

Morfologia, viabilidade polínica e índice meiótico de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth**Morphology, pollen viability and meiotic index of *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth**

DOI:10.34117/bjdv6n6-328

Recebimento dos originais:08/05/2020

Aceitação para publicação:15/06/2020

Jonis Franklin Leite dos Santos

Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas
Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta, MT, Brasil
jonisfranklin@hotmail.com

Ana Aparecida Bandini Rossi

Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas
Universidade do Estado do Mato Grosso – UNEMAT, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias
Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular, Campus de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. PGMP. PPGBioAgro. PPGBionorte/MT
anabanrossi@unemat.br

Guilherme Ferreira Pena

Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas
Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta, MT, Brasil
penabio2@gmail.com

Auana Vicente Tiago

Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia
Bolsista PNPd no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, PPGBioAgro
Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta, MT, Brasil
auana_bio@hotmail.com

Kelli Évelin Muller Zortéa

Doutoranda na Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazonia Legal, PPG-BIONORTE
Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta, MT, Brasil
kellimuller@hotmail.com

Elisa dos Santos Cardoso

Doutoranda na Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazonia Legal, PPG-BIONORTE
Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta, MT, Brasil
elisabyo@gmail.com

Eliane Cristina Moreno de Pedri

Doutoranda na Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazonia Legal, PPG-BIONORTE
Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta, MT, Brasil
elicmbio@gmail.com

Ísis Caroline B. dos Santos

Graduanda em Ciências Exatas
Universidade Estadual de Mato Grosso, Campus de Sinop, Mato Grosso, Brasil
isiscarolinesnp@gmail.com

Denise Borkenhagen dos Santos

Especialista em Psicopedagogia
Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Cuiabá, MT, Brasil
borkenhagensantos@hotmail.com

Ingridys Regina B. dos Santos

Graduanda em Ciências Humanas
Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop, Mato Grosso, Brasil
ingridysregina@outlook.com

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento meiótico, estimar a viabilidade e descrever a morfologia polínica de *B. crassifolia*, visando obter informações que possibilitam a seleção genética de novos cultivos e práticas otimizadas de produção. Foram coletados botões florais com diferentes tamanhos e estágios de desenvolvimento de 20 indivíduos de *B. crassifolia* nas bordas das árvores, dentro do perímetro urbano do município de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. A descrição da morfologia do pólen foi realizada a partir da acetólise com comparação na literatura especializada. A análise da meiose e pós-meióticos foi realizada com uso do corante carmim acético 2% e orceína. *B. crassifolia* é uma espécie com poucas irregularidades meióticas, com pólen considerados grandes, 3-colporados e com exina reticulada. A viabilidade polínica foi estimada com os corantes Sudan IV, Reativo de Alexander, Lugol 1% e Carmim Acético 1%. O corante que revelou o maior percentual médio de viabilidade polínica para a espécie foi o sudan IV (98,8%). Os testes com corantes apresentam diferença significativa e revelam que a espécie apresenta alta viabilidade polínica e alta regularidade meiótica. As informações colhidas de *Byrsonima crassifolia* auxiliam no entendimento dos aspectos reprodutivos e podem ser utilizadas na implantação de cultivos comerciais, bem como programas de melhoramento e conservação da espécie.

Palavras-chave: Murici. testes colorimétricos. Melhoramento. Conservação.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate meiotic behavior, estimate viability and describe the pollen morphology of *B. crassifolia*, aiming to obtain information that allows the genetic selection of new crops and optimized production practices. Flower buds with different sizes and developmental stages were collected from 20 individuals of *B. crassifolia* on the edges of the trees, within the urban perimeter of the municipality of Alta Floresta, Mato Grosso, Brazil. The description of pollen morphology was carried out from acetolysis with comparison in the specialized literature. The analysis of meiosis and post-meiotics was performed using the 2%

acetic carmine dye and orcein. *B. crassifolia* is a species with few meiotic irregularities, with pollens considered large, 3-collporate and with reticulate exine. Pollen viability was estimated with Sudan IV, Alexander Reactive, 1% Lugol and 1% Carmine Acetic dyes. The dye that showed the highest average percentage of pollen viability for the species was sudan IV (98.8%). The tests with dyes show a significant difference and reveal that the species has high pollen viability and high meiotic regularity. The information collected from *Byrsonima crassifolia* helps in the understanding of reproductive aspects and can be used in the implantation of commercial crops, as well as programs of improvement and conservation of the species.

Keywords: Murici. colorimetric tests. Improvement. Conservation.

1 INTRODUÇÃO

Byrsonima crassifolia (L.) Kunth, popularmente conhecida como “muricizeiro”, é uma espécie de ampla distribuição, que ocorre nos Estados de Roraima, Amazonas, Tocantins, Bahia, Sergipe, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Mamede e Francener, 2015). Há registros de sua ocorrência também na Bolívia, Venezuela e República Cooperativa da Guiana (Benezar e Pessoni, 2006). Seu fruto é utilizado na fabricação de doces, sucos, sorvetes e licores. Sua madeira é própria para a construção civil, pois possui uma coloração amarela ou avermelhada, com tons acetinados e brilhantes, muito usados em marcenaria (Lorenzi e Matos, 2002; Vieira et al., 2006; Anderson, 1981). Na medicina popular, é utilizado como antitérmico, no controle a diarreia, infecção intestinal, afecção da boca e garganta (gingivite, amigdalite e faringite) e hemorróida (Vieira et al., 2006).

O muricizeiro floresce e frutifica praticamente durante o ano todo, isso faz com que o mesmo seja considerado uma árvore ornamental, adaptado a solos com presença de alumínio e ao clima do cerrado (Vieira et al., 2006). Sua floração é geralmente prolongada, característica comum às frutíferas tropicais, estando geralmente associada a estratégias reprodutivas para assegurar a polinização em ambientes com poucos agentes polinizadores (Gomes, 2007). Suas flores são produtoras de óleo, as quais são visitadas e polinizadas por abelhas coletoras de óleo das famílias Melittidae e Apidae (Frankie et al., 1976; Vinson et al., 1977).

Estudos palinológicos são realizados com o objetivo de caracterizar polens e identificar a qual espécie pertence contribuindo com a botânica, paleontologia, melissopalínologia entre outras áreas (Walker e Doyle, 1975; Martins et al., 2010; Guimarães et al., 2013; Ferreira e Absy, 2013; Hamid et al., 2015). Para análise da morfologia polínica é necessário a extração do conteúdo celular para melhor visualização da sexina e aberturas do pólen. Para isso, o

método utilizado é o de acetólise proposto por Erdtman (1952), que consiste na utilização de anidrido acético e ácido sulfúrico.

