



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia



Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

**POPULAÇÕES HEXAPLÓIDES E APOMÍTICAS DE *HANDROANTHUS*  
*SERRATIFOLIUS* (VAHL) S. GROSE (BIGNONIACEAE) COM DIFERENTES  
SISTEMAS REPRODUTIVOS**

Mariana Ferreira Alves

Orientadora: Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

Co- orientador: Prof. Dr. Paulo Eugênio A. M. de Oliveira

**UBERLÂNDIA – MG**

**2014**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia



Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

**POPULAÇÕES HEXAPLÓIDES E APOMÍTICAS DE *HANDROANTHUS***

***SERRATIFOLIUS* (VAHL) S. GROSE (BIGNONIACEAE) COM DIFERENTES  
SISTEMAS REPRODUTIVOS**

Mariana Ferreira Alves

Orientadora: Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

Co- orientador: Prof. Dr. Paulo Eugênio A. M. de Oliveira

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

**UBERLÂNDIA – MG**

**2014**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia



Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

**POPULAÇÕES HEXAPLÓIDES E APOMÍTICAS DE *HANDROANTHUS***

***SERRATIFOLIUS* (VAHL) S. GROSE (BIGNONIACEAE) COM DIFERENTES  
SISTEMAS REPRODUTIVOS**

Mariana Ferreira Alves

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente:

*Diana Salles Sampaio*

Orientadora: Dra. Diana Salles Sampaio - UFU

Examinadores:

*Nelson Sabino Bittencourt Júnior*

Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior - UNESP

*Daniela Guimarães Simão*

Dra. Daniela Guimarães Simão - UFSM

Dissertação aprovada em 27/02/2014

**UBERLÂNDIA – MG**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

A474p Alves, Mariana Ferreira, 1989-  
2014 Populações hexaplóides e apomíticas de *Handroanthus serratifolius*  
(Vahl.) Gross (Bignoniaceae) com diferentes sistemas reprodutivos /  
Mariana Ferreira Alves. -- 2014.  
81 f. : il.

Orientadora: Diana Salles Sampaio.

Co-orientador: Paulo Eugênio A. M. de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-  
grama de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

Inclui bibliografia.

1. Botânica - Teses. 2. Embriologia - Plantas - Teses. 3. Repro-  
dução - Plantas - Teses I. Sampaio, Diana Salles. II. Oliveira, Paulo  
Eugênio Alves Macedo de. III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. VI. Título.

---

CDU: 581

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Diana Salles Sampaio, por ter acreditado no meu trabalho, pelo apoio constante durante a realização deste projeto, por me incentivar frente às frustrações e pelo exemplo de dedicação profissional. Agradeço não só pela orientação, mas principalmente pela paciência e amizade desenvolvida nestes três anos de convívio.

Ao meu co-orientador Prof. Paulo Eugênio Oliveira por todos os ensinamentos, por disponibilizar recursos e pelo apoio ao longo dos projetos desenvolvidos desde a graduação.

Aos meus pais João e Neucia e aos meus irmãos João Jr. e Fabiana, por acreditar em mim quando eu duvidava, por incentivar meus estudos e principalmente por me proporcionar inúmeros momentos de felicidade.

À Mariana Oliveira Duarte, Jéfferson Rodrigues de Souza, Júlio Henrique Magalhães por me auxiliarem no árduo trabalho de campo. Vocês tornaram meu campo muito mais rápido e divertido. Em especial, agradeço minha “irmã” Mariana, por tamanho companheirismo, tanto na área acadêmica quanto na vida. Fico muito feliz por fecharmos mais um ciclo juntas.

Aos colegas do LAMOVI Mariana, Pamella, Ludimila, Nayara, Kleber, Wesley, Rafael, Stéphani, Lígia e Angélica por todas as conversas, almoços e pela boa convivência que tivemos. Às professoras Juliana, Neuza, Renata, Daniela, Júlia aos professores Dênis e Orlando pelo auxílio nos momentos de dúvida e pelas palavras de incentivo. À Marcinha pela boa vontade e por sempre ajudar no laboratório.

