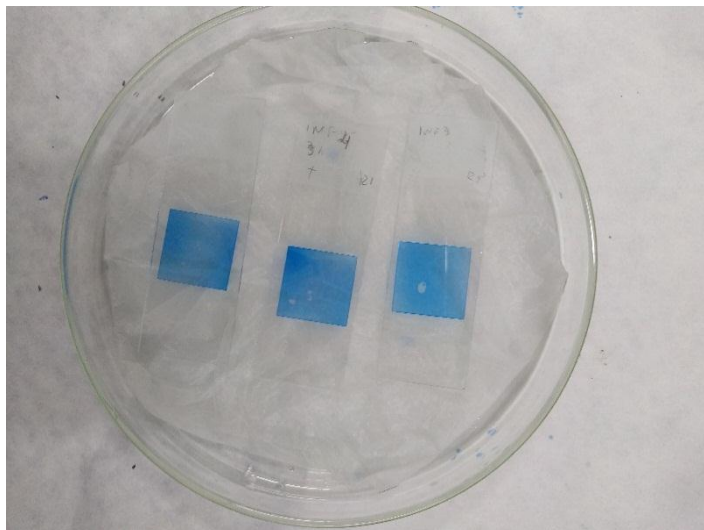


Figura 4 - Preparo de lâminas com pólen de *Euterpe oleracea* para teste colorimétrico com a solução Cotton Blue (0,05%).

As lâminas homogeneizadas com Azul de Tripán (0,2%) (Figura 5) foram colocadas em câmara úmida e deixadas em temperatura ambiente por 5 min.

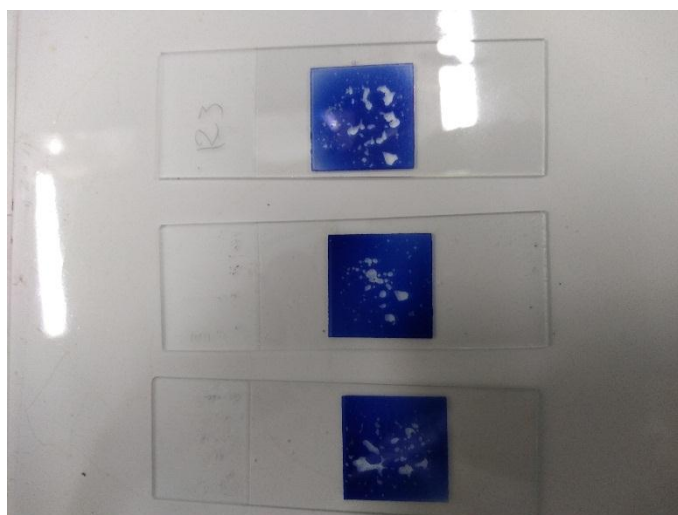


Figura 5 - Preparo de lâminas com pólen de *Euterpe oleracea* para teste colorimétrico com a solução Azul de Tripán (0,2%).

A análise dos grãos de pólen viáveis foi feita em microscópio e a leitura da lâmina foi determinada na área com melhor dispersão dos grãos em relação ao campo de visão. A percentagem de pólen viável foi obtida calculando o número de grãos viáveis dividido pelo número de grãos contados e multiplicado por 100, sendo contados 200 grãos/lâmina.

Os resultados foram submetidos a análise de variância e teste de médias (Tukey, $p < 0,05$), considerando o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 (inflorescências) x 3 (métodos colorimétricos) com três repetições, sendo a unidade experimental uma lâmina. As análises foram realizadas no software Genes da UFV.

4.3.2 Estudo de viabilidade de pólen durante o período de antese da flor masculina

Para verificar a viabilidade do pólen ao longo da antese das flores masculinas foram realizadas coletas e análises de viabilidade durante dez dias após o início da antese das flores masculinas. De uma mesma inflorescência Diariamente foi coletada diariamente um ráquila da inflorescência da qual foram extraídas anteras das flores masculinas em antese no dia da coleta. A viabilidade do pólen foi avaliada com os três métodos colorimétricos: Tetrazólio (0,1%), Cotton Blue (0,05 %) e Azul de Tripán (0,2 %).

Os resultados de viabilidade do pólen durante os dez primeiros dias após o início da antese das flores masculinas foram analisados por meio de estatística descritiva utilizando médias, desvio padrão, expressas de forma gráfica e realizado análise de regressão linear simples no software Genes da UFV.

4.3.3 Estudo de viabilidade de pólen armazenado

Após otimizadas as metodologias com os três corantes do método indireto de análise de grão de pólen, Tetrazólio (0,1 %), Cotton Blue (0,05 %) e Azul de Tripán (0,2%) foram coletadas inflorescências de três plantas diferentes e extraído anteras e armazenadas para análise de viabilidade de pólen armazenado *in vitro* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes do armazenamento foi avaliada a viabilidade de pólen coletado. Após um mês de armazenamento, foi retirada amostra de pólen e, esta foi colocada para hidratar por duas horas, em câmara úmida e, após a hidratação foi adotada as metodologias aplicadas para pólen *in vivo* com os três corantes (CYSNE et al., 2015). A percentagem de pólen viável foi obtida calculando o número de grãos viáveis dividido pelo número de grãos contados e multiplicado por 100, sendo contados 200 grãos/lâmina.

Os resultados de viabilidade obtidos do pólen fresco e após armazenamento por um mês foram comparados por meio de estatística descritiva no software Genes da UFV.

