



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia



Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

**EFEITOS DE POLINIZAÇÕES MISTAS EM ESPÉCIES
AUTOINCOMPATÍVEIS DE BIGNONIACEAE**

Mestranda: Mariana Oliveira Duarte

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

UBERLÂNDIA-MG

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia



Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

**EFEITOS DE POLINIZAÇÕES MISTAS EM ESPÉCIES
AUTOINCOMPATÍVEIS DE BIGNONIACEAE**

Mestranda: Mariana Oliveira Duarte

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Vegetal.

UBERLÂNDIA – MG

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia



Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

**EFEITOS DE POLINIZAÇÕES MISTAS EM ESPÉCIES
AUTOINCOMPATÍVEIS DE BIGNONIACEAE**


Mestranda: Mariana Oliveira Duarte

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente
(Orientador):


Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia

Examinadores:


Prof. Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
(UNESP-Campus São José do Rio Preto, SP)


Dr. Clesnan Mendes Rodrigues
Universidade Federal de Uberlândia

Dissertação aprovada em 28 / 02 / 2014

UBERLÂNDIA-MG

2014

D812c Duarte, Mariana Oliveira, 1989-
2014 Efeitos de polinizações mistas em espécies autoincompatíveis de
Bignoniaceae / Mariana Oliveira Duarte. -- 2014.
79 f. : il.

Orientador: Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira.
Coorientadora: Diana Salles Sampaio.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.
Inclui bibliografia.

1. Botânica - Teses. 2. Polinização - Teses. 3. Bignoniaceae - Teses.
4. Endosperma - Teses. 5. Germinação - Teses. I. Oliveira, Paulo Eugê-
nio Alves Macedo de. II. Sampaio, Diana Salles. III. Universidade Fede-
ral de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. IV.
Título.

*Dedico aos meus pais, Luciano e
Maria Inês, que sempre me
incentivaram a buscar os meus
sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter colocado no meu caminho tantas pessoas especiais durante estes dois anos, as quais contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização e conclusão deste trabalho, em especial...

Ao professor Dr. Paulo Eugênio Oliveira, por ter aceitado a me orientar e acreditado neste projeto. Por todo o conhecimento compartilhado, paciência, apoio e sugestões que foram importantes para elaboração deste trabalho. E por ter contribuído para minha formação acadêmica.

À professora Dra. Diana Salles Sampaio, primeiramente por ter confiado em mim e ter me apresentado à sua família tão querida, Bignoniaceae. Por todos os ensinamentos, pela dedicação a este projeto, por todas as considerações feitas neste trabalho, paciência, amizade e por ter feito parte da minha formação acadêmica.

À professora Dra. Rosane Garcia Collevatti (Universidade Federal de Goiás-UFG), pela colaboração neste trabalho e pela oportunidade de conhecer a técnica de genotipagem. À Ludymilla Guedes, técnica do Laboratório de Genética e Biodiversidade - UFG, por ter nos ensinado a metodologia para os procedimentos de genotipagem e por tirar nossas constantes dúvidas ao longo deste estudo.

Às doutorandas, Ana Carolina Cordeiro Dias e Rafaela Cabral Marinho, por terem se disponibilizado a me ajudar com as análises de biologia molecular, por todos os conhecimentos compartilhados e pela amizade. E à professora Dra. Ana Maria Bonetti por disponibilizado o laboratório de genética-UFU.

À minha amiga Mariana Ferreira Alves, por ter ajudado em vários momentos durante a realização deste trabalho e, principalmente, pela companhia e amizade durante todos esses anos.

Aos amigos Jefferson Rodrigues de Souza, Júlio Henrique Magalhães e Pamella Paula pelo auxílio, dedicação e companhia no trabalho de campo.

Ao Dr. Clesnan Mendes-Rodrigues pela ajuda e conselhos nos procedimentos de germinação e aos auxílios nas estatísticas. E ao doutorando Pietro K. Maruyama Mendonça por tirar minhas dúvidas quanto às análises estatísticas.

Ao Instituto Brasília Ambiental -IBRAM por ter concedido a autorização para pesquisa na Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE). Aos funcionários da ESECAE pela atenção e hospitalidade, em especial Willian, Misael, Igor e Abílio por terem nos acompanhado e nos ajudado no campo.

Aos colegas do Laboratório de Morfologia Vegetal, Microscopia e Imagem (LAMOVI), em especial Mariana, Pamella, Ludimila, Stéphanie, Rafael, Kleber, Wesley, Nayara, Lígia e Angélica pela companhia e conversas, e por terem me proporcionado tantos momentos de felicidade durante esses anos.

Aos membros da banca, Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior e Dr. Clesnan Mendes-Rodrigues, que certamente trarão valiosas colaborações a este trabalho e por terem aceitado o convite.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida e pelo auxílio financeiro concedido ao projeto CAPES/PNPD 23038008068/2010-95.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro concedido ao projeto APQ 00593-11.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, aos professores do programa pelo conhecimento compartilhado, e aos colegas da terceira turma pela companhia e amizade.

À secretária do programa, Nívia Maria, que sempre esteve disposta a ajudar e às demais secretárias do Instituto de Biologia pelo serviço prestado.

Ao Adriel que sempre esteve ao meu lado, me incentivando e apoiando a percorrer este caminho, pela companhia e força na etapa final deste trabalho.

Aos meus pais, Luciano e Maria Inês, que sempre me incentivaram a alcançar caminhos cada vez mais distantes e pelo constante apoio durante estes dois anos. E à minha irmã, Carolina, pelo apoio e ajuda durante os experimentos de germinação.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	03
INTRODUÇÃO GERAL	05
<i>Sistemas sexuais e polinização.....</i>	<i>05</i>
<i>Fecundação cruzada vs. autofecundação</i>	<i>06</i>
<i>Mecanismos para evitar a autofecundação</i>	<i>06</i>
<i>Autoincompatibilidade de ação tardia vs. depressão endogâmica.....</i>	<i>08</i>
<i>Flexibilidade no sistema de autoincompatibilidade de ação tardia</i>	<i>09</i>
<i>Objetivo geral.....</i>	<i>11</i>
<i>Estrutura da dissertação</i>	<i>11</i>
<i>Referências bibliográficas.....</i>	<i>12</i>
CAPÍTULO 1 - FRUTIFICAÇÃO POR POLINIZAÇÕES MISTAS EM DUAS ESPÉCIES DE BIGNONIACEAE COM AUTOINCOMPATIBILIDADE DE AÇÃO TARDIA	16
Resumo	17
Introdução.....	19
Material e métodos	21
Resultados	23
Discussão	28
Referências bibliográficas.....	32
CAPÍTULO 2 - AUTOINCOMPATIBILIDADE DE AÇÃO TARDIA E POLINIZAÇÕES MISTAS EM <i>TABEBUIA AUREA</i> (BIGNONIACEAE)	36
Resumo	37
Introdução.....	39

Material e métodos	41
Resultados	46
Discussão	58
Referências bibliográficas.....	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
<i>Referências bibliográficas.....</i>	<i>69</i>

RESUMO

DUARTE, M.O. 2014. **Efeitos de polinizações mistas em espécies autoincompatíveis de Bignoniaceae**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. 70p.