Durante a microsporogênese e a microgametogênese (Horner e Palmer, 1995) a célula-mãe do grão de pólen ou microsporócito passa por meiose, e após a citocinese originam quatro micrósporos ou grãos de pólen (Rodrigues et al., 2004). Os produtos seguintes, que são as células dos produtos pós-meióticos, podem permanecer unidos ou não: o grão de pólen isolado trata-se de uma mônade e, quando unidos, díades, tétrades ou políades (Hesse et al., 2009, citado por Martins et al., 2010). Anormalidades nestas fases podem dar origem a polens inviáveis, o que priva as espécies de sucesso na reprodução.

A viabilidade do grão de pólen, assim como a receptividade do estigma, são fatores importantes para o sucesso reprodutivo de uma espécie. Havendo também influência no tamanho dos frutos, no número de sementes e na percentagem de frutos, que aumentam de acordo com a quantidade de grãos de pólen viáveis depositada sobre o estigma (Stone et al., 1995; Rigamoto e Tyagi, 2002; Coelho e Barbosa, 2004).

Para avaliar a viabilidade dos pólenes há técnicas como germinação de tubo polínico *in vitro*, *in vivo* e testes colorimétricos. Os testes *in vitro* são realizados com preparo de meio de cultura; *in vivo* são feitos com a avaliação da fecundação dos pólenes depositados manualmente nas flores; e os testes colorimétricos são indicados para análise da constituição e integridade celular utilizando corantes (Einhardt et al., 2006).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar o índice meiótico, estimar a viabilidade polínica por testes colorimétricos e caracterizar morfológicamente os grãos de pólen de *B. crassifolia*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE COLETA

As coletas de botões florais foram realizadas em 20 genótipos de *B. crassifolia* no perímetro urbano do município de Alta Floresta, no norte do estado de Mato Grosso, Brasil, (Figura 1), durante o período de floração, que acontece entre julho a outubro na região de estudo, no ano de 2017.

O município de Alta Floresta tem área territorial de 8.976.309 km² e fica a 830 km de Cuiabá (IBGE, 2018). A vegetação local é caracterizada como floresta ombrófila aberta e densa e, floresta estacional semidecidual e decidual (Lira, 2011). A temperatura anual da

região varia de 19,6°C a 32,4°C. O clima é tropical chuvoso, tendo bem definidos o período de estiagem e de pluviosidade (Tarifa, 2011).

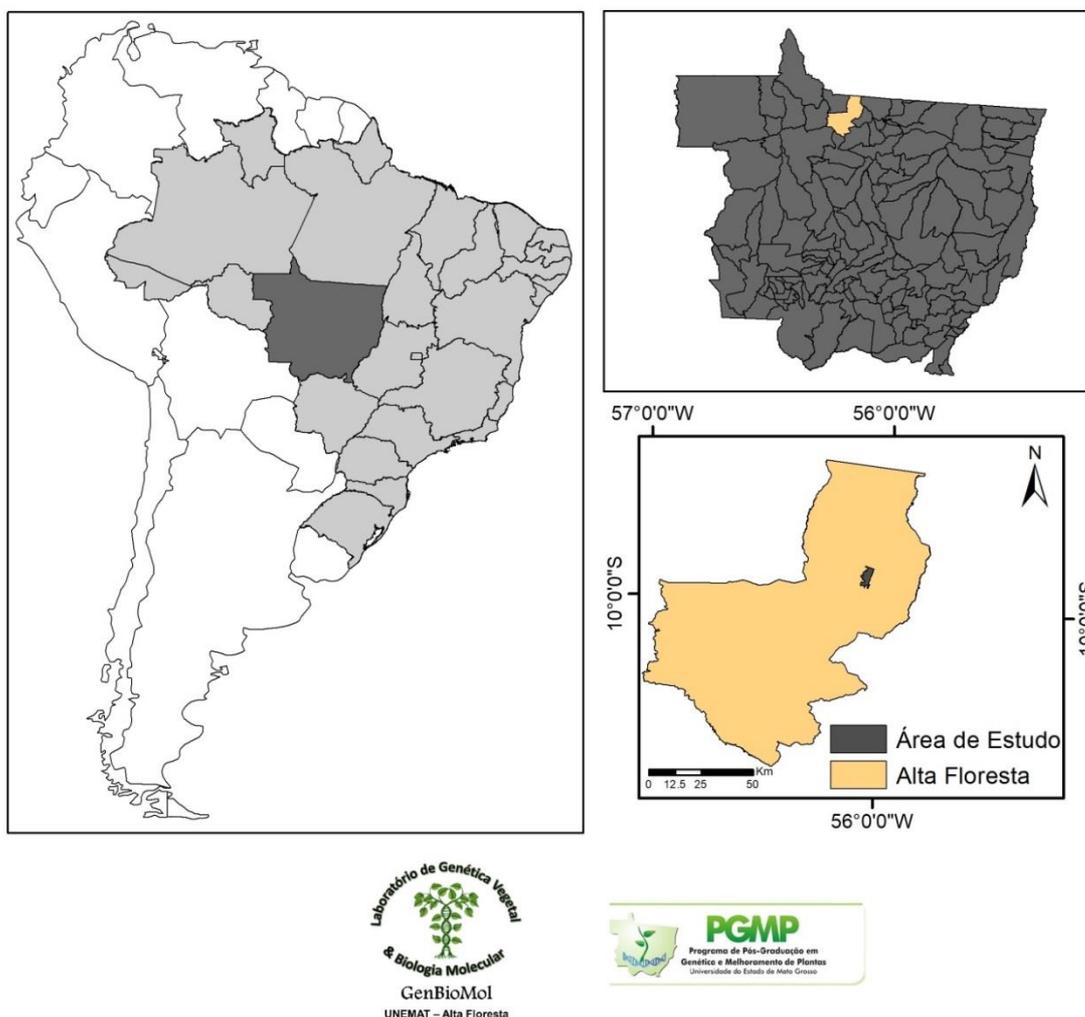


Figura 1. Localização geográfica do município de Alta Floresta- MT, onde foram realizadas as coletas em genótipos de *Byrsonima crassifolia*.

2.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Foram coletados em bulk 15 botões florais de cada um dos 20 genótipos de *B. crassifolia*, com diferentes tamanhos e estádios de desenvolvimento (Figura 2). Os botões foram fixados em solução Carnoy (etanol: ácido acético, na proporção de 3:1) por um período de 24 horas. Em seguida, foram transferidos para álcool etílico 70% e conservados sob refrigeração (4° C) até a utilização para avaliação da morfologia, produtos pós-meiose e viabilidade polínica.



Figura 2. Botões e flores de *Byrsonima crassifolia*. A – Racimos com botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento; B – Botões florais; C – Anteras e D - Flores hermafroditas de *B. crassifolia*. Fonte: o autor.