Aos professores do programa de pós-graduação e aos colegas da terceira turma de Biologia Vegetal pela oportunidade de aprendizado e por todos bons momentos que passamos.

Ao professor Nelson Sabino Bittencourt Junior. pelo esclarecimento de dúvidas que surgiram durante a realização do projeto.

Ao Clesnan Mendes Rodrigues e ao Pietro Kiyoshi Maruyama Mendonça pelo auxílio com as análises estatísticas.

A professora Daniela Simão Guimarães e ao professor Nelson Sabino Bittencourt Júnior por ter aceitado a participar da banca examinadora

À Juliana Helou, Aline Sicari, Isabella Siman e Beatriz Nacamura por terem sido a minha família em Uberlândia.

Aos meus queridos primos e aos amigos pelo apoio constante, e por me proporcionar tantos momentos de alegria.

À coordenação da Pós-Graduação, à Nívia, as secretárias do Instituto de Biologia e a Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio logístico e infraestrutura durante o desenvolvimento do trabalho.

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

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro concedido ao projeto APQ 00593-11 e pelo auxílio para participação no 64º Congresso Nacional de Botânica.

Ao Centro Municipal de Estudos e Projetos Educacionais Julieta Diniz (CEMEPE-Uberlândia), e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM-Uberaba) pelas permissões para a realização do trabalho com árvores localizadas nestas Instituições.

E, por último, e não menos importante a Deus, por ter colocado tantas pessoas no meu caminho, que possibilitaram a realização desse projeto.

A todos vocês, muito obrigada!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUÇÃO GERAL .....	5
Bignoniaceae: fenologia e polinizadores.....	5
Sistemas de autoincompatibilidade .....	7
LSI e depressão endogâmica.....	8
Sistemas reprodutivos em Bignoniaceae .....	9
Poliploidia e sistema reprodutivo .....	10
A espécie <i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S. Grose .....	12
Objetivo .....	14
Referências Bibliográficas .....	14
CAPÍTULO 1: APOMIXIA ESPOROFÍTICA E AUTOFERTILIDADE EM POPULAÇÃO HEXAPLÓIDE E POLIEMBRIÔNICA DE <i>HANDROANTHUS SERRATIFOLIUS</i> (VAHL)	
S. GROSE (BIGNONIACEAE).....	21
Resumo.....	22
Introdução.....	23
Material e Métodos.....	25
Resultados .....	29
Discussão.....	42
Referências Bibliográficas .....	47

CAPÍTULO 2: AUTOINCOMPATIBILIDADE DE AÇÃO TARDIA E MONOEMBRIONIA EM <i>HANDROANTHUS SERRATIFOLIUS</i> (VAHL) S. GROSE (BIGNONIACEAE), UMA ESPÉCIE POLIPLÓIDE E APOMÍTICA .....	52
Resumo.....	53
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	56
Resultados .....	57
Discussão.....	64
Referências Bibliográficas .....	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	71
Referências Bibliográficas .....	72

