

ANA CARLA BRITO

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MACAÚBA: FLORAÇÃO,
POLINIZADORES, FRUTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE PÓLEN**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B862b
2013

Brito, Ana Carla, 1979-

Biologia reprodutiva de macaúba : floração, polinizadores,
frutificação e conservação de pólen / Ana Carla Brito. –
Viçosa, MG, 2013.
xi, 47 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas - Reprodução. 2. Macaúba. 3. Pólen.
4. Coleóptero. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 584.5

ANA CARLA BRITO

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MACAÚBA: FLORAÇÃO,
POLINIZADORES, FRUTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE PÓLEN**

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

APROVADA: 25 de março de 2013.

D.Sc. Nilton Tadeu Vilela Junqueira

D.Sc. Simone Palma Favaro

D.Sc. Milene Faria Vieira

D.Sc. José Antonio Saraiva Grossi

D.Sc. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Orientador)

Aos meus pais, Carlito e Antonia,
e ao meu noivo Joadson

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor, saúde, equilíbrio e sabedoria.

Aos meus pais, Carlito e Antonia, pelo amor, companheirismo, educação e pela transmissão de valores de vida imprescindíveis. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Aos meus irmãos, Adriana e Toninho; meu cunhado, Magno; minha cunhada, Nilzete; e sobrinhos Yan e Luiza, obrigada por tanto amor, carinho e cuidado. Vocês me fizeram forte e capaz de suportar a distância e todas as dificuldades. Obrigada por acreditarem em mim!

Ao meu noivo, Joadson, pelo amor, confiança, paciência e companheirismo. Por ser o meu ombro amigo nos momentos difíceis e, em que a saudade falou mais alto.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de formação.

Às instituições de fomento CNPq e CAPES pela concessão de bolsa. À FAPEMIG por auxílios financeiros para a condução dos trabalhos.

Ao meu orientador, prof. Sérgio Motoike, pela confiança, apoio e incentivo constante para a conclusão desse trabalho.

Ao professor Paulo Cecon, pelo auxílio estatístico, dedicação e amizade.

À professora Milene, pela amizade, parceria, e apoio constante na condução dos trabalhos.

Ao Sr. Carlos e D. Lulucha pela permissão de uso de sua propriedade para a condução dos experimentos e acolhimento familiar. Ao funcionário Ailton pela prestatividade.

Às amigas, Angélica, Luciana, Dani, Lorêta, Aurora pela amizade, carinho e companheirismo. Ao amigo Sofrimento, pela amizade e parceria.

Ao amigo Luis Carlos, pela parceria e imensa ajuda na identificação dos insetos.

Aos estagiários, Antonio, Zé Maria e Débora; e funcionário, Bebeto, pela imensa ajuda nos trabalhos de campo. Muito obrigada! Ao técnico de laboratório, Francisco, pela amizade e assistência e, aos colegas do grupo REMAPE, pela parceria.

A todos os coordenadores e funcionários, dos Laboratórios de: Anatomia Vegetal, Biotecnologia e Melhoramento, Cultura de Tecidos Vegetais e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise, pelo suporte.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuições.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
RESUMO	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS	6
Local de estudo	6
Espécie estudada.....	7
Fenologia e Morfologia Floral.....	7
Biologia Floral.....	8
Sistema Reprodutivo	8
Visitantes Florais	9
RESULTADOS	10
Fenologia de Floração	10
Morfologia Floral	13
Biologia Floral.....	15
Sistema Reprodutivo	15
Visitantes Florais	16
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 2	28
RESUMO	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
Ensaio 1: Avaliação da viabilidade do pólen por meio de testes colorimétricos e germinativos	32
Ensaio 2:Efeito da dessecação e meios de cultura na germinação do pólen	33
Ensaio 3: Efeito de diferentes temperaturas e dessecação na germinação do pólen ..	34

RESULTADOS	34
Ensaio 1: Testes colorimétricos e germinativos	34
Ensaio 2: Efeito da dessecação e meios de cultura na germinação do pólen	37
Ensaio 3: Efeito de diferentes temperaturas e dessecação na germinação do pólen ..	37
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CONCLUSÕES GERAIS	47

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Relações entre fenologia, polinização por besouros e frutificação em população natural de macaúba.

Figura 1. *Acrocomia aculeata*: A- planta adulta; B- inflorescência jovem totalmente recoberta pela espata; C- inflorescência exposta, após a abertura da espata, posicionada acima da inflorescência.....11

Figura 2. Período de floração de *Acrocomia aculeata* e condições meteorológicas. A- outubro de 2010 a setembro de 2011; B-Outubro de 2011 a setembro de 2012.....12

Figura 3. Ráquulas de *Acrocomia aculeata*. A- Ráquulas curtas, com flores pistiladas na porção basal e estaminadas na porção restante; ráquila superior com flores em antese e a inferior em pré-antese; B- ráquila longa, em antese.....14

Figura 4. Flores pistiladas e estaminadas de *Acrocomia aculeata* e detalhes de suas partes. A- flor pistilada; B- flor pistilada, ladeada por flor estaminada; C- parte da área estigmática (porção ventral); D- flor estaminada iniciando a antese, E- em plena exposição de estames, F-destaque do pistilódio (seta); G- estigma apresentando reação positiva ao teste de receptividade, com o uso do peróxido de hidrogênio (note borbulhamento sobre as áreas estigmáticas); H- grão de pólen viável, corado com carmim acético e I- inviável.....14

Figura 5. Visitantes florais de *Acrocomia aculeata* em Minas Gerais. (A) Polinizadores em inflorescências; (B) Hymenoptera: *Apis mellifera*; (C) Coleoptera: *Dialomia* sp., (D) *Phyllotrox tatarianae*, (E) *Andranthobius* aff. *bondari*, (F) *Mystrops debilis*, (G) *Mystrops dalmasi*, (H) *Mystrops costaricensis*, (I) pólen no corpo de *M. costaricensis*; (J) Diptera: *Drosophila* sp.; (K) Thysanoptera: (Thripidae).....18

Capítulo 2. Viabilidade e avaliação de métodos de conservação do pólen de macaúba

Figura 1. Flores estaminadas e grãos de pólen de *Acrocomia aculeata*. A e B- Flores em pré-antese; C- flor em antese com o pólen exposto sobre as anteras; D a J- Grãos de pólen: corados com, D- carmin acético 1%, E- Reativo de Alexander, F- solução de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), G- lugol; H- grão de pólen sem coloração. I e J: Grãos de pólen com o tubo polínico, I- corado com lactofenol blue solution, J- sem coloração.....35

Figura 2. Valores médios da germinação in vitro de grãos de pólen recém coletados de *Acrocomia aculeata* em quatro meios de cultura. **M1**: 100 g L⁻¹ de sacarose; 10 g L⁻¹ de ágar; **M2**: 100 g L⁻¹ de sacarose; 500 mg L⁻¹ de H₃BO₃; 10 g L⁻¹ de ágar; **M3**: 100 g L⁻¹ de sacarose; 300 mg L⁻¹ de CaCl₂; 10 g L⁻¹ de ágar; **M4**: 100 g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de KNO₃; 200 mg L⁻¹ de MgSO₄ (7H₂O); 100 mg L⁻¹ H₃BO₃; 300 mg L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ 4(H₂O); 10 g L⁻¹ de ágar (BREWBAKER e KWACK, 1963).....36

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. TÍTULO

Tabela 1. Frutificação obtida após polinizações controladas em *Acrocomia aculeata* em população nativa em Acaiaca, Minas Gerais.....16

Tabela 2. Composição e frequência dos visitantes florais de *Acrocomia aculeata* em Minas Gerais, Brasil.....17

Capítulo 2. TÍTULO

Tabela 1. Valores médios percentuais e desvio padrão da coloração dos grãos de pólen de *Acrocomia aculeata*.....36

Tabela 2. Germinação (%) de grãos de pólen de *Acrocomia aculeata*, recém coletados ou dessecados por sílica gel e liofilização, em diferentes meios de cultura.....37

Tabela 3. Efeito da dessecação na taxa de germinação (%) do pólen de *Acrocomia aculeata*, submetido a diferentes condições de armazenamento, ao longo de seis meses.....38

RESUMO

BRITO, Ana Carla; D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Biologia reprodutiva de macaúba: floração, polinizadores, frutificação e conservação de pólen**. Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Milene Faria Vieira e Paulo Roberto Cecon.

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. é uma palmeira conhecida popularmente como macaúba, cujos frutos apresentam elevado teor de óleo e que podem ser utilizados na produção de biodiesel, além de seus co-produtos serem aproveitados em indústrias de segmentos diversos. Para melhor explorar o potencial desta espécie é preciso domesticá-la para o desenvolvimento no futuro de cultivares. Este estudo foi conduzido em uma população nativa no município de Acaiaca-MG, Brasil, no período de 2010 a 2012, buscando-se elucidar aspectos da biologia reprodutiva, com ênfase na morfologia, biologia floral, fenologia de floração, polinizadores e, o estabelecimento de um protocolo para a conservação do pólen, tendo em vista subsidiar programas de melhoramento genético para que, características de interesse sejam alcançadas e genótipos de interesse obtidos, possibilitando a implantação de cultivos comerciais e exploração racional desta oleaginosa. Os resultados indicaram que a macaúba apresentou floração na estação chuvosa; suas inflorescências abrem-se preferencialmente à noite e há ocorrência de protoginia; o pólen é abundante e apresentou elevada viabilidade; seu sistema reprodutivo é misto, é autocompatível, mas com predominância de xenogamia; os polinizadores são, principalmente, pequenos coleópteros das famílias Curculionidae e Nitidulidae. Em testes de conservação, o pólen da macaúba foi tolerante à dessecação realizada por meio da sílica gel em condição de vácuo, e mostrou-se mais eficiente na manutenção da viabilidade do pólen do que o método da liofilização. As temperaturas de 4° C e -20°C, associadas ou não à dessecação, foram as mais efetivas na conservação do pólen, no período avaliado. A possibilidade da conservação do pólen, evidenciada neste estudo, permite o intercâmbio de germoplasma para subsidiar programas de melhoramento genético da macaúba.

ABSTRACT

BRITO, Ana Carla; D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2013. **Reproductive biology of macaw palm: flowering, pollinator, fruit-set and pollen conservation**
Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-Advisers: Milene Faria Vieira and Paulo Roberto Cecon.

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. is a palm tree popularly known as macaw palm, whose fruits have a high oil content and can be used in biodiesel production, and its co-products are utilized in many types of industries. To better to explore the potential of this species is necessary domesticate it for the future development of cultivars. This study was conducted in an wild population in Acaiaca-MG, Brazil, at 2010 to 2012, seeking to elucidate aspects of reproductive biology, with emphasis on morphology, floral biology, flowering phenology, pollinators, and the establish a protocol for the conservation of pollen in order to support breeding programs so that features of interest are achieved and obtained interest genotypes, enabling the deployment of commercial crops and rational use of this oleaginous. The results indicated that the presented macaw palm flowering in the rainy season; inflorescence open at night and in all of them protogyny occurs; pollen abundance and high viability; the the mixed mating system, self-compatibility, but xenogamy predominantly; the pollinator are coleopter Curculionidae and Nitidulidae family. In conservation tests, pollen of macaw palm desiccation was tolerance performed by silica gel under vacuum terms, and was more efficient than lyophilization. The temperatures of 4° C and -20°C associated or not desiccation were the most effective in the pollen conservation evaluated period. The possibility of pollen conservation, as showed in this study, allows the exchange of germplasm for macaw palm breeding programs.

INTRODUÇÃO GERAL

A preocupação crescente com o agravamento dos problemas climáticos relacionados ao efeito estufa em todo o mundo tornou-se uma motivação para a busca por sistemas renováveis de consumo e por matéria-prima vegetal para a produção de combustíveis alternativos (LOPES e STEIDLE NETO, 2011). Assim, visando obter fontes energéticas mais sustentáveis e menos poluentes, despertou-se o interesse pela produção do biodiesel, através do uso de espécies oleaginosas (TÁVORA, 2012).

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart., Arecaceae) é uma espécie amplamente distribuída nas Américas e ocorrendo em todas as regiões brasileiras (AQUINO et al., 2008) e, vem demonstrado ser uma cultura tolerante a diversos ambientes. É utilizada na alimentação humana e de animais (palmito, frutos e sementes), para construção de habitações (madeira e palha), para produção de cosméticos (LORENZI, 2006) e como fonte calorífera (endocarpo). Seus frutos com elevado potencial oleífero, apresenta-se como excelente fonte para a fabricação de biodiesel. Sua alta produtividade original representa uma vantagem e, estimativas apontam que, através de programas de melhoramento genético e do plantio racional pode-se obter mais de 5.000 kg de óleo por hectare (TICKEL, 2000; OLIVEIRA, 2006).

Por ser uma espécie rústica, é capaz de trazer benefícios ecológicos ao ser utilizada em projetos de recuperação de pastagens degradadas. Do ponto de vista social, o cultivo da macaúba em escala comercial, a tornaria uma fonte de renda extra para os produtores, pela possibilidade de utilizá-la em plantios associados a outras culturas e à pecuária.

Diante desses fatos, e por se tratar de uma espécie nativa ainda não domesticada, a macaúba necessita de estudos, para gerar informações sobre: exigências edafoclimáticas, consórcio com culturas temporárias, fenologia, reprodução vegetativa e/ou sexuada, variações genéticas dentro e entre populações, entre outras. Na reprodução sexuada, incluem-se a compreensão sobre a biologia floral, o sistema reprodutivo e a identificação dos polinizadores.

