

LILIAN MARIA DA SILVA LIMA



**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Bertholletia excelsa* Bonpl. EM
UM PLANTIO NO ACRE**

RIO BRANCO

2009

LILIAN MARIA DA SILVA LIMA

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Bertholletia excelsa* Bonpl. EM UM
PLANTIO NO ACRE**

Monografia apresentada ao Curso de graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheira Florestal.

Orientadora: Dra Lúcia H. de Oliveira Wadt

RIO BRANCO

2009

Aos meus pais
Geraldo Lima e Maria de Lourdes,
À minha irmã Marlúcia Silva
E aos meus sobrinhos Marília e Ramon

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais Geraldo de Souza Lima e Maria de Lourdes da Silva que torceram, e sempre me deram apoio nos momentos mais difíceis desta caminhada.

A minha irmã Marlúcia Silva pelo apoio confiança e carinho.

A Dra. Lúcia Helena de Oliveira Wadt pela orientação, paciência e todos os ensinamentos.

As doutoras Ana Yamaguishi Ciampi e Vânia Cristina R. Azevedo por todo apoio e pela amizade.

A Dra. Márcia Maués pelas valiosas dicas e pela amizade.

À Embrapa pela oportunidade que me proporcionou.

A Dra. Andrea Raposo e as amigas do Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular Vanessa, Raifanny e Susana, pelo apoio ajuda e cooperação.

Ao Aldeci pela amizade e apoio nas coletas de campo.

Ao Luciélío Manoel da Silva pelas dicas e colaboração neste trabalho.

A Dra. Karina Martins pelo apoio e pela amizade.

A Christie Ann Klimas pela ajuda e tradução do resumo.

Ao professor Edimilson pelo apoio e amizade.

A Universidade Federal do Acre e o Curso de Engenharia Florestal pela oportunidade.

Aos professores do Curso de Engenharia Florestal pelas informações recebidas e conhecimentos adquiridos em suas disciplinas.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que fosse possível a realização do trabalho de pesquisa, a elaboração da monografia e a conclusão deste curso.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivos estudar a biologia reprodutiva, aspectos da morfologia floral e os padrões fenológicos da castanheira em situação de plantio no estado do Acre. Todas as árvores do plantio foram avaliadas quanto aos eventos fenológicos. Para avaliação do sistema reprodutivo flores de cinco árvores foram submetidas a tratamentos de polinização controlada. O horário da antese foi verificado em 150 botões florais. Grãos de pólen e estigma foram verificados quanto à viabilidade e receptividade, respectivamente, num período de 12 horas consecutivas a partir do momento da abertura total das flores. Visando verificar diferenças morfológicas nas flores de diferentes castanheiras, flores de seis árvores foram coletadas e avaliadas morfometricamente. Análise da variabilidade genética de todas as árvores, por meio de marcadores RAPD, também foi realizada para verificar o relacionamento genético entre as árvores do plantio. O ponto máximo de floração, nos anos de 2007 e 2008 ocorreu no mês de dezembro. As flores polinizadas não resultaram no desenvolvimento de frutos, sendo necessário repetir o experimento. O horário da antese da flor da castanheira foi às 3h. O horário em que o estigma da flor se mostrou mais receptivo foi por volta das 10h, enquanto que a maioria dos grãos de pólen (cerca de 60%) estavam viáveis no período de 6 às 8h. O período mais indicado para polinização artificial foi das 9 às 12h. As flores analisadas apresentaram características morfológicas específicas para cada árvore, com exceção de duas árvores que não puderam ser diferenciadas. As castanheiras desse plantio foram geneticamente diferentes contrariando a hipótese de clones. Aparentemente há maior diversidade genética representada no plantio do que em árvores de duas populações naturais do Estado do Acre.

Palavras-chave: Manejo não-madeireiro. Floração. Frutificação.

ABSTRACT

The objective of this research was to study the reproductive biology, aspects of floral morphology and phenological patterns of Brazil nut in a plantation setting in Acre, Brazil. All trees in the plantation were visited for phenological study. To evaluate the flower reproductive system, we hand-pollinated 5 trees. The hour of anthesis was verified for 150 flower buds. Pollen grains and stigmas were tested for their viability and receptivity, respectively, during 12 consecutive hours beginning at the time of complete flower opening. To test morphological differences between flowers of different Brazil nut trees, flower morphology was evaluated using flowers collected from 6 trees. Genetic analysis of variability was determined for all trees using RAPD markers. This method also analysed kinship between individuals in the plantation. Peak flowering in 2007 and 2008 occurred in December. Hand-pollinized flowers did not result in fruit development, necessitating future studies. The hour of anthesis for Brazil nut flowers was 3am. Tests showed that the stigma was most receptive at approximately 10am, though the majority of pollen grains (approximately 60%) were viable between 6 and 8am. Based on this work, the most appropriate time for artificial pollinization was between 9am and 12pm. Flower morphology showed specific characteristics for each of the sampled trees, with the exception of two trees that where flowers were indistinguishable. Brazil nut trees in this plantation were genetically different, disproving the hypothesis that they were clones. This study showed a greater genetic diversity within the plantation trees than in two natural populations of Brazil nut trees in the state.

Key words: non-timber management. Flowering. Fruiting.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 - Número de flores avaliadas quanto às características morfométricas para cada uma das árvores estudadas	21
QUADRO 02 - Número de flores utilizadas nos tratamentos	28
QUADRO 03 - Médias para as variáveis avaliadas de morfometria floral de castanheira, em plantio no Acre.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 - Valores mensais de precipitação pluviométrica e média diária dos meses no período de novembro de 2007 a dezembro de 2008.....	17
GRÁFICO 02 - Porcentagem de indivíduos com botões e flores no período de novembro de 2007 a dezembro de 2008.....	25
GRÁFICO 03 - Porcentagem de indivíduos frutificando no período de novembro de 2007 a dezembro de 2008.....	26
GRÁFICO 04 - Porcentagem de indivíduos apresentando mudança foliar no período de novembro de 2007 a dezembro de 2008.....	27
GRÁFICO 05 - Porcentagem de grãos de pólen e estigmas receptivos para cada horário avaliado.....	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - (A) Croqui da disposição das castanheiras no plantio; (B) Imagem do plantio.....	16
FIGURA 02 - (A) Inflorescência protegida; (B) Polinização manual.....	18
FIGURA 03 - (A) Escada na castanheira; (B) Assoalho no interior da copa.....	18
FIGURA 04 - Remoção do pistilo e mensuração do ovário com paquímetro digital..	21
FIGURA 05 - Processo de abertura da flor de castanheira.....	29

FIGURA 06 - Grãos de pólen viáveis (escuros) e não viáveis (amarelos).....	29
FIGURA 07 - Germinação do tubo polínico e óvulos da flor da castanheira, visualizados por microscopia com epifluorescência.....	31
FIGURA 08 - Corte transversal de ovários com 4 e 5 lóculos.....	32
FIGURA 09 - Dendrograma da dissimilaridade pelo método UPGMA.....	32
FIGURA 10 - Dendrograma da similaridade pelo método UPGMA das castanheiras do plantio.....	34
FIGURA 11 - Dendrograma da similaridade pelo método UPGMA das castanheiras da floresta primária.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 DESCRIÇÃO E OCORRÊNCIA	11
2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E BIOLOGIA REPRODUTIVA	11
2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SOCIAL	13
3 MATERIAL E METODOS	15
3.1 ÁREA DE ESTUDO	15
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO PLANTIO	15
3.3 ESTUDOS DE BIOLOGIA REPRODUTIVA	16
3.3.1 Fenologia reprodutiva	16
3.3.2 Sistema reprodutivo	17
3.3.3 Horário da antese	19
3.3.4 Viabilidade do pólen	19
3.3.5 Receptividade do estigma	20
3.3.6 Observação de tubo polínico no estilete	20
3.3.7 Morfometria floral	21
3.4 VARIABILIDADE GENÉTICA DAS ÁRVORES DO PLANTIO.....	22
3.4.1 Extração e quantificação do DNA	22
3.4.2. Seleção de <i>primers</i> e amplificação RAPD	23
3.4.3 Leitura e análise dos dados moleculares.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 FENOLOGIA REPRODUTIVA.....	25
4.2 SISTEMA REPRODUTIVO	27
4.3 HORÁRIO DA ANTESE	28
4.4 VIABILIDADE DO PÓLEN E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA	29
4.5 OBSERVAÇÃO DE TUBO POLÍNICO NO ESTILETE	30
4.6 MORFOMETRIA FLORAL	31
4.7 VARIABILIDADE GENÉTICA DAS ÁRVORES DO PLANTIO.....	33
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A *Bertholletia excelsa* pertence a uma família pantropical de árvores (Lecythidaceae), que inclui aproximadamente 200 espécies no Neotrópico. É a única espécie descrita no gênero *Bertholletia*, embora exista uma considerável variação morfológica nos seus frutos, mas essa variação não tem sido considerada suficiente para reconhecer mais de uma espécie no gênero (MORI; PRANCE, 1990; PRANCE; MORI, 1979).

A *B. excelsa* é conhecida vulgarmente por várias denominações: Castanha-do-Brasil como citação mais recente, Castanha do Pará, Castanha, Castanheira, Castanha verdadeira, Amendoeira da América e Castanha mansa (PARDO, 2001). Neste trabalho será chamada de Castanha-do-Brasil ou apenas castanheira.

A coleta e o processamento da Castanha-do-Brasil ocorre há décadas e praticamente em toda a Amazônia pode ser considerada como uma importante fonte de renda para as famílias que vivem do extrativismo (SOUZA, 1963; KAINER et al., 2007; ORTIZ, 2002; PERES et al., 2003). Além disso, é a única noz comercializada internacionalmente que é produzida quase que exclusivamente em populações naturais de floresta primária (CLAY, 1997).