## RESUMO

**Alves MF. 2014 Populações hexaplóides e apomíticas de *Handroanthus serratifolius* (Vahl.) Grose (Bignoniaceae) com diferentes sistemas reprodutivos. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.** De todas as espécies poliplóides de Bignoniaceae investigadas até o momento apenas *Handroanthus serratifolius* apresentou autoesterilidade. *Handroanthus serratifolius* é hexaplóide, apresenta populações monoembriônicas e auto-estéreis, e populações poliembriônicas com sistema reprodutivo desconhecido. O objetivo do presente trabalho foi verificar se populações poliembriônicas de *H. serratifolius* seriam apomíticas esporofíticas e consequentemente auto-férteis, além de verificar se a população monoembriônica apresenta um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI), confirmando a ideia de que a poliploidia não acarreta autofertilidade. Para isso, foram realizados tratamentos de polinização experimental e análises histológicas de óvulos e sementes jovens. Indivíduos poliembriônicos produziram megagametófitos reduzidos do tipo *Polygonum*. Estas plantas se mostraram auto-férteis e células precursoras de embriões adventícios (PEA) se diferenciaram da hipóstase e do tegumento da região micropilar do óvulo, indicando a presença de apomixia esporofítica e corroborando o encontrado para outras espécies poliplóides e poliembriônicas da família. A autofertilidade encontrada parece estar relacionada à expressão da apomixia esporofítica e não à poliploidia, uma vez que os indivíduos hexaplóides e monoembriônicos já investigados são auto-estéreis. As análises histológicas dos eventos pós-polinização em indivíduos monoembriônicos mostraram não haver malformação do zigoto e endosperma em pistilos autopolinizados. Endosperma em pistilos autopolinizados não apresentou diferenças do endosperma encontrado em pistilos de polinização cruzada, o que indica que o aborto dos pistilos autopolinizados seja decorrente de um LSI, como nas demais espécies auto-estéreis

investigadas até então. A presença de PEA oriundas da hipóstase também foi observada nestes indivíduos auto-estéreis e monoembriônicos, indicando que estes indivíduos apresentam um potencial para a expressão da apomixia esporofítica. Os resultados encontrados sugerem que a poliploidia parece ser a responsável pela expressão da apomixia esporofítica. Entretanto, a poliploidia não parece ter uma relação direta com a autofertilidade encontrada em populações poliembrionicas, mas sim a presença e desenvolvimento dos embriões adventícios parecem ser o estímulo para manutenção dos pistilos autopolinizados nas plantas de *H. serratifolius*.

Palavras-chave: apomixia esporofítica, autofertilidade, autoesterilidade, monoembrionia, poliembrionia.

## ABSTRACT

**Alves MF. 2014. Hexaploid and apomictic populations of *Handroanthus serratifolius* (Vahl.) Grose (Bignoniaceae) with different breeding systems. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.** Among the polyploid species of Bignoniaceae investigated so far, only *Handroanthus serratifolius* shows self-sterility. *Handroanthus serratifolius* is hexaploid, and presents monoembryonic and self-sterile populations, as well polyembryonic populations with unknown breeding system. The objective of this study was to determine if the polyembryonic populations of *H. serratifolius* were sporophytic apomictic and consequently self-fertile, and verify that the monoembryonic population showed late-acting self-incompatibility system (LSI), confirming the idea that polyploidy does not result in self-fertility. Experimental pollination and histological analyzes of ovules and young seed after pollination treatments were carried out. Polyembryonic individuals produced reduced megagametophytes of the *Polygonum* type. These plants were self-fertile and showed adventitious embryos precursor cells (PEAs), which differentiated from the hypostasis and from the integument at the micropylar region of the ovule, indicating the presence of sporophytic apomixis and corroborating the finds for other polyploid and polyembryonic species of the family. The self-fertility seems to be related to the expression of sporophytic apomixis and not polyploidy, because the hexaploid and monoembryonic individuals investigated are self-sterile. Histological analyses of post-pollination events in monoembryonic individuals showed no malformation neither in the zygote nor in the endosperm of self-pollinated pistils. Endosperms in these selfed pistils were not different from endosperms in later stages of development in cross-pollinated pistils, indicating that self-pollinated pistils abortion is due to LSI action, as observed in other species investigated so far. The presence of PEA arising from the hypostasis was also observed in self-fertile and

monoembryonic individuals, indicating that these individuals have the potential for expression of sporophytic apomixis. Our results suggest that polyploidy seems to be responsible for the expression of sporophytic apomixes. However, polyploidy does not seem to have any direct relationship with self-fertility found in polyembryonic populations, but the presence and development of adventitious embryos seem to be the stimulus for the maintenance of self-pollinated pistils in *H. serratifolius*.