Para obtenção de genótipos com características de interesse em programa de melhoramento genético, é comum a realização de cruzamentos controlados. Nesse sentido, o aprimoramento das técnicas de polinização é alcançado quando se têm o conhecimento do sistema reprodutivo da espécie alvo, de seu ciclo fenológico e biologia floral. Essas informações são fundamentais na seleção de métodos de melhoramento

adequados e na conservação de recursos genéticos, contribuindo para o processo de domesticação de plantas nativas.

Nesse contexto, os objetivos foram: compreender a fenologia de floração, a biologia floral e o sistema reprodutivo; identificar os polinizadores e sua atuação e testar a conservação dos grãos de pólen.

CAPÍTULO 1

RELAÇÕES ENTRE FLORAÇÃO, POLINIZAÇÃO POR BESOUROS E FRUTIFICAÇÃO EM POPULAÇÃO NATURAL DE MACAÚBA

Relações entre floração, polinização por besouros e frutificação em população natural de macaúba

RESUMO

Acrocomia aculeata, conhecida como macaúba, é uma palmeira oleaginosa com grande potencial para a produção de biocombustíveis. O conhecimento de sua biologia reprodutiva é fundamental para o estabelecimento de métodos eficientes em programas de melhoramento genético, buscando a sua domesticação. Foi objetivo caracterizar a fenologia de floração, analisar a biologia das flores (pistiladas e estaminadas) e o sistema reprodutivo, identificar os visitantes florais, destacando-se os polinizadores, em indivíduos de macaúba de população natural em Minas Gerais, região sudeste do Brasil. Sua floração ocorreu na estação chuvosa, as inflorescências abriram-se predominantemente à noite e há protoginia. Registrou-se alta viabilidade dos grãos de pólen, característica que pode contribuir para a manutenção ou intercâmbio de germoplasma. O sistema reprodutivo, embora misto, apresentou-se predominantemente xenogâmico. A baixa frutificação natural indica baixa eficiência dos polinizadores, principalmente pequenos coleópteros das famílias Curculionidae (*Andranthobius* aff. *bondari*, *Phyllotrox tatiana*) e Nitidulidae (*Mystrops debilis*, *Mystrops dalmasi*). Pela primeira vez esses insetos são identificados em nível de espécie nas inflorescências desta palmeira no Brasil. Neste estudo, verificou-se que o período de floração da macaúba sobrepõe-se ao período de acasalamento e oviposição dos besouros que potencialmente atuam na sua polinização cruzada, que é obrigatória para que ocorra a frutificação, devido à unissexualidade das flores associada à protoginia.

PALAVRAS-CHAVE: macaúba, cantarofilia, xenogamia, besouros, domesticação.

INTRODUÇÃO

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart., Arecaceae) é uma palmeira amplamente distribuída nas Américas; no Brasil, é considerada uma das palmeiras de maior dispersão, sendo encontrada em praticamente todas as regiões do país, demonstrando ser tolerante a diversos ambientes (TÁVORA et al., 2012; MOTOIKE et al., 2013). É fornecedora de palmito, frutos e sementes, que são utilizados na alimentação humana e de animais, de madeira e folhas, utilizadas na construção de habitações, e de óleo, extraído das sementes, utilizado na produção de cosméticos (LORENZI, 2006). O elevado potencial oleífero de seus frutos apresenta-se ainda, como excelente fonte para a fabricação de biodiesel. A alta produtividade representa uma vantagem e estimativas apontam que, por meio de programas de melhoramento genético e plantio racional, produção de mais de 5.000 kg de óleo por hectare (TICKEL, 2000; OLIVEIRA, 2006). Este perfil energético enquadra-se na atual busca mundial por matéria-prima vegetal com potencial para a produção de biocombustíveis, visando adotar sistemas renováveis de consumo.

O pressuposto básico em programas de melhoramento genético vegetal fundamenta-se na obtenção de cultivares com características desejáveis, a partir da seleção de genótipos e cruzamentos controlados (TECHIO et al., 2006). Para tanto, são necessárias informações sobre a biologia reprodutiva da planta envolvida no programa, que incluem interações entre flores e polinizadores e pólen e estigma e o sucesso reprodutivo. Essas informações ampliam o entendimento sobre o fluxo gênico e fornecem subsídios básicos para a exploração racional (BAWA, 1974, 1990; MARTÉN e QUESADA, 2001; NAVARRO e GUITIÁN, 2002; LEE et al., 2006), principalmente de plantas em processo de domesticação, como a macaúba.

Estudos que envolveram aspectos da biologia reprodutiva de macaúba são escassos e foram conduzidos em indivíduos de população natural do cerrado brasileiro, no Distrito Federal, por Scariot et al. (1991; 1995). Segundo esses autores, a floração da macaúba ocorre na estação das chuvas (agosto a dezembro), suas flores são unissexuais localizadas em uma mesma inflorescência, com uma marcada dicogamia, tornando-a dependente de polinizadores, principalmente coleópteros, para que ocorra a frutificação.

Para a obtenção de cultivares de macaúba é necessário, dentre outros fatores, avaliar polinizações entre genótipos, verificando-se, pela frutificação obtida, a sua

capacidade combinatória e, desse modo, selecionar os mais promissores para um programa de melhoramento. Ressalta-se que sua ampla ocorrência no território nacional, em diferentes condições edafoclimáticas, conduz a pressões seletivas distintas, que interferem na estrutura genética das populações e esta, por sua vez, está diretamente associada ao fluxo gênico, que é dependente de insetos polinizadores.

Assim, foi objetivo deste estudo caracterizar a fenologia de floração, analisar a biologia floral e o sistema reprodutivo, identificar os visitantes florais, destacando-se os polinizadores, de *Acrocomia aculeata* em população natural do sudeste brasileiro. Buscou-se conhecer melhor os aspectos da biologia reprodutiva da macaúba, comparando-se o seu comportamento reprodutivo com o de outra população natural. Deste modo, abre-se a possibilidade de intercâmbio de germoplasma para a realização de polinizações manuais, permitindo a sua utilização, como planta domesticada, possibilitando a exploração racional de seus recursos, em menor escala de tempo, em programas de melhoramento genético.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

No período de outubro de 2010 a fevereiro de 2012, foram avaliados indivíduos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. de população natural localizada no município de Acaiaca (20°23'33''S, 43°07'31''W) e 421m de altitude, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, sudeste brasileiro. Os indivíduos apresentavam cerca de quatro a oito metros de altura (Figura 1A) de ocorrência em área de pastagem, em proximidade a fragmentos florestais bastante alterados (capoeiras).

O clima do município é do tipo Cwa, segundo a classificação de Koeppen. A temperatura média anual mínima é de 16,5°C e máxima de 26,5°C e a precipitação média anual de 1323 mm (Dados obtidos a partir de registros diários da Estação meteorológica de Viçosa-MG). A estação de seca ocorre nos meses de abril a setembro e a estação das chuvas de outubro a março.

Espécie estudada

A macaúba é arborescente, monoica; o estipe pode atingir mais de 15 m de altura com 20 a 30 cm de diâmetro (MOBOT, 2011), frequentemente, coberto pelas bases das bainhas, que permanecem aderidas ao caule por muitos anos. A estipe é coberta de espinhos escuros, pontiagudos com cerca de 10 cm de comprimento. As folhas verdes, ordenadas em diferentes planos, são pinadas com comprimento variando de 4 a 5 m, apresentando aproximadamente 130 folíolos de cada lado e espinhos na região central (LORENZI et al., 1996).

Entre as folhas destacam-se as inflorescências subentendidas por bráctea lenhosa, a espata, com até 2 m comprimento. A inflorescência, com 50 a 80 cm de comprimento, é pendente, possui um eixo principal, a raque, e vários eixos de segunda ordem, as ráquias, de coloração amarelada. As flores de coloração amarelo-clara são unissexuais e ambas aparecem numa mesma ráquila. Os frutos são esféricos ou ligeiramente achatados, do tipo drupa, com diâmetro variando de 2,5 a 5,0 cm. O pericarpo rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo é fibroso, mucilaginoso, de sabor adocicado, rico em glicerídeos (ANDRADE, et al., 2006) de coloração amarelo ou esbranquiçado, comestível. O endocarpo é fortemente aderido à polpa (mesocarpo), com parede lignificada enegrecida e a amêndoa oleaginosa, comestível e revestida de uma fina camada de tegumento (BONDAR, 1964; HENDERSON et al., 1995).

Fenologia e Morfologia Floral

Sessenta indivíduos, com flores acessíveis (utilizando-se escada com 6m de altura), foram marcados e neles 311 inflorescências foram monitoradas de outubro de 2010 a fevereiro de 2012. Foram registrados: os números de indivíduos floridos, de inflorescências abertas por indivíduo e de flores pistiladas e estaminadas e o período de duração das fases femininas e masculinas nas inflorescências (OLLERTON e DAFNI 2005).

Flores frescas e estocadas em álcool 70% foram analisadas em estereomicroscópio. Adicionalmente, flores foram analisadas com auxílio da microscopia eletrônica de varredura. Para tanto, flores em diferentes estádios foram coletadas e fixadas, ainda em campo, em glutaraldeído. Posteriormente, as amostras foram lavadas com tampão fosfato (pH 7,0), submetidas a uma série de desidratação

alcoólica crescente e ao ponto crítico com CO₂ ou “critical point dryer”. Em seguida, as flores passaram pela etapa de metalização em ouro-paladium (BOZZOLA e RUSSEL 1992, POSTEK et al. 1980). Registros fotográficos foram realizados utilizando-se o equipamento LEO VP1430.

Biologia Floral

Devido a elevada atividade enzimática verificada em estigmas receptivos, algumas reações são utilizadas como indicadoras em testes de receptividade de estigmas, como a peroxidase (DAFNI, et al., 2005). Foram utilizados dois testes para a verificação da receptividade dos estigmas: 1) reação ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (KEARNS e INOUE, 1993), cuja reação ocorre com a liberação de bolhas de ar, uma vez que a reação com a enzima peroxidase indica que o estigma está receptivo; e 2) o do Peroxtesmo KO paper (Macherey-Nagel D-52313), segundo Dafni e Maués (1998). Em ambos, foram avaliados estigmas em diferentes estádios, desde a abertura até a senescência da flor.

A viabilidade do pólen foi analisada por meio da técnica de coloração do citoplasma pelo carmim acético 1,2% (DAFNI e FIRMAGE, 2000). Flores de 12 indivíduos foram coletadas em pré-antese e quando abertas, o pólen foi utilizado. Para cada indivíduo, três flores foram avaliadas e três lâminas foram montadas (uma lâmina/flor) e contando-se 100 grãos de pólen por lâmina, perfazendo um total de 3.600 grãos de pólen. Em seguida, foi calculada a proporção de pólen viável.

Sistema Reprodutivo

As ráquulas, com suas flores pistiladas e estaminadas, foram utilizadas como a unidade de polinização. As polinizações manuais foram realizadas seguindo as técnicas sugeridas por Kearns e Inouye (1993), com algumas modificações*, que são: 1) polinização aberta (controle)- ráquulas foram marcadas e suas flores permaneceram expostas aos polinizadores; 2) geitonogamia intra-ráquila- ráquulas com flores em pré-antese foram ensacadas; 3) geitonogamia inter-ráquila- flores pistiladas de uma ráquila foram ensacadas juntamente com flores estaminadas de outra ráquila proximalmente localizada(*técnica utilizada devido a ausência de outra inflorescência, no mesmo indivíduo, com flores em antese); 4) polinização cruzada (xenogamia)- eliminou-se as flores estaminadas das ráquulas e as flores pistiladas foram polinizadas com o pólen de

outro indivíduo; 5) apomixia- eliminou-se as flores estaminadas e, ainda, foram cortados os estigmas das flores pistiladas que, posteriormente, foram ensacadas. Para a execução dos testes, foram utilizados 16 indivíduos, que tiveram as espatas previamente protegidas com sacos confeccionados com failete. Os testes foram acompanhados até a frutificação ou queda das flores.

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, onde cada planta representou um bloco, visando eliminar o efeito da heterogeneidade entre elas. Assim, utilizou-se 16 blocos com 5 tratamentos (polinização aberta-controle-; geitonogamia intra-ráquila; geitonogamia inter-ráquila; polinização cruzada ou xenogamia e; apomixia). Cada planta recebeu então os 5 tratamentos, com 10 repetições, totalizando assim, 800 flores em todo experimento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias. Os procedimentos estatísticos foram realizados no pacote computacional SAEG, versão 9.1 (2007).

Visitantes Florais

Os visitantes florais foram observados por 200 horas, de outubro de 2010 a fevereiro de 2012. Do total de horas, 180 horas foram observações diurnas e 20, observações noturnas. O comportamento, frequência e horário das visitas foram monitorados assim que as espatas abriram e as flores foram expostas aos visitantes.

Os visitantes foram classificados, de acordo com a frequência de visitação (muito frequente- acima de 20; frequente- entre 5 e 20; raro- abaixo de 5), o comportamento de visita e a deposição de pólen em seus corpos, em: polinizadores efetivos (visitantes capazes de contatar estigmas e estames com elevada frequência ao longo do período de floração); polinizadores ocasionais (visitantes capazes contatar estigmas e estames, entretanto observados em baixa frequência, pois nem sempre estão presente durante o período de floração) ou pilhadores (independente da frequência, visitam as flores, mas sem contatar estigmas e estames) (OSTROROG e BARBOSA, 2009). O tipo de recurso oferecido pela planta para estes visitantes também foi verificado.

Os visitantes foram coletados durante as florações dos dois anos de estudo. Os insetos coletados foram mortos em frascos de vidro contendo acetato de etila e acondicionados em frascos de vidro (5 x 10 cm). Foram identificados no Laboratório de

Ultra-estrutura de Insetos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e, posteriormente, depositados na coleção entomológica do Museu de Entomologia (UFV).

