

## Meiose e viabilidade polínica de Castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.)

### Meiosis and pollen viability of Brazil Nut Tree (*Bertholletia excelsa* Bonpl.)

### Meiosis y viabilidad del polen de Castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.)

Recebido: 18/05/2022 | Revisado: 02/06/2022 | Aceito: 03/06/2022 | Publicado: 07/06/2022

#### **Bruno Vindilino Roelis**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4335-5894>

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, Brasil

E-mail: [brunovindilino@gmail.com](mailto:brunovindilino@gmail.com)

#### **Giseudo Aparecido de Paiva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8905-220X>

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, Brasil

E-mail: [giseudo.paiva@hotmail.com](mailto:giseudo.paiva@hotmail.com)

#### **Ana Paula Roveda**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4752-7128>

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, Brasil

E-mail: [anapaularoveda@hotmail.com](mailto:anapaularoveda@hotmail.com)

#### **Aisy Botega Baldoni**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8355-6957>

Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Brasil

E-mail: [aisy.baldoni@embrapa.br](mailto:aisy.baldoni@embrapa.br)

#### **Rosimeire Barboza Bispo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3455-1084>

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil

E-mail: [rosimeirebarboza1@hotmail.com](mailto:rosimeirebarboza1@hotmail.com)

#### **Ana Aparecida Bandini Rossi**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8318-5375>

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, Brasil

E-mail: [anabanrossi@unemat.com.br](mailto:anabanrossi@unemat.com.br)

#### **Resumo**

A castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), configura entre as espécies arbóreas mais importantes da Floresta Amazônica. Estudos de fenologia reprodutiva auxiliam no desenvolvimento de estratégias de polinizações manuais e naturais. A polinização é uma das formas de garantir a sobrevivência de uma espécie por meio da fecundação do óvulo pelo grão de pólen. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o comportamento meiótico, estimar a viabilidade polínica e determinar o conteúdo de reserva dos grãos de pólen em *B. excelsa* nativa da Amazônia mato-grossense. Foram coletados botões florais em vários estádios de desenvolvimento em uma população, e em seguida estes foram fixados em solução de ácido acético 3:1 e álcool 70%. Para as análises meióticas foi utilizado o corante carmim acético, para viabilidade polínica os corantes, carmim acético e reativo de Alexander e para citoquímica os corantes lugol e sudan IV. Todas as observações foram realizadas em microscópio óptico. Foi observado que a espécie possui  $2n=2x=26$  cromossomos. A meiose foi considerada regular, com índice meiótico de 92,4%, sendo observados alguns cromossomos retardatários na anáfase I, além de segregação irregular dos cromossomos e dissincronia celular na anáfase II. A viabilidade polínica por meio de corantes foi considerada alta, acima de 80%, juntamente com a viabilidade através da germinação do tubo polínico, que foi acima de 50% no melhor meio de cultura. A análise citoquímica revelou positividade para amidos e lipídios, com maior porcentagem de lipídios. A castanheira-do-brasil apresenta meiose regular, viabilidade polínica alta e maior porcentagem de lipídios em seus grãos de pólen.

**Palavras-chave:** Índice meiótico; Citoquímica; Germinação de pólen.

#### **Abstract**

The Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) is one of the most important tree species in the Amazon Forest. Reproductive phenology studies help in the development of manual and natural pollination strategies. Pollination is one of the ways to ensure the species survival through the ovule fertilization by the pollen grain. This work aimed to characterize the meiotic behavior, estimate pollen viability and determine the pollen grains reserve content in *B. excelsa* native in Mato Grosso Amazon. Flower buds were collected at various stages of development in a population, and then they were fixed in a acetic acid solution 3:1 and 70% alcohol. For meiotic analysis, acetic carmine dye was used, for pollen viability, acetic carmine and Alexander's reactive dyes and for cytochemistry, lugol and sudan IV dyes. All observations were performed under an optical microscope. It was observed that the species has  $2n=2x=26$  chromosomes. Meiosis was considered regular, with a meiotic index of 92.4%, with some latent chromosomes being

observed in anaphase I, in addition to irregular segregation of chromosomes and cellular dyssynchrony in anaphase II. Pollen viability through dyes was considered high, above 80%, along with viability through pollen tube germination, which was above 50% in the best culture medium. Cytochemical analysis revealed positivity for starches and lipids, with a higher percentage of lipids. The Brazil nut tree has regular meiosis, high pollen viability and a higher percentage of lipids in its pollen grains.