No Brasil, o histórico de produção total da Castanha-do-Brasil apresenta uma tendência de queda desde a década de 90, com alguns picos nos anos de 1995 e 2000 (IBGE/SIDRA, 2007 e GE/SEPROF-AC – dados não publicados), mas de uma maneira geral, percebe-se que a produção da espécie tem diminuído a cada ano. Alguns autores discutem essa queda como consequência do desmatamento (MORITZ, 1984; LOCATELLI et al., 2002) e também como uma senescência das árvores milenares e falta de reposição das mesmas devido à baixa regeneração das populações naturais de castanheiras (PERES et al., 2003).

Os fatores que afetam ou estão diretamente relacionados à produção de frutos em castanheira não são bem conhecidos. Sabe-se que existe variação anual na produção em relação tanto ao indivíduo quanto à população (ZUIDEMA; BOOT 2002; ORTIZ, 2002; KAINER et al., 2007), mas poucos estudos têm sido realizados para explicar essa variação observada. Kainer et al. (2007), em um estudo realizado na Reserva Extrativista Chico Mendes, verificaram ampla variação na produção de frutos de castanheiras individuais ao longo de cinco anos e uma menor variação

anual em nível de população. Ainda nesse estudo, foi verificada baixa produção média de frutos ($66,2 \text{ frutos} \cdot \text{árv}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$).

No estudo de Kainer et al. (2007) foram avaliados fatores bióticos e abióticos externos que poderiam estar afetando a produção, no entanto aspectos da biologia reprodutiva da planta não foram considerados. Os resultados sugerem que o tamanho da árvore, atributos da copa, infestação da copa por cipós, e atributos do solo afetam a produção de frutos em castanheiras, mas desde que foi observado um alto coeficiente de variação na produção individual das árvores, outras variáveis não avaliadas ao nível de indivíduo podem ter importância significativa. Outro resultado relevante e que desperta o interesse pelo estudo da biologia reprodutiva da espécie foi o fato de muitas árvores não produzirem ou produzirem muito pouco. Neste estudo foi observado que apenas $\frac{1}{4}$ da população foi responsável por 72% da produção total das árvores avaliadas, mostrando que o potencial de produção pode ser muito maior caso se conheça os mecanismos da reprodução e seja possível manipulá-los.

O presente trabalho tem como objetivo estudar, descrever a biologia reprodutiva, aspectos da morfologia floral e os padrões fenológicos da castanheira em situação de plantio a fim de melhor entender seu comportamento reprodutivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESCRIÇÃO E OCORRÊNCIA

B. excelsa pertence à família das Lecythidaceae, sendo a única espécie do gênero *Bertholletia*. Foi originalmente descrita em 1807 por Humbolt e Bonpland. Em 1825, Poiteau foi o primeiro a dar a Lecythidaceae o *status* de família, removendo os gêneros *Bertholletia*, *Couratari*, *Couroupita* e *Gustavia* da família Myrtaceae, onde eram tradicionalmente classificados (MORI; PRANCE, 1990).

A espécie é encontrada em estado nativo na Amazônia, sendo que as maiores concentrações ocorrem na porção brasileira, principalmente no planalto que separa a bacia formada pelos afluentes do baixo Amazonas, alto Tocantins e alto Moju e em terras altas ao norte do rio Jarí, no estado do Pará e nos estados do Amazonas e Acre, até o alto Beni na Bolívia (MULLER et al., 1995).

Lorenzi (2000) relata que *B. excelsa* é uma planta semidecídua, heliófila, característica da mata alta de terra firme, sendo planta “social”, ocorrendo em determinados locais com grande frequência.

A *B. excelsa* desenvolve-se bem em regiões de clima quente e úmido, sendo que as maiores concentrações da espécie ocorrem em regiões onde predominam os tipos climáticos tropicais chuvosos com a ocorrência de períodos de estiagem definidos (MULLER et al., 1995).

2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E BIOLOGIA REPRODUTIVA

B. excelsa é uma árvore de grande porte que se sobressai na floresta, chegando a 50 metros de altura e 2 metros de diâmetro. Apresenta caule cilíndrico, liso e desprovido de ramos, com casca escura, fendida e os ramos curvos nas extremidades (CORRÊA, 1931).

Suas folhas são simples, alternas, coriáceas, glabras em ambas as superfícies (MORI; PRANCE, 1990).

As flores possuem seis pétalas, de cor pálida, do amarelo para o branco. Possuem uma câmara de estaminódios soldados, formando uma estrutura robusta (lígula), que recobre os estames e o estigma, o que restringe e seleciona os polinizadores em relação ao seu vigor e tamanho (MAUÉS, 2002). Desenvolve-se em panículas retas, verticais, racemosas nas extremidades dos ramos (MORI; PRANCE, 1990). O ovário é ínfero e o estilete estende-se normalmente, até além das anteras e está inclinado geralmente em um plano superior das anteras, o que pode impedir a autopolinização. (MORITZ, 1984).

A floração da espécie está intimamente ligada às condições climáticas de cada zona fisiográfica onde a mesma ocorre, havendo variações quanto à época e período de floração (PARDO, 2001). No estado do Acre, as flores de *Bertholletia excelsa* começam a abrir no final da estação seca, quando os frutos da floração anterior estão quase prontos para caírem. Lima et al. (2007) observou, em Rio Branco-AC, que a floração ocorreu de outubro a janeiro, e neste mesmo período ocorreu a queda de frutos da floração anterior.

B. excelsa é uma planta alógama com síndrome de polinização melitófila (MAUÉS, 2002). A referida autora cita que os principais visitantes e polinizadores da espécie são as abelhas dos gêneros *Bombus*, *Centris*, *Xylocopa* e *Epicharis*, assim como algumas espécies de Euglossina. Ao estudar os visitantes de flores de *Bertholletia excelsa* em árvores plantadas próxima a floresta secundária em Manaus, Nelson et al. (1985) encontraram três gêneros de abelhas: *Epicharis*, *Eulaema*, e *Euplusia*. Já em um estudo realizado no Acre, foram observadas apenas abelhas do gênero *Xylocopa* penetrando e permanecendo por alguns segundos no interior das flores de *Bertholletia excelsa* (ARGOLO; WADT, 2003).

O Fruto da *Bertholletia excelsa* é capsular, conhecido vulgarmente como ouriço, variando de tamanho e peso, conforme a região em que se desenvolve, contém de 5 a 25 sementes ou castanhas, dispostas em torno do eixo central. Segundo Mori e Prance citado por Pardo (2001) o fruto da *Bertholletia excelsa* é considerado como pixídio deiscente, mas funcionalmente indeiscente, pois necessita de ação de agentes dispersores com capacidade de abrir a espessa cápsula do fruto e do envoltório das sementes. O tempo de maturação dos frutos é de 14 ou 15 meses (CYMERYYS et al., 2005).

As sementes de *Bertholletia excelsa* apresentam o formato triangular-anguloso, transversalmente rugosa e estritamente comprimidas. O comprimento

pode variar entre 4 e 7 cm e a casca é bastante dura e rugosa (TONINI; ARCO-VERDE, 2004). As sementes são predadas e disseminadas por roedores como a cutia. Algumas sementes são consumidas imediatamente, outras são armazenadas para posterior consumo ou abandonadas em outras áreas, onde germinam (TONINI; ARCO-VERDE, 2004). Os macacos também atuam como dispersores da espécie, pois eles quebram frutos velhos batendo-os em galhos rígidos das árvores da floresta, espalhando as sementes pelo chão (CYMERYYS et al., 2005).

2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SOCIAL

A Castanha-do-Brasil faz parte do mercado internacional de amêndoas comestíveis, juntamente com diversas outras nozes como o amendoim, a avelã e a castanha-de-caju. Seu preço é fixado a partir do mercado, que é uma função da oferta das castanhas e da demanda nos países importadores.

Segundo dados do IBGE/SIDRA a produção brasileira de castanha-do-brasil em 2006 foi de 28.806 ton, com uma participação da região Norte de 98,35% desse total. A castanha-do-brasil tem um mercado bem estruturado, com regras conhecidas para o mercado interno e externo, onde o principal empecilho tem sido a contaminação por aflatoxina. Como o mercado interno consome pouco, o produto depende dos mercados internacionais para alcançar melhores preços. Dessa forma, o potencial de mercado para a castanha encontra-se ligado à oferta para os países importadores de alta renda.

A castanheira é uma espécie economicamente importante na Amazônia brasileira, por possuir múltiplos usos. A principal matéria-prima extraída é a amêndoa, de onde são obtidos: o leite para tempero de comida, o óleo para elaboração de sabonetes, creme e xampu, farinha ou paçoca. O ouriço é utilizado no preparo de chá, como remédio natural para anemia, problemas intestinais e hepatite. A madeira, historicamente, foi muito utilizada para construção, mas hoje a derrubada de castanheiras naturais é ilegal, de acordo com a lei federal nº 4.771 (CYMERYYS et al., 2005). A Castanha-do-Brasil é explorada por moradores da floresta e por isso possui um destaque sócio-econômico para as comunidades (extrativistas), que

vivem na floresta amazônica. No Estado do Acre, principalmente no vale do Rio Acre, onde ocorre a espécie, as pessoas que coletam a castanha têm nessa atividade sua principal fonte de renda (KAINER et al., 2007).