Os detalhes morfológicos das espécies de maior tamanho foram observados usando lupa LEICA M205. As espécies de menor tamanho foram desidratadas em série crescente de etanol, metalizadas com ouro e observadas usando microscópio eletrônico de varredura LEO VP1430. As imagens dos insetos identificados foram analisadas usando Gimp image v. 2.2 para Windows.

RESULTADOS

Fenologia de Floração

O comprimento médio da espata (Figura 1B) variou de 0,75 a 2,0 metros. A abertura da espata e a exposição da inflorescência ocorrem através de uma fenda ventral mediana, sendo acompanhadas pela liberação de odor forte. A abertura ocorreu quase sempre no período de queda de temperatura do ar, ao anoitecer ou no início da manhã, comumente, entre 19:00h (70% das inflorescências) e 6:00h (30%), podendo entretanto variar de acordo com as condições climáticas. Em dias com temperaturas mais amenas, as inflorescências demoram mais tempo para abrirem-se.

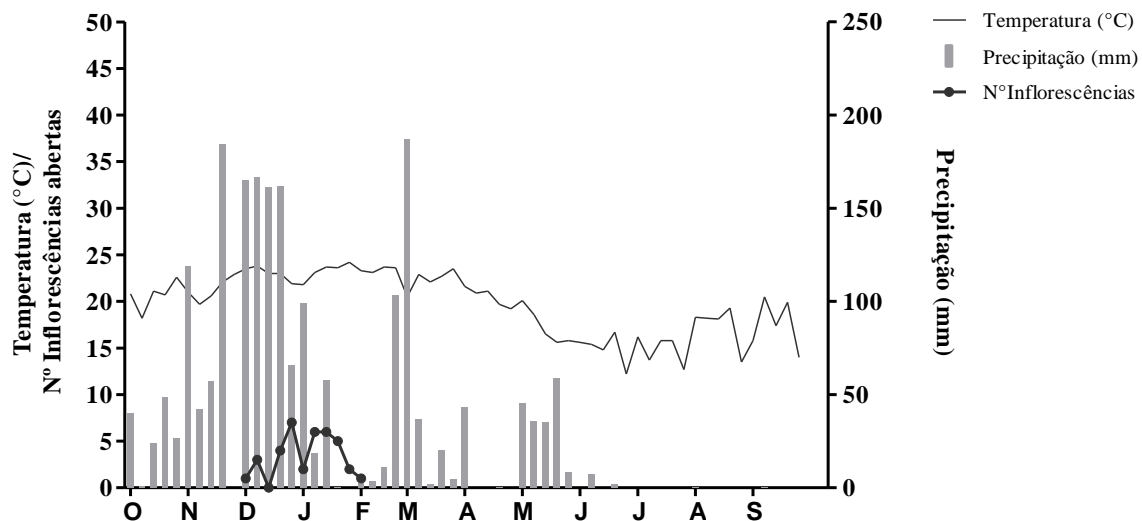
Na primeira avaliação de florescimento, entre 1º de outubro de 2010 a 10 de fevereiro de 2011, foram monitorados 60 indivíduos quanto ao período de emissão das espatas e a sua posterior abertura, com a exposição da inflorescência, protegida por essa bráctea. Apenas 13 plantas emitiram espatas neste período, das quais totalizaram 37 inflorescências abertas (Figura 1C e 2A); em média, 3 a 5 inflorescências por planta. As primeiras inflorescências surgiram na última semana de outubro de 2010, coincidindo com o início das chuvas.

A abertura das espatas e conseqüente exposição das flores ocorreram na primeira semana de dezembro de 2010, estendendo-se até a primeira semana de fevereiro de 2011 (Figura 2A). Do início da floração até o final foi observado dados de precipitação variando entre 2,4 a 166,0 mm. No pico de floração, que ocorreu na última semana de dezembro, com 19% do total de inflorescências abertas, a precipitação foi de 65mm (Figura 2A). A espata permanece junto à inflorescência durante todo o período de floração, inclusive durante a frutificação, proporcionando a completa exposição de flores e frutos.



Figura 1. *Acrocomia aculeata*: A- planta adulta; B- inflorescência jovem totalmente recoberta pela espata; C- inflorescência exposta, após a abertura da espata, posicionada acima da inflorescência. Barra: 50 cm.

A



B

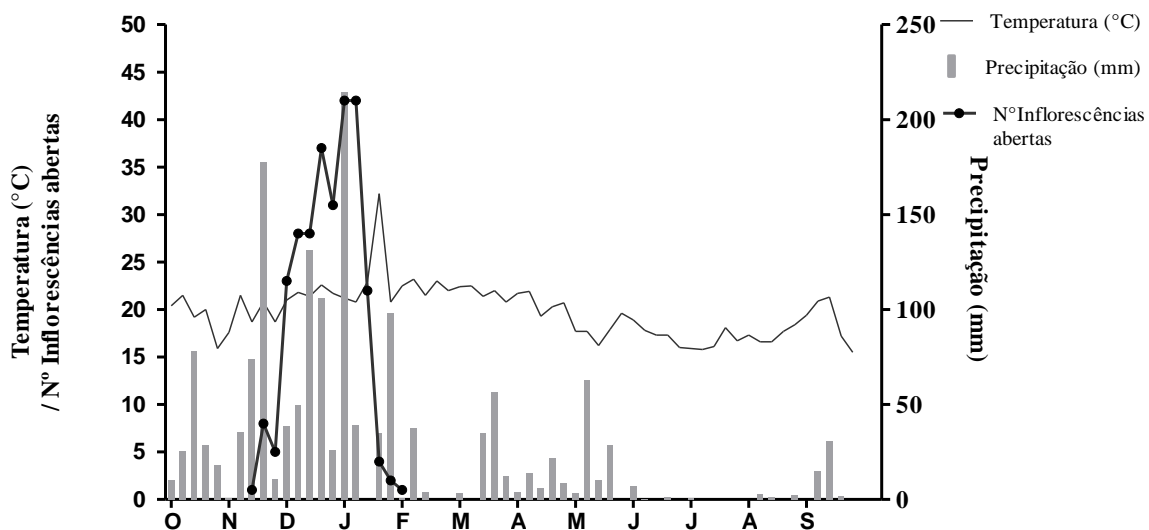


Figura 2. Períodos de floração de *Acrocomia aculeata* e condições meteorológicas. A- outubro de 2010 a setembro de 2011; B-Outubro de 2011 a setembro de 2012 (Boletim meteorológico UFV, Viçosa-MG).

A segunda avaliação de florescimento ocorreu entre 1º de novembro de 2011 e 10 de fevereiro de 2012. Dos sessenta indivíduos monitorados todos emitiram espatas, totalizando 274 inflorescências abertas, valor oito vezes superior ao observado na primeira floração. Este aumento observado de um ciclo para o outro, provavelmente, ocorreu devido a adubações realizadas após a primeira avaliação de florescimento. As adubações foram nos meses de setembro e novembro de 2011, de formulação NPK (20-5-20) e micronutrientes.

As primeiras espatas surgiram a partir da última semana de setembro; iniciando sua abertura e exposição das flores na terceira semana de novembro, e término na primeira semana de fevereiro. Ao longo da floração registrou-se precipitação variando de 2 a 214 mm. O pico de floração foi alcançado nas duas primeiras semanas de janeiro, com 30,6% do total, aproximadamente 84 inflorescências. Neste pico, a precipitação foi elevada, atingindo 214 mm (Figura 2B).

Morfologia Floral

As inflorescências possuíam, em média, 250 ± 30 ráquias, com comprimento que pode variar de 10 a 36 cm de comprimento (Figura 3A e 3B). Nelas, as flores pistiladas, organizadas em tríades (Figura 4B), ou seja, cada flor pistilada ladeada por duas estaminadas ocupam a porção basal. Da porção mediana à apical, encontram-se numerosas flores estaminadas. Cada ráquila tem de três a seis tríades e, em média, 300 flores estaminadas. Na inflorescência há, portanto, 750 flores pistiladas e 75.000 flores estaminadas, em média.

As flores pistiladas têm forma globosa, são sésseis, trímeras, gamossépalas, gamopétalas; o perianto é persistente. O estilete é terminal, com estigma carnoso e trífido (Figura 4A e 4C). O ovário é súpero, tricarpelar, sincárpico e com um único óvulo em cada lóculo.

As flores estaminadas são tubiformes, trímeras, sésseis, gamossépalas, gamopétalas. Possuem seis estames livres, com anteras dorsifixas e deiscência longitudinal (Figura 4D e 4E). Cada flor apresenta um pistilódio trífido (Figura 4F). Apresentam valores médios de 0,8 cm de comprimento e 0,41 cm de diâmetro, desvio padrão $\pm 0,1$. Oferecem como recurso aos visitantes florais uma enorme quantidade de pólen.



Figura 3. Ráquulas de *Acrocomia aculeata*. A- Ráquulas curtas, com flores pistiladas na porção basal e estaminadas na porção restante; ráquila superior com flores em antese e a inferior em pré-antese; B- ráquila longa, em antese. Barra: 10cm.

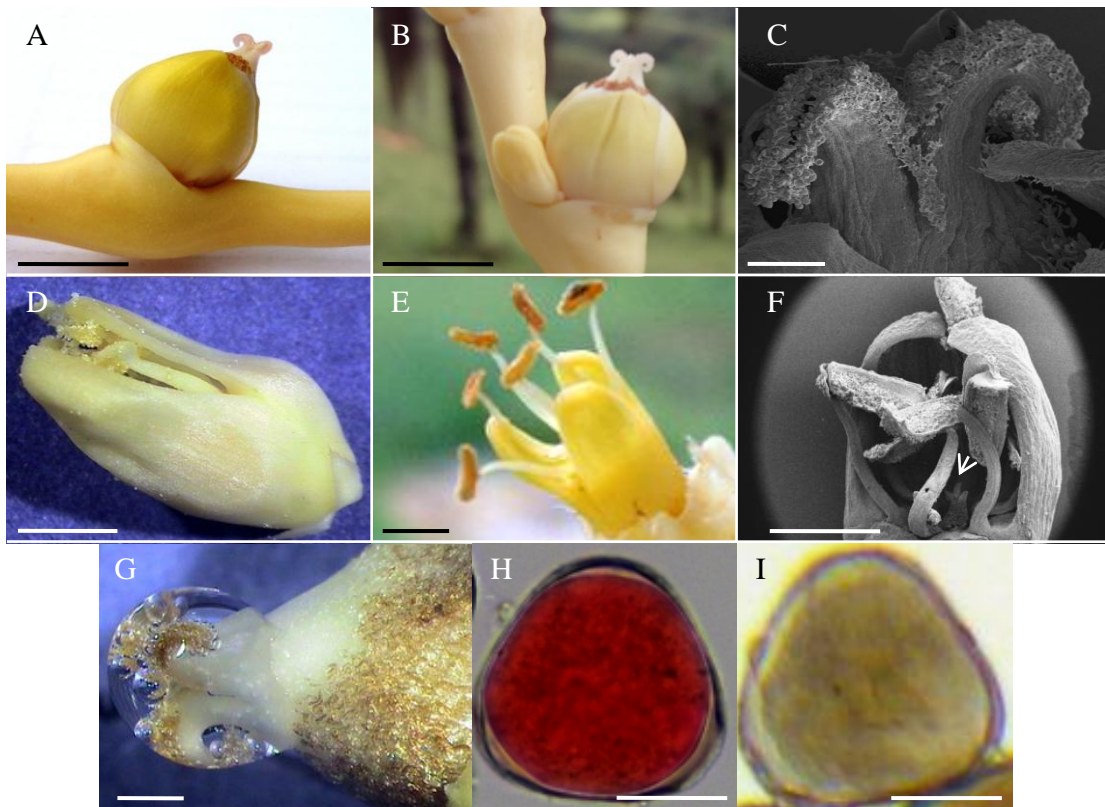


Figura 4. Flores pistiladas e estaminadas de *Acrocomia aculeata*. A- flor pistilada; B- flor pistilada, ladeada por flor estaminada; C- parte da área estigmática (porção ventral); D- flor estaminada iniciando a antese, E- em plena exposição de estames, F-destaque do pistilódio (seta); G- estigma apresentando reação positiva ao teste de receptividade, com o uso do peróxido de hidrogênio (note borbulhamento sobre as áreas estigmáticas); H- grão de pólen viável, corado com carmim acético e I- inviável. Barras: A, B=1 cm; D,E= 2mm; F= 1mm; C= 300 μ m; G= 1 mm; H,I= 10 μ m.

Biologia Floral

As flores pistiladas apresentaram-se receptivas (confirmado pelo teste com peróxido de hidrogênio) desde o momento da abertura da inflorescência e permaneceram assim por 15 horas. Durante esse período observou-se intenso borbulhamento das áreas estigmáticas (Figura 4G), que diminuiu gradativamente ao longo de 24 horas. O teste com o Peroxtesmo KO paper não foi muito efetivo para verificar a receptividade, pois apresentou uma reação lenta e de difícil interpretação. Portanto, não é um bom teste para se utilizar em flores da macaúba.

As flores estaminadas entram em antese (Figura 4D e 4E) cerca de 12 horas após as pistiladas, ou mais, a depender das variações climáticas, principalmente em dias com temperaturas mais amenas, cujas flores levaram mais tempo para abrirem-se. A diferença temporal na maturação entre as flores pistiladas e estaminadas, caracteriza a dicogamia protogínica.

Com a antese, os grãos de pólen são liberados e apresentaram elevada viabilidade ($94,33\% \pm 5,4$). O carmim acético corou os grãos com vermelho intenso, demonstrando a sua integridade cromossômica. Os inviáveis não coram de vermelho e exibem cor amarelada (Figura 4H e 4I). As flores estaminadas liberam pólen por cinco dias, em média, após a antese. Posteriormente, ocorreu abscisão.