2.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO PÓLEN

Para análise da morfologia polínica foi utilizado o método de acetólise proposto por Erdtman (1952). As anteras de botões em pré-antese fixados em carnoy, foram colocadas em microtubos de 1,5 mL, contendo 1 mL de ácido acético por 20 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados a 3.000 rotações por minutos, durante 5 minutos.

O ácido acético foi descartado juntamente com as anteras, ficando no microtubo somente os pólenes que formaram um *pellet*. Posteriormente foi acrescentado no microtubo, sobre o *pellet*, 1 mL da solução acetólica na proporção 9:1 (anidrido acético: ácido sulfúrico), que promove a hidrólise ácida nos grãos de pólen para facilitar a visualização e reconhecimento da morfologia do pólen, removendo o conteúdo celular.

Em seguida os microtubos permaneceram em banho-maria por 2 minutos, a 100 ± 2 °C. O material foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto, durante 5 minutos. Posteriormente a mistura acetólica foi descartada, sendo acrescentado ao microtubo 1 mL de água destilada mais 2 gotas de álcool etílico. O material foi então novamente centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Depois foi acrescentado 1 mL de água destilada e glicerina na proporção de 3:1 por duas horas e então as lâminas foram preparadas. As lâminas foram montadas com gelatina glicerinada, conforme proposto por (Kisser, 1935 citado por Erdtman, 1952).

As mensurações foram realizadas em fotos dos pólen, tiradas no mesmo dia da preparação das lâminas, com o intuito de evitar possíveis problemas de intumescimento e alterações no tamanho dos pólen que podem ocorrer com o passar do tempo (Faegri e Deuse, 1960; Melhem e Matos, 1972; Salgado-Labouriau, 1973).

Foram mensurados o diâmetro polar e equatorial, em vista equatorial (grão de pólen perpendicular à vista polar), o diâmetro equatorial em vista polar (grão de pólen com a área polar voltada para o observador) dos grãos de pólen, e da espessura das camadas da exina (sexina e nexina). Foram realizadas 25 medições de cada característica de no mínimo, cinco pólen por lâmina, em um total de 25 grãos de pólen em vista equatorial e 25 grãos de pólen em vista polar.

Em relação ao seu tamanho, os grãos de pólen foram classificados de acordo com Erdtman (1945), baseado no comprimento do eixo maior, nas seguintes classes: muito pequenos ($< 10 \mu\text{m}$), pequenos ($10\text{-}25 \mu\text{m}$), médios ($25\text{-}50 \mu\text{m}$), grandes ($50\text{-}100 \mu\text{m}$), muito grandes ($100\text{-}200 \mu\text{m}$) e gigantes ($> 200 \mu\text{m}$).

Para classificar os grãos de pólen de acordo com sua forma, foi utilizada a relação entre o eixo polar e o eixo equatorial (P/E) em vista equatorial, segundo classificação proposta por Erdtman (1952) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos grãos de pólen com base na relação entre o eixo polar e equatorial (P/E), segundo Erdtman (1952).

Classes de Pólen	
P/E	Denominação
0,50	Peroblato
0,50 – 0,74	Oblato
0,75 – 0,87	Suboblato
0,88 – 0,99	Oblato-esferoidal
1,00	Esférico
1,01 – 1,14	Prolato-esferoidal
1,15 – 1,33	Subprolato
1,34 – 2,00	Prolato
2,00	Perprolato

Subesferoidal

As descrições polínicas e as terminologias adotadas foram baseadas no glossário de Barth (1965) e Punt et al. (2007). Os pólen foram classificados pelo Índice de Área Polar (IAP) proposto por Barth e Melhem, (1988, citado por Martins et al., 2010) (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação dos grãos de pólen em relação ao índice de área polar (IAP):

Denominação	Intervalo do I.A.P.
Sem área polar	0
Área polar muito pequena	<0,25 (abertura muito longa)
Área polar pequena	0,25 – 0,50 (abertura longa)
Área polar grande	0,50 – 0,75 (abertura curta)
Área polar muito grande	>0,75 (abertura muito curta)

As imagens dos grãos de pólen foram capturadas em fotomicroscópio Leica DMLB, com o auxílio do programa Leica IM50 e posteriormente analisados e medidos utilizando-se o programa Anati Quanti 2[®] UFV (Aguiar et al., 2007).

2.4 VIABILIDADE POLÍNICA

Os testes colorimétricos foram realizados com quatro diferentes corantes: o reativo de Alexander, carmim acético, lugol e sudan IV. O carmim acético indica a integridade dos cromossomos; o lugol indica a presença de amido; o corante sudan IV indica a presença de lipídios; a solução de Alexander reage com o protoplasma e a celulose da parede do pólen (Dafni, 1992; Munhoz et al., 2008).

No preparo das lâminas, foram utilizadas duas anteras por botão floral, sendo separadas e levemente maceradas sobre uma lâmina junto a uma gota de cada corante utilizado. As lâminas foram observadas em microscópio binocular modelo Photonics Bio 2 LED da marca BEL em magnitude de 400x. Foram contados 250 pólenes em cada lâmina. Para cada corante foram preparadas 8 lâminas, totalizando 2.000 grãos de pólenes por corante. Para o cálculo da porcentagem de germinação utilizou-se a fórmula:

$$1. \text{ Viabilidade} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de pólenes viáveis}}{\text{N}^\circ \text{ total de pólenes contados}} \times 100$$

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade pelo Programa SISVAR, versão 2016.5.6 (Ferreira, 2011).

2.5 ÍNDICE MEIÓTICO

Para a análise do índice meiótico foram preparadas oito lâminas, sendo contabilizadas 250 células por lâmina, totalizando 2.000 produtos pós-meiótico.

Para o preparo das lâminas, as anteras foram extraídas com auxílio de pinças dos botões florais, sendo em seguida emergidas por vinte minutos em solução de HCl 1N para melhor abertura das anteras, posteriormente, foram esmagadas em 10 μ L deorceína acética 2% (Figura 3), retirando-se o debris e em seguida recobertas com lamínulas e observadas em microscópio óptico na magnitude de 400X.

Para estimar o índice meiótico (IM), foram contabilizado o número de células dos produtos pós-meióticos, sendo que tétrades com quatro células de mesmo tamanho foram consideradas normais e quaisquer desvios como: mônades, díades, tríades e políades foram considerados anormais.