3 MATERIAL E METODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Campus Experimental da Embrapa Acre, localizada no município de Rio Branco, AC, nas coordenadas 9°58'29" sul e 67°44'28" oeste. Os solos predominantes da região do Campus são o Pódzólico Vermelho-Escuro e o Vermelho-Amarelo. O clima é do tipo Aw (Koppen) com uma estação seca bem diferenciada entre os meses de junho e outubro (OLIVEIRA, 1994). A precipitação média anual é de 1.700 mm e temperatura média anual de 25,5°C.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO PLANTIO

O Campus Experimental da Embrapa Acre possui um plantio de castanheiras implantado no ano de 1982, com o objetivo de realização de testes de enxertia visando maximizar a produção da cultura (comunicação oral). As informações de procedência do material vegetal e dos enxertos realizados não foram recuperadas.

Atualmente o plantio é composto por 76 árvores de castanheira (Figura 01A) com um diâmetro (DAP) médio de 37,77 cm e altura média estimada em 12,97 m, ocupando uma área de aproximadamente 2.000 m² (Figura 01B).

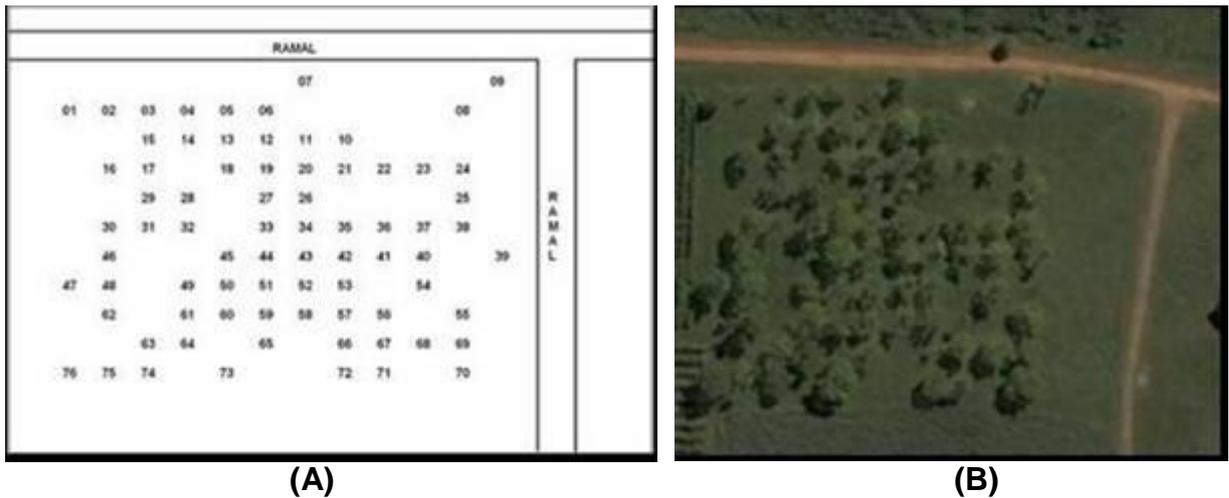


FIGURA 01 - (A) Croqui da disposição das castanheiras no plantio; (B) Imagem do plantio.

Fonte: Google Earth (2008).

3.3 ESTUDOS DE BIOLOGIA REPRODUTIVA

3.3.1 Fenologia reprodutiva

O estudo de fenologia reprodutiva foi conduzido no período de novembro de 2007 a dezembro de 2008. Todos os indivíduos foram avaliados semanalmente quanto aos eventos fonológicos, os quais consistiram na ocorrência de floração (botão floral e flor), frutificação (fruto novo, fruto desenvolvendo, fruto maduro e dispersão) e mudança foliar (folha nova e desfolhamento).

A porcentagem de indivíduos que apresenta uma determinada fenofase foi calculada a partir dos dados de presença ou ausência dos eventos avaliados. A maior porcentagem de indivíduos com determinada fenofase mostra o período em que um determinado evento ocorreu na maioria dos indivíduos. Para a visualização das fenofases utilizou-se um binóculo com aumento mínimo de 10x25. Os dados fonológicos foram correlacionados a registros meteorológicos cedidos pela Estação de meteorologia da Universidade Federal do Acre (Gráfico 01).

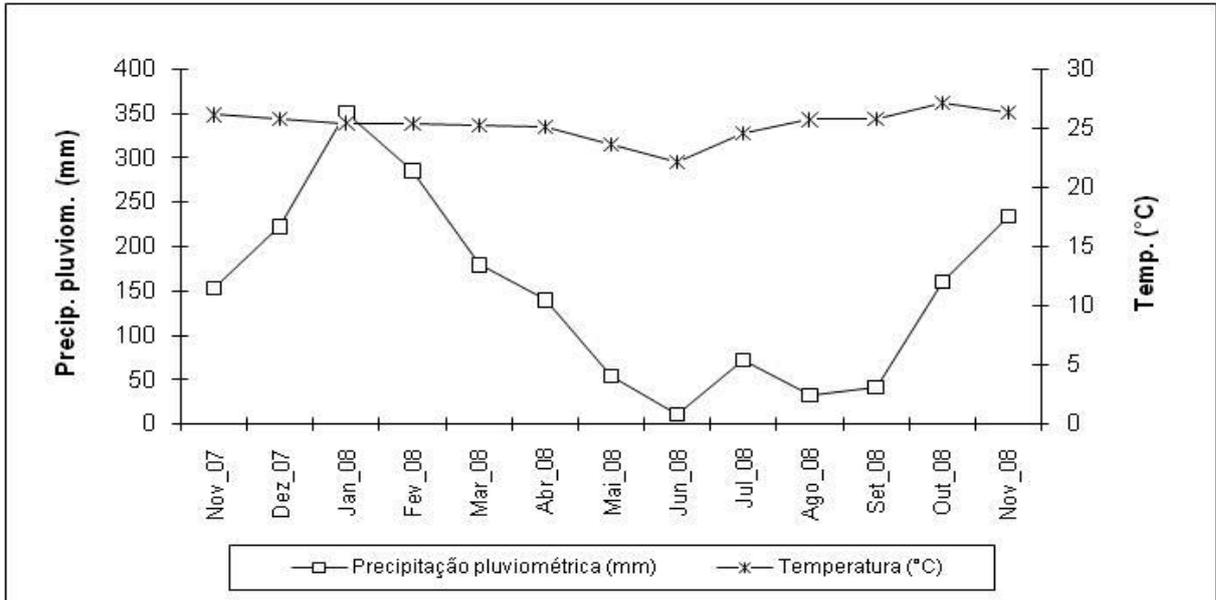


GRÁFICO 01 - Valores mensais de precipitação pluviométrica e média diária dos meses no período de novembro de 2007 a dezembro de 2008.

3.3.2 Sistema reprodutivo

Este experimento foi conduzido no ano de 2007. Para a realização dos testes de polinização, foram utilizados cinco indivíduos de castanheira. Em cada indivíduo foram isoladas, com sacos de tecido transparente (fino/microperfurado), inflorescências com 100 a 200 botões florais (Figura 02A), os quais foram submetidos aos seguintes tratamentos:

- Autopolinização espontânea*: inflorescências ensacadas e intactas, sem manipulação para verificação da formação de frutos;
- Autopolinização induzida*: polinização manual da flor (Figura 02B) com seu próprio pólen;
- Xenogamia*: Polinização manual com pólen de flores doadoras oriundas de árvore distinta da árvore receptora;
- Controle*: inflorescências etiquetadas e deixadas para polinização aberta.



FIGURA 02 - (A) Inflorescência protegida; (B) Polinização manual.

➤ Acesso à copa: Para a realização dos testes de polinização, escadas de madeira foram construídas com o objetivo de permitir acesso à copa das árvores. As escadas foram construídas com pernambucas no próprio tronco da árvore (Figura 03A) e no interior da copa foram utilizadas tábuas para construir assoalhos de forma a permitir a permanência de até duas pessoas (Figura 03B).



FIGURA 03 - (A) Escada na castanheira; (B) Assoalho no interior da copa.

3.3.3 Horário da antese

Apesar de haver na literatura informações sobre o horário de abertura das flores de castanheira, em 2008 foi feito experimento para verificar o horário em que a antese ocorre nas condições do Estado do Acre.

Às 17h foram marcados 150 botões florais no estágio de pré-antese para posterior observação do horário de início da abertura dos mesmos. As flores foram observadas no período das 18 até a completa abertura das mesmas, quando foi considerado o horário da antese.

3.3.4 Viabilidade do pólen

A viabilidade dos grãos de pólen foi testada por meio do método de coloração com cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio (TTC), descrita por Stanley e Linskens (1974). Os grãos de pólen na presença de TTC apresentam-se rosa ou avermelhados quando viáveis e transparentes quando não viáveis.

A viabilidade dos grãos de pólen foi avaliada a cada hora a partir do momento da abertura total das flores, por um período de 12 horas consecutivas. Em cada horário preparou-se três lâminas para avaliação posterior em laboratório, a qual foi realizada em microscópio óptico, utilizando a objetiva de 40X. Em cada lâmina, avaliou-se 10 campos aleatórios, onde foram contados os grãos de pólen viáveis e inviáveis.

A viabilidade dos grãos de pólen foi determinada pela porcentagem média de grãos de pólen viáveis em relação ao número total de grãos de pólen contado para cada horário.

3.3.5 Receptividade do estigma

A receptividade do estigma foi testada com o método do reagente peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% (Kearns & Inouye, 1993). Este reagente indica a receptividade do estigma por meio da formação de bolhas de ar (Maués, 2006). A solução foi utilizada em campo testando-se flores frescas, da seguinte forma: em cada estigma colocou-se uma gota da solução de H_2O_2 observando-se após um minuto o aparecimento de bolhas.