Sistema Reprodutivo

Os resultados das polinizações manuais demonstraram que a espécie tem um sistema reprodutivo misto, mas é predominantemente xenógama (Tabela1). A polinização cruzada foi superior e diferiu dos demais tratamentos. A frutificação obtida no teste de apomixia pode ser atribuída a possíveis contaminações, pois a quantidade elevada de pólen produzida possibilita polinizações acidentais, mesmo tomando-se os cuidados necessários com a manipulação das flores.

Tabela 1. Frutificação obtida após polinizações controladas em *Acrocomia aculeata* em população nativa em Acaiaca, Minas Gerais.

Tratamentos	Frutificação (%)
Polinização Cruzada (xenogamia)	51,9*a
Geitonogamia Intra-ráquila	19,4 b
Geitonogamia Inter-ráquila	20,0 b
Polinização aberta (Controle)	12,5 b
Apomixia	6,25 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. A média com asterisco na coluna difere do controle ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

Visitantes Florais

As inflorescências foram visitadas por espécies de insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Thysanoptera (Figura 5), apresentando diferentes níveis de importância e frequência na polinização (Tabela 2).

Das seis espécies de besouros observadas, quatro apresentaram maior abundância e parecem ser os responsáveis por efetuar a polinização: *Andranthobius* aff. *bondari*, *Phyllotrox tatianae*, *Mystrops dalmasi* e *Mystrops debilis*. Estas espécies permaneceram sobre uma mesma inflorescência, desde o momento da sua abertura, à noite, e estendendo-se ao longo do dia, procurando as flores como sítio de acasalamento, desenvolvimento, fonte alimentar (pólen) e refúgio. Outros besouros, tais como, *Dialomia* sp. e *Mystrops costaricensis*, foram encontrados como visitantes ocasionais, do mesmo modo que as espécies das ordens Diptera e Hymenoptera (Tabela 2).

As abelhas *Apis mellifera* e *Trigona spinipes*, foram observadas coletando pólen e, por isso, raramente contactavam as flores pistiladas, sendo consideradas polinizadoras ocasionais. Dípteros, tais como, *Drosophila* sp. e *Pericyclopera* sp., apresentaram menor frequência nas inflorescências.

Tabela 2. Composição e frequência dos visitantes florais de *Acrocomia aculeta* em Minas Gerais, Brasil.

Ordem/Família	Espécies/morfo	Flor ♀	Flor ♂	Contacta estigma	Presença de pólen no corpo	Categoria
COLEOPTERA						
Curculionidae	<i>Andranthobius</i> aff. <i>bondari</i> **					
	Hustache 1940**	++	+	S	S	Pe
Curculionidae	<i>Phyllotrox tatarianae</i> Bondar 1941**	++	++	S	S	Pe
Curculionidae	<i>Dialomia</i> sp.**	+	+	S	S	Po
Nitidulidae	<i>Mystrops costaricensis</i> Gillogly 1972**	+	+	S	S	Po
Nitidulidae	<i>Mystrops dalmasi</i> Grouvelle 1902**	+++	+++	S	S	Pe
Nitidulidae	<i>Mystrops debilis</i> Erichson 1843**	+++	+++	S	S	Pe
DIPTERA						
Drosophilidae	<i>Drosophila</i> sp.*	+	+	S	S	Po
Phoridae	<i>Pericyclopera</i> sp.*	+	+	S	S	Po
HYMENOPTERA						
Apidae	<i>Apis mellifera</i> Linnaeus 1758*	++	+	S	S	Po
Apidae	<i>Trigona spinipes</i> Fabricius 1793*	+	+	S	S	Po
THYSANOPTERA						
Thripidae	Morfo 1	+		S	NS	Pi

Legenda: +++ = muito frequente (acima de 20); ++ = frequente (entre 5 e 20), + = raro (abaixo de 5); S = presente, N = ausente; NS = não observado; Pe = polinizador efetivo; Po = polinizador ocasional; Pi = provável pilhador.*Diurnos; ** Noturnos.

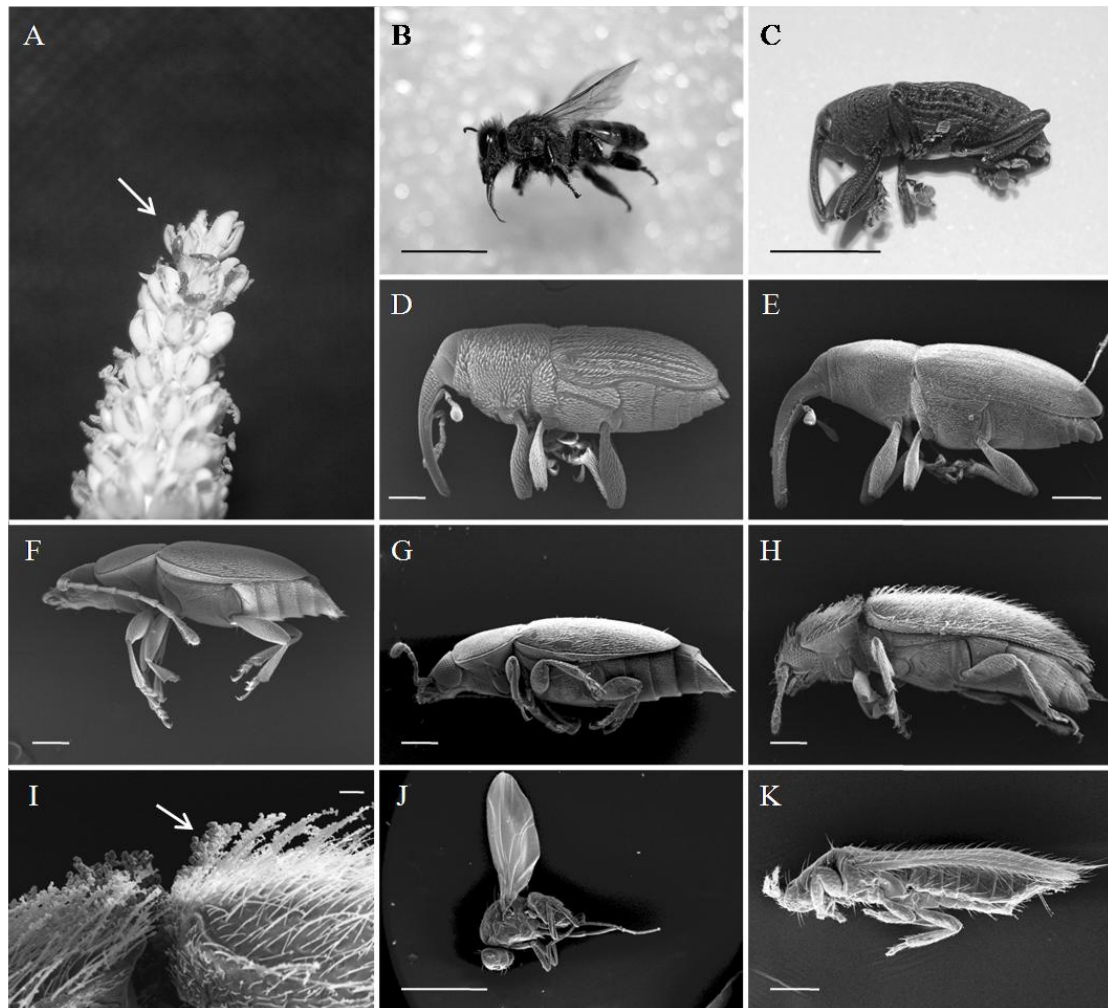


Figura 5. Visitantes florais de *A. aculeata* em Acaiaca, Minas Gerais. (A) Polinizadores em inflorescências; (B) Hymenoptera: *Apis mellifera*; (C) Coleoptera: *Dialomia* sp., (D) *Phyllotrox tatiana*, (E) *Andranthobius* aff. *bondari*, (F) *Mystrops debilis*, (G) *Mystrops dalmasi*, (H) *Mystrops costaricensis*, (I) pólen no corpo de *M. costaricensis*; (J) Diptera: *Drosophila* sp.; (K) Thysanoptera: (Thripidae). Tamanhos: B, C (Bar= 1cm); J (Bar= 1mm); E (Bar= 300µm); D, F, G, H (Bar= 200µm); K (Bar= 100µm); I (Bar= 30µm).

DISCUSSÃO

A floração da macaúba, nos dois anos de estudo, ocorreu durante a estação chuvosa, semelhantemente ao observado por Scariot et al. (1995) no cerrado brasileiro, Distrito Federal. Estes resultados indicam a importância da precipitação como um dos fatores que desencadeiam a floração. Diferentes variáveis ambientais tais como temperatura, umidade e fotoperíodo, além da precipitação, podem agir sinergicamente e influenciar os períodos de ocorrência das fenofases reprodutivas, floração e frutificação. Por isto, os ciclos fenológicos de plantas tropicais são complexos e podem variar, mesmo sendo de uma espécie, se avaliados em ecossistemas diferentes (NEWSTROM et al., 1994), tal como observado na macaúba; no Distrito Federal (15°35'S, 47°45'W), floresceu de agosto a dezembro (SCARIOT et al., 1991;1995) e no presente estudo, de novembro a fevereiro. Esses resultados mostram que é possível que ocorra variação na floração e frutificação entre populações, entre indivíduos e entre anos, conforme observado por vários autores, em outras espécies (BAWA, 1983; FISCH et al., 2000; BENCKE e MORELLATO, 2002).

A combinação de períodos de seca seguidos de períodos de chuva parece ser também um fator estimulante para a floração de outras palmeiras (DE STEVEN et al., 1987; FISCH et al., 2000; HENDERSON et al., 2000), além da macaúba. Segundo Borchert (1996), o período de estresse hídrico, que inibe a atividade meristemática, tem como resultado indireto a sincronização da floração pela subsequente reidratação das gemas florais, no período seguinte. Além disso, as florações de representantes de *Arecaceae* parecem ter um importante papel para maximizar o fluxo gênico, por estabelecerem padrões sazonais e relações com os polinizadores e dispersores de sementes (JARDIM, 1991; ABREU, 2001).

A permanência da espata junto à inflorescência, durante toda a sua longevidade, indica que a bráctea e as flores atuam, em conjunto, na atratividade dos polinizadores. A espata pode, ainda, servir de abrigo para insetos polinizadores (OLIVEIRA et al., 2003).

As características da morfologia das flores de macaúba e de sua biologia, incluindo a dicogamia protogínica, são semelhantes às descritas por Scariot et al. (1991), exceto a viabilidade do pólen, não analisada por esses autores. A alta viabilidade observada pode-se tornar uma ferramenta valiosa para programas de melhoramento genético, visando a domesticação da espécie (TECHIO et al., 2006). Os cruzamentos controlados são comuns nesses programas e, portanto, pólen com elevada viabilidade é

desejado, para a utilização imediata ou para ser armazenado. Nesse sentido, foram realizados testes mais precisos de viabilidade e germinação *in vitro*, visando a conservação do pólen (Ver capítulo 2).

A protoginia é característica comum em flores polinizadas por besouros (DAVIS et al., 2008), tal como observado na macaúba. Nesta planta, é um mecanismo reprodutivo em que há separação temporal da maturação das flores pistiladas e estaminadas de uma mesma inflorescência. Desta forma, aumentam-se as chances de polinização cruzada (xenogamia), favorecendo o sucesso reprodutivo da planta (OSTROROG, 2009), na presença de polinizadores eficientes.

Os resultados das polinizações manuais demonstraram que, na área do presente estudo, os polinizadores não foram eficientes, se comparadas às frutificações obtidas no controle e na polinização cruzada manual. Resultados semelhantes foram obtidos por Scariot et al. (1991) em população natural de macaúba do Distrito Federal. Diante destas constatações, levanta-se a dúvida sobre a potencialidade dos besouros coletados como polinizadores da macaúba. A área do presente estudo e a de Scariot et al. (1991) são de vegetações alteradas, com predomínio de pastagem, o que pode não refletir a condição primária de hábitat da macaúba, onde vetores de pólen mais efetivos são esperados. Estudos posteriores em áreas de ocorrência da macaúba com vegetação preservada poderão esclarecer esta questão.

Se, em populações naturais, a eficiência dos insetos na polinização da macaúba é baixa, no seu processo de domesticação haverá necessidade de polinizações artificiais, para obtenção de alta frutificação. Esse procedimento é uma realidade em outras palmeiras cultivadas, como, por exemplo, o dendê, onde as inflorescências são previamente protegidas, inclusive com aplicações de soluções de formaldeído, para evitar a contaminação por pólen indesejável e insetos; e posteriormente, é realizada a deposição de pólen, previamente selecionado, por meio de pulverizações (CORLEY e TINKER, 2003). Desta forma, salienta-se a importância de estudos sobre a manipulação de material genético, como o pólen, estabelecendo métodos eficazes para a sua conservação.

A macaúba e outras palmeiras (CONTE et al., 2008; RAMOS et al., 2011) apresentaram sistema reprodutivo misto. Esta característica parece ser vantajosa, pois não impede a transferência de pólen entre flores do mesmo indivíduo (geitonogamia). A autocompatibilidade, portanto, possibilita a frutificação mesmo com a escassez de polinizadores ou redução da população devido a distúrbios por predadores ou antrópicos

(NAZARENO e REIS, 2012). Por outro lado, a xenogamia pode manter a variabilidade genética dentro das populações, promovida pelo fluxo gênico, realizado pelos polinizadores (ALLARD, 1971; HAMRICK, 1983).