Para estimar o índice meiótico (IM), foi utilizada a expressão proposta por Love (1951):

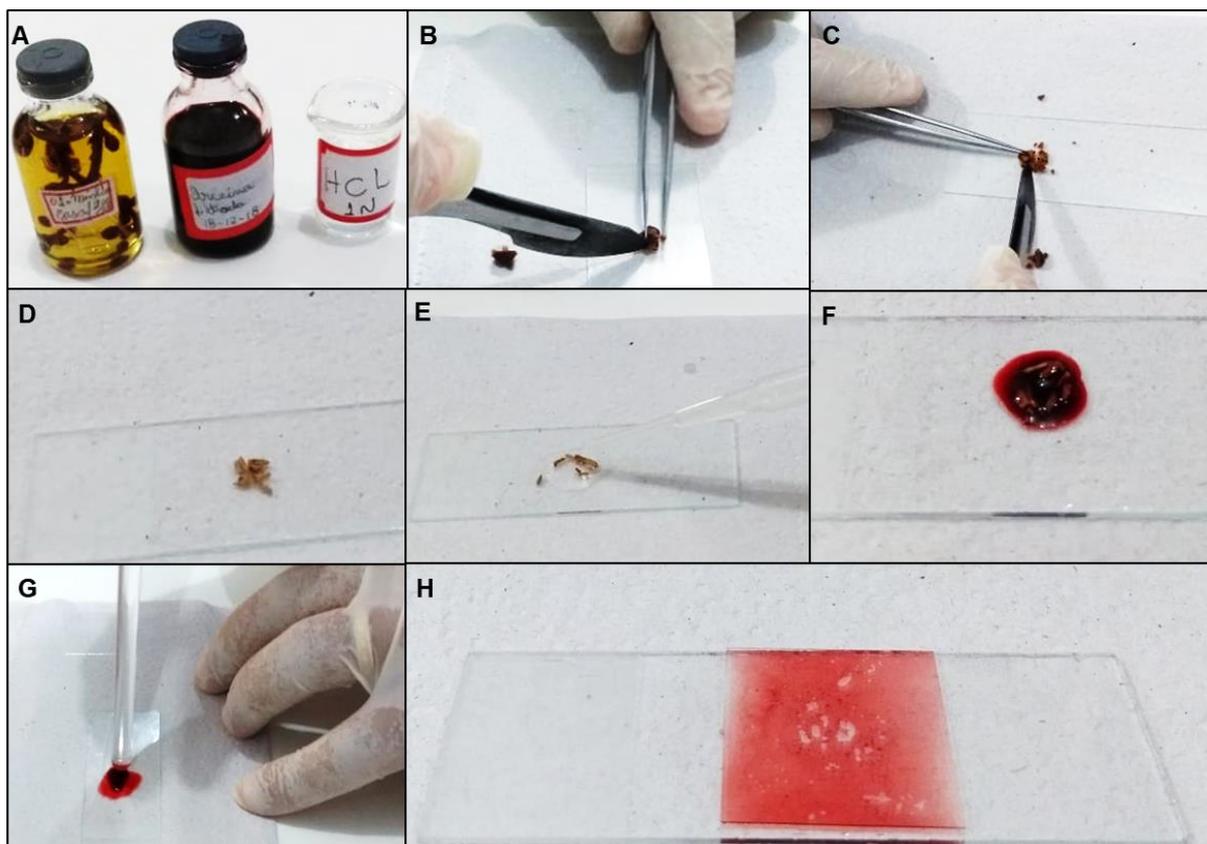
$$IM = \left[\frac{\text{número total de tétrades normais}}{\text{número total de mônade} + \text{díades} + \text{tríades} + \text{tétrades} + \text{políade}} \right] \times 100.$$


Figura 3. Preparo das lâminas. A – Botões, corante e ácido clorídrico (HCL); B – Corte da base do botão floral; C – Remoção das anteras do botão floral; D – Anteras selecionadas; E – Anteras imersas no ácido clorídrico; F – Anteras imersas no corante orceína filtrada; G – Maceração das anteras com bastão de vidro e H – Lâmina pronta para visualização. Fonte: o autor.

2.6 RAZÃO PÓLEN/ÓVULO (P/O)

A estimativa da razão pólen/óvulo (P/O) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Cruden (1977), em que contabilizou-se o total de pólenes presentes em uma antera e multiplicou-se pelo total de anteras do botão floral, em seguida dividiu-se esse valor pelo número de óvulos presentes no botão floral.

As flores foram cortadas longitudinalmente, sob microscópio estereoscópico, para determinação do número de anteras e óvulos. O ovário foi cortado longitudinalmente, e em seguida os óvulos foram contados sob microscópio estereoscópico.

Foi realizada a contagem dos grãos de pólen de 10 botões florais em pré-antese de genótipos de *B. crassifolia*. De cada botão floral separou-se uma antera, colocando-a em tubinho de 1,5 mL, em uma solução contendo: 840 µm de etanol 70%, 80 µm de detergente e 80 µm do corante azul de metileno, ajustando a uma solução de 1000 µm por tubinho de 1,5 mL, totalizando assim 10 tubinhos de soluções. Em seguida preparou-se 5 lâminas para cada tubinho de solução, adicionando em cada lâmina 1µm da solução, sobre o material foi colocado uma lamínula e visualizada em microscópio binocular modelo Photonics Bio 2 LED da marca BEL em objetiva de 40x. Por meio da técnica de varredura, foram contabilizados todos os pólenes presentes na lâmina (Dafni, 1992).

A partir da média da razão P/O foi realizada a inferência sobre o sistema reprodutivo de *B. crassifolia*, com base na classificação proposta por Cruden (1977), descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Sistema reprodutivo com base na razão pólen/óvulo conforme Cruden (1977).

Sistema Reprodutivo	Razão pólen/óvulo
Cleistogamia	2,7 – 5,4
Autogamia obrigatória	18,1 – 39,0
Autogamia facultativa	31,9 – 396,0
Alogamia facultativa	244,7 – 2.588,0
Alogamia obrigatória	2.108,0 – 195.525,0

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO PÓLEN**

Os grãos de pólen de *B. crassifolia* são 3-colporados (Figura 4), apresentando de 75,00 à 95,00 µm de diâmetro equatorial e de 77,50 à 97,50 µm de eixo polar (Tabela 4). Baseando-se no comprimento do eixo maior, os grãos de pólen de *B. crassifolia*, foram considerados de tamanho grande, pois a medida do maior eixo encontra-se entre 50 a 100 µm, conforme classificação proposta por Erdtman (1945).

A exina tem em média 5,70 μm e apresenta a sexina microrreticulada na região polar (Figura 4). Quanto à forma dos pólenes de *B. crassifolia*, os mesmos foram classificados como esférico, seguindo a metodologia proposta por Erdtman (1952), (Tabela 4). Já a sua classificação quanto ao índice de área polar, apresentou-se pólenes de área polar grande, conforme classificação proposta pelo glossário de Barth (1965) e Punt et al. (2007), (Tabela 4).