**Keywords:** Meiotic index; Cytochemistry; Pollen germination.

### Resumen

El árbol de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) es una de las especies arbóreas más importantes de la Selva Amazónica. Los estudios de fenología reproductiva ayudan en el desarrollo de estrategias de polinización manual y natural. La polinización es una de las formas de asegurar la supervivencia de una especie a través de la fecundación del óvulo por el grano de polen. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el comportamiento meiótico, estimar la viabilidad del polen y determinar el contenido de reserva de los granos de polen en *B. excelsa* nativa de la Amazonía de Mato Grosso. Se colectaron botones florales en diversos estados de desarrollo en una población, y luego se fijaron en una solución de ácido acético 3:1 y alcohol al 70%. Para el análisis meiótico se utilizó colorante carmín acético, para viabilidad del polen carmín acético y colorantes reactivos de Alexander y para citoquímica, colorantes lugol y sudan IV. Todas las observaciones se realizaron bajo un microscopio óptico. Se observó que la especie tiene  $2n=2x=26$  cromosomas. La meiosis se consideró regular, con un índice meiótico del 92,4%, observándose algunos cromosomas latentes en el anafase I, además de segregación irregular de cromosomas y asincronía celular en el anafase II. La viabilidad del polen a través de colorantes se consideró alta, superior al 80%, junto con la viabilidad a través de la germinación del tubo polínico, que fue superior al 50% en el mejor medio de cultivo. El análisis citoquímico reveló positividad para almidones y lípidos, con mayor porcentaje de lípidos. El árbol de nuez de Brasil tiene una meiosis regular, alta viabilidad de polen y un mayor porcentaje de lípidos en sus granos de polen.

**Palabras clave:** Índice meiótico; Citoquímica; Germinación de polen.

## 1. Introdução

A castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl. / Lecythidaceae) é uma das espécies arbóreas mais importantes da Floresta Amazônica, possui tronco escuro, crescimento ortotrópico, flores creme-amareladas e um fruto globoso denominado pixídio, inflorescência terminal ou em panículas axilares de 10 a 20 cm de comprimento, com 10 a 40 flores subsésseis, bissexuais, globosas de 3-3, 5 cm de diâmetro e a antese ocorre entre 04h30 e 05h00 (Müller et al., 1980; Orwa, 2009; Flora e Funga do Brasil, 2022).

Estudos de fenologia reprodutiva são importantes para auxiliar no desenvolvimento de estratégias de polinizações manuais e naturais, visando a conservação das espécies vegetais (Morellato, 1995). A polinização é uma das formas de garantir a sobrevivência de uma espécie por meio da fecundação do óvulo pelo grão de pólen, porém a fertilidade de um organismo está diretamente correlacionada a sua regularidade meiótica, pois é através dela que células reprodutivas são formadas (Davide et al., 2007). Através da viabilidade polínica e estabilidade meiótica é possível verificar o potencial do gameta masculino na eficiência da fecundação, sendo de grande importância no melhoramento de espécies vegetais (Horner & Palmer, 1995; Corrêa et al., 2010).

Quando se deseja fazer uma avaliação rápida, os testes colorimétricos que não envolvem germinação, podem ser utilizados, por meio de corantes químicos específicos, como reativo de Alexander e carmim acético por exemplo, que reagem com os constituintes presentes no pólen maduro (Pagliarini & Pozzobon, 2004). Além dos métodos de coloração relativamente rápidos e baratos, outros métodos também podem ser usados para avaliar a viabilidade do pólen como germinação dos grãos de pólen *in vitro*, visto que os corantes reagem com constituintes químicos ou estruturas, cujas presenças podem não refletir a capacidade de o grão de pólen germinar (Bettiol Neto et al., 2009; Biondo & Battistin, 2001).

Outra forma de avaliar grãos de pólen é a análise citoquímica que avalia a presença de materiais de reserva dos grãos polínicos, com destaque para os corantes Sudan IV (para a identificação de lipídios) e Lugol (para identificação de amido), que reagem com componentes celulares presentes nos grãos de pólen (Pagliarini & Pozzobon, 2004). O consenso ecológico é de que pólenes amiláceos é característico de flores polinizadas pelo vento e pela água, já as espécies polinizadas por insetos apresentam substituição de amido por açúcar ou lipídios (Baker & Baker, 1979).

A reprodução sexuada necessita de células especializadas denominadas gametas, que são resultado de uma divisão celular chamada meiose, na qual os cromossomos parentais são reduzidos à metade, diferentemente dos animais, as plantas produzem esporos no término da meiose e o estudo desse processo (microsporogênese), que resulta na formação de gametas masculinos, é relativamente simples pois as anteras (órgão masculino onde ela ocorre) são mais fáceis de serem manipuladas (Pagliarini & Pozzobon, 2004). Irregularidades no processo de microgametogênese têm reflexo na viabilidade polínica e consequentemente na formação de frutos. Informações sobre a viabilidade polínica são de grande importância para caracterizar e conservar germoplasma, bem como melhorias genéticas (Pozzobon et al., 2015).