Os besouros coletados nas inflorescências de macaúba, neste estudo, foram reportados pela primeira vez no Brasil para macaúba. Informações sobre a biologia desses insetos são escassas. Seu ciclo de vida é curto e, provavelmente, no período da floração da macaúba, eles devem migrar para as suas flores, vindos de flores de outras espécies de palmeiras proximamente localizadas, atraídos pelo odor (CASTRILLON, L.C., comunicação pessoal).

Esses insetos têm pêlos no corpo, característica que permite abrigar e transportar o pólen. Larvas e pupas de *Phyllotrox tatianae*, *Andranthobius* aff. *bondari* (Curculionidae), *Mystrops debilis* e *Mystrops dalmasi* (Nitidulidae) foram encontradas nas flores estaminadas da macaúba (obs. pessoal). O uso das flores como local de acasalamento e de oviposição e o pólen abundante usado como alimento, podem explicar a abundância, frequência e permanência desses insetos nas inflorescências. Este comportamento favorece o transporte do pólen entre flores do mesmo indivíduo, pois permanecem em uma inflorescência por longos períodos.

Espécies de Curculionidae e Nitidulidae têm sido reportadas na polinização de Arecaceae (ENDERSON, 1986; HOWARD et al., 2001; VOEKS, 2002; NUÑEZ et al., 2005). Os curculionídeos *P. tatianae* e *A. bondari* foram reportados em palmeiras do gênero *Bactris* e em *Attalea phalerata* (Mart.), respectivamente (LISTABARTH, 1996; DOS SANTOS et al., 2003). No caso dos nitidulídeos, *M. costaricensis* tem sido reportado como polinizador em *Elaeis guineensis* (Jacquin); *M. debilis* em *Attalea funifera* (Martius), *Attalea pindobassa* (Bondar), *Cocos nucifera* (L.), *Syagrus coronata* (Martius) e *Syagrus romanzoffiana* (Chamisso-Glassman); e *Mystrops dalmasi* em *Mauritia flexuosa* (L.) e *Mauritia carana* (Wallace ex. Archer) (HOWARD et al., 2001; KIREJTSHUK e COUTURIER, 2010). As outras espécies de Nitidulidae, visitantes da macaúba, ampliam a relação dos coleópteros reportados como visitantes de flores de palmeiras (KIREJTSHUK e COUTURIER, 2010).

As abelhas *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* (Apidae) são espécies sociais e poliléticas (MICHENER, 2007) e, por isso, visitam flores de diversas espécies, incluindo as flores estaminadas da macaúba, para a coleta do pólen. Outros autores, que observaram visitas dessas abelhas em flores de palmeiras, as classificaram como

polinizadores secundários (DOS SANTOS et al., 2003; BARFOD et al., 2011), tal como no presente estudo.

Neste estudo, verificou-se que o período de floração da macaúba sobrepõe-se ao período de acasalamento e oviposição de besouros que potencialmente atuam na sua polinização cruzada, que é obrigatória para que ocorra a frutificação, devido à unissexualidade das flores associada à protoginia.

CONCLUSÕES

A macaúba apresenta floração na estação das chuvas (novembro a fevereiro);

As inflorescências abrem-se preferencialmente à noite e há protoginia;

O pólen abundante, principal recurso oferecido aos polinizadores, apresenta alta viabilidade;

Seu sistema reprodutivo é misto, demonstrando que há autocompatibilidade, mas é planta predominantemente xenogâmica;

A baixa frutificação natural indica baixa eficiência dos polinizadores;

É entomófila, polinizada principalmente por pequenos coleópteros das famílias Curculionidae e Nitidulidae;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381p.
- ANDRADE, M. H.C. ; VIEIRA, A. S. ; AGUIAR, H. F. ; CHAVES, J. F. N. ; SILVA, R. M. P. ; MIRANDA, T. L. S. ; SALUM, A. . Óleo do Fruto de Palmeira Macaúba: Parte I. Uma Aplicação Potencial para Indústrias de Alimentos, Fármacos e Cosméticos. In: **II Encontro brasileiro sobre tecnologia na indústria química (II ENBTEQ) -3º Seminário ABIQUIM de tecnologia**. São Paulo: ABEQ, 2006.
- ABREU, S. A. B. **Biologia reprodutiva de *Mauritia flexuosa* L. (Arecaceae) em vereda no município de Uberlândia-MG**. Uberlândia, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, p.87, 2001.
- ABREU, A. G.; PRIOLLI, R. H. G.; AZEVEDO-FILHO, J. A.; NUCCI, S. N.; ZUCCHI, M. I.; COELHO, R. M.; COLOMBO, C. A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v.35, n.1, p.119-121, 2012.
- AQUINO, F.G.; SILVA, M.R.; RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; VILELA, M.F.; OLIVEIRA, M.C. Distribuição geográfica das espécies *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. e *Caryocar brasiliense* Cambess. no bioma Cerrado. In: **Simpósio nacional do cerrado**. 9, Brasília, 2008. Anais...Planaltina: EMBRAPA, CPAC. p. 1-6.
- BARFOD, A. S.; HAGEN, M., BORCHSENIUS, F. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (*Arecaceae*). **Annals of Botany**, v.108, n.1503-1516, 2011.
- BAWA, K.S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**, v.28, n.1,p. 85–92, 1974.
- BAWA, K. S. Patterns of flowering in tropical plants. In: JONES, C. E.; LITTLE, R. J. (Ed.). **Handbook of experimental pollination biology**. New York: Scientific and Academic, 1983. p.394-410.
- BAWA, K.S. Plant–pollinator interactions in tropical rain forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.21, p.399–422, 1990.
- BENCKE, C.S.C.; MORELLATO, L.P.C. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. **Revista Brasileira de Botânica** v.25, p.269-275, 2002.
- BONDAR, G. O. **Palmeiras do Brasil**. São Paulo: Instituto de Botânica, n. 2, 1964, 554p.
- BORCHERT, R. Phenology and flowering periodicity of neotropical dry forest species: evidence from herbarium collections. **Journal of Tropical Ecology**, v.12, n.1, p.65-80, 1996.

- BOZZOLA, J.J.; RUSSEL, L.D. **Electron microscopy: principle and techniques for biologists**. Jones and Bratlett Publishers, Boston, 1992, 542p.
- CONTE, R.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. Populations: a comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. **The Journal of Heredity.**, v.99, p.476–482, 2008.
- CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. **The Oil Palm**. Blackwell, Oxford, UK, 4ed., 2003, 562p.
- DAFNI, A.; FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution**, v.222, p.113-132, 2000.
- DAFNI, A.; MAUÉS, M.M. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**, v.11, n. 3, p.177-180, 1998.
- DAFNI, A.; KEVAN, P.G.; HUSBAND, B.C. **Practical pollination biology**. Ontario, Enviroquest Ltd. 2005.
- DAVIS, C. C.; ENDRESS, P. K.; BAUM, D. A. The evolution of floral gigantism. **Current Opinion in Plant Biology**. v.11, n.1, p.49–57, 2008.
- DE STEVEN, D.; WINDSOR, D.M.; Putz, F.E.; De LEÓN, B. Vegetative and reproductive phenologies of a palm assemblage in Panamá. **Biotropica**, v.19, n.4, p.342-356, 1987.
- DOS SANTOS, G. B.; MARQUES, M. I.; ADIS, J.; DE MUSIS, D. R. Artrópodos associados à copa de *Attalea phalerata* Mart. (*Arecaceae*), na região do Pantanal de Poconé, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.47, p.211-224, 2003.
- FISCH, S. T.; NOGUEIRA, JR., L.R.; MANTOVAI, W. Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. na mata atlântica (Reserva ecológica do Trabiçu, Pindamonhangaba-SP). **Revista Biociências.**, Taubaté, v.6, n.2, p.31-37, 2000.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. *In* **Genetics and conservation** (C.M. Schone-Wald-Cox, S.H. Chambers, B. MacByde; L. Thomas, eds.). Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, 1983, p.335-348.
- HENDERSON, A. A review of pollination studies in the Palmae. **The Botanical Review**, v.52, n.3, p.221-259, 1986.
- HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field Guide to the Palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University, 1995. p.166-167.
- HENDERSON, A.; PARDINI, R.; REBELLO, J.F.S.; VANIN, S.; ALMEIDA, D. Pollination of *Bactris* (Palmae) in an Amazon forest. **Brittonia**, v.52, n.2, p.160-171, 2000.

HOWARD, F. W.; MOORE, D.; GIBLIN-DAVIS, R. M.; ABAD, R. G. **Insects on Palms**. CABI Wallingford-New York. 2001.

Jardim, M. A. G. **Aspectos da biologia reprodutiva de uma população natural de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) no Estuário Amazônico**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1991.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. University Press, Niwot, 1993.

KIREJTSHUK, A. G.; COUTURIER, G. Sap beetles of the tribe Mystropini (Coleoptera: Nitidulidae) associated with South American palm inflorescences. **Annales de la Société Entomologique de France**, v.46, p.367-421, 2010.

LEE, S. L.; NG, K. K. S.; SAW, L. G.; LEE, C. T.; MUHAMMAD, N.; TANI, N.; TSUMURA, Y.; KOSKELA, J. Linking the gaps between conservation research and conservation management of rare dipterocarps: A case study of *Shorea lumutensis*. **Biological Conservation**, v.131, N.1, p.72-92, 2006.

LISTABARTH, C. Pollination of *Bactris* by *Phyllotrox* and *Epurea*. Implications of the palm breeding beetles on pollination at the community. **Biotropica**, v.28, p.69-81, 1996.

LOPES, D. C.; STEIDLE NETO, A. J. Potential crops for biodiesel production in Brazil: A review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 7, n. 2, p. 206-217, 2011.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; MEDEIROS-COSTA, J.T.; CERQUEIRA, L.S.; BEHR, N. **Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas**. Nova Odessa: Editora Plantarum, p.1-20, 1996.

LORENZI, G. M. A. C. **Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. Curitiba, 2006, 156f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MARTÉN, S.; QUESADA, M. Phenology, Sexual Expression, and Reproductive Success of the Rare Neotropical Palm *Geonoma epetiolata*. **Biotropica**, v.33, n.04, p.596–605, 2001.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**, 2nd edn. Baltimore, MD: The John Hopkins University Press. 2007.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN (MOBOT). **Acrocomia aculeata**. Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acesso em: abril, 2011.

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

- NAVARRO, L.; GUITIÁN, J. The role of floral biology and breeding system on the reproductive success of the narrow endemic *Petrocoptis viscosa* rothm (Caryophyllaceae). **Biological Conservation**, v.103, n.2, p.125-132, 2002.
- NAZARENO, A. G.; REIS, M. S. Linking Phenology to Mating System: Exploring the Reproductive Biology of the Threatened Palm Species *Butia eriospatha*. **Journal of Heredity**, v.103, n.6, p.842–852, 2012.
- NEWSTROM, L.E.; FRANKIE, G.W.; BAKER, H.G. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. **Biotropica**, v. 26, p.141-159, 1994.
- NÚÑEZ, L. A.; BERNAL, R.; KNUDSEN, J. T. Diurnal palm pollination by mystropine beetles: is it weather-related? **Plant Systematics and Evolution**, v.254, p.149-171, 2005.
- OLLERTON, J.; DAFNI, A. Functional floral morphology and phenology. In: DAFNI, A.; KEVAN, P.G.; HUSBAND, B.C. (Eds.) **Practical Pollination Biology**. Enviroquest, Cambridge, Ontario, 2005, p.1-26.
- OLIVEIRA, F. A. M. A produção de óleos vegetais de macaúba e seus co-produtos na região metropolitana de Belo Horizonte. In: **3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, Gorduras e Biodiesel**, Varginha, CD-Rom, 2006.
- OLIVEIRA, M.S.P.; COUTURIER, G.; BESERRA, P. Biologia da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) em Belém, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.3, p.343-353, 2003.
- OSTROROG, D. R. V.; BARBOSA, A. A. A. Biologia reprodutiva de *Geonoma brevispatha* Barb. Rodr. (Arecaceae) em mata de galeria inundável em Uberlândia, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.32, n.3, p.479-488, 2009.
- POSTEK, M.T.; HOWARD, K.S.; JOHSON, A.H.; MCMICHEL, K.L. **Scanning Microscopy**. A student´s handbook. Ladd Research Industries, 1980,305p.,
- RAMOS, S. L. F.; LOPES, M. T. G; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; MACÊDO, J. L. V.; CONTIM, L. A. S.; CLEMENT, C. R.; RODRIGUES, D. P.; BERNARDES, L. G. Determination of the mating system of Tucumã palm using microsatellite markers. **Crop Breed Applied Biotechnology**, v.11, p.181–185, 2011.
- SAEG - Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes-UFV, Viçosa, 2007.
- SCARIOT, A.; LIERAS, E.; HAY, J.D. Reproductive Biology of the Palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. **Biotropica**, v.23, n.1, p.12-22, 1991.
- SCARIOT, A.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. **Biotropica**, v.27, n. 2, p. 168-173, 1995.

TÁVORA, F.L. **Biodiesel e proposta de um novo marco regulatório : Obstáculos e Desafios**. Núcleo de Estudos e Pesquisas do Senado, Brasília-DF, 2012.

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

TICKEL, J. **From the fryer to the fuel tank: the complete guide to using vegetable oil as an alternative fuel**. Tickel Energy Consulting, Tallahassee, FL, 162p. 3rd. ed., 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Departamento de Engenharia Agrícola. Estação Climatológica Principal de Viçosa. **Boletim meteorológico 2010**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Departamento de Engenharia Agrícola. Estação Climatológica Principal de Viçosa. **Boletim meteorológico 2011**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. Departamento de Engenharia Agrícola. Estação Climatológica Principal de Viçosa. **Boletim meteorológico 2012**.

VOEKS, R.A. Reproductive ecology of the piassava palm (*Attalea funifera*) of Bahia, Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v.18, p.121-136, 2002.