Key words: monoembryony, polyembryony, self-fertility, self-sterility, sporophytic apomixis.

## INTRODUÇÃO GERAL

### *Bignoniaceae: fenologia e polinizadores*

Bignoniaceae é considerada uma das mais diversas famílias de plantas lenhosas (Gentry 1980), possui distribuição predominantemente neotropical e apresenta cerca de 82 gêneros e 827 espécies distribuídas em oito tribos (Bignonieae, Catalpeae, Coleae, Crescentieae, Jacarandeae, Oroxyleae, Tecomeae e Tourrettiae) (Olmstead *et al.* 2009). A família é composta predominantemente por árvores, arbustos e lianas, sendo as últimas representadas, em sua maioria, por espécies da tribo Bignonieae (Olmstead *et al.* 2009). No Brasil, há cerca de 391 espécies, com registros de sua ocorrência em áreas de Caatinga, Cerrado, Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Pantanal (Gentry 1980, 1992, Flora do Brasil).

Os primeiros estudos sobre a biologia reprodutiva de Bignoniaceae foram realizados por Gentry (1974a), que demonstrou a existência de uma grande variabilidade na morfologia floral e diferentes padrões fenológicos de floração para a família na América Central. São descritos quatro tipos de padrões fenológicos para Bignoniaceae: cornucópia, estado estacionário, big-bang e múltiplo big-bang, os quais estão diretamente relacionados ao ambiente em que as espécies se encontram e a diferentes estratégias de polinização (Gentry 1974a, b).

Espécies que possuem o padrão cornucópia florescem num intervalo de várias semanas e atraem um espectro diversificado de polinizadores (Gentry 1974a). O padrão estacionário consiste na produção de algumas flores por dia durante cerca de um mês e está associado com polinizadores que estabelecem rotas de forrageio (Gentry 1974a). Plantas que apresentam fenologia do tipo big-bang apresentam floração maciça, florescendo na maioria das vezes na

estação seca, sendo que o período de floração de uma espécie pode ser de alguns dias a alguns meses em cada ano (Gentry 1974a). O padrão fenológico do tipo múltiplo big-bang é considerado o mais especializado. As plantas desse grupo têm períodos de floração com cerca de 3 dias espalhados por todo o ano (Gentry 1974a).

Bignoniaceae também apresenta uma grande diversidade na morfologia floral, o que reflete na variedade de visitantes. Já foram registrados como polinizadores abelhas, beija-flores, borboletas e morcegos, sendo que as abelhas de médio e grande porte das tribos Centridini e Euglossini são consideradas os polinizadores efetivos para a maior parte da família (Gentry 1980; Correia *et al.* 2005; Machado & Vogel 2004; Gottsberger & Silberbauer-Gottsbeger 2006; Yanagizawa & Maiomni-Rodela 2007; Guimarães *et al.* 2008; Almeida-Soares *et al.* 2010). Estas abelhas possuem um longo aparelho bucal e, no momento em que conseguem atingir o néctar na base da corola tubular, tocam o estigma e, posteriormente, as anteras, propiciando a ocorrência da polinização (Gottsbeger & Silberbauer-Gottsbeger 2006).

A relação entre planta e polinizador é extremamente importante para o sucesso reprodutivo de Bignoniaceae, uma vez que das 65 espécies estudadas quanto ao sistema reprodutivo, 50 apresentaram-se auto-estéreis e necessitam de pólen cruzado para formação de frutos, além da autopolinização espontânea estar praticamente ausente. Diversos estudos indicam que a autoesterilidade encontrada na família é decorrente de algum tipo de sistema de autoincompatibilidade controlado geneticamente (Gibbs & Bianchi 1993,1999; Bittencourt & Semir 2005, 2006; Gandolphi & Bittencourt 2010).