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi caracterizar o comportamento meiótico, estimar a viabilidade polínica e determinar o conteúdo de reserva dos grãos de pólen em *Bertholletia excelsa* nativa da Amazônia mato-grossense.

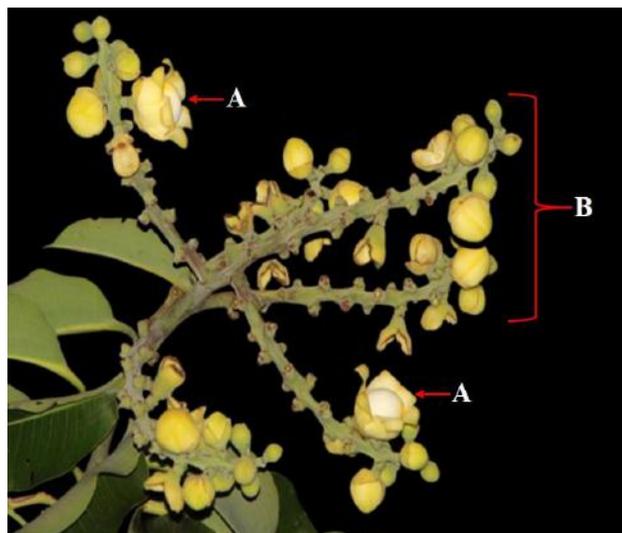
## 2. Metodologia

Foram coletados dois mix de botões florais e flores de oito indivíduos nativos de *B. excelsa*, em uma população na propriedade denominada Sítio São João, próxima ao perímetro urbano do município de Alta Floresta-MT, sob as coordenadas geográficas 09° 02' 29" a 11° 15' 45" de latitude sul e 54° 44' 55" a 58° 45' 10" de Longitude Oeste.

### 2.1 Comportamento Meiótico

Para análise do comportamento meiótico, botões florais de *B. excelsa* foram coletados em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 1). O material coletado foi fixado em etanol-ácido acético na proporção de 3:1, por 24 horas. Em seguida foram transferidos para álcool 70% e mantidos sob refrigeração até serem utilizados. As análises foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), campus de Alta Floresta, Mato Grosso.

**Figura 1.** Inflorescência de *Bertholletia excelsa* com flores abertas (A) e botões em pré-antese (B).



Fonte: Roelis (2018).

Para a preparação das lâminas, anteras foram maceradas em carmim acético a 1% e observadas ao microscópio óptico na objetiva de 40x. Diferentes fases da meiose e irregularidades foram analisadas e registradas. O índice meiótico (IM) foi estimado com a contagem de 300 células/lâminas, em 6 lâminas, perfazendo um total de 1.500 produtos pós-meióticos. Anteras foram maceradas e coradas com carmim acético a 1% para a visualização e contagem dos produtos pós-meióticos. As

tétrades foram consideradas como produto pós-meiótico normal, e mônades, díades, tríades e políades foram consideradas anormais. Com base nestes dados, o índice meiótico foi calculado de acordo com Love (1951) pela equação (1):

$$\text{Equação 1: IM} = \frac{\text{Número de tétres normais}}{\text{Número total de tétres}} \times 100$$

## 2.2 Viabilidade Polínica

A viabilidade polínica de *B. excelsa* foi avaliada utilizando o método colorimétrico e a germinação do tubo polínico *in vitro*. Para estimar a viabilidade do pólen pelo método do corante, anteras foram maceradas e coradas com carmim acético 1% e reativo de Alexander, cada corante foi utilizado para avaliação de duas fases de desenvolvimento floral: antese (flores abertas coletadas das 6 horas às 7 horas do mesmo dia da antese) e pré-antese (botões coletados 12 horas antes da abertura floral).

Cinco lâminas foram preparadas por corante para cada fase de desenvolvimento floral, contabilizando 300 grãos de pólen/lâmina, totalizando 1.500 pólenes por corante/fase floral. A viabilidade polínica foi estimada por meio do percentual de grãos de pólen viáveis obtidos pela equação (2):

$$\text{Equação 2: Viabilidade do pólen (\%)} = \frac{\text{Número grãos corados}}{\text{Número grãos contados}}$$

Para verificar a normalidade dos dados da viabilidade polínica foi utilizado o teste de Lilliefors e para o ajustamento das médias de viabilidade polínica foi utilizado a transformação linear  $\ln(x)$  com o auxílio do programa BioEstat versão 5.3 (Ayres et al., 2007). Em seguida foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias significativas foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as fases de desenvolvimento floral entre os corantes e para a germinação do tubo polínico. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2016).