4.3.4 Estudo de germinação de pólen

Para o estudo de germinação de pólen foram coletadas inflorescência de três indivíduos às 10:30 hrs. Foram removidas as anteras e armazenadas em microtúbulos. Os testes de germinação foram realizados utilizando dois métodos, em três repetições de cada indivíduo. O mesmo número de tratamentos e repetições foram analisados com método de coloração Cotton Blue (0,05 %) que foi usado para comparação.

Para a germinação do pólen in vitro foram testados dois meios de cultura semi sólido, um preparado com 0,6 g de ágar, 6,0 g de sacarose e 0,08 g Cloreto de Cálcio completado até 60 ml com água destilada e distribuído em placas de petri (Figura 6). O segundo meio com todos os componentes do primeiro, exceto o Cloreto de Cálcio. Após a solidificação e o resfriamento do meio de cultura, o pólen foi aspergido sobre a superfície do meio solidificado com auxílio de um pincel e, em seguida, foi incubado a 37°C, em B.O.D., durante 24 horas.

Após o período de incubação, sob microscópio, em objetiva com aumento de 20 vezes, o número de pólenes germinados foi contabilizado. Considerou-se que o grão de pólen germinado quando o tubo polínico alcançou comprimento igual ou maior ao diâmetro do pólen. Foram adotadas quatro repetições, sendo cada uma constituída de um campo de observação formado por cem polens, totalizando quatrocentos grãos de pólen.

Os resultados de viabilidade de germinação polínica obtidos foram comparados por meio do teste t pareado ($t, p < 0,05$) no software Genes da UFV.

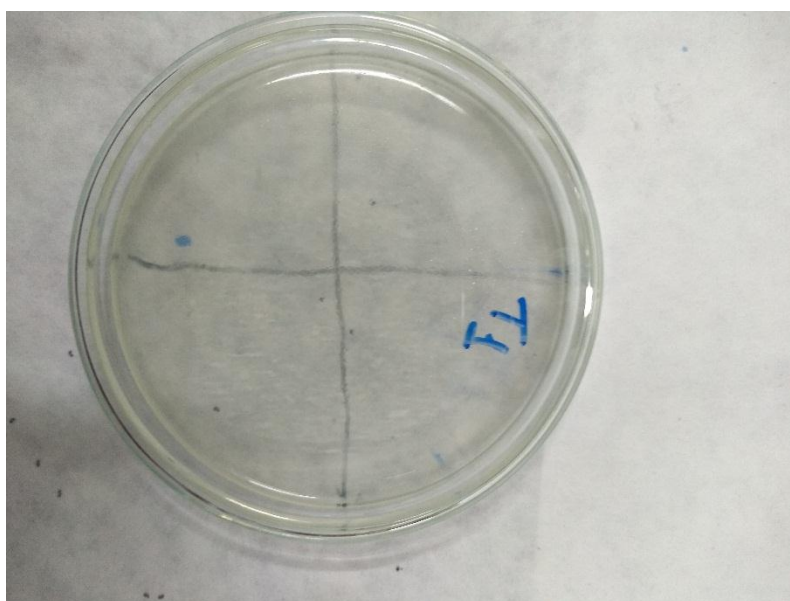


Figura 6 - Preparo de placa com meio para germinação de pólen.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo dos eventos fenológicos: floração, antese e formação do fruto.

Os eventos fenológicos de mudança de floração e frutificação são apresentados nas Figuras 7, 8 e 9. Em relação aos eventos da floração foram registrados em todo o período, com a emissão de inflorescência alcançando as maiores porcentagens nos meses de fevereiro e abril de 2019, ou seja, no período mais chuvoso. Fato semelhante ocorreu com a presença de inflorescências em plena floração sendo, porém, mais intensa, nos meses de maio de 2018 e abril de 2019. A incidência de cachos se deu durante o ano todo com maior índice de cachos nos meses de julho, Agosto, novembro e dezembro de 2018.

Verificou-se que o açaizeiro na Amazônia Ocidental é uma planta monóica com inflorescência tipo cacho (Figuras 7b e 7c). As flores são unissexuais e pequenas, com distribuição em tríades (duas masculinas e uma feminina), que apresenta eventos de floração e de frutificação o ano todo.



Figura 7 - (a) Espata fechada. (b) Inflorescência recém aberta (c) Inflorescência com flores masculinas abertas.



Figura 8 - (a) Ráquila com flor feminina. (b) Cacho com frutos verdes em formação (c) Cacho com fruto próximo ao ponto de colheita.