CAPÍTULO 2

VIABILIDADE E AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO PÓLEN DE MACAÚBA

Viabilidade e avaliação de métodos de conservação do pólen de macaúba

RESUMO

Em programas de melhoramento genético é comum a realização de cruzamentos entre diferentes genótipos, e conseqüentemente, a condução do pólen de uma planta para outra. Alguns fatores relacionados ao tempo de receptividade do estigma, diferenças no período de florescimento, longevidade do pólen e a conservação de germoplasma, são aspectos que reforçam a importância do armazenamento de grãos de pólen. O objetivo deste estudo foi avaliar algumas técnicas de conservação que promovam maior longevidade ao pólen de *Acrocomia aculeata*. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento de Plantas da UFV. Primeiramente, foi verificada a viabilidade e a germinação *in vitro* do pólen fresco. Em um segundo experimento, foi avaliada a germinação do pólen sob diferentes condições de umidade (dessecação em sílica gel sob vácuo, liofilização e pólen fresco) e meios de cultura. E ainda, foi investigada a conservação do pólen, acondicionado em geladeira (4°C), freezer (-20°C) e ultrafreezer (-80°C) ao longo de seis meses. O valor médio para a germinação *in vitro* de pólen fresco, foi de 91%, e que foi reduzida após a conservação. A dessecação utilizando-se a sílica gel foi mais eficiente do que o processo de liofilização. As temperaturas de 4° C e -20° C, associadas ou não à dessecação, proporcionaram taxas de germinação acima de 40%, até 120 dias de armazenamento. O meio Brewbacker e Kwack foi o que proporcionou a melhor germinação *in vitro*. Estes resultados indicaram a possibilidade de conservação do pólen de macaúba para posterior utilização em programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: pólen, viabilidade, germinação *in vitro*, dessecação, liofilização.

INTRODUÇÃO

A Floresta Tropical apresenta abundante biodiversidade vegetal e abriga ao menos dois terços das espécies da Terra. Várias plantas fornecem ao homem benefícios de âmbito local, regional e global, por meio de bens econômicos e ecossistêmicos. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart., Arecaceae, conhecida como macaúba, é uma destas espécies. Desde os tempos pré-colombianos já fornecia comida, abrigo e matéria-prima para a fabricação de vários produtos para os povos indígenas da América Central e do Sul (MARKLEY, 1985). No Brasil, é considerada uma das espécies de palmeiras mais notáveis, que crescem naturalmente em pelo menos quatro ecossistemas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Abundantemente encontradas nessas áreas, são plantas perenes, arbóreas espinhosas, apresentando frutos oleaginosos em cachos que podem pesar mais de 25 kg (WANDECK e JUSTO, 1988; SCARIOT et al., 1995). O fruto da macaúba tem sido muito utilizado no Brasil e Paraguai para extrair o óleo e para fabricação de sabão, mas hoje essa planta é conhecida como uma das mais promissoras para a produção sustentável de biocombustíveis (ABREU et al, 2012; PIRES et al., 2013).

Apesar de seu grande potencial, a macaúba ainda não é domesticada, e informações acerca de sua biologia floral são escassas. Scariot et al. (1995) estudaram a sua fenologia em populações do cerrado brasileiro. No entanto, esse estudo não traz subsídios sobre a viabilidade dos grãos de pólen, conhecimento que é fundamental para estabelecer processos de sua conservação e longevidade em bancos de germoplasma e na condução de programas de melhoramento genético.

Os indivíduos de macaúba apresentam inflorescências compostas por numerosas ráquulas com flores pistiladas e estaminadas, caracterizando-os como monóicos. Além disso, apresenta protoginia, estratégia reprodutiva que favorece a polinização cruzada, de modo que, a presença de polinizadores torna-se obrigatória para que o cruzamento entre genótipos ocorra.

Assim, o armazenamento dos grãos de pólen para a realização de polinizações controladas é uma alternativa, já que o pólen pode ser guardado e utilizado no próximo ciclo reprodutivo ou em regiões onde a floração não é coincidente (TIGHE, 2004; EINHARDT, 2006; MORTAVAZI, 2010).

Dentre os vários métodos utilizados para a avaliação da viabilidade do pólen, destacam-se os testes colorimétricos e a germinação *in vitro* (DAFNI et al., 2005;

KEARNS e INOUE, 1993; OLIVEIRA et al., 2001). A utilização de corantes é uma técnica rápida e simples (GALLETTA, 1983) e fornece uma estimativa da viabilidade. A germinação *in vitro* complementa esta técnica e evidencia o atual estado de reservas do pólen e como estas reservas são convertidas durante a sua germinação.

A germinação *in vitro* é influenciada por diversos fatores como os constituintes do meio, a temperatura e o tempo de incubação (CAMOLESI, 2010). Os meios de cultura utilizados buscam propiciar as condições ideais que o estigma e o estilete encontram, em condições naturais, para que ocorra a fixação e germinação do pólen e crescimento do tubo polínico (KEARNS e INOUE, 1993).

Para assegurar a viabilidade do pólen armazenado é necessário que condições adequadas de temperatura e umidade sejam mantidas, visando preservar ao máximo a sua capacidade germinativa (SOUZA et al., 2002). Há poucos bancos de dados de pólen para plantas lenhosas de florestas tropicais (CHARRIER, 1990), e essas informações são imprescindíveis para subsidiar programas de conservação em bancos de germoplasma e para o melhoramento genético (LORA et al., 2006; PERVEEN e KHAN, 2009). Para a maioria das espécies a redução da umidade e temperatura favorece a longevidade do pólen ao longo do armazenamento (STANLEY e LINSKENS, 1974; KHAN e PERVEEN, 2008; DAVIDE et al., 2009), pois diminuem a atividade metabólica e a proliferação de microorganismos. O baixo teor de água reduz a formação de cristais de gelo intracelular, em temperaturas abaixo de 0° C (BARNABÁS e RAJKI, 1976) e, conseqüentemente, o rompimento de membranas, preservando assim a viabilidade do pólen.

Considerando a importância da conservação e da domesticação de espécies de grande potencial econômico das florestas tropicais no Brasil, o presente trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade e conservação de pólen de *Acrocomia aculeata* proveniente de indivíduos de população natural, sob diferentes condições de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Os 60 indivíduos de macaúba utilizados no presente estudo pertencem a uma população natural localizada em área de pastagem, no município de Acaiaca (20°23'33''S, 43°07'31''W), Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, sudeste brasileiro. Acaiaca possui temperatura média anual mínima de 16,5°C e máxima de 26,5°C, com precipitação média anual de 1323 mm. O clima do município é do tipo Cwa, segundo a classificação de Koeppen.

As inflorescências foram monitoradas até que a espata se abrisse, expondo as ráquulas com flores estaminadas, em pré-antese. Ráquulas de cinco plantas foram coletadas, aleatoriamente e, armazenadas em caixas de isopor, e conduzidas até o laboratório, distante cerca de 75 Km. No Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Viçosa, as ráquulas foram mantidas em recipientes com água, até que as flores liberassem o pólen (Figura 1A e 1C).

Este estudo foi dividido em três ensaios, nos quais foi verificado: 1) a viabilidade e germinação do pólen recém-coletado; 2) o efeito da dessecação dos grãos de pólen e a influência dos meios de cultura na germinação *in vitro*; e 3) o efeito de diferentes temperaturas e condições de umidade na germinação, ao longo do tempo.

Ensaio 1: Avaliação da viabilidade do pólen por meio de testes colorimétricos e germinativos

A viabilidade dos grãos de pólen, recém liberados (frescos), foi avaliada pela técnica de coloração por carmim acético 1% (KEARNS e YNOUYE, 1993), Reativo de Alexander (ALEXANDER, 1980), lugol (DAFNI, 2005) e solução de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (COOK e STANLEY, 1960). Para cada corante utilizou-se foram preparadas cinco lâminas e contados 200 grãos de pólen (mistura das cinco plantas coletadas) por lâmina, perfazendo um total de 4.000 grãos. As observações foram feitas em microscópio óptico com aumento de 200x. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado composto de quatro corantes e cinco repetições (lâminas).

Para a verificação da taxa de germinação *in vitro*, o pólen foi avaliado em quatro meios de cultura distintos, tendo em vista que cada espécie responde de modo diferencial a certas combinações de nutrientes do meio (STANLEY e LINSKENS, 1974). Os meios testados tinham as seguintes composições:

Meio 1 (M1): 100g L⁻¹ de sacarose; 10g L⁻¹ de ágar

Meio 2 (M2): 100g L⁻¹ de sacarose; 500mg L⁻¹ de H₃BO₃; 10g L⁻¹ de ágar

Meio 3 (M3): 100g L⁻¹ de sacarose; 300mg L⁻¹ de CaCl₂; 10g L⁻¹ de ágar

Meio 4 (M4): 100g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de KNO₃; 200 mg L⁻¹ de MgSO₄ (7H₂O); 100 mg L⁻¹ H₃BO₃; 300 mg L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ 4(H₂O); 10g L⁻¹ de ágar (BREWBAKER e KWACK, 1963)

Após o ajuste do pH para 6,5 os meios foram aquecidos e posteriormente vertidos em lâminas escavadas. Após esfriamento, os grãos de pólen foram aspergidos sobre esses meios. Em seguida, essas lâminas foram acondicionadas em placas de Petri, previamente revestidas com papel filtro e umedecidas com água, simulando uma câmara úmida e, mantidas em temperatura ambiente. A avaliação da germinação *in vitro* ocorreu 24 h após a inoculação do pólen. Foram considerados germinados os grãos de pólen que apresentavam crescimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen (ZHANG et al., 1997), avaliados em microscópico óptico com aumento de 100x.

Para cada meio de cultura foram preparadas oito lâminas, e contados 200 grãos de pólen por lâmina, perfazendo um total de 6.400 grãos. O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado, composto por quatro meios de cultura e oito repetições. Os dados obtidos nos testes colorimétricos e germinativos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias. Os procedimentos estatísticos foram realizados no pacote computacional SAEG, versão 9.1(2007).

Ensaio 2: Efeito da dessecação e meios de cultura na germinação do pólen

A influência da redução do teor de água dos grãos de pólen foi verificada por meio de três processos: 1) em dessecador com sílica gel, sob vácuo, por 24 h (10% de umidade final); 2) em liofilizador por 24h; e 3) pólen que não sofreu nenhum tipo de redução de umidade, sendo denominado como: sem dessecação. Após a redução ou não da umidade, o pólen previamente acondicionado em tubos eppendorf foi armazenado em freezer (-20°C). Após 30 dias, foram preparados os quatro meios de cultura utilizados no Ensaio 1, sob a mesma metodologia, e avaliada a germinação do pólen. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 com oito repetições.

Ensaio 3: Efeito de diferentes temperaturas e dessecação na germinação do pólen

Para o estudo da germinação do pólen, armazenado ao longo de seis meses, foi avaliado o efeito da interação entre temperatura e diferentes condições de umidade dos grãos. De modo que selecionou-se o pólen dessecado (em dessecador com sílica gel, sob vácuo por 24h) e o pólen sem dessecação, ambos armazenados em três ambientes distintos: geladeira (4°C), freezer (-20°C) e ultra-freezer (-80°C). Mensalmente, uma amostra de cada ambiente (temperatura) foi retirada e avaliada através de germinação *in vitro*, adotando-se o meio M4 (BREWBAKER e KWACK, 1963) como o padrão. O delineamento foi em parcelas subdivididas, com três repetições, dispostas em esquema fatorial 3x2x6, correspondente a três temperaturas, duas condições de umidade e seis tempos de armazenamento, totalizando 21.600 grãos de pólen.

RESULTADOS

Ensaio 1: Testes colorimétricos e germinativos

O pólen apresentou elevada viabilidade, evidenciada pelos testes com os diversos corantes utilizados (Tabela 1, Figura 1). O carmim acético corou 95% dos grãos de pólen com um vermelho intenso (Figura 1D), demonstrando a sua integridade cromossômica. O corante de Alexander corou o grão de pólen com uma coloração púrpura no protoplasma e com fino contorno azul-esverdeado na parede celular (Figura 1E), indicando que 96% dos grãos possuíam protoplasma e parede celular íntegra. A atividade respiratória foi determinada pelo TTC, que corou 83% dos grãos de pólen com a coloração vermelha, indicando a atividade da desidrogenase (Figura 1F). O TTC apresentou a menor média de viabilidade e diferiu significativamente dos demais corantes (Tabela 1). Essa diferença pode ser atribuída ao pouco tempo destinado a incubação (2h), e assim, para a reação enzimática desenvolver-se.

A presença de reserva foi observada em 93% dos grãos de pólen pelo teste com lugol, que reage com o amido presente, proporcionando coloração marrom intensa (Figura 1G).

A germinação *in vitro* do grão de pólen é iniciada com aproximadamente 12 h após a sua incubação. A intina projeta-se através dos poros da exina, formando o tubo polínico (Figura 1 I e J). Obteve-se uma taxa média de 91% de germinação. Dentre os

meios testados a menor média foi para o M1, com 86% de germinação. Os meios M4 e M2 tiveram 87 e 92% de germinação, respectivamente. E a maior média foi obtida no M3 (97%) (Figura 2).