Foram testadas 5 flores a cada hora, por um período de 12 horas consecutivas, conforme foi feito para a viabilidade dos grãos de pólen.

3.3.6 Observação de tubo polínico no estilete

Para observação do crescimento do tubo polínico, flores coletadas das árvores em que foram realizados os tratamentos de polinização foram fixadas em álcool 70% e levadas para o Laboratório de Entomologia da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém-PA. Esta parte do estudo foi feita em 2007 em conjunto com os tratamentos de polinização.

No laboratório, as flores foram dissecadas para a remoção dos pistilos, os quais foram tratados em solução 8N de hidróxido de sódio (NaOH) para clarificar e amaciar o tecido, permitindo uma penetração adequada do corante biológico. Em seguida os pistilos foram lavados com água corrente e posteriormente imersos em solução 0,1N de fosfato de potássio (K_3PO_4) com azul de anilina a 0,1%. Foram montadas cinco laminas de cada árvore. A análise dos pistilos foi feita em sala escura para melhor visualização dos tubos polínicos, em microscópio eletrônico com epifluorescência Leica MPS 30.

3.3.7 Morfometria floral

Com o objetivo de verificar diferenças morfológicas nas flores de diferentes castanheiras, foram coletadas e medidas flores de seis árvores. O número total de flores variou entre os indivíduos conforme mostra o Quadro 01.

As flores foram coletadas na parte da manhã, no momento em que se estava fazendo as polinizações controladas, as mesmas foram fixadas em álcool 70% e levadas ao laboratório. Para avaliação das variáveis da parte feminina da flor a mesma foi dissecada com bisturi de modo a remover o máximo do tecido vegetal que envolve o ovário e o pistilo (Figura 04).

QUADRO 01 - Número de flores avaliadas quanto às características morfométricas para cada uma das árvores estudadas

Número da árvore	Número de flores avaliadas
34	3
40	10
68	6
70	9
76	5
47	9



FIGURA 04 - Remoção do pistilo e mensuração do ovário com paquímetro digital.

As variáveis tomadas foram: comprimento do ovário, largura do ovário, comprimento do estilete, base do estilete, largura do estigma, contagem do número de estames e contagem do número de lóculos. As medidas foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm.

Os dados obtidos foram utilizados para cálculo de dissimilaridade usando a distância Euclidiana e posteriormente foi elaborado um dendrograma pelo método do UPGMA (método de agrupamento de pares não ponderados por média aritmética), para verificar se há algum tipo de agrupamento das árvores pelas características morfológicas das partes florais.

3.4 VARIABILIDADE GENÉTICA DAS ÁRVORES DO PLANTIO

Pelo fato de não se saber corretamente a origem das árvores do plantio de castanheiras presente no Campus Experimental da Embrapa Acre e pela possibilidade de haverem clones, procedeu-se a análise da variabilidade genética de todas as árvores, por meio de marcadores RAPD (marcadores de DNA amplificados ao acaso). Utilizaram-se também os resultados da análise de marcadores RAPD, realizada por Kageyama et al. (2004) onde castanheiras de população natural da Reserva Extrativista Chico Mendes, Brasiléia e do PAE Caquetá, Porto Acre foram analisadas. O objetivo foi comparar os resultados de agrupamento das árvores do plantio com as das populações naturais para verificar que apresentam o mesmo padrão.

O material vegetal utilizado para extração do DNA foi câmbio coletado de todos os indivíduos de castanheira do plantio. O tecido foi coletado em microtubos contendo 1 ml de solução de transporte (70% etanol e 30% CTAB 2% que possui 0,2% de β - mercaptoetanol e 0,2% de ac. Ascórbico) e logo em seguida levado para o Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LABMOL) da Embrapa Acre onde foi mantido a -4°C , para posterior extração do DNA.

3.4.1 Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo CTAB 2% (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Após a extração, alíquotas de 2 μl de cada

amostra foram utilizadas para quantificação do DNA, utilizando eletroforese em gel de agarose 1,0% e coloração com brometo de etídio.

A quantidade de DNA foi estimada por meio da comparação das bandas resultantes das amostras com bandas padrões oriundas de quantidades conhecidas de DNA de fago λ : 50, 100 e 200 ng. Após a quantificação todas as amostras foram diluídas a uma concentração de 2,5 ng/ μ l para uso nas reações de amplificação com iniciadores RAPD.

3.4.2. Seleção de *primers* e amplificação RAPD

Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília. A seleção de iniciadores foi realizada a partir do teste de 85 iniciadores RAPD da Operon Technologies, tendo-se como critério o polimorfismo. Desses 85 foram selecionados 20 polimórficos para serem utilizados com todos os indivíduos da população. No entanto, apenas 13 foram escolhidos para leitura das bandas e análise estatística por gerarem bandas consistentes e informativas para a maioria das castanheiras analisadas. Os primers utilizados na análise foram OPB17, OPB1, OPG10, OPC2, OPC10, OPJ11, OPL17, OPE16, OPN11, OP19, OPX4, OPY19 e OPV12.

As reações de amplificação (PCR) foram conduzidas em termociclador GeneAMP PCR System 9700 (Applied Biosystems), num volume de 13 μ L contendo: 2 μ L do DNA genômico, 1,3 μ l Tampão 10x, 1,04 μ l dNTP 2,5 mM, 1,04 μ l BSA 2,5 mg/ml, 3,0 μ l Iniciador 10 ng/ μ l, 0,2 μ l Taq DNA polimerase 5 U/ μ l e 4,42 μ l de H₂O Milli Q estéril. Sobre cada reação foram adicionados 30 μ l de óleo mineral puro, para impedir que a reação evaporasse quando exposta as altas temperaturas no termociclador. O programa utilizado para essa PCR consistiu de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 min, anelamento a 35°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min e um passo final de extensão da fita amplificada de 7 min a 72°C.

Após amplificação, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE 1X sob uma voltagem constante de 120 Volts durante 4 a 5 horas. O DNA padrão, com fragmentos de tamanhos conhecidos utilizado foi 1kb Ladder. A visualização

dos fragmentos de DNA amplificados foi realizada pela detecção em luz ultravioleta e o gel foi fotodocumentado por sistema eletrônico de captura de imagem da Kodak (Kodak Molecular Imagem 4.5.0).

3.4.3 Leitura e análise dos dados moleculares

Para análise dos dados, cada fragmento amplificado foi considerado como um loco RAPD, sendo denominado pelo primer utilizado seguido de uma letra correspondente ao peso molecular do fragmento, de modo que o maior fragmento recebeu a letra *a*, o subsequente a letra *b* e assim por diante. Locos RAPD consistentes foram analisados para presença (1) ou ausência (0) de bandas e uma matriz com os diferentes fenótipos RAPD foi montada. Como os marcadores RAPD são de natureza dominante, assumiu-se a presença de dois alelos por loco.

Utilizando a matriz gerada pelos dados foram calculados valores de similaridade entre as bandas RAPD utilizando a fórmula abaixo, segundo Lynch (1990):

$$S_{xy} = \frac{N_{xy}}{N_x \cdot N_y}$$

Onde, N_{xy} é o número de bandas em comum e N_x e N_y são os números de bandas em dois indivíduos que estão sendo comparados. Um par de indivíduos pode ter 0, 1 ou 2 bandas em comum em cada loco.

Com os valores de similaridade foi construída uma matriz correspondente, a qual foi usada para gerar um dendrograma pelo método UPGMA. Essas análises foram feitas com o programa NTSYS Versão 2.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FENOLOGIA REPRODUTIVA

A avaliação dos eventos fenológicos das castanheiras teve início no mês de novembro de 2007.

No início das observações 49,12% dos indivíduos já apresentavam botões florais e 30,04% apresentavam flores. O ponto máximo de florescimento no ano de 2007 ocorreu no mês de dezembro, quando 50,66% dos indivíduos monitorados estavam florescendo (Gráfico 02).

Em 2008 o início da floração ocorreu no mês de setembro com apenas 1,32% das árvores apresentando as primeiras flores. Em relação ao ano de 2007, a floração de 2008 foi menos intensa em termos do número de flores por árvore. Apesar dessa diferença observada, a porcentagem de árvores florescendo nos dois anos foi semelhante, coincidindo com o período em que a precipitação pluviométrica aumenta (Gráfico 01).

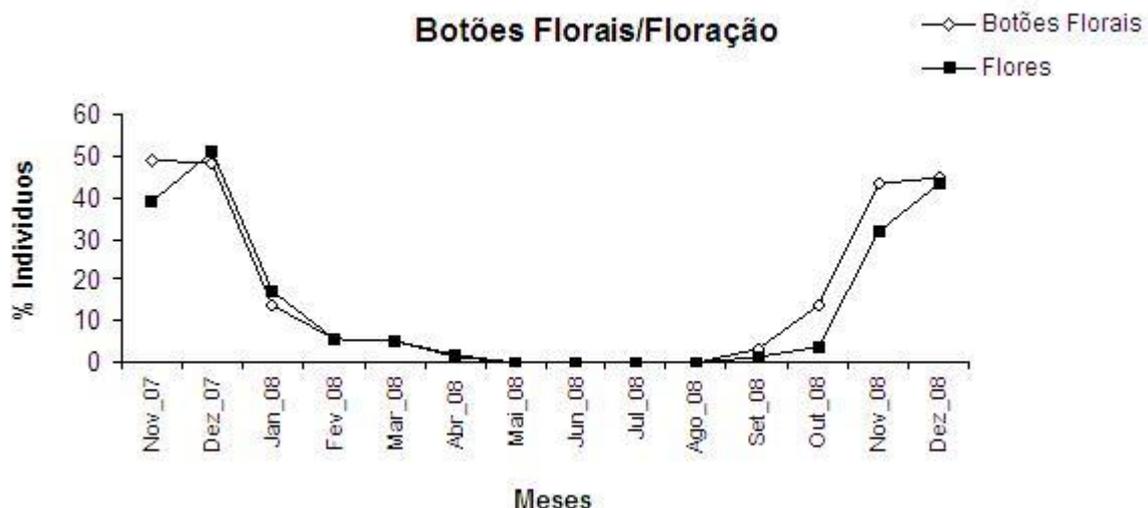


GRÁFICO 02 - Porcentagem de indivíduos com botões e flores no período de novembro de 2007 a dezembro de 2008.