Tabela 4. Medidas dos pólenes de *Byrsonima crassifolia* coletados no município de Alta Floresta, MT e submetidos ao método de acetólise.

Medida	Min.- Máx.(μm)	$\bar{x}\pm\text{sx}$ (μm)	IC 95% (μm)	CV (%)
Diâmetro Equat.(VE)	75,00 - 95,00	$87,30 \pm 4,83$	84,77 - 89,23	5,54
Eixo Polar (VE)	77,50 - 97,50	$87,30 \pm 5,29$	84,94 - 89,42	6,07
Diâmetro Equat.(VP)	72,50 - 102,50	$88,20 \pm 7,30$	84,95 - 91,12	8,28
Nexina	1,50 - 4,50	$2,94 \pm 0,71$	2,62 - 3,22	24,33
Sexina	1,25 - 4,25	$2,76 \pm 0,95$	2,33 - 3,14	34,44
Exina	2,75 - 8,50	$5,70 \pm 1,36$	5,09 - 6,24	23,98
P/E	0,94 - 1,03	$1,00 \pm 0,02$	0,98 - 1,01	2,44
I.A.P	0,55 - 0,83	$0,75 \pm 0,07$	0,72 - 0,78	10,01

\bar{x} = média; sx = desvio padrão da média; IC = intervalo de confiança; CV (%) = coeficiente de variação; VE = Vista Equatorial; VP = Vista Polar; P/E = Razão entre eixo polar sobre diâmetro equatorial; I.A.P.= Índice de área polar.

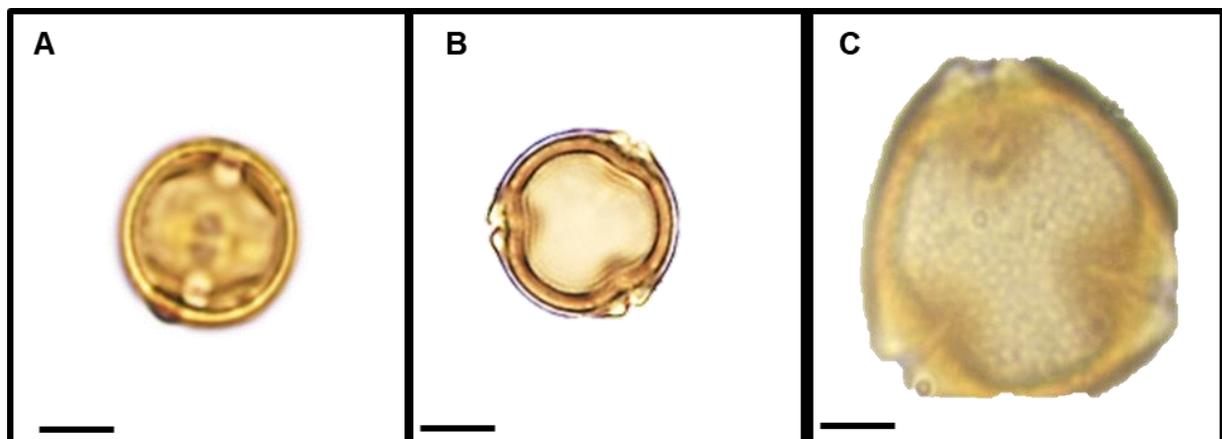


Figura 4. Fotomicrografias dos grãos de pólen de *Byrsonima crassifolia*. A) Vista equatorial com detalhe dos colpos. B) Vista polar com detalhe das aberturas dos escolpos. C) Detalhe da superfície. Barra = 35 μm para figura A e B e 86 μm para figura C.

Os pólenes de *B. crassifolia* são triangular a circular e superfície microrreticulada, esses resultados são semelhantes aos encontrados por Carreira et al., (1991) em estudo realizado em *B. crassifolia* cultivadas no parque do museu Goeldi.

Lobreau, (1967) e Salgado-Labouriau, (1973), analisando os grãos de pólen de *Byrsonima verbascifolia* os descreveram como prolato esferoidais, 3-colporados, sexina

finamente reticulada, menos espessa que a nexina. Já Andrade, (1974), ao estudar os grãos de pólen de 17 espécies do gênero *Byrsonima* Rich da Amazônia e, dentre elas, *Byrsonima crassifolia*, descreveu características similares às encontradas neste estudo para os pólenes. Segundo Souza et al.(2010), a morfometria polínica pode servir de parâmetros em estudos de diversidade genética.

3.2 RAZÃO PÓLEN/ÓVULO (P/O)

A razão pólen/óvulo de *B. crassifolia* foi de 28.979,99, sugerindo o sistema reprodutivo de xenogamia obrigatória para a espécie de acordo com a classificação proposta por Cruden (1977).

A razão P/O pode ser utilizada como uma ferramenta para avaliar os sistemas reprodutivos nos vegetais, sendo uma técnica alternativa hábil, precisa e de custo baixo quando comparados com técnicas de marcadores moleculares ou técnicas de cruzamentos (Cruden, 2000). A razão pólen/óvulo está diretamente relacionada à oferta de recursos tróficos florais, ao modo de polinização e ao sistema reprodutivo dos vegetais (Bertin 1989).

Cruden (1977) definiu que espécies xenogâmicas apresentam protandria, são autoincompatíveis e a maioria requer um polinizador. Bezerra et al. (2009), em estudos sobre a biologia reprodutiva de *Byrsonima gardnerana*, encontrou resultados semelhantes a este para a razão pólen/óvulo com sistema reprodutivo xenogâmico obrigatório.

3.3 VIABILIDADE POLÍNICA VIA TESTE COLORIMÉTRICO

Os quatro corantes utilizados na avaliação da viabilidade polínica de *B. crassifolia* foram eficazes na distinção de grãos de pólen viáveis e inviáveis (Figura 5).

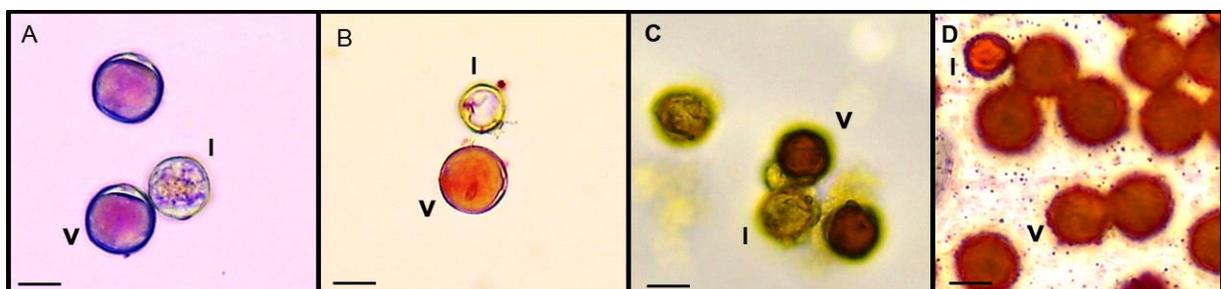


Figura 5: Grãos de pólen de *Byrsonima crassifolia*. Viáveis (V) e inviáveis (I). (A) reação com o reativo Alexander; (B) Reação com o carmalum acético 1%; (C) Reação com o lugol; e (D) Reação com o sudan IV. Barra = 10 µm.