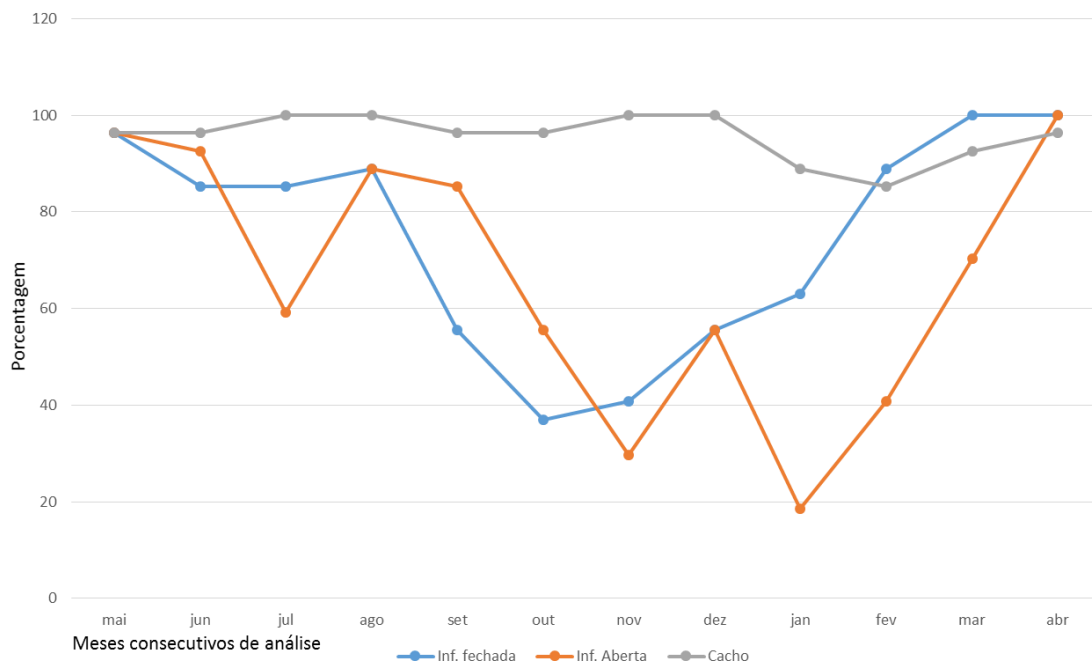


Figura 9 - Porcentagem de ocorrência de eventos fenológicos de 27 indivíduos de *Euterpe oleracea* no decorrer de 12 meses entre 15 de maio de 2018 e 14 de abril de 2019. Inf. fechada = inflorescências fechadas. Inf. aberta = inflorescências abertas.

Os eventos de floração foram mais frequentes no período mais chuvoso, enquanto os de frutificação, no período menos chuvoso (Tabela 1). Em populações naturais, o açazeiro apresenta maior floração e frutificação em períodos distintos (JARDIM, 1991; JARDIM & KAGEYAMA, 1994).

Tabela 1 - Porcentagem de ocorrência de eventos fenológicos de 27 indivíduos de *Euterpe oleracea* no decorrer de 12 meses entre 15 de maio de 2018 e 14 de abril de 2019. Inf. fechada = inflorescências fechadas. Inf. aberta = inflorescências abertas.

	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez	jan	fev	mar	abr
Inf. fechada	96	85	85	89	56	37	41	56	63	89	100	100
Inf. aberta	96	93	59	89	85	56	30	56	19	41	70	100
Cachos	96	96	100	100	96	96	100	100	89	85	93	96

5.2 Viabilidade polínica

5.2.1 Estudo de métodos colorimétricos

Os programas de melhoramento necessitam ter controle da viabilidade polínica para as espécie vegetais visando o sucesso de polinizações controladas para a obtenção de bom índice de fertilização. O uso de diferentes tipos corantes em diversas concentrações podem ser

observados na literatura para análise de viabilidade polínica e no presente trabalho, três inflorescências foram analisadas com os métodos de coloração: Tetrazólio (0,1 %), Cotton Blue (0,05 %) e Azul de Tripan (0,2 %) em um fatorial 3x3 para comparar metodologias para *Euterpe oleracea* e estudar a viabilidade polínica na Amazônia Ocidental. Os resultados da análise de variância para porcentagem de pólen viável para as três metodologias testadas em três inflorescências podem ser observados na Tabela 2. Verificou-se diferenças significativas para inflorescências e soluções, mostrando a existência de diferença quanto ao uso das metodologias e variação também quanto às inflorescência analisadas. Tal resultado evidencia que o genótipo e a escolha do método de análise colorimétrico podem influenciar nos resultados, entretanto é necessário a comparação entre os métodos para identificar o melhor método para cada espécie. Ressalta-se que não houve interação significativa entre inflorescências x soluções, evidenciando ausência na mudança de comportamento das inflorescências dos genótipo frente as variações do método de coloração.

Tabela 2 - Análise de variância de porcentagem de pólen viável utilizando três soluções para estudo de viabilidade colorimétrica (Tetrazólio 0,1 %, Cotton Blue 0,05 % e Azul de Tripan 0,2 %) em três inflorescências de *Euterpe oleracea*.

Fonte de variação	GL	QM	F	Probabilidade
Inflorescências	2	810,6*	10,638	0,000892*
Soluções	2	7.550,5*	99,092	0,000000*
Inflorescências * Soluções	4	177,1	2,324	0,095863
Resíduo	18	76,2		
Total	26			

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Coeficiente de variância a 12,75%.
Delineamento Inteiramente Casualizado, fatorial 3x3.

Um método colorimétrico confiável para avaliar a viabilidade de pólen, permite relacionar as estruturas do gameta masculino de acordo com cada corante (MENCK et al., 1990).