Nesse plantio, nem todas as castanheiras floresceram. Até o mês de dezembro de 2008 o máximo de árvores com flores durante todo o período do estudo foi de 50%, ao contrário do que ocorre em ambiente de floresta natural, onde praticamente 100% das castanheiras florescem todos os anos (LIMA et al., 2007). Com relação ao desenvolvimento de frutos, observou-se que no início do estudo apenas 10% dos indivíduos apresentavam frutos em desenvolvimento. Estes frutos eram oriundos da floração do ano de 2006 que estavam amadurecendo e dispersando lentamente no mesmo período do início dos frutos novos da safra de 2007.

Em 2007, os frutos novos apareceram no final do mês de novembro, atingindo o ponto máximo de árvores frutificando em janeiro de 2008, mesmo mês que ocorreu a maior intensidade de chuvas. O período de desenvolvimento dos frutos foi verificado entre os meses de fevereiro de 2007 a novembro de 2008, sendo que após esse período foram considerados como maduros, pois já estavam entrando no período de dispersão (Gráfico 03). No mês de outubro de 2008 houve registro de 2,63% das árvores com frutos no chão.

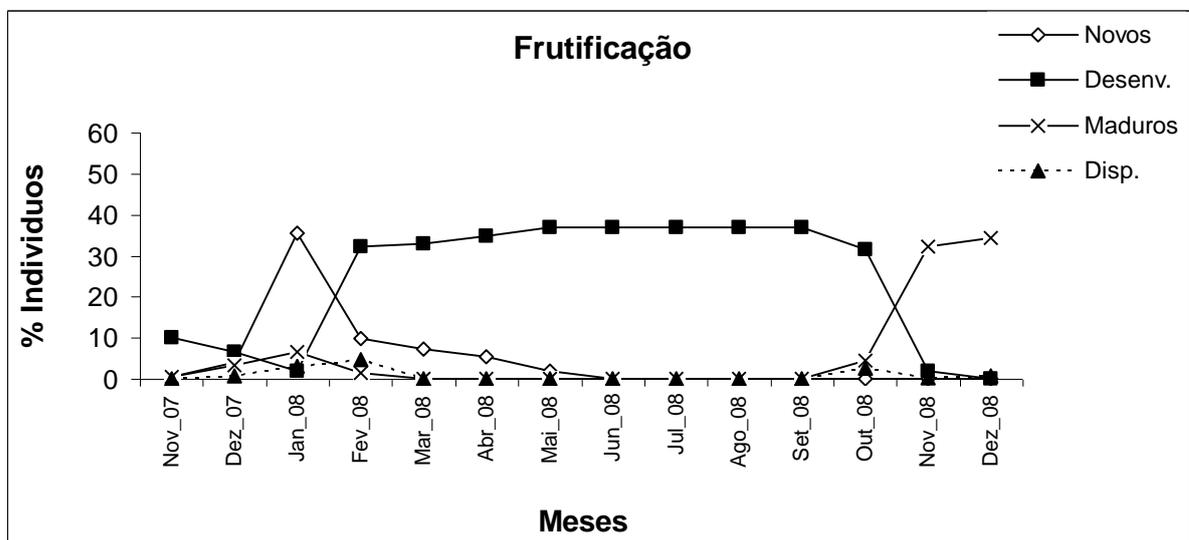


GRÁFICO 03 - Porcentagem de indivíduos frutificando no período de novembro de 2007 a dezembro de 2008.

No ano de 2007 não foi observado o desfolhamento das castanheiras, muito provavelmente pelo período em que o estudo foi iniciado, pois parece que houve desfolhamento devido mais de 90% das árvores apresentaram folhas novas.

Em 2008, o desfolhamento das árvores teve início no mês de abril e foi observado até o mês de setembro, com pico em julho onde quase 60% das castanheiras apresentaram-se sem folhas (Gráfico 04). No mês seguinte, 92,11% das árvores já estavam apresentando folhas novas, havendo um decréscimo nos meses de setembro a novembro, se elevando novamente em dezembro. A partir do período em que muitas árvores apresentaram desfolhamento observou-se quase o dobro de árvores com folhas novas, o que ocorreu pelo fato de algumas árvores apresentarem somente o enfolhamento parcial.

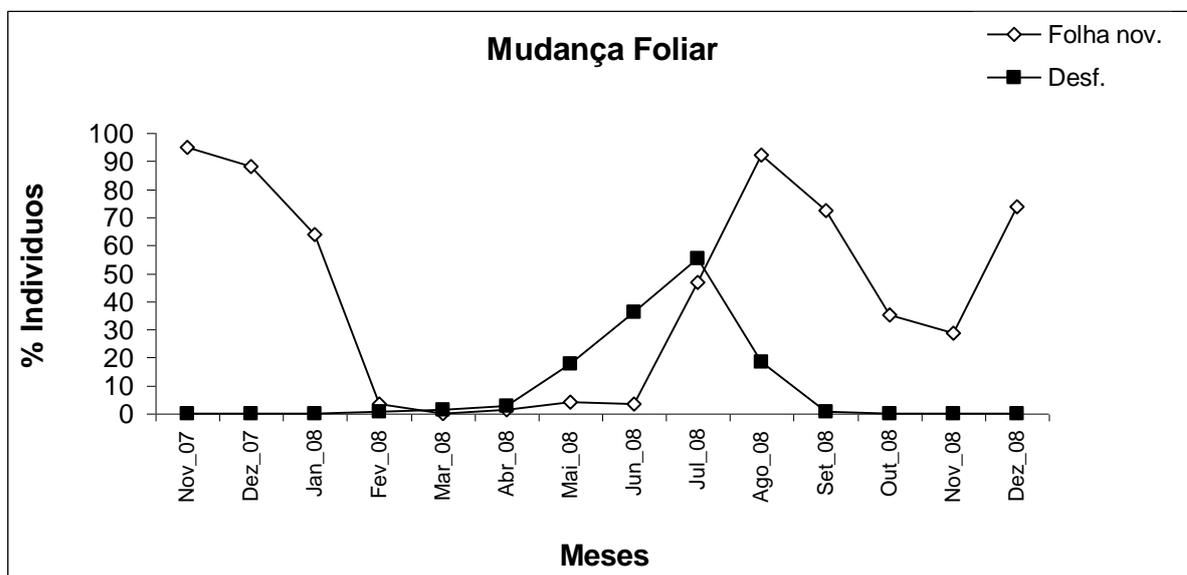


GRÁFICO 04 - Porcentagem de indivíduos apresentando mudança foliar no período de novembro de 2007 a dezembro de 2008.

4.2 SISTEMA REPRODUTIVO

Os tratamentos de polinização de castanheira tiveram início no dia 27 de novembro de 2007. No Quadro 2 está apresentado a quantidade de flores utilizadas em cada tratamento. O tratamento de autopolinização espontânea foi o tratamento em que mais se utilizou flores, e a xenogamia foi o de menor flores avaliadas, com 87 flores manipuladas. Essa diferença ocorreu devido à disponibilidade de flores em cada inflorescência ensacada. Todos os tratamentos foram realizados a partir das 6:00h da manhã, uma vez que segundo Muller et al. (1980) os horários em que

ocorrem melhores taxas de fecundação das flores e conseqüentemente vingamento dos frutos são entre 6h e 8h.

Após 20 dias dos tratamentos realizados nas inflorescências isoladas, foi feito um monitoramento para a verificação da formação de frutos. Os resultados mostraram que os tratamentos em que as flores foram isoladas e polinizadas manualmente não obtiveram nenhum fruto iniciado, ao contrário do tratamento controle que iniciou um fruto, sendo que este não chegou ao estágio de maturação.

QUADRO 02 - Número de flores utilizadas nos tratamentos

Tratamento	Nº de flores usadas	Frutos iniciados	Frutos maduros
Autopolinização espontânea	841	0	0
Autopolinização induzida	141	0	0
Xenogamia	87	0	0
Controle	772	1	0

4.3 HORÁRIO DA ANTESE

Pelo fato dos tratamentos de polinização não terem dado resultado, realizou-se experimento para verificar o horário da antese e também dos melhores horários de viabilidade do pólen e receptividade do estigma das flores de castanheira nas condições do plantio, em Rio Branco, AC.

O processo de abertura da flor da castanheira foi muito lento. Por volta das 19h observou-se o descolamento da pétala que fica na parte superior do botão e a flor foi se abrindo de maneira muito lenta, estando completamente aberta somente às 3h da manhã do dia seguinte (Figura 05).

Neste trabalho, o processo de abertura das flores foi diferente do relatado por Cavalcante (2008), em que as flores de castanheiras plantadas em Itacoatiara-AM, iniciaram a abertura às 3h estando completamente abertas às 4h da manhã, ou seja um processo de abertura durou apenas 1 hora, enquanto que no Acre, esse mesmo processo demorou cerca de 8 horas.