O reativo de Alexander e o carmim acético são os corantes que distinguiram, com mais nitidez, pela coloração diferencial, os polens viáveis e não viáveis (Figura 5A e B). O reativo de Alexander tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida. Dessa maneira, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen abortados coram-se de verde (Alexander, 1980).

O corante carmim acético, devido à reação com o material genético existente no citoplasma (Pagliarini & Pozzobon, 2004), cora os grãos de pólen viáveis, e apresenta coloração rosa/vermelha, enquanto que os inviáveis revelam-se transparentes e não corados (Figura 5B). Segundo Munhoz et al. (2008) o carmim acético indica a integridade cromossômica.

Nos testes com lugol a coloração dos polens viáveis apresenta-se marrom devido uma reação química que ocorre entre o iodo e a molécula de amido, enquanto os inviáveis apresentam coloração amarela clara ou transparente devido à ausência de amido (Figura 5C), (Pagliarini e Pozzobon, 2004). Segundo Dafni, (1992) o corante Sudan IV identifica a presença de lipídios, onde a coloração vermelha identifica grãos de pólen viáveis e o vermelho claro e tamanhos menores apresentam-se como polens inviáveis (Figura 5D).

As médias de viabilidade polínica estimada com os quatro corantes foram superior a 90%, variando entre 93,6% com carmim acético e 98,8% com sudan IV, sendo que foi detectado diferença significativa entre os corantes (Figura 6). Bezerra et al. (2009) encontraram viabilidade polínica média de 97,8% ao avaliarem os pólenes de *Byrsonima gardnerana* com carmim acético 2%, corroborando com a alta viabilidade encontrada neste estudo para *B. crassifolia*.

O corante sudan IV apresentou a maior média de viabilidade polínica, corando de vermelho 98,8% dos grãos de pólen seguidos pelo lugol com média de 97,7% dos grãos de pólen viáveis, que ficaram corados de marrom, não havendo diferença estatística entre as médias de viabilidade polínica reveladas em *B. crassifolia* por estes dois corantes (Figura 6).

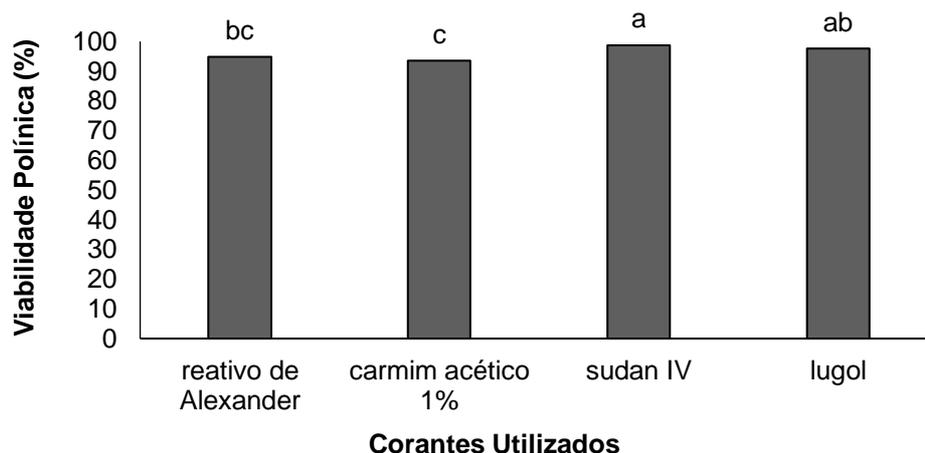


Figura 6: Médias de viabilidade polínica de *Byrsonima crassifolia*, por meio de testes colorimétricos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Segundo Souza et al. (2002) e Huang et al. (2004) os corantes sudan IV e lugol são utilizados em alguns estudos como indicativos de viabilidade polínica, entretanto, de acordo com outros autores, esses testes estão associados apenas à detecção de substâncias constituintes dos grãos de pólen, como lipídios e amido (King, 1960; Beyhaut, 1988; Rodriguez-Riano e Dafni, 2000). Portanto, pode-se inferir que a espécie *B. crassifolia* possui uma alta taxa de amido e lipídios como substância de reserva no grão de pólen. Segundo Wang et al. (2004), o lipídio evita perda de água, atrai polinizadores e mantém os pólenes unidos durante o transporte. Para *B. crassifolia* a presença de lipídios no grão de pólen é fundamental para a efetivação da polinização, uma vez que a espécie é polinizada quase que exclusivamente por abelhas da tribo Centridini, que são coletoras de lipídios e não misturam os recursos polínicos durante o vôo para a coleta de pólen, apresentando fidelidade às flores desta espécie (Ribeiro et al., 2008).

O corante reativo de Alexander e carmim acético 1% revelaram médias de 94,9% e 93,6, respectivamente, estes permitem avaliar a integridade de estruturas celulares como núcleo e parede celular (Alexander, 1969; Penaloza et al., 2005). Mesmo apresentando menores valores médios de viabilidade polínica em relação aos corantes sudan IV e lugol, o reativo de Alexander e carmim acético 1% são os recomendados para avaliação da viabilidade polínica de *B. crassifolia*, pois os demais podem superestimar os resultados, uma vez que identificam substâncias de reservas presentes no grão de pólen abortados também.

3.4 ÍNDICE MEIÓTICO

A análise das células dos produtos pós-meióticos indicou que os níveis de irregularidades meióticas para *B. crassifolia* foram baixos. A média do IM para a espécie foi de 95,35%. A anormalidade encontrada com maior frequência consistiu em tríades (Tabela 5).

Tabela 5. Produtos pós-meióticos de *Byrsonima crassifolia* observados em lâminas com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 40x.