As angiospermas apresentam diferentes estratégias para evitar que ocorra a autofecundação, seja por mecanismos pré-polinização (hercogamia e dicogamia) ou por mecanismos pós-polinização (sistema de autoincompatibilidade e depressão endogâmica). Algumas espécies apresentam o sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (AIT), que pode atuar depois da penetração ou da fecundação no óvulo, causando a abscisão do pistilo autopolinizado. Entretanto, alguns estudos realizados com espécies que apresentam AIT relataram a formação de sementes decorrentes de autofecundação após polinizações mistas (grãos de pólen cruzados + grãos de pólen próprios). No presente trabalho investigou-se a possibilidade de formação de frutos e de sementes autofecundadas viáveis provenientes de polinizações mistas em três espécies de Bignoniaceae com AIT, *Adenocalymma peregrinum*, *Fridericia platyphylla* e *Tabebuia aurea*. Para tal, foram realizadas polinizações experimentais, teste de germinação de sementes (*A. peregrinum*), análises histológicas de eventos pós-polinização e teste de paternidade (*T. aurea*). As três espécies formaram frutos após as polinizações mistas e polinizações cruzadas, no entanto, apresentaram uma taxa de frutificação menor em polinizações mistas. Os pistilos submetidos à autopolinização foram abortados em um período de tempo uniforme em todas as espécies, confirmando a presença do AIT. Em *A. peregrinum* verificou-se uma maior porcentagem de sementes sem embrião em frutos provenientes de polinização mista. A menor germinabilidade das sementes de frutos por polinização mista desta espécie pode indicar a menor capacidade de sementes resultantes de autofecundação germinarem e uma possível atuação da depressão endogâmica. A baixa taxa de frutificação

natural em espécies com AIT pode ser explicada por uma elevada frequência de sementes oriundas de autofecundação em polinizações mistas, as quais devem ser comuns no ambiente natural. As análises do desenvolvimento do endosperma em *T. aurea* revelaram um atraso no desenvolvimento inicial deste tecido em óvulos de pistilos autopolinizados quando comparados aos óvulos de pistilos provenientes de polinização cruzada, sendo uma evidência da ação do AIT. A maioria dos óvulos de pistilos submetidos à polinização mista apresentava um número de células do endosperma semelhante aos óvulos de pistilos submetidos à polinização cruzada e nenhuma semente oriunda de autofecundação foi detectada no teste de paternidade. Embora testes de paternidade tenham detectado a presença de progênie autofecundada em algumas populações de espécies de Bignoniaceae, e a formação de frutos provenientes de polinizações mistas tenha se mostrado viável no presente trabalho, os dados obtidos neste estudo mostraram que as sementes provenientes de autofecundação parecem não terem sido formadas ou apresentaram menor vigor durante a germinação e emergência.

Palavras-chave: autoincompatibilidade de ação tardia, depressão endogâmica, desenvolvimento do endosperma, germinação de sementes.

ABSTRACT

DUARTE, M.O. 2014. **Effects of mixed pollinations on self-incompatible species of Bignoniaceae**. Dissertation. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. 70p.

The angiosperms have different strategies to prevent self-fertilization, either by pre-pollination mechanisms (herkogamy and dichogamy) or mechanisms for post-pollination (system of self-incompatibility and inbreeding depression). Some species present late-acting self-incompatibility (LSI), which can act after penetration or fertilization the ovule, causing abscission of selfed pistil. However, some studies on species with LSI reported the formation of seeds derived from selfing after mixed pollinations (pollen crossed + self-pollen). In the present work we investigated the possibility of formation of fruits and viable selfed seeds from mixed pollinations in three species of Bignoniaceae with LSI, *Adenocalymma peregrinum*, *Fridericia platyphylla* and *Tabebuia aurea*. We performed experimental pollination, germination of seeds (*A. peregrinum*), histological analysis of post-pollination events and paternity testing (*T. aurea*). The three species formed fruit after mixed pollination and cross-pollination, however, showed a lower rate of fruiting in mixed pollinations. The selfed pistils were aborted in a uniform period of time in all species, confirming the presence of the LSI. In *A. peregrinum* there was a greater percentage of seeds without embryo on fruit from mixed pollination. The lower germination of seeds of fruits mixed pollination of this species may indicate less ability to germinate seed from selfing and a possible role of inbreeding depression. The low rate of natural fruiting species with LSI can be explained by a high frequency the seeds resulting of self-fertilization after mixed pollinations, which should be common in the natural environment. Analysis of endosperm development in *T. aurea* showed a delay in the initial development of this tissue into ovules of selfed pistils compared

to the ovules of pistils from cross-pollination, evidence of the action of LSI. Most ovules from pistils after mixed pollination showed a number of endosperm cells similar to the ovules of pistils submitted cross-pollination and no seeds originated from selfing were detected in paternity testing. Although paternity tests have detected the presence of selfing progeny in some species populations of Bignoniaceae and fruits formation of mixed pollinations has proved viable in the present study, our data showed that seeds from selfing did not seem to be formed or were less viable during germination and emergence.

Keywords: endosperm development, inbreeding depression, late-acting self-incompatibility, seed germination.

INTRODUÇÃO GERAL

Sistemas sexuais e polinização

O estudo do sistema reprodutivo em plantas é um componente básico para entender os processos ecológicos, genéticos e evolutivos, contribuindo também com informações importantes para conservação e manejo das espécies. A reprodução sexual é importante para que haja variabilidade genética na população, entretanto, a constituição genética da progênie pode diferir ou não dos genótipos dos pais, e isto irá depender de diversos fatores relacionados ao sistema reprodutivo destas plantas (Richards 1997, Holsinger 2000).

A evolução de diversos sistemas sexuais nas angiospermas permitiu uma polinização mais precisa e uma maior diversidade de espécies capazes de alcançar diferentes habitats (Barrett 2010). Quando uma planta é considerada hermafrodita, a flor apresenta tanto o androceu quanto o gineceu (flores perfeitas). Se a flor apresenta apenas o androceu (flores estaminadas) ou somente o gineceu (flores pistiladas), mas com distribuição em um mesmo indivíduo, a planta é considerada monoica (potencialmente hermafrodita) (Richards 1997). Quando um indivíduo apresenta somente flores pistiladas e outro indivíduo flores estaminadas a planta é dioica (Tanurdzic & Banks 2004, Amorim & Oliveira 2006). Outras variações também podem ocorrer entre os três principais tipos de sistema sexual nas angiospermas (Richards 1997).

As diferentes estratégias do sistema sexual podem influenciar diretamente na qualidade da prole (Barrett 2010). As flores são estruturas adaptadas para que ocorra a transferência dos grãos de pólen, seja por vetores bióticos ou abióticos (Richards 1997, Oliveira & Gibbs 2000). A transferência natural dos grãos de pólen das anteras para o estigma da flor pode ocorrer por polinização cruzada entre indivíduos diferentes (xenogamia) ou por autopolinização, seja entre flores de um mesmo indivíduo (geitonogamia), ou dentro da mesma flor (autogamia) (Richards 1997).

Fecundação cruzada vs. autofecundação

A polinização cruzada pode levar à fecundação cruzada (fecundação do óvulo por um pólen de indivíduo diferente) (Richards 1997). Este tipo de fecundação proporciona maior rearranjo da diversidade genética, devido ao aumento da recombinação gênica que pode produzir uma progênie com maior vigor e aptidão (De Nettancourt 1997, Richards 1997). No entanto, para que haja fecundação cruzada é necessária a presença de polinizadores (Richards 1997, Oliveira & Gibbs 2000).

A autopolinização pode levar à autofecundação (fecundação do óvulo por um grão de pólen do mesmo indivíduo) (Richards 1997, Eckert 2000). Na autofecundação há um aumento da homozigose e maiores chances de alelos recessivos deletérios serem expressos, o que levaria a uma depressão por endogamia (De Nettancourt 1997, Richards 1997, Holsinger 2000). Entretanto, a autopolinização pode ser vantajosa em condições ambientais estáveis, em espécies que estão completamente adaptadas ao ambiente (Richards 1997, Stephenson et al. 2000). Muitas espécies apresentam um sistema reprodutivo misto, se reproduzindo tanto por autofecundação quanto por fecundação cruzada (Vogler & Kalisz 2001).

Mecanismos para evitar a autofecundação

Mais de 80% das angiospermas apresentam flores perfeitas, o que faz com que a eficiência do polinizador aumente, pois em uma única visita ele deposita os grãos de pólen no estigma e remove os grãos de pólen do estame (Richards 1997). Contudo, isto pode facilitar a deposição do grão de pólen próprio no estigma favorecendo a autofecundação (Gibbs 1990, Richards 1997). Isto pode ser evitado por diferentes mecanismos estruturais ou temporais (pré-polinização) e genéticos (pós-polinização) (Richards 1997, Barrett 2003).