De acordo com a Tabela 3, verifica-se que os corantes que apresentaram maior viabilidade de pólen para *E. oleracea* são o Cotton Blue 0,05 % e o Tetrazólio 0,1 %, com porcentagens de viabilidade 93,49 % e 82,80 %, respectivamente, e estes diferiram estatisticamente de Azul de Tripan 0,2 % que detectou menor viabilidade polínica (64,01 %). Ressalta-se que na prática o Azul de Tripan 0,2 % tem um processo de ação mais rápido e por

isso a análise deve ser feita com menor tempo de atuação do corante devido o corante agir em tecido morto e quanto mais tempo o pólen exposto ao corante menor será o número de pólen viável. Para padronização da análise, todas as lâminas do experimento foram fotografadas cinco minutos após o pólen exposto ao Azul de Tripan 0,2 % para contagem do número de pólen viável (pólen azul claro). No entanto, a metodologia Azul de Tripan pode ser testada em menores concentrações (0,1 % ou 0,5 %) no mesmo tempo de coloração (5 minutos), porque este método pode ser utilizado ao ser melhor otimizado como uma metodologia alternativa para complementar metodologias que coram tecido vivo como Cotton Blue 0,05 % e o Tetrazólio 0,1 %.

O resultado da análise de viabilidade de pólen mostrou a variação na porcentagem de pólen viáveis de diferentes genótipos de *E. oleracea* (Tabela 3), evidenciando que os programas de melhoramento devem também analisar a viabilidade de pólen dos diferentes genitores doadores da espécie para sucesso em polinizações controladas. Ressalta-se que porcentagens de viabilidade de pólen inferiores foram relatadas para açazeiros cultivados no litoral paulista (76 % a 82 %) (BOVI et al. 1987), no entanto altos valores de porcentagem de viabilidade polínica “in vivo” e “in vitro” em genótipos de diferentes procedências de açazeiro também foram relatadas por Oliveira et al. (2001).

Tabela 3 - Comparação da porcentagem de pólen viável utilizando três soluções colorimétricas em três inflorescências de três genótipos diferentes de *Euterpe oleracea*.

Método de coloração	Porcentagem (%) média de pólen viável			
	G 1	G 2	G 3	Eficiência do método *
Cotton Blue 0,05 %	93,42	92,72	94,34	93,49 a
Tetrazólio 0,1 %	84,05	80,68	83,67	82,80 a
Azul de Tripan 0,2 %	68,83	64,16	59,05	64,01 b
Desempenho dos genótipos *	82,10 a	79,19 b	79,02 b	

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. IG = Inflorescências dos genótipos.

A análise para tomada de decisão de um melhor método colorimétrico para analisar viabilidade de pólen de uma espécie não pode ser realizada somente de forma quantitativa. Um bom corante deve permitir identificar um maior contraste entre pólen viável e inviável para facilitar a análise e menor variação entre repetições de mesmo genótipo, mesma inflorescência

e mesmo corante. Neste sentido, o método colorimétrico Cotton blue 0,05 % apresentou maior poder de discriminação de viabilidade de pólen para *E. oleracea* (Figura 10) e menor variação considerando repetições nas avaliações controladas, confirmando a eficiência deste corante não apenas considerando a análise quantitativa. O corante também é apresentado na literatura como azul de Lactofenol e baseia-se na coloração do citoplasma denso de células vivas, tornando os mesmos azuis, não colorindo aqueles que não possuem citoplasma ou o contém em baixa quantidade (RADFORD et al., 1974; PLINE et al., 2002; MUNHOZ et al., 2008).

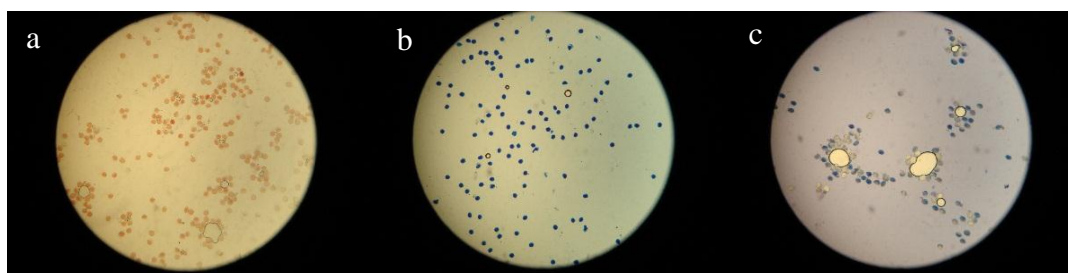


Figura 10 - (a) Lâmina com pólen viáveis corados em vermelho escuro com tetrazólio (0,1 %) e inviáveis em vermelho claro. (b) Lâmina com pólen viáveis corados em azul escuro com Cotton blue (0,05 %) e inviáveis em azul claro. (c) Lâmina com pólen inviáveis corados em azul escuro com Azul de Tripán (0,2 %) e viáveis em azul claro.

Não foram encontradas informações na literatura sobre as mesmas concentrações e períodos utilizando os métodos colorimétricos apresentados, para comparar com o presente trabalho. A maioria dos trabalhos encontrados usa menor concentração com maior tempo, com 12, 18 e ou até 24 horas, como apresentou França (2008), em seu trabalho com pólen de berinjela. No entanto, estamos procurando um teste rápido e eficiente no poder de discriminação comprado a métodos de germinação realizado por 24h. A definição de um método rápido facilita a rotina dos programas de melhoramento.