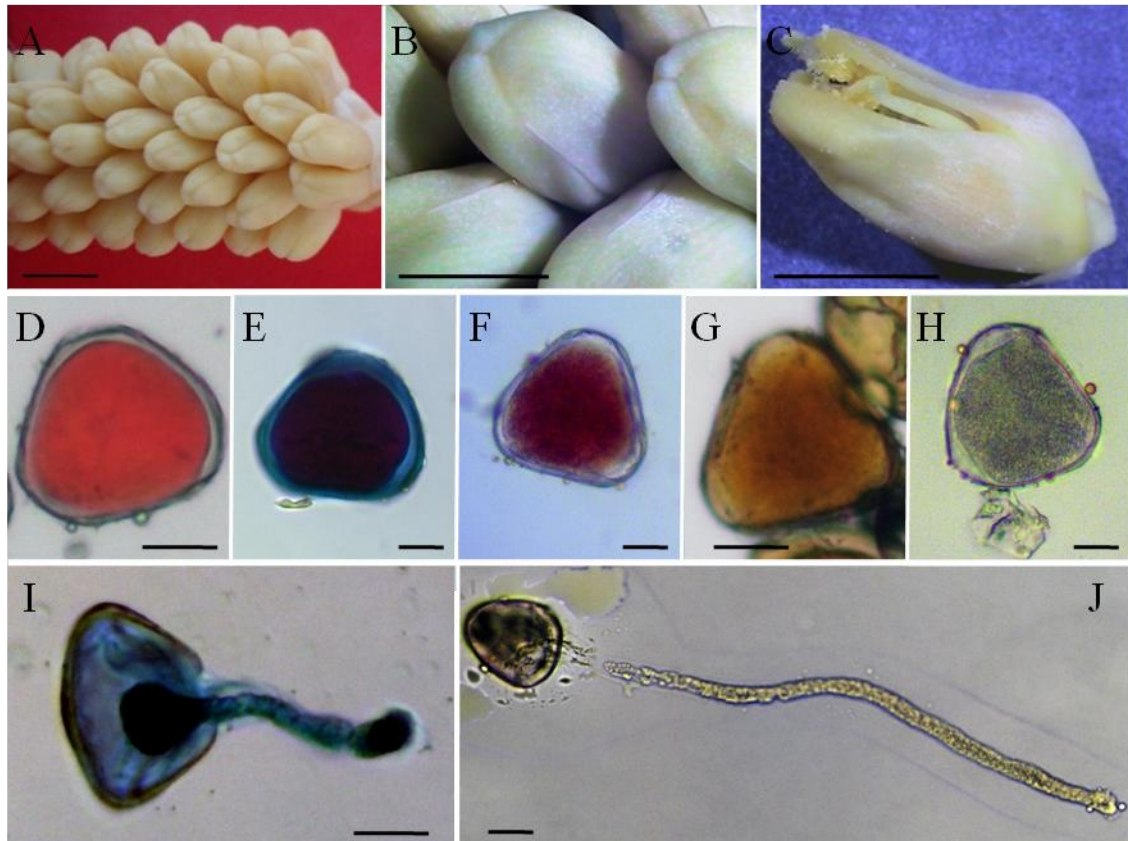


Figura 1. Flores estaminadas e grãos de pólen de *Acrocomia aculeata*. A e B- Flores em pré-antese; C- flor em antese com o pólen exposto sobre as anteras; D a J- Grãos de pólen: corados com, D- carmim acético 1%, E- Reativo de Alexander, F- solução de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), G- lugol; H- grão de pólen sem coloração. I e J: Grãos de pólen com o tubo polínico, I- corado com lactofenol blue solution, J- sem coloração. Barras: A= 0,5 cm; B e C= 2mm; D,E,F,G,H,I,J= 10μm.

Tabela 1. Valores médios percentuais e desvio padrão da coloração dos grãos de pólen de *Acrocomia aculeata*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

CORANTES	VIABILIDADE (%)	FONTE DA METODOLOGIA
Carmin acético	95,0 ± 2,63 ^a	KEARNS e INOUYE (1993)
Alexander	96,2 ± 1,04 ^a	ALEXANDER (1980)
Lugol	93,3 ± 3,05 ^a	DAFNI (2005)
TTC	83,3 ± 3,54 ^b	COOK e STANLEY (1960)

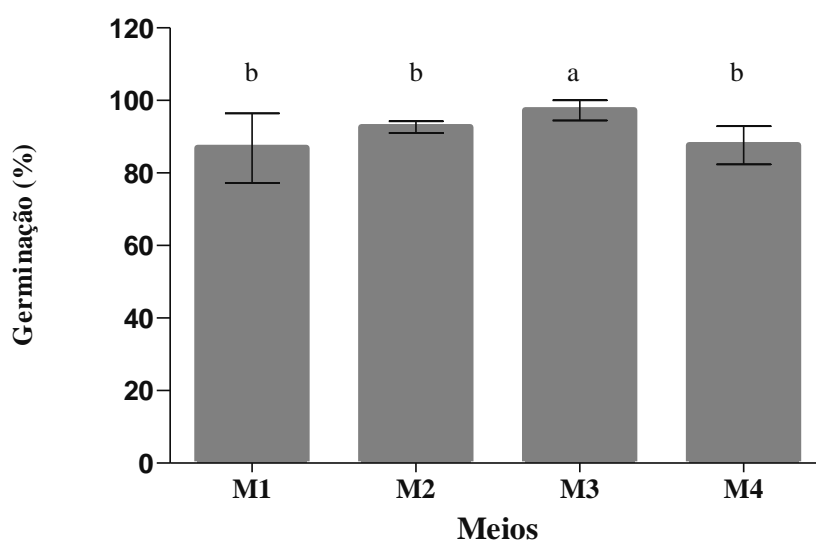


Figura 2. Valores médios da germinação in vitro de grãos de pólen recém coletados de *Acrocomia aculeata* em quatro meios de cultura. **M1**: 100 g L⁻¹ de sacarose; 10 g L⁻¹ de ágar; **M2**: 100 g L⁻¹ de sacarose; 500 mg L⁻¹ de H₃BO₃; 10 g L⁻¹ de ágar; **M3**: 100 g L⁻¹ de sacarose; 300 mg L⁻¹ de CaCl₂; 10 g L⁻¹ de ágar; **M4**: 100 g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de KNO₃; 200 mg L⁻¹ de MgSO₄ (7H₂O); 100 mg L⁻¹ H₃BO₃; 300 mg L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ 4(H₂O); 10 g L⁻¹ de ágar (BREWBAKER e KWACK, 1963). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Ensaio 2: Efeito da dessecação e meios de cultura na germinação do pólen

Pólen dessecado, tanto em sílica gel como por liofilização apresentou germinação menor que o pólen não dessecado. A redução da umidade do grão de pólen em dessecador com sílica gel proporcionou taxas de germinação entre 45 a 57%. Por outro lado, a taxa de germinação de pólen liofilizado foi menor, entre 0,67 a 43,33%. Já o pólen não dessecado apresentou taxas de germinação de 43,33% a 62,33% (Tabela 2).

A germinação do pólen de *A. aculeata* diferiu nos diferentes meios de cultura testados. De forma geral, as menores taxas foram obtidas no meio M1, seguidos por M2 ou M3 e atingindo as maiores taxas em M4. Esse efeito foi observado em todas as condições de dessecação estudadas (Tabela 2).

Tabela 2. Germinação (%) de grãos de pólen de *Acrocomia aculeata*, recém coletados ou dessecados por sílica gel e liofilização, em diferentes meios de cultura.

Meios	Dessecação		Sem Dessecação
	Sílica gel	Liofilização	
M1	45,00Ab	0,67Bc	43,33Ab
M2	46,00Bb	3,00Cc	62,00Aa
M3	46,33Bb	20,00Cb	61,33Aa
M4	57,00Aa	43,33Ba	62,33Aa

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste Tukey.

Ensaio 3: Efeito de diferentes temperaturas e dessecação na germinação do pólen

O pólen dessecado e conservado a 4°C, em ambiente de refrigerador, apresentou comportamento crescente na germinação nos primeiros 90 dias de armazenamento; para os tempos avaliados, as médias quando comparadas foram iguais, exceto aos 30 dias de incubação. Já quando o pólen não foi dessecado e conservado na mesma temperatura, apresentou comportamento decrescente logo após o armazenamento; as médias observadas nos dois primeiros meses foram superiores e diferiram das demais (Tabela 3).

Quando avaliou-se o pólen armazenado em freezer (-20°C), sob a condição de dessecação, observou-se médias diferindo entre si apenas aos 90 dias de armazenamento. Quando sem dessecação, as médias foram iguais e superiores, até 120 dias de armazenamento (Tabela 3).

Para o ambiente de ultra-freezer (-80°C) na condição de dessecação, o comportamento da taxa de germinação foi decrescente, principalmente, nos primeiros 120 dias de armazenamento. Para esta mesma temperatura, quando o pólen não foi dessecado, a taxa de germinação decresceu constantemente, exceto aos 120 dias, onde verificou-se um incremento na taxa de germinação. As médias obtidas diferiram apenas aos 150 dias de armazenamento.

Tabela 3. Efeito da dessecação na taxa de germinação (%) do pólen de *Acrocomia aculeata*, submetido a diferentes condições de armazenamento, ao longo de seis meses.

Tempo (dias)	Dessecação	Condições de armazenamento		
		Geladeira (4°C)	Freezer (-20°C)	Ultra-freezer (-80°C)
30	Dessecado	50,33Ab	57,00Aa	40,00Bb
	Não dessecado	59,00Ba	62,33Ba	69,33Aa
60	Dessecado	56,33Aa	42,33Ba	39,00Ba
	Não dessecado	57,00Aa	47,33Ba	39,00Ba
90	Dessecado	67,33Aa	54,33Bb	24,00Ca
	Não dessecado	41,33Bb	65,33Aa	24,00Ca
120	Dessecado	65,33Aa	42,00Ba	19,00Cb
	Não dessecado	52,00Ab	44,00Aa	50,00Aa
150	Dessecado	20,00Ba	52,33Aa	28,66Ba
	Não dessecado	11,33Ab	10,33Ab	18,33Ab
180	Dessecado	36,00Aa	25,33Ba	17,33Ba
	Não dessecado	25,33Ab	9,33Bb	18,00Ba

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

DISCUSSÃO

Os grãos de pólen de macaúba avaliados por meio dos testes colorimétricos apresentaram estruturas íntegras e conteúdo de reservas suficientes para que possam ser armazenados. Todos os corantes testados foram eficazes na determinação da viabilidade apresentando percentual médio acima do recomendado por Souza et al.(2002), que considera 70% de viabilidade polínica adequada para a utilização do pólen.

O carmim acético atua sobre os cromossomos do grão de pólen não abortado, e ainda pólen imaturo e inviável (STANLEY e LINSKENS, 1974). O corante de Alexander visualmente oferece uma maior confiabilidade na avaliação da viabilidade polínica de *A. aculeata*, pois é possível diferenciar os grãos de pólen abortados dos não abortados. Os abortados, por não possuírem o núcleo e apenas a celulose contida na parede celular, coram-se de azul-esverdeado. Outros estudos, (TECHIO et al., 2006; DAMASCENO JÚNIOR, 2008; PETERSON et al., 2010; PRAKASH et al., 2010) também recomendaram a utilização da solução de Alexander para o monitoramento da viabilidade de grãos de pólen frescos ou armazenados. Apesar da praticidade que a técnica de coloração permite, Galetta (1983) contestou o método por este superestimar a viabilidade polínica, embora seja eficiente na determinação de componentes celulares e na integridade do grão de pólen.

O TTC embora tenha proporcionado a menor média de viabilidade, é uma ferramenta bastante útil e confiável na estimativa rápida da viabilidade polínica, por apresentar resultados próximos aos obtidos pela germinação *in vitro* (MUNHOZ et al., 2008; HUANG et al., 2004). Os resultados obtidos neste estudo para o pólen recém coletado, enquadram-se nesta comparação.

O pólen recém coletado apresentou elevada germinação *in vitro*, mesmo em meio contendo apenas sacarose (M1). Entretanto, os meios suplementados com elementos que são importantes para a germinação do pólen, como cálcio e boro, encontrados nos outros meios testados, obtiveram maiores médias, além de uma aparência mais robusta do tubo polínico. O meio M2, enriquecido com boro, proporcionou a maior percentagem de germinação, e diferiu dos demais meios. O boro é essencial na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico, metabolismo fenólico e protéico, e na integridade e funcionamento das membranas celulares. Além de ter papel fundamental no metabolismo de carboidratos, facilitando o

transporte dos açúcares através das membranas, por meio do complexo açúcar-borato (MALAVOLTA, 1980; MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA et al., 1997).

Segundo Almeida et al. (2002), a germinação *in vitro* apresenta alta correlação com a fertilização no campo, entretanto os resultados para a fertilização tende a serem menores do que as taxas de germinação *in vitro*, considerando-se que outros fatores não controláveis, como a receptividade do estigma, barreiras morfológicas e genéticas, influências de temperatura e umidade relativa, e condições nutricionais da planta podem interferir nos resultados de campo. Assim, é recomendado testar *in vivo* o pólen, como complemento ao teste de germinação, e conhecer como é dada a frutificação, realizada por meio de cruzamentos controlados.

A baixa germinação observada em grãos de pólen liofilizados, em relação aos demais tratamentos de dessecação, pode ter sido causada pela desestruturação da membrana celular. O processo de dessecação retira a umidade de um material sob baixa temperatura e condição de vácuo (VALLAN, 2007). Nesse processo, a desestruturação ocorre em função da alteração da composição lipídica da membrana, devido à degradação de fosfolipídios, geralmente, por oxidação e lipólise induzida pela liofilização (CASTRO et al., 1997). Entretanto o enriquecimento do meio de cultura com substâncias nutritivas, tal como nos meios M2, M3 e M4, aumentam as chances de sobrevivência da célula (CASTRO et al., 1997). Neste trabalho, observou-se que o pólen liofilizado apresentou taxa de germinação crescente nos meios M1, M2, M3 e M4, respectivamente. Esse aumento foi, provavelmente, devido à diferença na composição desses meios.