Para a análise da germinação do tubo polínico *in vitro* utilizou-se meio de cultura gelatinoso com sacarose a 0%, 10%, 20%, 30% e 40%, acrescido de 4 g/L de ágar, sendo cinco tratamentos com e cinco tratamentos sem adição de 0,06g/L de Nitrato de Cálcio -  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  e 0,02g/L de Ácido Bórico -  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , totalizando 10 tratamentos. Com o auxílio de um pincel, os grãos de pólen foram espalhados sobre a superfície das placas de Petri contendo o meio de cultura, de acordo com os tratamentos. As culturas foram mantidas a 25°C em uma câmara do tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*).

Os meios de cultura foram avaliados de duas em duas horas com o intuito de verificar o crescimento do tubo polínico dos pólenes. Após seis horas de incubação foi avaliada a porcentagem de germinação dos pólenes, contando-se 250 grãos de pólen/lâmina/tratamento sob microscópio ótico com objetiva de 10x, considerando-se germinados aqueles com tubo polínico maior que o diâmetro do pólen.

## 2.3 Citoquímica

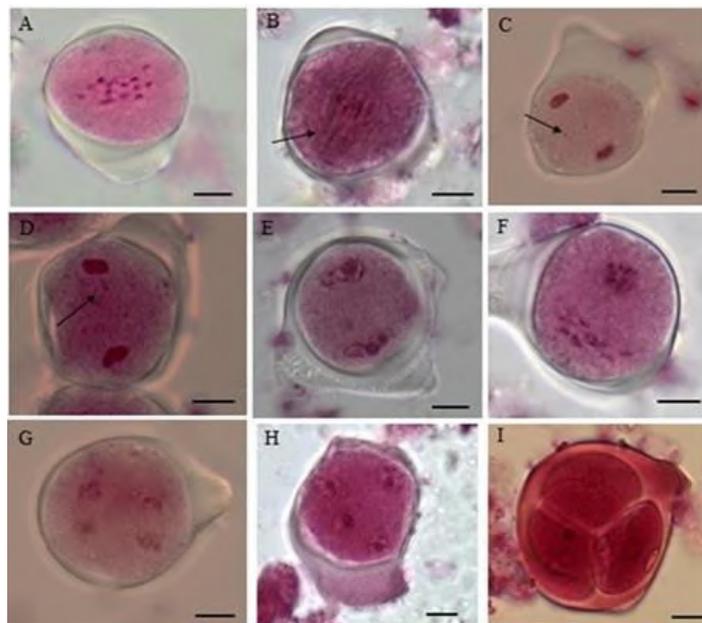
A fim de constatar a presença de substâncias de reserva nos grãos de pólen, técnicas citoquímicas foram utilizadas de acordo com o protocolo de Baker & Baker (1979). Anteras de botões em pré-antese foram maceradas para a confecção das lâminas com os corantes lugol para verificar a presença de amido, onde foram considerados grãos de pólen amido positivo, aqueles que apresentaram coloração marrom e grãos de pólen amido negativos, aqueles que não apresentaram coloração no citoplasma (Baker & Baker, 1979) e o sudan IV para a presença de lipídios, onde foram considerados lipídio positivo os grãos de pólen corados em vermelho e lipídio negativos os que não apresentaram coloração (Dafni, 1992). Foram preparadas cinco lâminas por corante, contabilizando 300 grãos de pólen/lâmina, totalizando 1.500 pólenes por corante.

### 3. Resultados e Discussão

Na análise meiótica verificou-se que a espécie é diploide com  $n=x=13$  pares de cromossomos nas células em diacinese (Figura 2-A), confirmando o que a literatura registra para a espécie (Sodré & Karsburg, 2009). A meiose da espécie foi considerada regular. Entretanto, algumas fases da meiose I e II foram consideradas irregulares ocorrendo em anáfase I cromossomos retardatários (Figura 2-C e D) e em anáfase II, segregação irregular dos cromossomos (Figura 2-F) e não sincronia celular no final da anáfase II (Figura 2-H). De acordo com Pagliarini (2000), as anormalidades meióticas mais comuns observadas em diversas espécies estão relacionadas com falhas na segregação dos cromossomos, caracterizada pela migração precoce ou por cromossomos retardatários em metáfase I e em anáfase I, além do desalinhamento em metáfase.