Os mecanismos pré-polinização podem ocorrer devido uma separação espacial das partes florais (hercogamia), ou por diferenças temporais na maturação dos órgãos sexuais

(dicogamia) (Webb & Lloyd 1986, Bertin 1993). No entanto, estes mecanismos não necessariamente evitam a geitonogamia, como observado em *Borago officinalis* (Montaner et al. 2001), *Costus spiralis* (Araújo & Oliveira 2007) e *Gaylussacia brasiliensis* (Araújo et al. 2011), podendo levar à autofecundação em espécies autocompatíveis.

Um dos principais mecanismos pós-polinização é conhecido como sistema de autoincompatibilidade (AI) (De Nettancourt 1997). Neste sistema ocorre um reconhecimento do grão de pólen próprio (grão de pólen do próprio indivíduo) e do grão de pólen não próprio (grão de pólen de indivíduo diferente), sendo o principal mecanismo para evitar a autofecundação (Gibbs 1990, De Nettancourt 1997). O sistema de autoincompatibilidade pode ser definido como a “*incapacidade de uma planta fértil hermafrodita produzir zigotos ou sementes após a autopolinização*” (De Nettancourt 1997).

O sistema de autoincompatibilidade é controlado geneticamente, geralmente por um único *locus* polimórfico, S - *locus*, em que há no mínimo dois genes polimórficos, sendo que um controla a identificação do pólen e o outro a rejeição por parte do pistilo (De Nettancourt 1977, Allen & Hiscock 2008). De acordo com os sistemas de autoincompatibilidade já estudados, estes foram classificados em três tipos clássicos: sistema de autoincompatibilidade gametofítico, sistema de autoincompatibilidade esporofítico homomórfico e sistema de autoincompatibilidade esporofítico heteromórfico (De Nettancourt 1977, Allen & Hiscock 2008).

O sistema de autoincompatibilidade gametofítico é determinado pelo alelo *s* contido no gametófito masculino, sendo que a compatibilidade pode ser parcial se um dos alelos for comum entre a planta doadora de pólen e a planta mãe (De Nettancourt 1997). O sistema de autoincompatibilidade gametofítico é o mais comum entre as angiospermas, em que a rejeição do tubo polínico incompatível (grão de pólen próprio) geralmente ocorre no estilete,

impedindo o crescimento destes tubos até o ovário (De Nettancourt 1977, Allen & Hiscock 2008).

O sistema de autoincompatibilidade esporofítico homomórfico é determinado pelo genoma diploide da planta mãe contido na parede do grão de pólen (Allen & Hiscock 2008). Quando o autopólen é depositado no estigma de espécies com SSI, uma reação química é desencadeada bloqueando a fusão de vesículas secretoras necessárias para fornecer água e nutrientes que serão essenciais para a germinação do grão de pólen (De Nettancourt 1977, Allen & Hiscock 2008), assim a rejeição do autopólen é realizada no estigma. Já o sistema de autoincompatibilidade esporofítico heteromórfico está relacionado aos polimorfismos florais, ou seja, flores que apresentam diferentes alturas das anteras e do estigma dentro de uma espécie, em que os genes que controlam a incompatibilidade estão associados aos genes que controlam o polimorfismo floral (De Nettancourt 1977, Allen & Hiscock 2008).

Outro sistema de autoincompatibilidade, considerado não convencional, é o sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (AIT). Este sistema opera no ovário antes da penetração ou após a penetração e fecundação no óvulo de pistilos autopolinizados (Seavey & Bawa 1986). Este mecanismo vem sendo retratado em várias espécies (Seavey & Bawa 1986, Gibbs & Bianchi 1993, Sage et al. 1994, Gibbs & Bianchi 1999, Bittencourt Jr. et al. 2003, Carvalho & Oliveira 2003, Gibbs et al. 2004, Gandolphi & Bittencourt Jr. 2010), no entanto, o controle genético ainda não é conhecido, embora estudos apontem a presença de um *locus* S multialélico (Lipow & Wyatt 2000).

Autoincompatibilidade de ação tardia vs. depressão endogâmica

Muitas espécies são consideradas autocompatíveis, ou seja, formam frutos após a autofecundação (Chang & Rousher 1998, Gibbs & Sasaki 1998, Goodwillie & Knight 2006). Alguns estudos de biologia reprodutiva com espécies autocompatíveis mostraram que o

número de frutos formados por autofecundação é inferior quando comparado ao número de frutos formados por polinização cruzada (Chang & Rousher 1998, Gibbs & Sasaki 1998, Goodwillie & Knight 2006). A principal causa de abortos em pistilos autopolinizados é a depressão endogâmica, que ocorre devido à expressão de alelos recessivos deletérios em homozigose (Kephart et al. 1999, Hufford & Hamrick 2003).

Como a ação da depressão endogâmica e a ação do AIT podem ocorrer após a fecundação, a diferenciação entre estes dois mecanismos é de difícil detecção (Seavey & Bawa 1986). Alguns critérios podem ser utilizados para diferenciar o mecanismo que está ocasionando o aborto de pistilos autopolinizados, se estes são resultado de um atraso na ação do sistema de autoincompatibilidade ou da ação precoce da depressão endogâmica (Seavey & Bawa 1986, Sage et al. 1994).

Em espécies com AIT a taxa de frutificação por autopolinização é praticamente nula, sendo que as abscisões dos pistilos autopolinizados ocorrem uniformemente, além de não haver malformações durante o desenvolvimento do endosperma em óvulos decorrentes de autofecundação (Seavey & Bawa 1986, Sage et al. 1994). O desenvolvimento do zigoto e das células do endosperma podem apresentar malformações devido à ação da depressão endogâmica em óvulos de pistilos autopolinizados (Seavey & Bawa 1986, Sage et al. 1994). A depressão endogâmica usualmente se manifesta na primeira geração, e pode ocorrer em diferentes estágios do ciclo de vida da planta (Richards 1997). Frutos formados através de autopolinizações podem estar em menor quantidade no caso da ação da depressão endogâmica, mas a taxa nula dificilmente ocorreria, pois para isso uma alta carga genética de genes letais teria de ser expressa nos embriões (Seavey & Bawa 1986, Sage et al. 1994).

Flexibilidade no sistema de autoincompatibilidade de ação tardia

Alguns estudos com espécies que apresentam o AIT relataram a formação de frutos provenientes de polinizações mistas (mistura do grão de pólen próprio com pólen de outro indivíduo), em que foram produzidas algumas sementes resultantes de autofecundação (Bertin et al. 1989, Gribel et al. 1999, Gribel & Gibbs 2002).

Em *Campsis radicans*, Bignoniaceae, sementes resultantes de autofecundação foram produzidas após polinizações mistas, sendo caracterizada como possuidora de uma autofertilidade críptica (Bertin & Sullivan 1988). Acredita-se que para que ocorra a formação de sementes provenientes de autofecundação em frutos decorrentes de polinizações mistas é necessário que haja uma maior ocorrência de óvulos fecundados por pólen cruzado do que por autopólen em um mesmo ovário (Bertin & Sullivan 1988, Bertin et al. 1989, Gibbs et al. 2004). Isto favoreceria um estímulo hormonal para que o fruto fosse formado, e assim sementes decorrentes de autofecundação se desenvolveriam somente devido ao número maior de sementes oriundas de fecundação cruzada (Bertin & Sullivan 1988, Bertin et al. 1989, Gibbs et al. 2004).

Como a transferência de autopólen juntamente com pólen cruzado no estigma da flor é comum na natureza, algumas sementes provenientes de autofecundação se desenvolvem em frutos formados naturalmente em espécies com o AIT (Bianchi et al. 2005, Braga & Collevatti 2011). Neste contexto, o sistema reprodutivo destas espécies pode ser considerado misto (Bianchi et al. 2005).