5.2.2 Estudo de viabilidade de pólen durante o período de antese da flor masculina

Ao realizar a definição dos corantes capazes de discriminar com maior eficiência a viabilidade de pólen de genótipos de *E. oleracea* (Cotton blue 0,05 % e Tetrazólio 0,1 %), foi realizado a análise de monitoramento de uma inflorescência de um indivíduo ao longo de dez dias, visando observar a variação de viabilidade de pólen dentro da mesma inflorescência desde a abertura das primeiras flores até o final do período de liberação de pólen. Os resultados da análise gráfica (Figura 11) e de regressão linear (Figuras 12 e 13) mostram que não houve alteração com grande variação nas porcentagens de viabilidade de pólen ao longo dos dez dias, podendo obter média de pólen viável dos dias de avaliação superior a 70 % (Tabela 4). No

entanto, considerando os vários dias de análise, o método colorimétrico Cotton blue 0,05, apresentou maior estabilidade nas análises comparado a Tetrazólio 0,1 %, como menor variação nos valores de cada dia, reforçando a capacidade do método para análise de viabilidade.

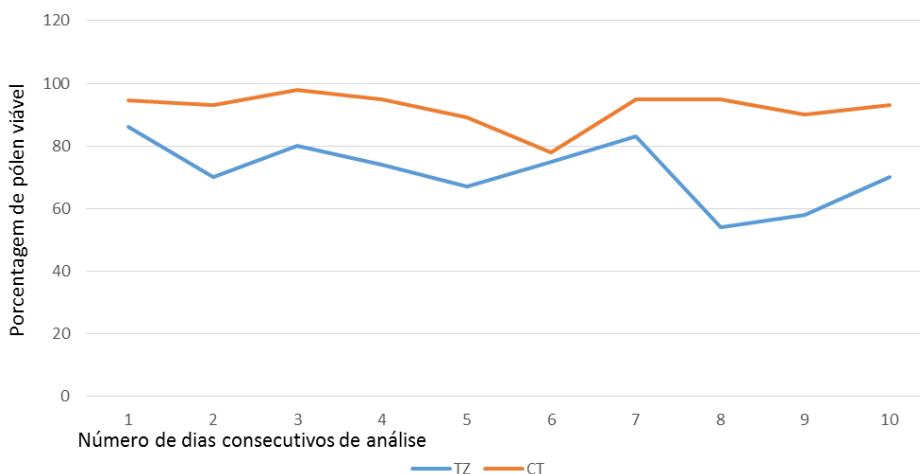


Figura 11 - Porcentagem de viabilidade de pólen de uma inflorescência de um indivíduo avaliada no decorrer de 10 dias consecutivos. TZ: Tetrazólio 0,1 %. CT: Cotton Blue 0,05 %.

Tabela 4 - Porcentagem de viabilidade de pólen de uma inflorescência de um único indivíduo avaliada durante o período de 10 dias consecutivos. TZ: Tetrazólio 0,1%. CT: Cotton Blue 0,05%.

Solução	Porcentagem (%) de pólen viável por dia de avaliação										Média de viabilidade de 10 dias de avaliação
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
TZ (%)	86	70	80	74	67	75	83	54	58	70	71,17
CT (%)	95	93	98	95	89	78	95	95	90	93	92,10

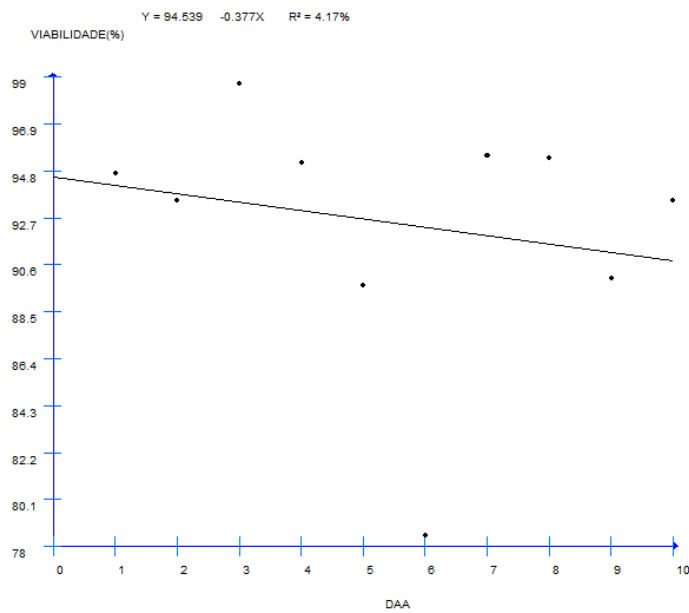


Figura 12 - Regressão linear de viabilidade de pólen de uma inflorescência de um único indivíduo avaliada no decorrer de 10 dias consecutivos pelo método colorimétrico Tetrazólio.

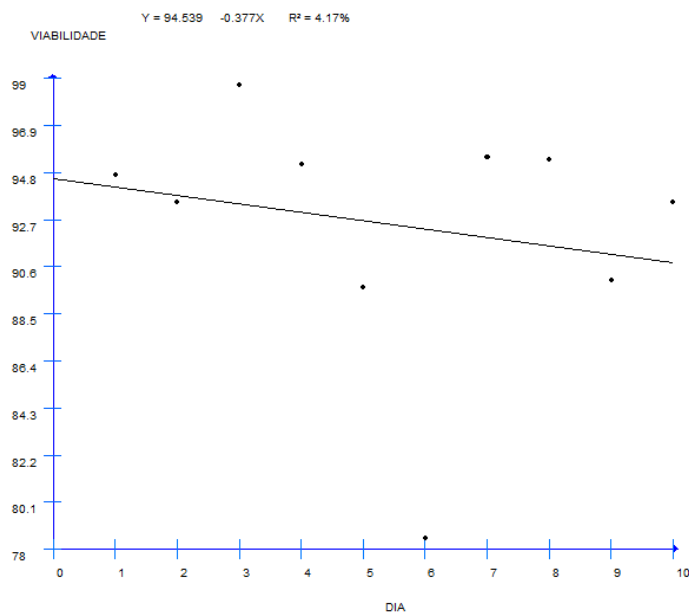


Figura 13 - Regressão linear de viabilidade de pólen de uma inflorescência de um único indivíduo avaliada no decorrer de 10 dias consecutivos pelo método colorimétrico com Cotton Blue.