O desalinhamento em metáfase é definido como cromossomos alinhados incorretamente fora da placa equatorial na metáfase (Rao et al., 2008). Por sua vez, os cromossomos retardatários são caracterizados por retardar a migração de cromossomos inteiros devido à rápida polimerização, ou seja, o alongamento dos microtúbulos, podendo dessincronizar a anáfase (Bajer & Vantard, 1988). Segundo Risso-Pascotto et al. (2003), os cromossomos retardatários são associados à presença de micronúcleo nos produtos pós-meiótico. Entretanto, neste estudo não foi constatada a presença de micronúcleo podendo ter ocorrido a ação do mecanismo check-point que impede a segregação dos cromossomos na meiose I até o término da recombinação (Weinert, 1998). As demais fases foram consideradas normais, já que nenhuma outra irregularidade foi observada durante a divisão celular (Figura 2).

**Figura 2.** Meiose em *B. excelsa*. A- Diacinese apresentando 13 pares bivalentes. B- Metáfase I evidenciando as fibras do fuso (seta). C- Anáfase I com dois pares de cromossomo retardatário (seta). D- Anáfase I com um par de cromossomo retardatário (seta). E- Prófase II. F- Segregação irregular dos cromossomos. G- Anáfase II. H- Anáfase II demonstrado falta de sincronia na célula. I- Tétrade. Barra 20  $\mu$ m. Aumento de 400x.



Fonte: Roelis (2018).

O índice meiótico para a espécie foi de 92,4% indicando baixo nível de irregularidades meióticas. Zortéa et al. (2022), ao estudarem o índice meiótico de *Vochysia divergens* também relataram valores superiores a 90%. Segundo Love (1951), plantas com índices acima de 90% são consideradas citogeneticamente estáveis. Levando em consideração que a gametogênese é regulada por muitos genes, a meiose é uma grande fonte de variabilidade genética garantindo a perpetuação das espécies

(Pagliarini, 2000).

O trabalho evidenciou que as anormalidades mais frequentes na espécie foram mônades, sendo contabilizadas no total 96, seguidas das díades com 14 e tríades com 4. O produto pós-meiótico tétrade normal foi o mais encontrado, 1.386 no total. A normalidade da meiose gera gametas viáveis, sendo esperada uma alta porcentagem de grãos de pólen viáveis como resultados de um alto percentual de tétrades normais, as quais refletem um processo meiótico regular (Helena et al., 2005). Foi possível evidenciar que a população de *B. excelsa* analisada se encontra em processo meiótico regular e, portanto, apresenta potencial para produtividade de frutos.

Houve diferença estatística entre as médias de viabilidade na antese. Enquanto na fase de pré-antese não foi observada diferença estatística entre os corantes utilizados (Tabela 1). O reativo de Alexander apresentou maior percentual de viabilidade (93,40%) quando comparado ao percentual da antese do carmim acético (82,27%). Resultados semelhantes utilizando esse teste colorimétrico, foram descritos por Roveda et al. (2021), que ao estudarem a espécie arbórea *Erythrina poeppigiana* obtiveram viabilidade polínica acima de 90%. Conforme Neto et al., (2006) a viabilidade do pólen de uma espécie pode variar dentro de um mesmo indivíduo, assim a maior porcentagem de pólenes viáveis encontrados na pré-antese neste estudo pode ter decorrido de variações ao acaso.

**Tabela 1.** Valores médios percentuais de viabilidade polínica de *B. excelsa*, dentro das fases de desenvolvimento floral, com os corantes Carmim Acético 1% e Reativo de Alexander.

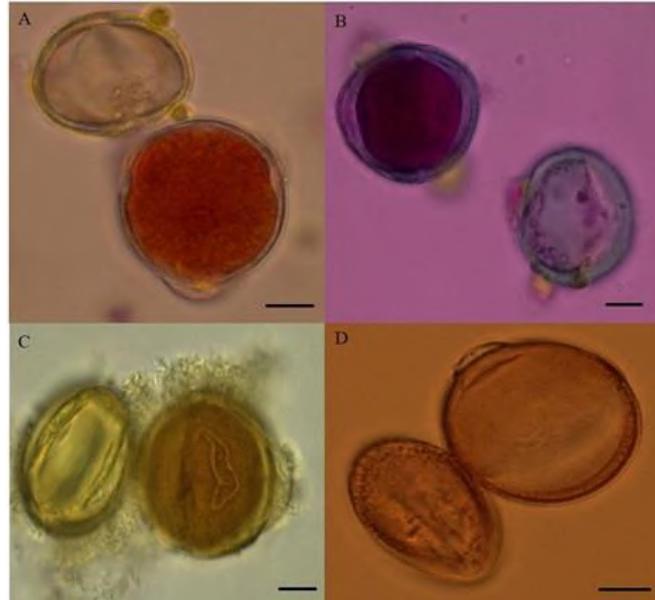
Corantes	Antese	Pré-antese
Carmim acético 1%	82,27 b	97,20 a
Reativo de Alexander	93,40 a	91,80 a

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Fonte: Roelis (2018).