Para esclarecer se ocorre ou não a polinização mista em espécies com AIT e se sementes autofecundadas podem ser formadas nestas espécies, algumas técnicas são utilizadas para elucidar a influência da polinização mista nestas espécies como: testes de polinizações controladas, juntamente com análises do crescimento dos tubos polínicos e análises de paternidade das progênies oriundas de frutos formados por polinização mista (Bertin & Sullivan 1988, Gribel et al. 1999, Gribel & Gibbs 2000).

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a possibilidade de formação de frutos contendo sementes autofecundadas viáveis através de polinizações mistas em três espécies de Bignoniaceae autoestéreis com autoincompatibilidade de ação tardia.

Estrutura da dissertação

O trabalho foi organizado em dois capítulos. O primeiro capítulo verificou se houve formação de frutos provenientes de polinização mista em duas espécies de Bignoniaceae com autoincompatibilidade de ação tardia. Além disso, comparou a taxa de frutificação, o peso das sementes, a germinabilidade e o tempo médio de germinação das sementes formadas nos diferentes tratamentos de polinização experimental.

O segundo capítulo investigou a formação de frutos provenientes de polinização mista em *Tabebuia aurea* e verificou por meio de genotipagem se sementes provenientes de autofecundação se desenvolveram nestes frutos. Através da análise dos eventos pós-polinização objetivou-se verificar se existem evidências de AIT e ainda constatar se existem indícios do desenvolvimento dos óvulos autofecundados em pistilos oriundos de polinizações mistas.

Referências bibliográficas

- Allen, A.M. & Hiscock, S.J. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility system in angiosperms. In: Franklin-Tong, V.E. (Ed). **Self-incompatibility in flowering plants- evolution, diversity and mechanisms**. Springer. Pp 73-95.
- Amorim, F.W. & Oliveira, P.E. 2006. Estrutura sexual e ecologia reprodutiva de *Amaioua guianensis* Aubl.(Rubiaceae), uma espécie dioica de formações florestais de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica** 29: 353-362.
- Araújo, F.P. & Oliveira, P.E. 2007. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. **Revista Brasileira de Botânica** 30: 61-70.
- Araújo, F.P.; Farias, Y.E.F. & Oliveira, P.E. 2011. Biologia foral e visitantes de *Gaylussacia brasiliensis* (Spr.) Meissner (Ericaceae) - Uma espécie com anteras poricidas polinizada por beija-flores. **Acta Botanica Brasilica** 25: 387-394.
- Barrett, S.C.H. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. **Philosophical Transactions of the Royal Society** 358: 991-1004.
- Barrett, S.C.H. 2010. Darwin's legacy: the forms, function and sexual diversity of flowers. **Philosophical Transactions of the Royal Society** 365: 351-368.
- Bertin, R.I & Sullivan, M. 1988. Pollen interference and cryptic self-fertility in *Campsis radicans*. **American Journal of Botany** 75: 1140-1147.
- Bertin, R.I.; Barnes, C. & Guttman, S.I. 1989. Self-sterility and cryptic self-fertility in *Campsis radicans* (Bignoniaceae). **Botanical Gazette** 150: 397-403.
- Bertin, R.I. 1993. Incidence of monoecy and dichogamy in relation to self-fertilization in angiosperms. **American Journal of Botany** 80: 557-560.

- Bianchi, M.B.; Harris, S.A.; Gibbs, P.E. & Prado, D.E. 2005. A study of the mating system in *Dolichandra cynanchoides* (Bignoniaceae): an Argentinian Chaco woodlands liana with a late-acting self-incompatibility. **Plant Systematics and Evolution** 251: 173-181.
- Bittencourt Jr., N.S.; Gibbs, P.E. & Semir, J. 2003. Histological study of post-pollination events in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), a species with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany** 91: 827-834.
- Braga, A.C. & Collevatti, R.G. 2011. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity** 106: 911-919.
- Carvalho, D.A. & Oliveira, P.E. 2003. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica** 26: 319-328.
- Chang, S. & Rausher, M.D. 1998. The role of inbreeding depression in maintaining the mixed mating system of the common morning glory *Ipomoea purpurea*. **Evolution** 53: 1366-1376.
- De Nettancourt, D. 1977. **Incompatibility in angiosperms**. Berlin. Springer. 230p.
- Eckert, C.G. 2000. Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in mass-flowering, clonal plant. **Ecology** 81: 532-542.
- Gandolphi, G. & Bittencourt Jr., N.S. 2010. Sistema reprodutivo do Ipê-Branco - *Tabebuia roseo-alba*. (Ridley) Sandwith. **Acta Botanica Brasilica** 24: 840-851.
- Gibbs, P.E. 1990. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revista Brasileira de Botânica** 13: 125-136.
- Gibbs, P.E. & Bianchi, M.B. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta** 106: 64-71.

- Gibbs, P.E. & Sasaki, R. 1998. Reproductive biology of *Dalbergia muscolobium* Benth. (Leguminosae-Papilionoideae) in SE Brazil: The effects of pistillate sorting on fruit set. **Annals of Botany** 81: 735-740.
- Gibbs, P.E. & Bianchi, M.B. 1999. Does late-acting selfincompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany** 84: 449-457.
- Gibbs, P.E.; Bianchi, M.B. & Ranga, N.T. 2004. Effects of self-, chase and mixed self/cross-pollinations on pistil longevity and fruit set in *Ceiba* species (Bombacaceae) with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany** 94: 305-310.
- Goodwillie, C. & Knight, M.C. 2006. Inbreeding depression and mixed mating in *Leptosiphon jepsonii*: A comparison of three populations. **Annals of Botany** 98: 351-360.
- Gribel, R.; Gibbs, P.E. & Queiroz, A.L. 1999. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. **Journal of Tropical Ecology** 15: 247-263.
- Gribel, R. & Gibbs, P.E. 2002. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). **International Journal of Plant Sciences** 163: 1035-1043.
- Holsinger, K.E. 2000. Reproductive system and evolution in vascular plants. **Colloquium** 97: 7037-7042.
- Hufford, K.M. & Hamrick, L.L. 2003. Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). **Evolution** 57: 518-526.
- Kephart, S.R.; Brown, E. & Hall, J. 1999. Inbreeding depression and portal selfing: evolutionary implications of mixed-mating in a coastal endemic, *Silene douglasii* var. *ovaria* (Caryophyllaceae). **Heredity** 92: 543-554.

- Lipow, S.R. & Wyatt, R. 2000. Single gene control of postzygotic self-incompatibility in poke milkweed, *Asclepias exaltata* L. **Genetics** 154: 893-907.
- Montaner, C.; Floris, E. & Alvarez, J.M. 2001. Geitonogamy: a mechanism responsible for high selfing rates in borage (*Borago officinalis* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 102: 375–378.
- Oliveira, P.E. & Gibbs, P.E. 2000. Reproductive biology of wood plants in a cerrado community of central Brazil. **Flora** 195: 311-329.
- Richards, A.J. 1997. **Plant breeding systems**. London: Chapman & Hall. 529p.
- Sage, T.L.; Bertin, R.I. & Williams, E.G. 1994. Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. In Williams, E.G.; Clarke, A.E. & Knox, R.B. (Eds.). **Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp: 116-140.
- Seavey, S.F. & Bawa, K.S. 1986. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. **The Botanical Review** 52: 195-218.
- Stephenson, A.G.; Good, S.V. & Vogler, D.W. 2000. Interrelationships among inbreeding depression, plasticity in the self-incompatibility system, and the breeding system of *Campanula rapunculoides* L. (Campanulaceae). **Annals of Botany** 85: 211-219.
- Tanurdzic, M. & Banks, J.A. 2004. Sex-determining mechanisms in land plants. **The Plant Cell** 16: 61-71.
- Vogler, D.W. & Kalisz, S. 2001. Sex among the flowers: The distribution of plant mating systems. **Evolution** 55: 202–204.
- Webb, C.J. & Lloyd, D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. **New Zealand Journal of Botany** 24: 163-178.