5.2.3 Estudo de viabilidade de pólen armazenado

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que houve diferença estatística significativa entre 0 e 30 dias de armazenamento (Tabela 5), entretanto a conservação e manutenção da viabilidade do pólen de genótipos de *E. oleracea* é possível de ser realizadas in vitro à -20 °C por pelo menos um período de 30 dias. Considerando os métodos

colorimétricos, Tetrazólio 0,1 % e Cotton Blue 0,05 %, foi possível obter porcentagens de viabilidade superiores a 70 % para os quatro genótipos analisados (Tabela 6). A alta viabilidade de pólen não armazenado (0 dias) de flores abertas (média 93,2 %) e viabilidade de pólen armazenado acima de 70 % foram encontradas por Oliveira et al., 2001 e pode ser usada em polinizações controladas sem prejuízos. Condições de armazenamento de sucesso de até doze meses de conservação foram relatadas para *E. oleracea* (OLIVEIRA et al., 2001).

Tabela 5 - Comparação da porcentagem de pólenes viáveis as 0 e 30 dias de armazenamento in vitro a 20°C em 4 indivíduos de *Euterpe oleracea* e três repetições, utilizando o método colorimétrico Cotton Blue 0,05 %.

Fonte de variação	GL	QM	F	Probabilidade
Tempo de armazenamento (0 e 30 dias)	1	196,08	17,0852	0,00078*
Genótipos	3	15,145	1,3196	0,30267
Tempo de armazenamento x Genótipos	3	3,612	0,3147	0,81454
Resíduo	16	11,477		
Total	23			

*Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F. Coeficiente de variância a 4.04 %.

Tabela 6 - Porcentagem (%) de pólenes viáveis aos 0 e 30 dias de armazenamento in vitro a -20 °C em 4 indivíduos de *Euterpe oleracea* e três repetições, utilizando método colorimétrico Cotton Blue 0,05 %.

Dias de armazenamento	Genótipo 1	Genótipo 2	Genótipo 3	Genótipo 4	Média de germinação
0	88,00	86,50	85,83	86,33	86,66a
30	84,17	80,83	80,10	78,71	80,95b
Média de germinação	86,08 a	83,66 a	82,96 a	82,52 a	

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, a 5 % de probabilidade, pelo teste t.

5.2.4 Estudo de germinação de pólen

O resultado de germinação de pólen para o meio de cultura com cálcio foi eficiente comparado ao método sem cálcio para *E. oleracea*. O valor médio de germinação (69,48 %) (Tabela 7) foi aproximado ao encontrado na literatura para coqueiro usando o meio Lora (66,87 %) (MOURA et al., 2015). O percentual de germinação de pólen de híbridos interespecíficos de dendezeiro x caiaué foi de 54,8 a 58,3 %, do caiaué (73,1 %), inferiores à do dendezeiro (84,8 %). 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., 2008). O teste de coloração com Cotton Blue forneceu estimativa de viabilidade (94,83 %) superior ao teste de germinação in vitro, no entanto, sabe-se que os corantes superestimaram a viabilidade do grão de pólen, enquanto a germinação in vitro subestimam. A Figura 14 mostra a viabilidade de pólen a partir do método de germinação sem uso de cálcio.



Figura 14 - Viabilidade de pólen a partir do método de germinação sem utilização de cálcio.

Tabela 7 - Comparação da porcentagem de pólen viável utilizando três tratamentos com três inflorescências de três genótipos diferentes de *Euterpe oleracea*. Tratamentos: Cotton Blue (0,05%), Meio de cultura com CaCl₂ e Meio de cultura sem CaCl₂.

Método de coloração	Porcentagem (%) média de pólen viável			
	G1	G 2	G 3	Eficiência do método *
Cotton Blue 0,05 %	95,12	95,87	93,50	94,83 a
Meio de cultura com CaCl₂	68,25	69,20	71,00	69,48 b
Meio de cultura sem CaCl₂	18,37	20,00	20,25	19,54 c
Desempenho dos genótipos *	60,58 a	61,69 a	61,58 a	

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

6 CONCLUSÃO

Na Amazônia Ocidental, para *E. oleracea*, os eventos de floração em doze meses foram mais frequentes no período mais chuvoso, enquanto os de frutificação, no período menos chuvoso.

Todos corantes testados permitiram diferenciação entre os grãos de pólen viáveis dos inviáveis em *E. oleracea*, porém Cotton blue (0,05 %) e Tetrazólio (0,1 %) apresentaram maior contraste no momento da contagem do número de pólenes viáveis comparado ao Azul de Tripan (0,2 %).