Tanto o corante carmim acético, quanto o reativo de Alexander distinguiram os pólenes viáveis de inviáveis (Figura 3 A e B) e revelaram uma alta viabilidade polínica para *B. excelsa*, independente das fases de desenvolvimento floral, sendo a média geral acima de 80%. Resultado semelhante foi encontrado por Santos et al., (2015), com viabilidade superior a 85% utilizando diferentes testes colorimétricos para a mesma espécie. Levando em consideração que o modo como o genótipo se manifesta no indivíduo é o resultado da contribuição dos gametas masculino e feminino, quanto maior a viabilidade polínica, maior a combinação de diferentes alelos e conseqüentemente, de variabilidade genética (Souza et al., 2002).

Neste estudo ficou evidenciado que tanto na fase de pré-antese quanto de antese, os pólenes de *B. excelsa* apresentam alta taxa de viabilidade, contudo recomenda-se utilizar pólen somente na antese, pois devido à grande aderência do pólen na pré-antese o processo de polinização torna-se praticamente inviável. Assim, como constatado por Santos et al., (2015), qualquer um dos corantes utilizados é recomendado para testes rotineiros com *B. excelsa*, destacando o reativo de Alexander que constatou maior viabilidade na antese, fazendo maior distinção visual entre os grãos de pólen viáveis e inviáveis (Figura 3). Conhecer o período de antese de uma espécie é muito importante em estudos sobre os grãos de pólen, pois pode-se através desse tipo de trabalho indicar o melhor momento de coleta do pólen (Costa et al., 2009).

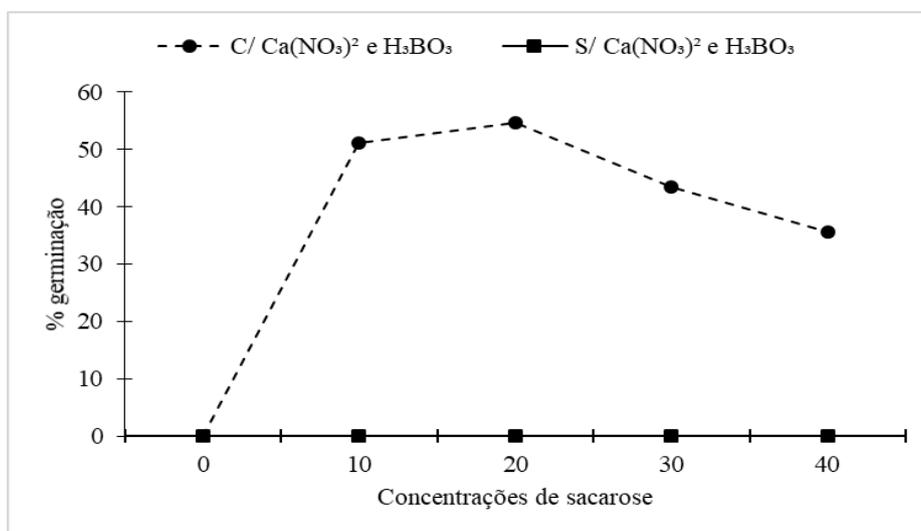
**Figura 3.** Análise citoquímica e viabilidade polínica em *B. excelsa*. A- Carmim Acético 1% Grão de pólen viável (escuro=vermelho) e inviáveis não corado. B- Alexander, Grão de pólen viável (escuros= púrpura) e inviável (claro = verde). C- Lugol, grão de pólen viável (amido positivo) corado e inviável não corado. D- Sudan IV (lipídio positivo) grão de pólen viável (forma arredondada) e inviável (forma oval) com tamanho reduzido. Barra 20 µm.



Fonte: Roelis (2018).

Nos testes de germinação *in vitro* observou-se que o tratamento 20% de concentração de sacarose e adição de nitrato de cálcio e ácido bórico foi o que apresentou maior taxa de germinação com 54,4%, seguido pelo tratamento 10% com 51,1%, já nos tratamentos sem adição de nitrato de cálcio e ácido bórico, não ocorreu germinação (Figura 4). Scorza e Sherman (1995) consideraram que um bom pólen deve apresentar de 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos. A emissão de tubos polínicos ocorreu após duas horas de inoculação do pólen no meio de cultura.

**Figura 4.** Percentual de grãos de pólen de *B. excelsa* germinados com e sem a adição de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{H}_3\text{BO}_3$ , em diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40%) e 4g/l de ágar.



Fonte: Paiva (2018).