CAPÍTULO 1

FRUTIFICAÇÃO POR POLINIZAÇÕES MISTAS EM DUAS ESPÉCIES DE BIGNONIACEAE COM AUTOINCOMPATIBILIDADE DE AÇÃO TARDIA

Resumo

A flexibilidade do sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (AIT) em permitir que ocorra a autofecundação dos óvulos, pode acarretar na formação de sementes autofecundadas após polinizações mistas (grãos de pólen cruzados + grãos de pólen próprios). Neste caso, plântulas provenientes de fecundações cruzadas e autofecundações poderiam se estabelecer no ambiente, mas caso os óvulos autofecundados não fossem viáveis, ocorreria uma limitação no número de sementes produzidas. O objetivo deste estudo foi verificar se ocorre a formação de frutos e de sementes viáveis através de polinizações mistas em duas espécies de Bignoniaceae com AIT. Para isso, foram realizadas autopolinizações, polinizações cruzadas e polinizações mistas, além de testes de germinação com as sementes formadas. A maioria dos pistilos autopolinizados foi abortada até 20 dias após a polinização para as duas espécies e, embora dois frutos tenham se desenvolvido por autopolinização em *Adenocalymma peregrinum*, estes foram abortados antes de atingirem a maturidade e não apresentavam embriões desenvolvidos em suas sementes. A taxa de frutificação em polinizações cruzadas foi pelo menos o dobro da taxa de frutificação observada em polinizações mistas para as duas espécies, o que pode ser explicado por uma elevada taxa de óvulos autofecundados em pistilos submetidos à polinização mista, os quais estimulariam o aborto causado pelo AIT. Não houve diferença entre o número de sementes por fruto entre os tratamentos em *A. peregrinum*, entretanto a germinabilidade das sementes dos frutos formados por polinização mista foi menor do que as sementes de frutos formados em polinizações cruzadas. A baixa germinabilidade pode indicar que sementes decorrentes de autofecundação tenham sido formadas, mas estas apresentaram uma menor viabilidade quando comparadas às sementes oriundas de fecundação cruzada. Os resultados indicam que sementes autofecundadas podem se formar a partir de polinizações mistas, mas que

difícilmente as plântulas resultantes de autofecundações teriam condições de se estabelecer no ambiente, devido a posterior ação da depressão endogâmica.

Palavras-chave: *Adenocalymma peregrinum*, depressão endogâmica, *Fridericia platyphylla*, germinação de sementes.

Introdução

No sistema de autoincompatibilidade pré-zigótico, grãos de pólen próprios geralmente são rejeitados no estilete (AI Gametofítico) ou no estigma (AI Esporofítico) (De Nettancourt 1997). Assim, quando há deposição de grãos de pólen de polinização cruzada e grãos de pólen de autopolinização concomitantemente no estigma (polinização mista) em espécies com este sistema é de se esperar que apenas os tubos polínicos de polinização cruzada consigam atingir o ovário e fecundar os óvulos. Estes sistemas asseguram a fecundação cruzada na população, aumentando a heterozigozidade e mantendo a variabilidade genética (De Nettancourt 1997, Allen & Hiscock 2008).

Outro sistema de autoincompatibilidade é conhecido como sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (AIT), o qual pode atuar após a penetração ou fecundação dos óvulos, causando a abscisão do pistilo autopolinizado (Seavey & Bawa 1986, Sage et al. 1994, Bittencourt Jr. et al. 2003, Bittencourt Jr. & Semir 2005). A AIT é descrita para diferentes espécies, podendo ser identificada por uma uniformidade na fase de abscisão dos pistilos autopolinizados e também pelo desenvolvimento normal do endosperma e do zigoto antes da abscisão do pistilo (Seavey & Bawa 1986, Gibbs & Bianchi 1993, Sage et al. 1994, Bittencourt Jr. & Semir 2005). Deste modo, se ambos os grãos de pólen estiverem num mesmo estigma, e seus tubos polínicos não apresentarem diferenças entre o tempo de germinação e crescimento até o ovário, frutos provenientes de polinização mista poderão ser formados. Isto ocorre devido à presença de um maior número de óvulos que passam pela fecundação cruzada e evitam o aborto do pistilo, mesmo na presença de alguns óvulos oriundos de autofecundação (Gibbs et al. 2004). Em frutos provenientes de polinizações mistas, sementes autofecundadas podem chegar à maturidade (Bertin et al. 1989, Gribel & Gibbs 2002, Gibbs et al. 2004, Bianchi et al. 2005), ocasionando um sistema reprodutivo misto (Bianchi et al. 2005).

Alguns estudos têm evidenciado uma baixa taxa de frutificação natural em espécies que apresentam o sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (Maués et al. 2008, Polatto & Alves Jr. 2009, Torretta & Cerino 2013). Vários fatores são atribuídos à baixa razão de conversão de flores em frutos (Stephenson 1981), sendo que um destes fatores é a ocorrência de polinizações mistas causadas naturalmente pelo comportamento de alguns visitantes florais que podem acarretar na transferência de pólen cruzado e autopólen (Bianchi et al. 2005). Dependendo da quantidade de óvulos de fecundação cruzada e de óvulos de autofecundação em um mesmo ovário, a formação do fruto pode não ocorrer (Bertin et al. 1989, Gribel & Gibbs 2002, Gibbs et al 2004, Bianchi et al. 2005).

A flexibilidade do AIT em permitir que ocorra a autofecundação pode acarretar a formação de sementes provenientes de autofecundação após as polinizações mistas (Gribel et al. 1999, Bianchi et al. 2005). No caso destas sementes chegarem a plântulas e se estabelecerem no ambiente, pode haver uma queda da variabilidade genética da população (Hufford & Hamrick 2003). A polinização mista também pode ser desvantajosa no caso dos óvulos autofecundados não se desenvolverem em sementes viáveis em condições naturais, o que levaria a uma limitação na produção de sementes pela planta (Gibbs et al. 2004, Vaughton et al. 2010).

O objetivo deste estudo foi verificar se ocorre a formação de frutos provenientes de polinização mista em duas espécies de Bignoniaceae com sistema de autoincompatibilidade de ação tardia e comparar o vigor das sementes nos diferentes tratamentos, a fim de saber se sementes provenientes de autofecundação podem ter sido formadas nos frutos provenientes de polinizações mistas.

Material e métodos

Espécies estudadas e área de estudo

Uma população de *Adenocalymma peregrinum* (Miers) L.G. Lohmann e uma de *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann foram estudadas em área de campo sujo no Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (18°58'49.53"S 48°17'456"W) de dezembro de 2012 a maio de 2013. As duas espécies são subarbustos típicos do Cerrado, pertencem à família Bignoniaceae e à tribo Bignonieae. O material testemunho está depositado no *Herbarium Uberlandense* da Universidade Federal de Uberlândia, com os números de registro HUFU 44908 e HUFU 48925 para *A. peregrinum* e HUFU 47294 para *F. platyphylla*.

Adenocalymma peregrinum é caracterizada por apresentar folhas compostas, bi ou trifolioladas, pinadas ou bipinadas, os folíolos e foliólulos são ovados e variam quanto à forma entre plantas e até no mesmo indivíduo. As flores tubulares apresentam corola amarela. A floração ocorre de dezembro a março, com frutificação de janeiro a abril. *Fridericia platyphylla* apresenta folhas simples, coriáceas e de ápice arredondado, as flores tubulares apresentam corola rósea com parte interna branca. A floração ocorre geralmente de janeiro a março e a frutificação de abril a julho. As duas espécies têm como principais polinizadores as abelhas de médio a grande porte das tribos Euglossine e Centridini, são autoestéreis e, de acordo com análises do crescimento de tubos polínicos, parecem apresentar um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (Sampaio 2010).