Os corantes Cotton blue (0,05 %) e Tetrazólio (0,1 %) podem ser usados para distinguir os pólenes viáveis dos inviáveis em *E. oleracea* por apresentar porcentagem de viabilidade de grão de pólen acima de 70%, sendo este percentual considerado satisfatório para análises em programas de melhoramento.

Entre os corantes avaliados recomenda-se o corante Cotton blue (0,05 %) para monitoramento de viabilidade de pólen em *E. oleracea* devido associação de resultados de análise de porcentagem de viabilidade de pólen e maior qualidade no poder de discriminação do contraste de pólenes viáveis e inviáveis.

A conservação e manutenção da viabilidade do pólen de genótipos de *E. oleracea* pode ser realizada in vitro à -20 °C por pelo menos um período de 30 dias.

7 REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and non aborted pollen. *Stain Technology*, v.44, p.117-122, 1969.
- ALTMAN, R.P.A . O caroço do Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Boletim Técnico do Instituto Agrônômico Norte, Belém. 1956.
- ALVES, M.R.P.; DEMATTÊ, M.E.S.P. Palmeiras: Características Botânicas e Evolução. Campinas - SP, Brasil, Fundação Cargill, 129p., 1987.
- ANDERSON, A.B. Use and management of native forests dominated by açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) in the amazon estuary. In: BALICK, M.J., ed. The palm - tree of life: biology, utilization and conservation. *Advances in Economical Botany*, New York, v.6, p.144-154, 1986.
- BATISTA, G.S. Morfologia e germinação de sementes de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc (Arecaceae). Dissertação de Mestrado. Jabocatibal, São Paulo, 2009.
- BIONDO, E.; BATTISTIN, A. 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*, v.15, p.39-44, 2001.
- CALZAVARA, B.B.G. As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico. Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém: FCAP, n5, 103p. 1972.
- CAMPOS, F.A.M.; PECUNI, M.; SIGUEIRA, R. DE. Valor nutritivo de frutas brasileiras *Arquivo Brasileiro de Nutrição*, Rio de Janeiro, 1951.
- CARVALHO, J.E.U.; NASCIMENTO, W.M.O.; MÜLLER, C.H. Características físicas e de germinação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia. Belém: EMBRAPA-CPATU, Boletim de Pesquisa, n.203, 18p.1998.
- CAVALCANTE, P. Frutas comestíveis da Amazônia. Belém: CEJUP, 271p.1991.
- CHIA, G.S.; LOPES, R.; CUNHA, R.N.V. da; ROCHA, R.N.C. DA. Germinação in vitro de pólen de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. *Ciência Rural*, v.39, p.1569-1571, 2009.
- CYSNE, B.L.; ANDRADE, M.C.R.; GONÇALVES, M.A.B.; LOPES, C.A. DE A.; RAMOS, S.; ZANINI, G.M.; CABELLO, P.H. Avaliação clínica, morfométrica e hematológica de macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) cativos. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v3, p.36-44, 2015.
- CRESTI, M.; BLACKMORE, S.; VAN WENT, J.L. Atlas of sexual reproduction in flowering plants. Springer, Berlin. 249 p., 1992.
- DAFNI, A. Pollination ecology: a practical approach. New York: Oxford University, 1992. 250p.

DAFNI, A.; FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*, v.222, p.113-132, 2000.

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

FARIAS NETO, J.T. DE; RESENDE, M.D.V. DE; OLIVEIRA, M.S.P. DE; NOGUEIRA, O.L.; FALCÃO, P.N.B.; SANTOS, N.S.A. Avaliação genética de progênies de polinização aberta de açaí (*Euterpe oleracea*) e estimativas de parâmetros genéticos. *Cerne*, v.13, p.376-383, 2008.

FREITAS, E. O. Embriogênese somática e análises morfoanatômicas e por citometria de fluxo em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). Dissertação de Mestrado. Brasília: UnB, 73 p., 2014.

HAYMAN, D.S. 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, 1970.

GALLETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Ed.). *Methods in fruit breeding*. Indiana: Purdue University Press, cap.3, p.23-47, 1983.

HEDHLY, A.; HORMAZA, J.I.; HERRERO, M. Global warming and sexual plant reproduction. *Trends in Plant Science*, v.14, p.30-36, 2008.

HENDERSON, A. A Multivariate Analysis of Hyospathe (Palmae). *American Journal of Botany*, v.91, p.953-965, 2004.

HENDERSON, A. Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.151, p.103-111, 2006.

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

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

HENDERSON, A.; GALEANO, G. *Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae: Euterpeinae)*. New York: New York Botanical Garden, 1996. 90p. (*Flora Neotropica*, 72).

HODGE, W.H. Palm cabbage. *Principes*, v.9, p.124-131, 1965.

HORNER, H. T.; PALMER, R.G. Mechanisms of genetic male sterility. *Crop Science*, v.35, p.1527-1535, 1995.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2013*. Rio de Janeiro: IBGE, v.28, p.66, 2017.

KAFIZADEH, N.; CARAPETIAN, J.; KALANTARI, K. M. Effects of heat on pollen viability and pollen tube growth in pepper. *Research Journal of Biological Sciences*, v.3, p.1159-1162, 2008.

KARAKAYA, D. Effects of inflorescence on pollen viability and morphology of strawberry (*Fragaria vesca* L.). *Journal of Science and Technology*, v.1, p.43-47, 2011.

KARUN, A.; SAJINI, K.K. Cryopreservation of coconut zygotic embryos and pollen. Kasaragod: Central Plantation Crops Research Institute. *Boletim Técnico*, n.63, 17p., 2010.