Este trabalho seguiu o mesmo protocolo de Santos et al., (2013) e obteve resultados diferentes com os tratamentos que levaram a adição de nitrato de cálcio e ácido bórico que foram: 77,8% com 10%; 52,5% com 20%; 76% com 30% e 19,8% com 40%. É possível observar que a maior taxa de germinação encontrada em Santos et al., (2013) foi a partir dos 10% de solução de sacarose com nitrato de cálcio e ácido bórico, enquanto neste trabalho obteve-se a maior germinação aos 20% de sacarose, e mesmo assim as taxas de germinação dos outros meios de diferentes concentrações de sacarose foram menores em comparação ao trabalho citado. Santos et al., (2013) obteve germinação com os meios contendo somente sacarose, contudo eles citam que a maioria resultou em no máximo 21,45% de pólen germinado.

Vários compostos orgânicos e inorgânicos interferem na germinação *in vitro*, dos quais ágar, sacarose, cálcio e boro são os mais importantes, para muitas espécies incluindo *B. excelsa*, boro e cálcio são necessários para o crescimento do tubo polínico, o boro quando adicionado na forma de ácido bórico é essencial para cultura *in vitro* de pólen para a maioria das espécies (Acar et al., 2010; Chagas et al., 2010).

Na análise citoquímica o corante lugol corou 92% dos grãos de pólen, indicando a presença de amido em sua constituição. Já o sudan IV evidenciou que 98,53% dos pólenes apresentaram lipídio como substância de reserva (Figura 3C e D). Apesar do percentual médio de pólenes de ambos os corantes não apresentar diferença estatística significativa, observa-se uma maior porcentagem de lipídios na composição celular dos pólenes de *B. excelsa*.

Constatou-se que *B. excelsa* possui amido e lipídio como substâncias de reserva. A presença de amido nos grãos de pólen faz parte do processo evolutivo das plantas, evitando que se tornem alimento de insetos não polinizadores. Já a presença de lipídios auxilia em uma melhor aderência dos grãos no estigma e nas anteras, além de proteger da desidratação e radiação solar (Baker & Baker, 1979; Pacini & Hesse, 2005). Nesse sentido, a flor da *B. excelsa* é bem adaptada para evitar insetos que não sejam polinizadores e seus grãos de pólen têm maior resistência à desidratação, fator este muito importante para uma espécie típica de clima tropical.

#### 4. Conclusões

A meiose da espécie apresentou comportamento normal com índice meiótico de 92,4%, demonstrando que a espécie possui alta estabilidade meiótica.

Os corantes, carmim acético e reativo de Alexander, independente da fase de desenvolvimento floral (antese ou pré-antese) demonstraram alta viabilidade polínica para *B. excelsa*, sendo corroborados pela alta viabilidade no crescimento do tubo polínico *in vitro*.

A análise citoquímica evidenciou que os pólenes apresentaram reação positiva para amido e lipídio, com porcentagem maior para grãos lipídio positivos. A caracterização meiótica e a alta viabilidade polínica revelam potencialidade para a fertilidade, tornando possível a sua utilização na obtenção de novos materiais para programas de melhoramento.

#### Referências

- Acar, I., Ak, B. E., & Sarpkaya, K. (2010). Effects of boron and gibberellic acid on *in vitro* pollen germination of pistachio (*Pistacia vera* L.). *African Journal of Biotechnology*, 9(32), 5126-5130.
- Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D. L., & Santos, A. D. A. (2007). Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. *Instituto Mamirauá*, 364.
- Bajer, A. S., & Vantard, M. (1988). Microtubule dynamics determine chromosome lagging and transport of acentric fragments. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 201(2), 271-281.
- Baker, H. G., & Baker, I. (1979). Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *American Journal of Botany*, 66(5), 591-600.
- Bettiol Neto, J. E., Del Nero, M., Kavati, R., & Pinto-Maglio, C. A. F. (2009). Viabilidade e conservação de pólen de três anonas comerciais. *Bragantia*, 68, 825-837.