Polinizações experimentais

As polinizações experimentais foram realizadas em 25 indivíduos de *A. peregrinum* e em 13 indivíduos de *F. platyphylla*. Para a realização dos tratamentos de polinizações controladas foram utilizados no mínimo 100 botões florais, sendo estes ensacados com

sacos de organza e, após a abertura da flor, foram realizadas as seguintes polinizações experimentais: Polinização cruzada - grãos de pólen de indivíduos localizados a mais de 10 metros de distância foram depositados no estigma das flores de outros indivíduos. Autopolinização manual - grãos de pólen foram depositados no estigma da mesma flor de que foram retirados. Polinização mista - foi depositada no estigma a mistura de grãos de pólen que foram retirados da mesma flor (autopólen) e de flores de indivíduos localizados a mais de 10 metros de distância (pólen cruzado), na proporção de 1:1 (grãos de pólen retirados de uma teca da antera de cada tipo e misturados em uma placa). Após as polinizações controladas as flores foram marcadas com linhas coloridas para identificação de cada tratamento, re-ensacadas com o saco de organza e acompanhadas quinzenalmente para verificação da formação do fruto ou da abscisão do pistilo.

Os frutos que chegaram à maturidade foram coletados e registrou-se o seu comprimento, o número de sementes por fruto, a porcentagem de sementes sem embrião (sementes vazias ou com embrião pouco desenvolvido), e a massa das sementes com embrião formadas. Estas análises não foram realizadas para *F. platyphylla*, devido à perda dos frutos maduros no campo por motivos desconhecidos.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste *Kolmogorov-Smirnov* Lilliefors. Foi utilizado o teste *t* de Student para comparações entre os tratamentos quanto ao comprimento dos frutos, o número de sementes por fruto, e a massa das sementes em um mesmo indivíduo que apresentaram frutos formados em mais de um tratamento. Enquanto o teste de Mann–Whitney foi utilizado para comparar os tratamentos quanto à porcentagem de sementes sem embrião e à massa total das sementes de cada tratamento. As análises estatísticas foram realizadas no programa BioEstat 5.0 (Ayres et al. 2007).

Germinação de sementes

As sementes de *A. peregrinum* foram armazenadas em sacos de papel e mantidas em geladeira por três semanas até serem colocadas para germinar. Para a avaliação dos parâmetros de germinação entre os tratamentos, as sementes com embrião de *A. peregrinum* foram semeadas em caixas Gerbox® forradas com algodão e papel filtro e umedecidas com água, sendo mantidas sob luz natural e temperatura ambiente. Foram utilizadas todas as sementes provenientes de polinizações mistas (n=72), sendo montadas três repetições com 24 sementes cada. As sementes oriundas de polinizações cruzadas foram escolhidas ao acaso, sendo montadas seis repetições com 24 sementes cada (n=144). O local onde cada repetição/caixa Gerbox® foi alocada foi sorteado. As sementes foram acompanhadas diariamente, sendo consideradas germinadas aquelas que emitiram a radícula. As observações se estenderam por 30 dias após cessarem as germinações. A germinabilidade e o tempo médio de germinação das sementes para cada tratamento foram calculados (Ranal & Santana 2006) e os tratamentos foram comparados pelo teste *t* de Student utilizando o programa SPSS (SPSS 2000).

Resultados

Frutos de todos os tratamentos realizados em *A. peregrinum* iniciaram o desenvolvimento, no entanto, apenas os frutos oriundos de polinizações cruzadas e de polinizações mistas chegaram à maturidade (Tabela 1). Os frutos maduros foram coletados 146 dias após as polinizações experimentais em 11 indivíduos. Nove indivíduos produziram frutos por polinização cruzada e seis produziram frutos por polinização mista, sendo que apenas três indivíduos formaram tanto frutos de polinização cruzada quanto frutos de polinização mista. Dois frutos provenientes de autopolinização permaneceram nas plantas até 70 dias após as polinizações experimentais, no entanto, estes foram abortados posteriormente e suas sementes não apresentavam embriões.

A taxa de frutificação em *F. platyphylla* foi baixa quando comparada a *A. peregrinum* (Tabela 2), com o desenvolvimento de frutos resultantes de polinizações cruzadas em três indivíduos e de polinizações mistas em dois indivíduos 48 dias após as polinizações experimentais (Tabela 2), sendo que apenas um indivíduo apresentou um fruto de cada tratamento. Todos os pistilos submetidos à autopolinização foram abortados em menos de 20 dias após a última polinização (Tabela 2). Como alguns frutos foram retirados das plantas por motivos desconhecidos, apenas três frutos maduros oriundos de polinizações cruzadas foram coletados 124 dias após a última polinização (Tabela 2).

O comprimento dos frutos não diferiu significativamente entre os tratamentos em *A. peregrinum* ($t=0,988$, $p=0,166$). Os frutos provenientes de polinizações mistas apresentaram, em média, $10,87 \pm 4,15$ (média \pm desvio padrão) sementes por fruto ($n=8$ frutos) e os frutos de polinização cruzada apresentaram aproximadamente $8,0 \pm 4,9$ sementes por fruto ($n=21$ frutos), entretanto não houve diferença entre os tratamentos ($t=1,325$, $p=0,098$). Os frutos provenientes de polinização mista apresentaram maior porcentagem de sementes sem embrião desenvolvido por fruto ($9,9 \pm 12,7\%$) do que os frutos decorrentes de polinização cruzada ($4,1 \pm 8,8\%$) ($U=49$, $p<0,05$).

Tabela 1. Porcentagem de frutos desenvolvidos (n=número de flores/número de frutos) em diferentes intervalos de tempo após a última polinização experimental em uma população de *Adenocalymma peregrinum* (Miers) L.G. Lohmann localizada no Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

Tratamentos de polinização	Dias após a última polinização		
	14	70	146
Polinização cruzada	40,7% (n=108/44)	19,4% (n=108/21)	19,4% (n=108/21)
Autopolinização	5,41% (n=111/6)	1,8% (n=111/2)	0% (n=111/0)
Polinização mista	19,3% (n=114/22)	11,4% (n=114/13)	7,01% (n=114/8)

Tabela 2. Porcentagem de frutos desenvolvidos (n= número de flores/número de frutos) em diferentes intervalos de tempo após a última polinização experimental em uma população de *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann localizada no Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

Tratamentos de polinização	Dias após a última polinização		
	20	48	124
Polinização cruzada	6,5% (n=107/7)	5,6% (n=107/6)	2,8% (107/3)
Autopolinização	0% (n=106/0)	0% (n=106/0)	0% (n=106/0)
Polinização mista	2,65% (n=113/3)	2,65% (n=113/3)	?

A massa total das sementes de *A. peregrinum* não diferiu entre os tratamentos ($U=542$, $p=0,081$). As sementes oriundas de frutos de polinização cruzada apresentaram média de $0,16\pm0,06$ gramas ($n=165$ sementes), enquanto que a massa das sementes de frutos decorrentes de polinização mista foi de $0,14\pm0,08$ gramas ($n=74$ sementes) (Figura 1). Quando se compara a massa das sementes de frutos provenientes de polinização cruzada com as sementes de frutos decorrentes de polinização mista dentro de cada indivíduo que produziu ambos os frutos (indivíduos 9, 22, 23), as sementes do fruto de polinização mista apresentaram massa menor ($0,058\pm0,026$ gramas) ($n=9$ sementes) do que as sementes do fruto de polinização cruzada ($0,158\pm0,013$ gramas) ($n=5$ sementes) no indivíduo 9 ($t=7,88$, $p<0,0001$) (Figura 1), nos outros indivíduos não houve diferença entre as massas das sementes.

As sementes com embrião ($n=74$) dos oito frutos formados a partir de polinizações mistas e as sementes com embrião ($n=144$) dos 21 frutos formados a partir de polinizações cruzadas iniciaram a germinação a partir do 17º dia após a embebição. As germinações cessaram no 69º dia após a embebição para as sementes oriundas de frutos de polinização mista e no 74º dia após a embebição para as sementes provenientes de frutos formados por polinização cruzada. A germinabilidade das sementes de frutos oriundos de polinização cruzada ($G=88,2\%$) foi maior do que a das sementes de frutos provenientes de polinização mista ($G=69,4\%$) ($t=2,826$, $p<0,05$). Não houve diferença em relação ao tempo médio de germinação entre as sementes de frutos oriundos de polinização cruzada ($33,98\pm2,94$ dias) e as sementes de frutos provenientes de polinização mista ($32,82\pm1,18$ dias) ($t=0,838$, $p=0,43$).