Repetição	Normais	Tríades	Díades	Mônades	Total	IM (%)
1	220	30	0	0	250	88,00
2	235	14	1	0	250	94,00
3	236	14	0	0	250	94,40
4	242	6	2	0	250	96,80
5	244	5	0	1	250	97,60
6	245	3	0	2	250	98,00
7	240	7	0	3	250	96,00
8	245	2	3	0	250	98,00
Total	1907	81	6	6	2000	95,35
Índice Meiótico (IM)					95.35%	

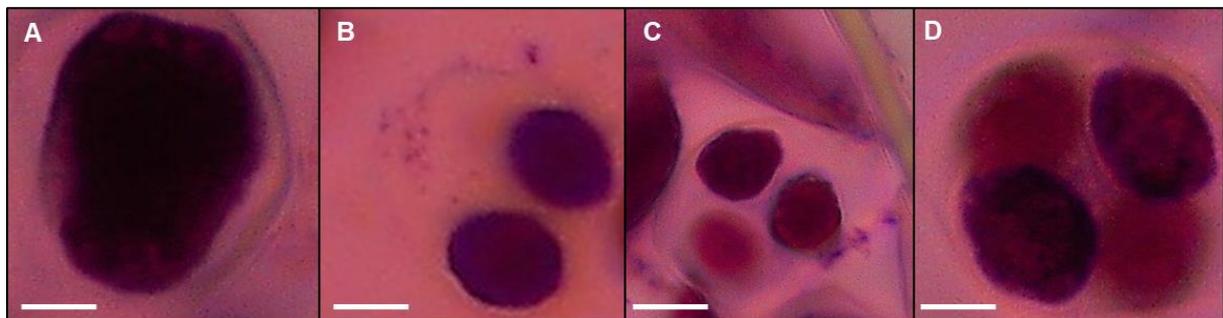


Figura 7. Produtos pós-meióticos observados em *Byrsonima crassifolia*. A) Mônade. B) Díade. C) Tríade. D) Tétrade normal. Barra = 20 μ m.

Botões florais com comprimento entre 1,92 – 2,91 mm apresentaram produtos pós-meióticos. Botões com comprimento superior já apresentavam pólen. Em função da escassez de pesquisas publicadas com produtos pós-meióticos para a espécie do murici, ficam essas informações como pré-requisitos para novos estudos.

As anormalidades meióticas influenciam diretamente os produtos pós-meióticos (Horner e Palmer, 1995), o que não ocorreu neste estudo, uma vez que a espécie *B. crassifolia* apresentou IM de 95,35%. Segundo Love (1951), plantas que apresentam IM superior a 90%

possuem alta estabilidade meiótica. A fertilidade das plantas depende da regularidade meiótica durante a formação de grãos de pólen (Pereira et al., 2017). A regularidade e estabilidade meiótica de *B. crassifolia* está refletida na alta viabilidade polínica da espécie estimada pelo teste colorimétrico.

Contudo, mesmo com percentagem de regularidade meiótica e viabilidade polínica alta, ainda deve haver preocupação com fatores externos que estejam diretamente ligados ao sucesso de reprodução da espécie, como por exemplo, a não sincronia no período de floração entre os indivíduos da espécie, a fragmentação (Bernacci et al., 2006), a distribuição da espécie e falta de polinizadores (Giannini et al., 2012). Uma vez que a matriz de paisagem onde se encontram os genótipos de *B. crassifolia* em estudo é atualmente muito fragmentada, podendo ocorrer resistência ao fluxo de pólen e polinizadores.

4 CONCLUSÃO

Os pólenes de *B. crassifolia* foram identificados como 3-colporados, esférico e a área polar grande.

O corante reativo de Alexander e carmim acético foram os mais eficientes em relação à estimativa da viabilidade dos grãos de pólen através da capacidade de coloração.

As células dos produtos pós-meióticos indicaram níveis de irregularidades baixas para *B. crassifolia* com média de IM de 95,35%.

Os testes com corantes apresentam diferença significativa e indicaram que a espécie possui alta viabilidade polínica e alta regularidade meiótica. Sendo uma planta com potencial fértil, podendo ser incluída em programas de ornamentação, reflorestamento de áreas degradadas como também em melhoramento genético.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Os autores agradecem ainda à Secretaria Municipal de Educação de Alta Floresta, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular, Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) e Herbário da Amazônia Meridional (Herbam).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, T. V.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZVEDO, A. A.; FERREIRA, R. S. Anati quanti: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. *Planta Daninha*, v. 25, n. 4, p. 649-659, 2007.

ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology*, v.44, n.3, p.117-122, 1969. DOI: 10.3109/10520296909063335.

ALEXANDER, M.P. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. *Stain Technology*, v.1, n.5, p.13-8, 1980. DOI: 10.3109/10520298009067890.

ANDERSON, W.R. Malpighiaceae. *Botany of the Guiana highlan - Memoirs of the New York Botanical Garden*, v. 32, p. 21-305, 1981.

ANDRADE, T.A.P. O pólen em da Amazônia. O *Byrsonima* Rich. (Malpighiaceae). *BoL Mus. Para. Emilio Goeldi, fi. sér. BOI.*, Belém, v. 46, p. 1-12, 1974.

BARTH, O. M. Catálogo sistemático dos polens das plantas arbóreas do Brasil Meridional – Glossário Palinológico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 63, p. 133-162, 1965.

BENEZAR, R.M.C.; PESSONI, L. A. Biologia floral e sistema reprodutivo de *Byrsonima coccolobifolia* (Kunth) em uma savana amazônica. *Acta Amazonica*, v.36, n.2, p.159-168, 2006. DOI: 10.1590/S0044-59672006000200005.

BERNACCI, L. C.; FRANCO, G. A. D. C.; ÀRBOCZ, G. F.; CATHARINO, E. L. M.; DURIGAN, G.; METZGER, J. P. O efeito da fragmentação florestal na composição e riqueza de árvores na região da Reserva Morro Grande (Planalto de Ibiúna, SP). *Revista do Instituto Florestal*, v. 18, n. 1, p.121-166, 2006.

BERTIN, I.R. Pollination biology. In *Plant-animal interactions* (G.A. Warren, ed.). McGraw-Hill, New York, p.23-83. 1989.

BEYHAUT, R. Estúdio comparado de técnicas para viabilidade de polen em *Vitis vinifera*. *Notas Técnicas*, 5. Faculdade de Agronomia, Montevideo, 1988.

BEZERRA, E. S.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. Biologia reprodutiva de *Byrsonima gardnerana* A. Juss. (Malpighiaceae) e interações com abelhas *Centris* (Centridini) no Nordeste do Brasil. *Revista Brasil. Botânica*, v.32, n.1, p.071-084, 2009.

CARREIRA, L. M. M.; LOBATO, E. S. P.; RAPOSO, R. C. O. Morfologia polínica de plantas cultivadas no parque do museu Goeldi v. família Malpighiaceae. *BoL Mus. Para. Emilio Goeldi, sér. BOL* 7(2),1991.

COELHO, C. P.; BARBOSA, A. A. A. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. *Acta Botânica Brasílica*, v.18, n.3, p. 481-489, 2004.