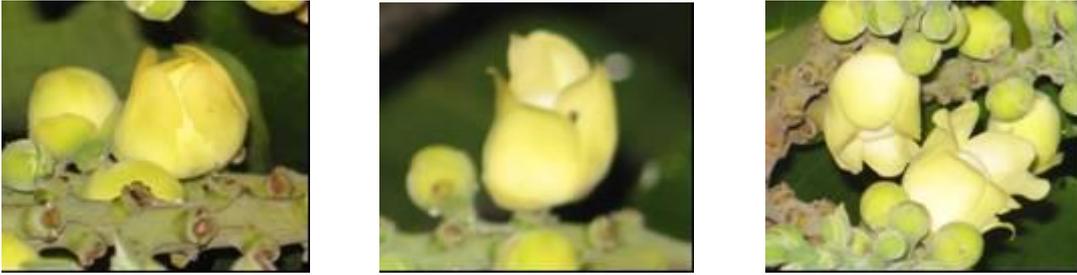


FIGURA 05 - Processo de abertura da flor de castanheira.

4.4 VIABILIDADE DO PÓLEN E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA

Para cada horário foram contados, em média, 1933 grãos de pólen, dos quais 971 foram viáveis (Figura 06). Para verificar o melhor horário em que os polens estão viáveis, calculou-se a porcentagem de grãos de pólen viáveis em relação ao total contado para cada lâmina e em cada horário. A partir da média das lâminas calculou-se a média de grãos de pólen viáveis para cada horário, sendo esses valores comparados com a porcentagem de estigmas receptivos (Gráfico 05).

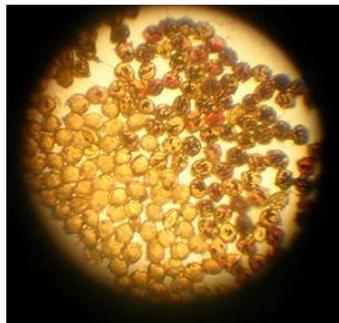


FIGURA 06 - Grãos de pólen viáveis (escuros) e não viáveis (amarelos).

Verificou-se que a maioria dos grãos pólen estavam viáveis a partir das 6h da manhã, apresentando a maior média às 8h com 64% de viabilidade. No entanto, o período em que o estigma mostrou-se mais receptivo foi de 9h às 11h, com 100% de receptividade por volta das 10h. Os resultados mostraram que embora a viabilidade do pólen tenha diminuído a partir das 8h, quando o estigma torna-se mais receptivo,

ainda houve cerca de 40 a 50% dos grãos de pólen viáveis, permitindo o processo de fecundação das flores.

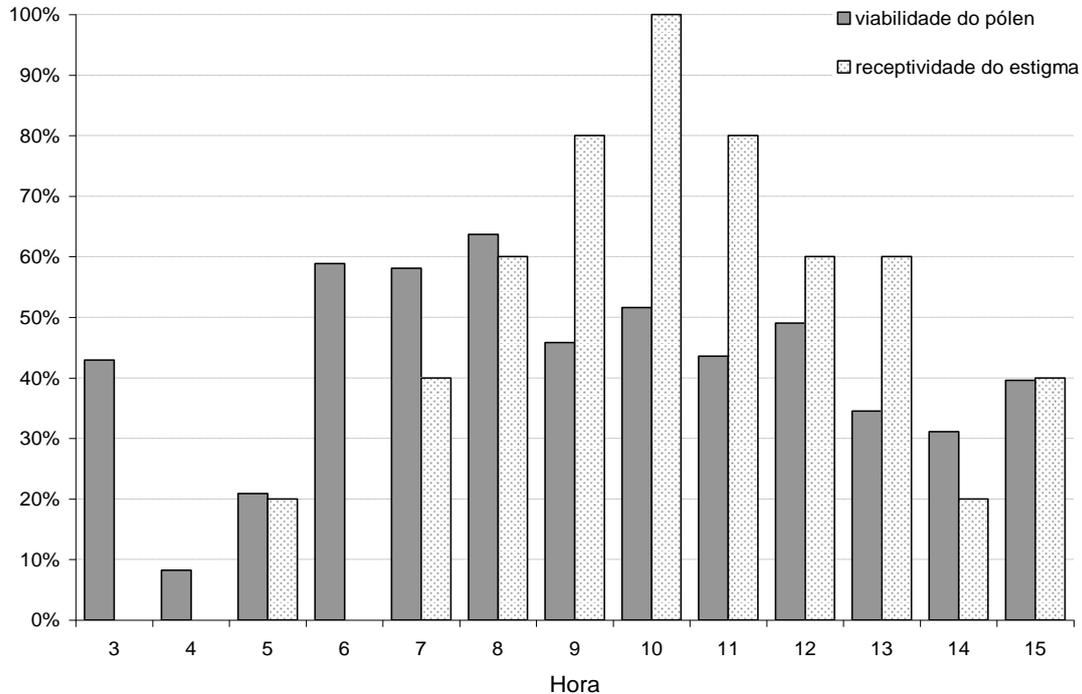


GRÁFICO 05 – Porcentagem de grãos de pólen viáveis e estigmas receptivos para cada horário avaliado.

4.5 OBSERVAÇÃO DE TUBO POLÍNICO NO ESTILETE

A avaliação da formação de tubo polínico por meio de microscopia de fluorescência mostrou que para a maioria das flores analisadas houve a formação de tubos polínicos por parte dos grãos de pólen, no entanto não foi visualizado para nenhuma flor a fertilização de óvulos (Figura 07).

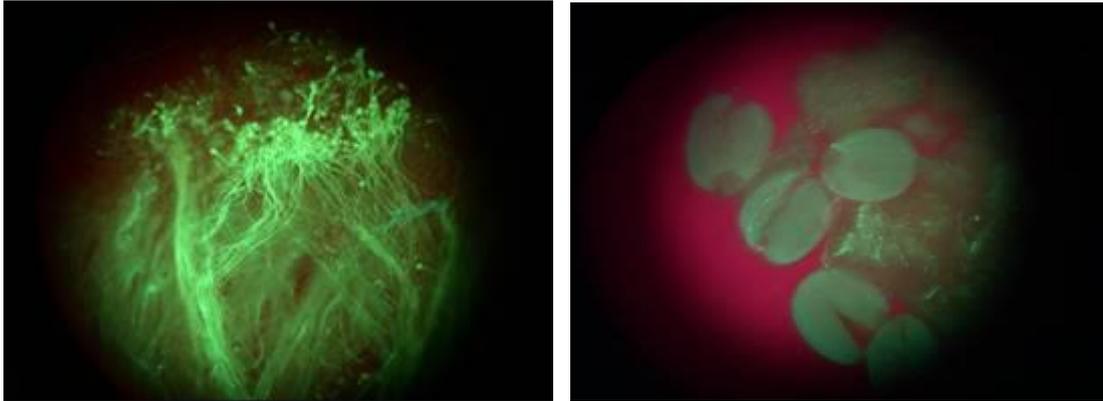


FIGURA 07 - Germinação do tubo polínico e óvulos da flor da castanheira, visualizados por microscopia com epifluorescência.

4.6 MORFOMETRIA FLORAL

De acordo com as médias obtidas, observou-se que a árvore 34, apesar de terem sido utilizadas poucas flores, apresentou o ovário de tamanho inferior das demais árvores, como por exemplo comprimento do ovário, largura do ovário e base do estilete (Quadro 03). O número médio de estames por flores variou de 82,5 a 174,7 e foi a medida que mais variou entre as árvores.

Em relação a quantidade de lóculos por ovário, observou-se que a maioria das flores analisadas possuíam ovários com quatro lóculos, embora algumas apresentaram cinco lóculos conforme já observado por Moritz (1984). A Figura 08 mostra a diferença em termos do número de lóculos por ovário.

QUADRO 03 - Médias para as variáveis avaliadas de morfometria floral de castanheira, em plantio no Acre

Variáveis	Árvores						Média geral
	34	40	47	68	70	76	
n	3	10	9	6	9	5	7
Comp. Ovário (mm)	3,15	3,80	3,51	3,38	3,38	3,29	3,48
Largura do ovário (mm)	3,80	4,21	4,22	4,09	4,03	4,12	4,12
Nº lóculos	4,33	4,10	4,00	4,00	4,00	4,60	4,12
Nº estames	129,67	82,90	174,67	82,50	97,56	112,80	112,55
Base do estilete (mm)	1,08	1,22	1,20	1,14	1,13	1,21	1,17
Estigma (mm)	0,66	0,65	0,62	0,66	0,61	0,67	0,64



FIGURA 08 - Corte transversal de ovários com 4 e 5 lóculos.

Análise de agrupamento pelo método UPGMA, utilizando a distância Euclideana, mostrou que a árvore 47 formou um grupo sozinho, as árvores 34 e 76 formaram outro grupo e as demais formaram um terceiro grupo, sendo que dentro deste a árvore 70 formou um sub-grupo (Figura 09). De um modo geral, apenas as árvores 68 e 40 não puderam ser diferenciadas.