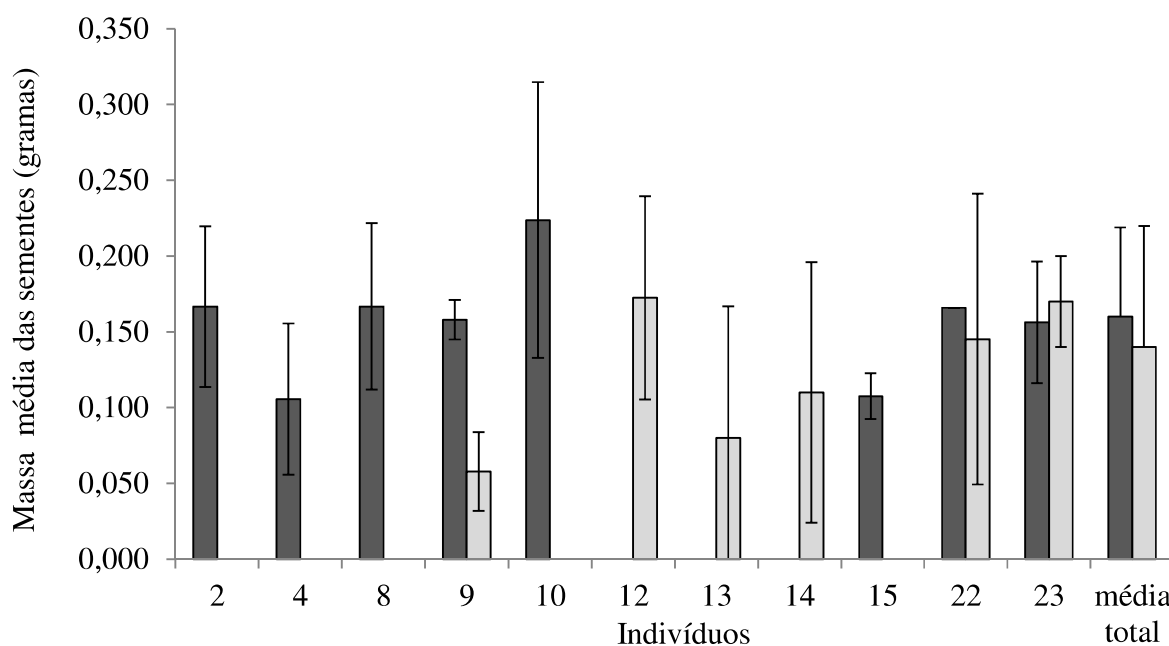


Figura 1. Média e desvio padrão das massas das sementes desenvolvidas por indivíduo em frutos oriundos de polinização cruzada (barras cinza escuro) e polinização mista (barras cinza claro) na população de *Adenocalymma peregrinum* (Miers) L.G. Lohmann localizada no Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

Discussão

Os resultados encontrados revelaram que as duas espécies não formaram frutos maduros nos tratamentos de autopolinização, ainda que para a mesma área a maioria dos pistilos autopolinizados tenha apresentado tubos polínicos que atingem o ovário e fecundaram os óvulos (Sampaio 2010). Esses dados unidos ao fato de ocorrer uma abscisão uniforme de quase todos os pistilos autopolinizados nestas espécies corroboram a ideia de que elas apresentam um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (AIT) como sugerido em estudos anteriores (Sampaio 2010) e como descrito para a maioria das espécies de Bignoniaceae estudadas quanto ao sistema reprodutivo (Gibbs & Bianchi 1999, Bianchi et al. 2005, Bittencourt Jr. & Semir 2005, Gandolphi & Bittencourt Jr. 2010, Torretta & Cerino 2013).

O fato de não ter sido observado crescimento do ovário em *F. platyphylla* em pistilos autopolinizados (Sampaio 2010) e estes serem abortados uniformemente antes dos 20 dias após a autopolinização, indicam que o AIT age cedo e de forma uniforme entre os pistilos autopolinizados. Por outro lado, foi observado um crescimento dos ovários de pistilos autopolinizados em *A. peregrinum*, embora menor que o observado para os pistilos de polinização cruzada (Sampaio 2010), indicando que a ação do AIT seja um pouco mais tardia nesta espécie. Além disso, o fato de 1,8% dos pistilos autopolinizados ter iniciado o seu desenvolvimento em frutos neste trabalho, bem como 1% observado também em estudos anteriores (Sampaio 2010), os quais apresentaram sementes sem embriões em todos os casos, pode ser interpretado como uma ação menos uniforme do AIT nesta espécie ou até mesmo a ação precoce da depressão endogâmica em pistilos que não tenham sido atingidos pela ação do AIT. Embora a AIT possa ser confundida com a ação precoce da depressão endogâmica (Seavey & Bawa 1986), o fato de 95% dos pistilos autopolinizados terem sido

abortados em menos de 14 dias após as polinizações neste estudo, indica este sistema esteja agindo em *A. peregrinum*.

A taxa de frutificação ficou abaixo de 20% tanto em polinizações cruzadas quanto em polinizações mistas para *A. peregrinum* e abaixo de 10% para *F. platyphylla*. O número de frutos foi superior para as polinizações cruzadas quando comparada com o número de frutos produzidos em polinizações mistas. Resultado similar foi encontrado para *Ceiba pentandra* (Gribel et al. 1999) e *Pseudobombax munguba* (Gribel & Gibbs 2002), espécies de Malvaceae-Bombacoideae que também apresentam AIT, nas quais a taxa de frutificação por polinizações mistas foi a metade da encontrada para polinizações cruzadas.

Nas espécies estudadas, onde aparentemente não há diferenciação na velocidade do crescimento dos tubos polínicos compatíveis (pólen cruzado) e incompatíveis (pólen próprio) (Sampaio 2010), a menor taxa de frutificação por polinizações mistas pode estar relacionada a uma maior eficiência do autopólen em relação aos grãos de pólen cruzados na competição pela penetração dos óvulos. Com isso, uma maior proporção de óvulos autofecundados levaria ao aborto destes pistilos. De acordo com o aumento das proporções de autopólen e a diminuição das proporções de pólen cruzado depositados nos estigmas das flores pode ocorrer uma redução no número de frutos formados por polinizações mistas, como relatado para *Pseudobombax munguba* (Gribel et al. 2002), ou um decréscimo do número de sementes por fruto, como observado para *Ceiba chodatii* (Gibbs et al. 2004), evidenciando que a competição dos tubos polínicos pelos óvulos também ocorreram nas espécies de Malvaceae-Bombacoideae com AIT.

A transferência do autopólen simultaneamente com o pólen cruzado para o estigma da flor por polinizadores é um fenômeno comum na natureza (Bianchi et al. 2005). O que pode tornar-se bastante frequente devido à predominância de geitonogamia em plantas que

apresentam várias flores abertas em um mesmo dia (Carvalho et al. 2007, Alves et al. 2013, Barros et al. 2013), como é o caso de *A. peregrinum* e *F. platyphylla*.

A taxa de frutificação natural não foi analisada no presente estudo, no entanto, outro estudo realizado para *A. peregrinum* e *F. platyphylla* na mesma área revelou que a frutificação natural foi bastante baixa, de aproximadamente 2% (Sampaio 2010). De acordo com a taxa de frutificação por polinizações naturais encontrada nestas espécies (Sampaio 2010), pode-se inferir que a maior parte das polinizações naturais sejam autopolinizações ou polinizações mistas, já que a taxa de formação de frutos por polinizações cruzadas manuais é muito superior (entre 20 e 30%). Embora a frutificação de *F. platyphylla* por polinizações cruzadas tenha sido muito baixa no presente trabalho, a mesma atingiu os 30% em estudo realizado no ano de 2007 (Sampaio 2010).