KARUN, A.; SAJINI, K.K.S.; NAIR, M.; KUMARAN, P.M.; SAMSUDHEEN, K. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen. *Journal of Plantation Crops*, v.3, p.568-571, 2006.

KHAN, S.A.; PERVEEN, A. Germination capacity of stored pollen of *Abelmoschus esculentus* L. (Malvaceae) and their maintenance. *Pakistan Journal of Botany*, v.38, p.233-236, 2006.

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

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

LIMA, A.L.; SOARES, J.J. Aspectos florísticos e ecológicos de palmeiras (Arecaceae) da Reserva Biológica de Duas Bocas, Cariacica, Espírito Santo. *Boletim Museu de Biologia Prof. "Mello Leitão"*, Santa Teresa, v.16, p.5-20, 2003.

LIMA, R.R. Agricultura nas várzeas do Estuário. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte*, n.33, 1956.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. de.; COSTA, J.T. de M.; CERQUEIRA, L.S.C. de.; FERREIRA, E. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2004.

MENEZES NETO, M.A. Influência da disponibilidade de oxigênio sobre a germinação, crescimento e atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase em açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Lavras, Tese de Mestrado. 50p., 1994.

MOORE, P.D.; WEBB, J.A. An illustrated guide to pollen analysis. A Halsted Press Book, New York, v.1, p.133, 1978.

MOURA, C.R.F.; MACHADO, C. de A.; LEDO, A. da S. Germinação *in vitro* e viabilidade de grãos de pólen de acessos de coqueiro. *Revista Ciência Agronômica*. v.46, p.421-427, 2015.

NICOLSON, T.H. Mycorrhiza in the Gramineae .I. Vesicular-arbuscular endo-phytes, with special reference to the external phase. *Transactions of the British Mycological Society*. 42,421-438, 1959.

NODA, H. In situ breeding and conservation of Amazonian horticultural species. In: Borém, A.; Lopes, M.T.G.; Clement, C.R.; Noda, H. (Eds.), *Domestication and breeding: Amazonian species*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. p.170-208. 2012.

NOGUEIRA, O.L.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; MÜLLER, A.A. Sistema de Produção do Açaí, Embrapa Amazônia Oriental, Sistemas de Produção, p.4, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai/index.htm> (acesso em: 28/12/2018).

OLIVEIRA, M.S.P.; FARIAS NETO, J.T.; PENA, R.S. Açai: técnicas de cultivo e processamento. Fortaleza: Instituto Frutal, p.104, 2007.

OLIVEIRA, A. G. de; CLEAVER, A.J.T.; EMPERAIRE, L.; KAGEYAMA, P.Y.; STELLA, A. Encontro nacional sobre agrobiodiversidade e diversidade cultural. In: Agrobiodiversidade e diversidade cultural. Brasília, Ministério do Meio Ambiente. 82p, 2006.

OLIVEIRA, M.S.P de. Melhoramento genético do açazeiro na Amazônia Oriental. 15p. (apostila). 1998.

OLIVEIRA, M. do S.P. de; MOCHIUTTI, S.; FARIAS NETO, J.T. de. Domesticação e melhoramento do açazeiro. In: BOREM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Edr.). Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Anais p. 207-235, 2009.

OLIVEIRA, M. do S.P. de; MÁUES, M.M. KALUME, M.A. de A. Viabilidade de pólen in vivo e in vitro em genótipos de açazeiro. Acta Botânica Brasileira. v.15, p.27-33, 2001.

OLIVEIRA, M.S.P.; CARVALHO, J.E.U.; NASCIMENTO, W.M.O. Açai (*Euterpe oleraceae* Mart.). Jaboticabal: FUNEP. Série Frutas Nativas, N.7, 52 p., 2000.

OLIVEIRA, M. do S.P. Avaliação do modo de reprodução e de caracteres quantitativos em 20 acessos de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart. – Arecaceae) em Belém-PA. Tese de Mestrado. Recife: UFRPE, 1995. 145p., 1995.

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

ROCHA, A. E. S.; SILVA, M. F. F. Aspectos fitossociológicos, florísticos e etnobotânicos das palmeiras (Arecaceae) de floresta secundária no município de Bragança, PA, Brasil. Acta Botanica Brasilica, São Paulo, v.19, p.657-667, 2005.

RODRIGUES, L. R.; DE OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. Revista Brasileira de Biociências/Brazilian Journal of Biosciences, v.2,4, p.159-167, 2004.

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

TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C.; PEDROZO, C.A.; PEREIRA, A.V. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim elefante x milho). Acta Scientiarum: Biological Sciences, v.28, p.7-12, 2006.

TOURAEV, A.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends in Plant Science, v.2, n.8, p.297-302, 1997.

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

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J.E.U. de; MÜLLER, C.H.; DIAZ, S.C.; ALMANZA, M. *Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia.* Lima:Tratado de Cooperación Amazonica. TCA, SPT, n.44, 367p., 1996.

YOKOMIZO, G.K.; QUEIROZ, J.A.L.; MOCHIUTTI, S.; PINHEIRO, I. N.; SILVA, P. A. R. da. *Desempenho de progênies de açaizeiros avaliadas para caracteres agronômicos no Estado do Amapá.* Scientia Florestalis, v. 38, n. 87, p. 367-376, set. 2010.