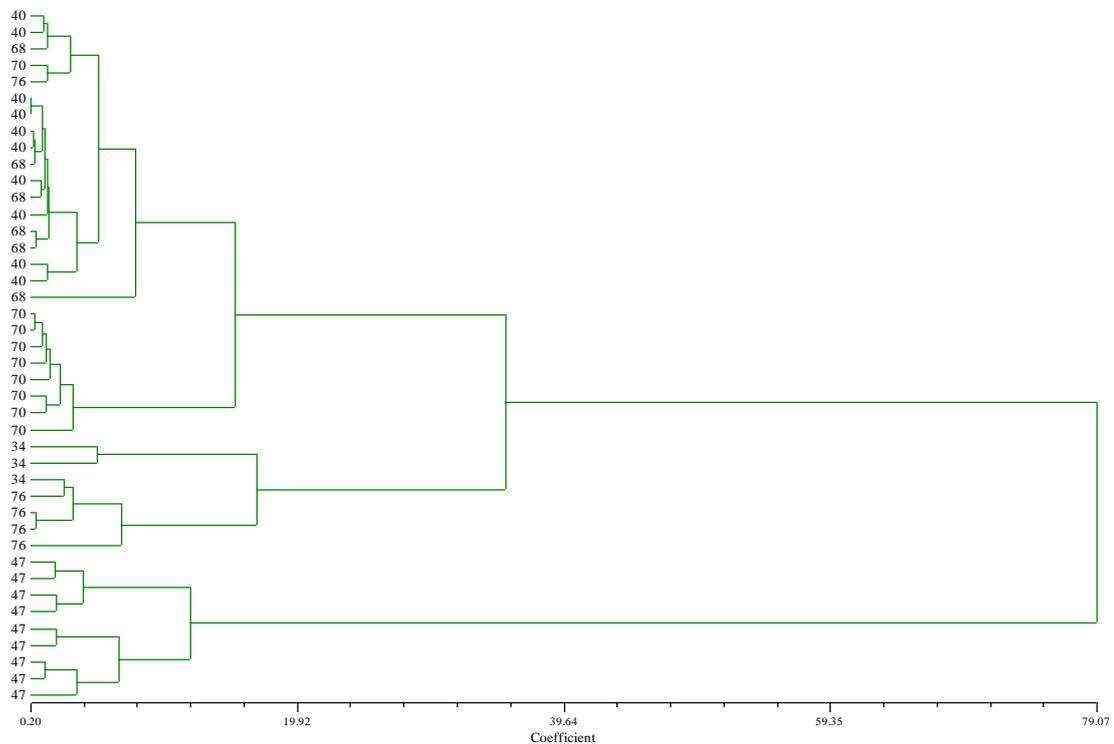


FIGURA 09 – Dendrograma da dissimilaridade pelo método UPGMA.

Estes resultados sugerem que os indivíduos de castanheira podem ter as características bem definidas para a parte floral. Sugere-se repetir estas análises com flores de castanheiras nativas para verificar se os resultados serão semelhantes ou não.

4.7 VARIABILIDADE GENÉTICA DAS ÁRVORES DO PLANTIO

Os 13 iniciadores utilizados para a análise geraram 40 marcadores polimórficos. Dos 76 indivíduos de castanheiras do plantio 63 foram analisados para a variabilidade genética devido a problemas provenientes na amplificação do DNA, ou seja, 13 indivíduos apresentaram falhas nos géis.

Os 63 indivíduos mostraram-se diferentes entre si. Observou-se a formação de três grupos genéticos (Figura 10).

Para comparação, a mesma análise de agrupamento foi realizada com dados RAPD provenientes de outro estudo onde foram avaliadas 22 árvores de população natural da Reserva Extrativista Chico Mendes (Ser. Filipinas) e 45 árvores de outra população natural do PAE Caquetá (Ser. Limoeiro) (Figura 11).

Os resultados mostraram que no plantio as árvores se agruparam de forma mais consistente, pois observou-se a formação de grupos distintos no plantio enquanto que nas populações naturais, as árvores se misturaram mais.

Os coeficientes de similaridade entre os grupos formados com as árvores do plantio foram menores que os observados com as árvores das populações naturais, Esse resultado sugere que a variabilidade genética representada no plantio pode ser maior que aquela das duas populações naturais do Acre. Como não se sabe a origem dos materiais genéticos que formaram o plantio, não tem como tirar maiores conclusões. No entanto, há possibilidade de que as sementes que originaram as árvores do plantio foram provenientes de várias regiões e até de estados diferentes. Na Embrapa, esse plantio foi caracterizado inicialmente como uma Banco de Germoplasma.

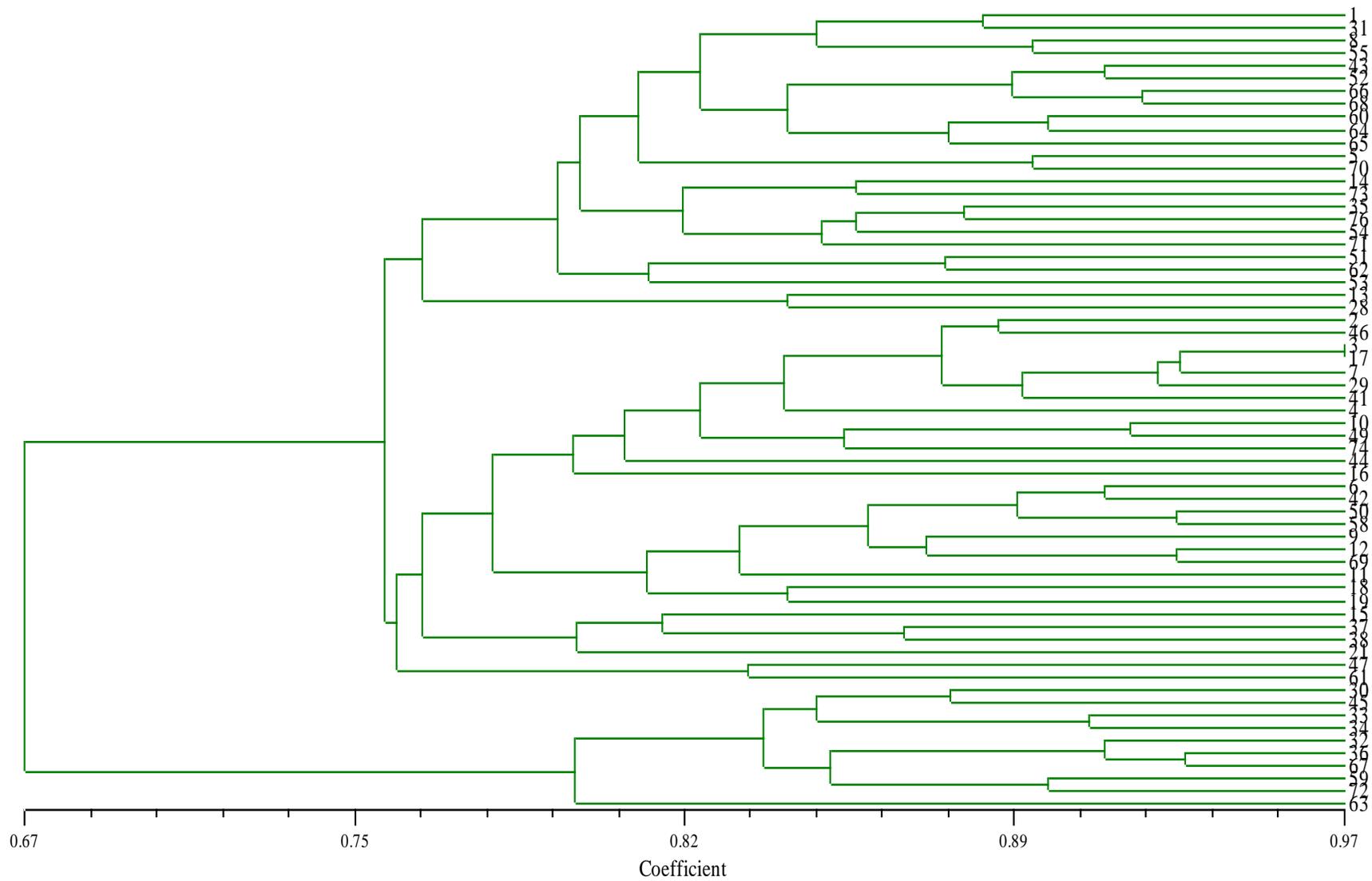


Figura 10 – Dendrograma da similaridade pelo método UPGMA das castanheiras do plantio.