- Biondo, E., & Battistin, A. (2001). Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae-Faboideae), nativas na região sul do Brasil. *Títulos não-correntes*, 15(1).
- Catenacci, F. S.; Ribeiro, M.; Smith, N. P.; Cabello, N. B. *Bertholletia* in *Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB23424>>. Acesso em: 30 mai. 2022.
- Chagas, E. A., Pio, R., Chagas, P. C., Pasqual, M., & Bettiol Neto, J. E. (2010). Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. *Ciência Rural*, 40, 231-236.
- Corrêa, D. J. P., Pereira, T. N. S., Neto, M. F., & Pereira, M. G. (2010). Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. *Caryologia*, 63(3), 229-236.
- Costa, R. S., Mõro, F. V., & Oliveira, J. C. D. (2009). Influência do momento de coleta sobre a viabilidade de grão de pólen em maracacujá-doce (*Passiflora alata* Curtis). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31, 956-961.
- Cruz, C. D. (2016). Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 38, 547-552.
- Dafni, A. (1992). Pollination ecology. *A practical approach*.
- Davide, L. C., Techio, V. H., Nunes, J. D., & Pereira, A. V. (2007). Variação cromossômica numérica em *Pennisetum*. *Ciência e Agrotecnologia*, 31, 398-405.
- Helena, T. V., Davide, L. C., & Pereira, A. V. (2005). Genomic analysis in *Pennisetum purpureum* x *P. glaucum* hybrids. *Caryologia*, 58(1), 28-33.
- Horner, H. T., & Palmer, R. G. (1995). Mechanisms of genic male sterility. *Crop science*, 35(6), 1527-1535.
- Love, R. M. (1951). Varietal Differences in Meiotic Chromosome Behavior of Brazilian Wheats 1. *Agronomy Journal*, 43(2), 72-76.
- Morellato, L. P. C. (1995). As estações do ano na floresta. *Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra*. Campinas: UNICAMP, 187-192.
- Müller, C. H., Rodrigues, I. A., Müller, A. A., & Müller, N. R. M. (1980). Castanha-do-brasil: resultados de pesquisa. *Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores (INFOTECA-E)*.
- Neto, O. D. S., Karsburg, I. V., & Yoshitome, M. Y. (2006). Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). *Revista de Ciências Agro-Ambientais*, Alta Floresta, 4(1), 67-74.
- Orwa, C. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide, version 4.0. <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedb/treedatabases.asp>.
- Pacini, E., & Hesse, M. (2005). Pollenkitt—its composition, forms and functions. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200(5), 399-415.
- Pagliarini, M. S. (2000). Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. *Genetics and Molecular biology*, 23(4), 997-1002.
- Pagliarini, M. S., & Pozzobon, M. T. (2004). Meiose vegetal: um enfoque para a caracterização de germoplasma. *Anais do II curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. EMBRAPA, Brasília*, 24-41.
- Pozzobon, M. T., de Bem Bianchetti, L., dos Santos, S., de Carvalho, S. I. C., Reifschneider, F. J. B., & da Costa Ribeiro, C. S. (2015). Comportamento meiótico em acessos de *Capsicum chinense* Jacq. do Banco de Germoplasma da Embrapa, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 13(2).
- Rao, X., Zhang, Y., Yi, Q., Hou, H., Xu, B., Chu, L., & Shi, Q. (2008). Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: direct evidence from long-term live cell imaging. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 646(1-2), 41-49.
- Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M. S., & Valle, C. B. D. (2003). A mutation in the spindle checkpoint arresting meiosis II in *Brachiaria ruziziensis*. *Genome*, 46(4), 724-728.
- Roveda, A. P., Fernandes, J. M., Tiago, A. V., Cavallari, A. A., dos Santos Cardoso, E., Zortéa, K. É. M., & Rossi, A. A. B. (2021). MORFOLOGIA, ÍNDICE MEIÓTICO, VIABILIDADE POLÍNICA E CITOQUÍMICA DE *Erythrina poeppigiana* (Walp.) OF Cook. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 12(6), 603-614.
- Santos, A. C., Maues, M., & Corrêa, F. D. S. (2013). Viabilidade e germinação do pólen de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl. Lecythidaceae) cultivada em Tomé-Açu/PA. In *Embrapa Amazônia Oriental-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 64.; ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS MG, BA E ES, 23., 2013, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: SBB, 2013.
- Santos, T., Tiago, P., Schmitt, K. F., Martins, K., & Rossi, A. A. (2015). Viabilidade polínica em *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Lecythidaceae) baseada em diferentes testes colorimétricos. *Enciclopédia Biosfera*, 11(22).
- Scorza, R. & Sherman, W. B. P. (1995). In: Janik J.; Moore, J. N. (Ed.). John & Sons, *Fruit breeding*. 325-440.
- Sodré, E., & Karsburg, I. V. (2009). Caracterização morfológica dos cromossomos de *Bertholletia excelsa* HBK.
- Souza, M. D., Pereira, T. N. S., & Martins, E. R. (2002). 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*, 26(6), 1209-1217.
- Weinert, T. (1998). DNA damage checkpoints update: getting molecular. *Current opinion in genetics & development*, 8(2), 185-193.
- Zortéa, K. É. M., Rossi, A. A. B., Cordeiro, A. G. M., Sander, N. L., dos Santos Cardoso, E., & da Silva, C. J. (2022). Pollen morphology, meiotic index and pollen viability in individuals of *Vochysia divergens* Pohl. native to the Amazon and the Pantanal. *Research, Society and Development*, 11(4), 1-17.