O boro presente no meio M2 está envolvido na translocação e metabolismo da sacarose; e no controle da síntese de calose que, quando sintetizada em quantidades excessivas, bloqueia o crescimento do tubo polínico, principalmente em células expostas a situação de estresse (BHATTACHARYA e MANDAL, 2000; WANG et al., 2003; GIBERNAU et al. 2003; FRANZON et al. 2005;). Em condições normais, tampões de calose são formados à medida que o tubo polínico estende-se, contribuindo para manter o citoplasma próximo a região apical do tubo (QIN et al., 2012). O boro participa também da síntese de pectina, que promove o alongamento do tubo polínico, mediada pela fusão de membranas vesiculares, provenientes do retículo endoplasmático e dictiossomas (NYOMORA et al., 2000).

O cálcio presente no meio M3 tem o papel de estabilizador da membrana e da parede celular, além de atuar como sinalizador, desencadeando reações enzimáticas

favoráveis à manutenção da célula (HARPER e HARMON, 2005). Em condições de estresse e sob baixa temperatura, como no processo de liofilização, o cálcio tem um efeito protetor para a membrana celular, amenizando os danos causados aos tecidos pelo congelamento e descongelamento (MARSCHNER, 1995). O cálcio também está envolvido em uma menor sensibilidade da célula a variações osmóticas (BHOJWANI e BHATNAGAR, 1974).

O meio M4 foi o que proporcionou a melhor taxa de germinação. Além do boro e cálcio, possui ainda em sua composição o potássio e o magnésio. O potássio está intrinsecamente relacionado ao transporte de solutos, principalmente, açúcares como a sacarose, para o interior das células, além de atuar como osmorregulador. Portanto, sua atuação tem efeito direto na expansão celular por meio do controle da turgescência (MARSCHNER, 1995, ZONIA e MUNNIK, 2011).

O magnésio atua diretamente nos processos metabólicos que requerem energia na forma de ATP, uma vez que sua associação a essa molécula torna-a ativa (SHAUL, 2002; SHABALA e HARIADI, 2005). Ademais, a presença do magnésio auxilia na estabilização da membrana celular semelhantemente ao cálcio. Por fim, a melhor taxa de germinação observada nesse meio pode ser creditada a um provável efeito sinérgico entre os quatro nutrientes: boro, cálcio, potássio e magnésio, que proporcionaram, mesmo em uma condição de estresse, tal como na liofilização, uma maior germinação, e por isso o meio M4 destacou-se entre os demais. Portanto, pelas justificativas anteriormente mencionadas, o meio M4 foi adotado como meio padrão para os ensaios de conservação com diferentes temperaturas.

Nas temperaturas de 4° C e -20° C, tanto para o pólen dessecado quanto para o não-dessecado, a taxa de germinação foi superior a 40% até 120 dias de armazenamento. Após esse período, houve tendência de queda da taxa de germinação, principalmente para o pólen que não foi dessecado.

Sob a condição de dessecação, no armazenamento do pólen ao longo de seis meses, o armazenamento em geladeira (4°C) manteve a longevidade do pólen, com taxa de germinação superior às demais, até os 120 dias de armazenamento. Curiosamente, após o armazenamento em geladeira, a taxa de germinação do pólen dessecado aumentou até os 90 dias. Resultados semelhantes foram obtidos em *Phoenix dactylifera* (MORTAZAVI et al., 2010), que aumentou sua taxa de germinação até 40 dias e; em *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb que teve um incremento na germinação no sexto e no décimo mês de armazenamento, em duas cultivares analisadas (MARTÍNEZ-GÓMEZ

et al., 2002). Segundo Boughediri e Bounanga (1991), este resultado pode ser atribuído ao fato de que alguns grãos de pólen podem continuar o seu desenvolvimento durante o armazenamento e, gradualmente tornar-se maduro e viável, principalmente nesta temperatura cujo pólen é apenas resfriado e não é congelado. Para o pólen não dessecado de macaúba este comportamento crescente não foi verificado.

Quando o pólen foi submetido a temperaturas muito baixas, como no ultra-freezer (-80° C), e não utilizou-se a dessecação, a taxa de germinação apresentou um comportamento decrescente logo após o seu armazenamento.

A presença de alguns tubos polínicos vigorosos, mesmo quando foi verificada uma baixa taxa de germinação, pode indicar que ainda são satisfatórios, pelo menos, para proporcionar uma moderada frutificação, sendo assim necessário a intensificação das polinizações controladas e confirmação em testes *in vivo*.

CONCLUSÕES

O pólen recém coletado de macaúba apresenta elevada viabilidade, confirmada por testes colorimétricos e germinativos.

A dessecação realizada por meio da sílica gel em condição de vácuo, mostrou-se mais eficiente na manutenção da viabilidade do pólen do que o método da liofilização.

As temperaturas de 4° C e -20°C foram mais efetivas na conservação do pólen, utilizando-se ou não a dessecação.

Esse estudo confirma a possibilidade da conservação de grãos de pólen de *Acrocomia aculeata* para fins de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. G.; PRIOLLI, R. H. G.; AZEVEDO-FILHO, J. A.; NUCCI, S. N.; ZUCCHI, M. I.; COELHO, R. M.; COLOMBO, C. A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (*Arecaceae*). **Genetics and Molecular Biology**, v.35, n.1, p.119-121, 2012.

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v.55, p.13-18, 1980.

ALMEIDA, C. C. S.; AMORIM, E. P.; SERE-NO, M. J. C. M.; BARBOSA NETO, J. F.; VOLTZ, A.H. Efeito de desidratante e temperatura na estocagem de pólen de milho (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2002. Florianópolis. **Meio ambiente e a nova agenda para o agronegócio de milho e sorgo**. Sete Lagoas: ABMS/ Embrapa Milho e Sorgo/EPAGRI, p.480, 2002.

BARNABÁS, B.; RAJKI, E. Storage of maize (*Zea mays* L.) pollen at -196°C in liquid nitrogen. **Euphytica**, v.25, p.747-752, 1976.

BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. Pollination biology in *Bombax ceiba* Linn. **Current Science**, v.79, p.1706-1712, 2000.

BHOJWANI, S. S.; BHATNAGAR, S. P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi, 1974, 368p.

BOUGHEDIRI, L. A.; CERCEAU-LARRIVAL, M. T.; DORÉ, J. C. Significance of freeze-drying in long term storage of date palm pollen. **Grana**, v.34, n.6, p.408-412, 1995.

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

CAMOLESI, M. R.; MARTINS, A. N.; SOUZA, L. D. de; SACONI, C. G. Enraizamento *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* sp.) em diferentes meios de cultivo. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.6, p.1446-1451, 2010.

CASTRO, H. P.; TEIXEIRA, P. M.; KIRBY, R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, p.87-94, 1997.

CHARRIER, A. Pollen et ressources génétiques. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v.137,n.2, p.101-104, 1990.

COOK, S. A.; STANLEY, R. G. Tetrazolium chloride as an indicator of pine pollen germinability. **Silvae Genetica**, v.9, n.5, p.134-136, 1960.

DAFNI, A.; KEVAN, P.G.; HUSBAND, B.C. **Practical pollination biology**. Ontario, Enviroquest Ltd. 2005.

- DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; SILVA, F. F.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G. Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya L.*). **Ceres**. Rio de Janeiro. v.5, n.55, p.433-438, 2008.
- DAVIDE, L. M. C, PEREIRA, R. C., ABREU, G. B., SOUZA, J. C.; PINHO, E. V. R. V. Viabilidade de pólen de milho em diferentes períodos de armazenamento em baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.8, p.199-206, 2009.
- EINHARDT, P. M.: CORREA, E. R.: RASEIRA, M. C. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de Pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.5-7, 2006.
- FRANZON, R. C.; CORRÊA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. *In vitro* pollen germination of feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, p.229-233, 2005.
- GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdue University Press, p.23-47, 1983.
- GIBERNAU, M.; MACQUART, D.; DIAZ, A. Pollen viability and longevity in two species of *Arum*. **Aroideana**, v.26, p.58-62, 2003.
- HARPER, J. F.; HARMON, A. Plants, Symbiosis and Parasites: A calcium signalling connection. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.6, 2005.
- HUANG, Z.; ZHU, J.; MU, X.; LIN, J. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, v.93, p.295-301, 2004.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. University Press of Colorado, 583p., 1993.
- KHAN, S. A.; A. PERVEEN. Germination capacity of stored pollen of *Morus alba* L. (Moraceae) and their maintenance. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.5, p.1823-1826, 2008.
- LORA, J.; OTEYZA, M. A. P.; FUENTETA, P.; HORMAZA, J. I. Low temperature storage and *In vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.91-94, 2006.
- MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo, **Ceres**, p.251, 1980.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. Avaliação do estado nutricional das plantas – princípios e aplicações. Piracicaba, **Potafos**, 1997, 308p.
- MARLEY, K.S. Mbocayá palm: an economic oil plant of Paraguay. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.32, p.4104-414, 1985.

- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego, Academic Press, p.889, 1995.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.; GRADZIEL, T.M.; ORTEGA, E.; DICENTA, F. Low Temperature Storage of Almond Pollen. **Hortscience**, v.37, n.04, p.691–692, 2002.
- MORTAVAZI, S. M. H.; ARZANI, K.; MOIENI, A. Optimizing storage and *in vitro* germination of date palm (*Phoenix dactylifera*) pollen. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.12, p.181-189, 2010.
- MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.2, p.209-214, 2008.
- NYOMORA, A. M. S.; BROWN, P. H.; PINNEY, K.; POLITO, V. S. Foliar Application of Boron to Almond Trees Affects Pollen Quality. **Journal of the American Society Horticultural Science**, v.125, n.2, p.265–270, 2000.
- OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M. ; KALUME, M. A. de A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de Açaizeiro. **Acta Botânica Brasílica**, v.15, n.1, p.27-33, 2001.
- PERVEEN, A.; KHAN, S. A. Maintenance pollen germination capacity of *Glycinemax* (L.) Merr., (Papilionaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v.41, n.5, p.2083-2086, 2009.
- PETERSON, R.; SLOVIN, J. P.; CHEN, C. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. **International Journal of Plant Biology**, v.1, n.2, 2010.
- PIRES, T. P.; SOUZA, E. S.; KUKI, K. N.; MOTOIKE, S.Y. Ecophysiological traits of the macaw palm: A contribution towards the domestication of a novel oil crop. **Industrial Crops and Products**, v.44, p.200-210, 2013.
- PRAKASH, A.; CHAUHAN, S.; RANA, A.; CHAUDHARY, V. Study of *In vitro* Pollen Germination and Pollen Viability in *Punica granatum* L. (Punicaceae). **Research Journal of Agricultural Sciences**, v.1, n.3, p.224-226, 2010.
- QIN, P.; TING, D.; SHIEH, A.; McCORMICK, S. Callose plug deposition patterns vary in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana* ecotypes and tomato species. **BMC Plant Biology**, v.12, 2012.
- SAEG - Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes-UFV, Viçosa, 2007.
- SCARIOT, A.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. **Biotropica**, v.27, n. 2, p. 168-173, 1995.

SHABALA, S.; HARIADI, Y. Effects of magnesium availability on the activity of plasma membrane ion transporters and light-induced responses from broad bean leaf mesophyll. **Planta**, v.221, p.56–65, 2005.

SHAUL, O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. **BioMetals**, v.15, n.3, p.309–323, 2002.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa degener*). **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.6, p.1209-1217, 2002.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. 1.ed. Berlin: Springer-Verlag, 1974, 307p.

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**, v.28, p.7-12, 2006.

TIGHE, M. E. **Manual de recolección y manejo de polen de pinus tropicales y subtropicales procedentes de rodales naturales**. 1.ed, Raleigh, NC, USA: NC State University, 20p., 2004.

VALLAN, A. **A Measurement System for Lyophilization Process Monitoring Instrumentation and Measurement Technology Conference - IMTC 2007** Warsaw, Poland, May 1-3, 2007.

WANDECK, F. A.; JUSTO, P. G. A macaúba, fonte energética e insumo industrial: sua significação econômica no Brasil. In: Simpósio Sobre o Cerrado, Savanas, 6. 1988, Brasília. **Anais ... Planaltina: EMBRAPA, CPAC**, 1988. p. 541-577.

WANG, Q.; LU, L.; WU, X.; LI, Y.; LIN, J. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. **Tree Physiology**, v.23, p.345–351, 2003.

ZHANG, C.; FOUNTAIN, W. D.; MORGAN, E. R. *In vitro* germination of the trinucleate pollen of *Limonium perezii*. **Grana**, v.36, p.284–288, 1997.

ZONIA, L.; MUNNIK, T. Understanding pollen tube growth: the hydrodynamic model versus the cell wall model. **Trends in Plant Science**, v.16, n.7, p.347-52, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

A macaúba apresenta variação quanto ao período de floração interpopulacional, que ocorre na estação chuvosa. Apresenta floração, preferencialmente noturna. Seu sistema reprodutivo é misto e, portanto, há autocompatibilidade, com predominância para a xenogamia. É uma espécie entomófila, polinizada principalmente por pequenos coleópteros, das famílias Curculionidae e Nitidulidae. Os insetos foram pouco eficientes na polinização, tornando a espécie dependente de polinizações artificiais em programas de melhoramento que busque a sua domesticação.

O pólen de macaúba apresenta elevada viabilidade, evidenciada pelos testes colorimétricos e germinativos. O pólen é tolerante a dessecação por meio da sílica gel em condição de vácuo, sendo mais eficiente na manutenção da viabilidade do pólen do que o método da liofilização. As temperaturas de 4°C e -20°C foram mais efetivas na conservação do pólen e, assim, torna possível a conservação de grãos de pólen de *Acrocomia aculeata* para subsidiar programas de melhoramento genético.