CRUDEN, R. W. Pollen-ovulo ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, v. 31, p. 32-46, 1977.

CRUDEN, R. W. Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution*, v. 222, n. 1-4, p. 143-65, 2000.

DAFNI, A. *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press Inc. New York, 1ª. Ed., 250p, 1992.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy Angiosperms. Almqvist e Wiksell, Stockholm, 539p. 1952.

ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy. III. *Morina L.* With an addition on pollenmorphological terminology. *Svensk Botanisk Tidskr*, v. 39, p. 279-285,1945.

FAEGRI, K.; DEUSE, P. Size variation in pollen grains with different treatment. *Pollen et Spores*, v. 2, n. 2, p. 293-298, 1960.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011. DOI: 10.1590/S1413-70542011000600001.

FERREIRA, M. G.; ABSY, M. L. Pollen analysis of the post-emergence residue of *Melipona* (*Melikerria*) *interrupta latreille* (Hymenoptera: Apidae) bred in the central Amazon region. *Acta Botanica Brasilica*, v. 27, n. 4, p. 709-713, 2013.

FRANKIE, G. W., I? A. OPLER, AND K. S. BAWA. Foraging behavior of solitary bees. Implications for outcrossing of a neotropical forest tree species. *Jornal Ecológico*, v. 64, p. 1049-1057, 1976.

GIANNINI, T. C.; ACOSTA, A. L.; GARÓFALO, C. A.; SARAIVA, A. M.; ALVES-DOS-SANTOS, I.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Pollination services at risk: bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. *Ecological Modelling*, v. 244, p.127-131, 2012.

GOMES, P. *Fruticultura brasileira*. 13. ed. São Paulo: Nobel, 446p. 2007.

GUIMARÃES, J. T. F.; COHEN, M. C. L.; FRANÇA, M. C.; ALVES, I. C. C.; SMITH, C. B PESSENDA, L. C. R.; BEHLING, H. An integrated approach to relate Holocene climatic,

hydrological, morphological and vegetation changes in the southeastern Amazon region. *Vegetation History and Archaeobotany*, v. 22, p. 185–198, 2013.

HAMID, K. A.; MOHD, A. F.; MOHD ZOHDI R.; ESHAK, Z.; OMA, R. Pollen analysis of selected Malaysian Honey. *Academic Journal of Entomology*, v. 8, n. 2, p. 99-103, 2015.

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

HUANG, Z.; ZHU, J.; MU, X.; LIN, J. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. *Annals of Botany*, v. 93, n. 3, p. 295-301, 2004. DOI: 10.1093/aob/mch044.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=510025>>. Acesso em: 15 de dez. de 2018.

KING, J.R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. *Stain technology*, v. 35, p. 225-227, 1960.

LIRA, G. Conhecendo o Estado de Mato Grosso – IV Microrregião de Alta Floresta, Mato Grosso, 38p. 2011.

LOBREAU, D. Contribution a J'étude du Pollen des Malpighiaceae *Pallei! et Spores*, v. 9, n. 2, p. 242-277, 1967.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2002.

LOVE, R. M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal*, v. 43, p. 72-76, 1951.

MAMEDE, M.C.H.; FRANCENER, A. *Byrsonima* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8827>>.

MARTINS, K. C.; SOUZA, S. A. M.; CUCHIARA, Morfologia polínica: aplicações, estudos e metodologias. 1º ed. Rio de Janeiro: CBJE, 75p. 2010.

MELHEM, T. S.; MATOS, M. E. R. Variabilidade de forma dos grãos de pólen de *Eriope crassipes* Benth. Labiatae. Hoehnea, v. 2, p. 1-10, 1972.

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.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, T. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: CURSO DE GENÉTICA APLICADO A RECURSOS VEGETAIS, 2. Documentos, Brasília: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia-DF, p. 24-41, 2004.

PEÑALOZA, A. I. P. S. (Coord). II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF, 89p. 2005.

PEREIRA, T. N. S.; GERONIMO, I. G. C.; ROSSI, A. A. B.; PEREIRA, M. G. *Passiflora cristalina* and *Passiflora miniata*: meiotic characterization of two wild species for use in breeding. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 17, p. 267-273, 2017.

PUNT, W.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of pollen and spore terminology. Review of Palaeobotany and Palynology, v. 143, p. 1-81, 2007.

RIBEIRO, É.K.M.D.; REGO, M.M.C.; MACHADO, I.C.S. Cargas polínicas de abelhas polinizadoras de *Byrsonima chrysophylla* Kunth. (Malpighiaceae): fidelidade e fontes alternativas de recursos florais. Acta Botanica Brasilica, v. 22, n. 1, p. 165-171, 2008. DOI: 10.1590/S0102-33062008000100017.

RIGAMOTO, R. R.; TYAGI, A. P. Pollen fertility status in coastal plant species of rotuma Island. South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences, v. 20, p. 30-33, 2002.

RODRIGUES, L. R.; DE OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. Revista Brasileira de Biociências/Brazilian Journal of Biosciences, v. 2, n. ¾, p. 159-167, 2004.

SALGADO-LABOURIAU, M. L. Contribuição à palinologia dos cerrados. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 291p. 1973.

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 Agrotécnica, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

SOUZA, S. A. M. Morfometria polínica: uma contribuição aos estudos de diversidade genética. In: MARTINS, K. C.; SOUZA, S. A. M.; CUCHIARA (Eds). Morfologia polínica: aplicações, estudos e metodologias. 1º ed. Rio de Janeiro: CBJE, 75p. 2010.

STONE, J.L.; THOMSON, J.D.; DENT-ACOSTA, S.J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. American Journal of Botany, v. 82, p. 1186-1197, 1995.

TARIFA, J. R. Alterações climáticas resultantes da ocupação agrícola no Brasil. Revista do Departamento de Geografia, v. 8, p. 15-27, 2011.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T da S.; SILVA, D. B. da; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Ed.). Frutas nativas da região centro-oeste do Brasil. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 320p. 2006.

VINSON, S. B., AND G. W. FRANKIE. Nests of *Centrir uethycteru* (Hymenoptera:Apoidea: Anthophoridae) in the dry forest of Costa Rica. J. Kans. Entomol. SOC, v. 50, p. 301-311, 1977.

WALKER, J. W.; DOYLE, J. A. The bases of angiosperm phylogeny: palynology. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 62, p. 664-723, 1975.

WANG, Y.Q.; ZHANG, D.X.; CHEN, Z.Y. Pollen Histochemistry and Pollen: Ovule Ratios in Zingiberaceae. Annals of Botany, v. 94, p. 583-591, 2004. DOI: 10.1093/aob/mch177.