Uma desvantagem da polinização mista em espécies com AIT é o desconto de óvulos, ou seja, óvulos penetrados por autopólen seriam inativados e, provavelmente, não formariam sementes viáveis, portanto, os frutos produziram um menor número de sementes (Gibbs et al. 2004, Vaughton et al. 2010). Em *A. peregrinum*, não houve diferença entre o número de sementes encontradas em frutos formados por polinização mista e por polinização cruzada, entretanto, a porcentagem de sementes sem embrião desenvolvido foi maior nos frutos provenientes de polinização mista. Neste caso, é provável que óvulos penetrados por tubo polínico incompatível (autopólen) tenham sido inativados, devido a AIT, e o embrião não chegou a se desenvolver. Enquanto que as sementes sem embrião, também observadas nos frutos formados por polinização cruzada, podem ser originadas devido a um menor vigor dos grãos de pólen cruzados.

Já a menor germinabilidade de sementes formadas por polinizações mistas pode indicar que existam sementes autofecundadas com embrião nestes frutos, mas que estas possuam uma menor viabilidade quando comparadas às de fecundação cruzada. Em outras

espécies com AIT a presença de sementes viáveis provenientes de autofecundação em frutos decorrentes de polinização mista foi registrada por meio de marcadores moleculares (Bertin & Sullivan 1988, Gribel et al. 1999, Gribel & Gibbs 2002). A frequência destas sementes por fruto é variável, como encontrado para *Pseudobombax munguba* que produziu de 0 a 22% de plântulas provenientes de autofecundação nos frutos decorrentes de polinização mista (Gribel & Gibbs 2002). Pode-se ressaltar que o valor (20%) correspondente à diferença da porcentagem de germinabilidade das sementes provenientes de polinizações mistas e polinizações cruzadas observadas para *A. peregrinum*, pode indicar que seja exatamente a proporção de sementes oriundas de autofecundação de frutos formados por polinizações mistas.

Diferentemente dos frutos oriundos de autopolinização que iniciam o seu desenvolvimento em *A. peregrinum*, e suas sementes não continham embrião desenvolvido, frutos oriundos de polinização mista parecem permitir que algumas sementes com embrião provenientes de autofecundação se desenvolvam, sendo prejudicadas posteriormente pela suposta ação da depressão endogâmica. Esta observação pode ser um indicativo da ação do AIT nos pistilos autopolinizados de *A. peregrinum*, uma vez que se estivesse ocorrendo a ação da depressão endogâmica, seria esperado encontrar sementes com embrião desenvolvido nestes frutos formados por autopolinização, já que a ação precoce da depressão endogâmica no desenvolvimento embrionário parece ser um fenômeno relativamente raro (Sage et al. 1994).

Ainda que o mecanismo de AIT seja flexível em casos de polinização mista e permita o desenvolvimento de sementes autofecundadas, isto não implica que as sementes sejam viáveis na natureza e que suas plântulas possam se estabelecer na população. Geralmente, a ação da depressão endogâmica em sementes autofecundadas ocorre entre os estádios de semente madura e estabelecimento de plântulas (Hufford & Hamrick 2003), o

que poderia explicar a menor germinabilidade das sementes de frutos formados por polinização mista em *A. peregrinum*. Portanto, a combinação de um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia e a posterior ação da depressão endogâmica faria com que a presença de indivíduos adultos oriundos de autofecundação fosse muito rara em condições naturais para as espécies estudadas, especialmente para *A. peregrinum*.

Referências bibliográficas

- Allen, A.M. & Hiscock, S.J. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility system in angiosperms. In: Franklin-Tong, V.E. (Ed). **Self-incompatibility in flowering plants- evolution, diversity and mechanisms**. Springer. Pp 73-95.
- Alves, M.F.; Duarte, M.O.; Oliveira, P.E. & Sampaio, D.S. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. **Acta Botanica Brasilica** 27: 714-722.
- Ayres, M.; Ayres Jr., M.; Ayres, D.L. & Santos, A.A. 2007. **Bioestat - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Ong Mamiraua. Belém, PA.
- Barros, E.C.O.; Webber, A.C. & Machado, I.C. 2013. Limitação de polinizadores e mecanismo de autoincompatibilidade de ação tardia como causas da baixa formação de frutos em duas espécies simpátricas de *Inga* (Fabaceae - Mimosoideae) na Amazônia Central. **Rodriguésia** 64: 37-47.
- Bertin, R.I & Sullivan, M. 1988. Pollen interference and cryptic self-fertility in *Campsis radicans*. **American Journal of Botany** 75: 1140-1147.
- Bertin, R.I.; Barnes, C. & Guttman, S.I. 1989. Self-sterility and cryptic self-fertility in *Campsis radicans* (Bignoniaceae). **Botanical Gazette** 150: 397-403.
- Bianchi, M.B.; Harris, S.A.; Gibbs, P.E. & Prado, D.E. 2005. A study of the mating system in *Dolichandra cynanchoides* (Bignoniaceae): an Argentinian Chaco woodlands liana

- with a late-acting self-incompatibility. **Plant Systematics and Evolution** 251: 173-181.
- Bittencourt Jr., N.S.; Gibbs, P.E. & Semir, J. 2003. Histological study of post-pollination events in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), a species with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany** 91: 827-834.
- Bittencourt Jr., N.S. & Semir, J. 2005. Late-acting, self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Sciences** 166: 493-506.
- Carvalho, A.T.; Santos-Andrade, F.G. & Schlindwein, C. 2007. Baixo sucesso reprodutivo em *Anemopaegma laeve* (Bignoniaceae) no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 102-104.
- De Nettancourt, D. 1977. **Incompatibility in angiosperms**. Berlin. Springer. 230p.
- Gandolphi, G. & Bittencourt Jr., N.S. 2010. Sistema reprodutivo do Ipê-Branco - *Tabebuia roseo-alba*. (Ridley) Sandwith. **Acta Botanica Brasilica** 24: 840-851.
- Gibbs, P.E. & Bianchi, M.B. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta** 106: 64-71.
- Gibbs, P.E. & Bianchi, M.B. 1999. Does Late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany** 84: 449-457.
- Gibbs, P.E.; Bianchi, M.B. & Ranga, N.T. 2004. Effects of self-, chase and mixed self/cross-pollinations on pistil longevity and fruit set in *Ceiba* species (Bombacaceae) with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany** 94: 305-310.

- Gribel, R.; Gibbs, P.E. & Queiroz, A.L. 1999. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. **Journal of Tropical Ecology** 15: 247-263.
- Gribel, R. & Gibbs, P.E. 2002. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). **International Journal of Plant Sciences** 163: 1035-1043.
- Hufford, K.M. & Hamrick, L.L. 2003. Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). **Evolution** 57: 518-526.
- Maués, M.M.; Oliveira, P.E.A.M. & Kanashiro, M. 2008. Pollination biology in *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don. (Bignoniaceae) at the “Floresta Nacional do Tapajós”, Central Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 31: 517-527.
- Polatto, L.P. & Alves Jr., V.V. 2009. Sistema reprodutivo de *Sparattosperma leucanthum* (Vell.) K. Schum. (Bignoniaceae). **Revista Árvore** 33: 289-296.
- Ranal, M. & Santana, D.G.D. 2006. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica** 29: 1-11.
- Sage, T.L.; Bertin, R.I. & Williams, E.G. 1994. Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. In Williams, E.G.; Clarke, A.E. & Knox, R.B. (Eds.). **Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp: 116-140.
- Sampaio, D.S. 2010. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil.
- Seavey, S.F. & Bawa, K.S. 1986. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. **The Botanical Review** 52: 195-219.

SPSS. 2000. **Systat version 10**. SPSS. Inc, San Francisco, California.

Stephenson, A.G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions.

Annals Review of Ecology, Evolution, and Systematics 12: 253-279.

Torretta, J.P. & Cerino, M.C. 2013. Biología reproductiva de tres especies simpátricas de Bignoniaceae en Argentina. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica** 48: 73-89.

Vaughton, G.; Ramsey, M. & Johnson, S.D. 2010. Pollination and late-acting self-incompatibility in *Cyrtanthus breviflorus* (Amaryllidaceae): implications for seed production. **Annals of Botany** 106: 547-555.