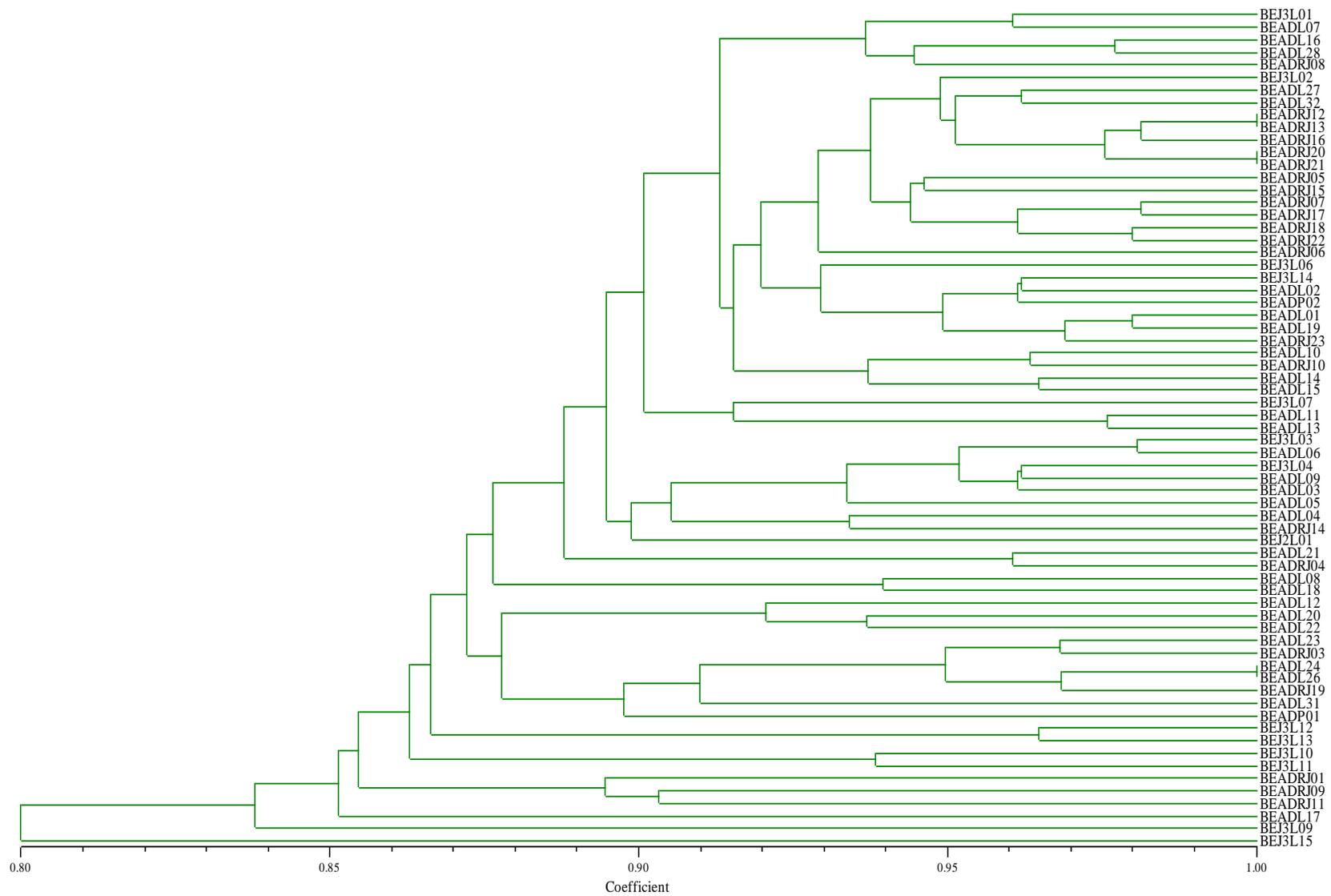


Figura 11 - Dendrograma da similaridade pelo método UPGMA das castanheiras da floresta primária

5 CONCLUSÃO

Apenas 50% dos indivíduos do plantio floresceram nos anos de 2007 e 2008, mostrando que este plantio apresenta uma certa deficiência na floração, pois em floresta nativa é comum que praticamente 100% das árvores floresçam a cada ano.

O ponto máximo de árvores apresentando frutos novos coincidiu com o mês que ocorreu a maior intensidade de chuvas.

Os tratamentos de polinização controlada não tiveram sucesso, sendo necessário repetir o experimento;

O horário da antese da flor da castanheira foi às 3h.

O horário em que o estigma da flor da castanheira se mostrou mais receptivo foi por volta das 10h, enquanto que a maioria dos grãos de pólen (cerca de 60%) estavam viáveis no período de 6 às 8h;

O período mais indicado para polinização artificial das flores de castanheiras, nesse plantio, é das 9 às 12h;

Houve formação de tubos polínicos em todas as flores analisadas, mas nenhum óvulo foi fertilizado.

As flores das castanheiras analisadas apresentaram características morfológicas específicas para cada árvore, com exceção de duas árvores que não puderam ser diferenciadas.

A hipótese de que as castanheiras do plantio são clones foi refutada pelos resultados genéticos obtidos por marcadores RAPD e aparentemente há maior diversidade genética representada no plantio do que em árvores de duas populações naturais do Estado do Acre.

REFERÊNCIAS

ARGOLO, V. M.; WADT, L. H. O. Abelhas visitantes de flores de *Bertholletia excelsa* em área de plantio e floresta nativa - Rio Branco Acre. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 6., 2003, Fortaleza. **Anais de trabalhos completos**. Fortaleza: Editora da Universidade do Ceará, 2003.

CAVALCANTE, M. C. **Visitantes florais e polinização da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. & B.) em cultivo na Amazônia Central**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

CLAY, W. J. Brazil Nuts. The use of a keystone species for conservation and development. In: tree-se, Cintis (ed). Harvesting wild species: Implications for biodiversity conservation. The John Hopkins University Press, Baltimore. p. 246-282, 1997.

CORRÊA, M. PIO. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e da exótica cultivada**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. p. 129-131

CYMERYS, M.; WADT, L.H.O.; KAINER, K.; ARGOLO, V. Castanheira. In: SHANLEY, P.; MEDINA, G. (Eds.) **Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônica**. Belém: CIFOR & Imazon, p. 61-73, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

IBGE/SIDRA. Extração vegetal. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em 28 dez. 2007.

KAGEYAMA, P. Y.; CARON, D., GANDARA, F. B., MARTINS, K., WADT, L. H. O.; LACERDA, C. M. B. de.; BOUFLEUER, N. T.; RIBAS, L. A.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E. M. Genetic and ecological aspects of nonwoods forest products exploitation in two western Amazonian settlements. In: Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil ed. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 2004, p. 149-217.

KAINER, K. A.; WADT, L. H.O.; STAUDHAMMER C. L. Explaining variation in Brazil nut fruit production. **Forest Ecology and Management** v. 250, p. 244–255, 2007.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. 1993. **Techniques for pollination biologists**. University Press of Colorado. 583p.

LIMA, L. M. S.; WADT, L. H. O.; KLIMAS C. Fenologia de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), Castanheira (*Bertholletia excelsa* HBK.) e Copaíba (*Copaifera* spp), No Município de Rio Branco, Acre. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007, Rio Branco. Rio Branco: Universidade Federal do Acre, 2007.

LOCATELLI, M.; VIEIRA, A. H.; BENTES-GAMA, M. M.; FERREIRA, M. G. R.; MARTINS, E. P.; SILVA FILHO, E. P.; SOUZA, V. F.; MACEDO, R. S. **Cultivo da castanha-do-Brasil em Rondônia**. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2005. Versão eletrônica. Sistemas de Produção 7.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, 4. ed. 384 p.

LYNCH, M. The similarity index and DNA fingerprinting. **Molecular Biology and Evolution**, v.7, p. 478 – 484,1990.

MAUÉS, M. M. Reproductive phenology and pollination of the brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb.& Bonpl.) in eastern Amazônia. In: KEVAN, P. & IMPERATRIZ FONSECA. **Pollinating Bees - The conservation link between agriculture and nature**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2002. p. 245-254.

MAUÉS, M. M. **Estratégias reprodutivas de espécies arbóreas e a sua importância para o manejo e conservação florestal: Floresta Nacional do Tapajós (Belterra-PA)**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, DF, 2006.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, v. 8, p. 130-150, 1990.

MORITZ, A. **Estudos biológicos da floração e da frutificação da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. And Bonpl.; Lecythidaceae)**. EMBRAPA-CPATU, Documentos n. 28, 82 p. 1984.

MÜLLER, C. H.; RODRIGUES, I. A; MÜLLER, A. A.; MÜLLER, N. R. M.. 1980. **Castanha-do-Brasil, resultados de pesquisa**. Belém, EMBRAPA-CPATU. Miscelânea, n.2.

MULLER, C. H.; FIGUEIREDO, F. J. C.; KATO, A. K. CARVALHO, J. E. U. de; STEIN, R. L. B; SILVA, A. de B. Castanha-do-brasil. Brasília, Embrapa-SPI, Coleção Plantar, 1995. 65p.

NELSON, B. W.; ABSY, M. L.; BARBOSA, E. M.; PRANCE, G. T. Observations on flower visitors to *Bertholletia excelsa* H.B.K. and *Couratari tenuicarpa* A.C.SM. (Lecythidaceae). **Acta Amazônica**, v.1/2, supl. 5, p.225-234, 1985.

OLIVEIRA, M. V. N. d'. **Composição florística e potenciais madeireiro e extrativista em uma área de floresta do Estado do Acre**. Rio Branco: EMBRAPA-CPAF-Acre, 1994. 42 p. (Boletim de Pesquisa, 9).

ORTIZ, E.G. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). In: SHANLEY, P.; PIERCE A. R.; LAIRD, S. A.; GUILLEN, A. (Eds.), **Tapping the green market: Certification & management of non-timber forest products**. London: Earthscan Publications Ltd, 2002. p. 61-74.

PARDO, M. De. **Estrutura Genética de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) em Floresta e em pastagens no Leste do Estado do Acre**. 2001. 72f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

PERES, C. O.; BAIDER, C.; ZUIDEMA, P. A.; WADT, L. H. O.; LAINER, K. A.; GOMES-SILVA, D. A. P.; SALOMÃO, R. P.; SIMÕES, L. L. FRANCISIOSI, E. R. N.; VALVERDE, F. C.; GRIBEL, R.; SHEPARD Jr, G. H.; KANASHIRO, M.; CONVENTRY, P.; YU, D. W.; WATKINSON, A. R.; FRECKLETON, R. P. Demographic threats to the sustainability of Brazil nut exploitation. **Science**, v. 302, p. 2112-2114. 2003.

PRANCE, G. T.; MORE, S. A. Lecythidaceae. **Flora Neotropica**, v. 21, n. 1, p. 1-270, 1979.

SOUZA, A. H. de, 1963. **Castanha do Pará: estudo botânico, químico e tecnológico**. Estudos Técnicos, 23. Ministério da Agricultura-Serviço de Informação Agrícola, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry, and management**. New York: Springer Verlag, 1974. 307 p.

TONINI, H.; ARCO-VERDE, M. F. **A castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*): crescimento, potencialidades e usos**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2004. 29p. (Embrapa Roraima. Documentos, 3)

ZUIDEMA, P. A.; BOOT, R. G. A. Demography of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) in the Bolivian Amazon: impact of seed extraction on recruitment and population dynamics. **Journal of Tropical Ecology**, v. 18, p. 1-31, 2002.