### *Sistemas de autoincompatibilidade*

Os sistemas de autoincompatibilidade (SI) são sistemas genéticos que têm como objetivo evitar à autofecundação (Seavy & Bawa 1986). Geralmente são controlados por um único locus gênico, com diferentes alelos, os quais são responsáveis pelo reconhecimento do pólen ou do tubo polínico da mesma planta ou de plantas com alelos similares e por impedir sua germinação e crescimento (Richards 1986; de Nettancourt 1997). Desta forma, os SI podem ser considerados um dos principais mecanismos responsáveis pela manutenção e incremento da variabilidade genética em uma população (Allen & Hiscock 2008). O SI pode ocorrer em plantas com flores homomórficas, onde todas as plantas de uma população e espécie apresentam a mesma morfologia floral, ou em plantas com flores heteromórficas, onde há uma variação na morfologia floral entre indivíduos, a qual é um mecanismo complementar para evitar a autopolinização, bem como a polinização entre indivíduos de genomas similares (Richards 1986). Como Bignoniaceae apresenta apenas espécies com flores homomórficas, somente os SI homomórficos serão discutidos.

No sistema de autoincompatibilidade homomórfico gametofítico (GSI) a reação de autoincompatibilidade é determinada por um alelo expresso no gametófito masculino. Algumas substâncias são liberadas pelo tubo polínico e são reconhecidas como próprias pelo estigma ou estilete, provocando a rejeição do pólen próprio através da estagnação e rompimento do tubo polínico (Richards 1986; Allen & Hiscock 2008). No sistema de autoincompatibilidade homomórfico esporofítico (SSI) o grão de pólen expressa dois alelos da planta doadora de pólen na superfície de sua parede, onde existe o depósito de proteínas (de Nettancourt 1977; Richards 1986). A proteína é liberada no momento em que o grão de pólen toca o estigma, o qual é reconhecido e impedido de germinar (Richards 1986; Allen & Hiscock 2008).

Outro tipo de sistema de autoincompatibilidade é o de ação tardia (LSI), onde o grão de pólen germina e o tubo polínico cresce ao longo do estilete, atingindo o ovário (Richards 1986; Allen & Hiscock 2008). O tubo polínico pode penetrar os óvulos e realizar a dupla fecundação, de forma que o desenvolvimento inicial do zigoto e do endosperma também podem ocorrer (Richards 1986; Allen & Hiscock 2008). Entretanto, o aborto do pistilo autopolinizado ocorre pouco tempo após a autopolinização (Seavy & Bawa 1986; Richards 1986).

### *LSI e depressão endogâmica*

Não se sabe ao certo como funciona o controle genético do LSI e, pesquisas que tentam elucidar essa questão ainda são escassas (Lipow & Wyatt 1999). Este fato faz com que muitas vezes este tipo de SI seja confundido com a ação da depressão endogâmica (Bittencourt *et al.* 2003). A depressão endogâmica consiste na expressão de alelos recessivos deletérios que, em homozigose, podem levar ao aborto de pistilos autopolinizados em diferentes estádios de desenvolvimento, mas também podem permitir a formação de frutos, sementes e plântulas que apresentam anomalias em seu desenvolvimento (Richards 1986; Charlesworth & Willis 2009).

Dentre as anormalidades causadas pela depressão endogâmica, estão fenótipos mutantes que são letais no início da vida da planta (Richards 1986; Charlesworth & Willis 2009). Mesmo quando não há anormalidades evidentes, a depressão endogâmica é detectada pela diminuição nos valores médios de componentes de aptidão, como a germinação, o crescimento, sobrevivência e reprodução (Schemske 1983; Charlesworth & Willis 2009).

Embora conceitualmente simples, a discriminação entre depressão endogâmica e LSI e sua verificação experimental pode ser difícil (Seavy & Bawa 1986). Alguns critérios vêm

sendo utilizados para avaliar se o aborto do pistilo autopolinizado seria decorrente do LSI ou da ação depressão endogâmica. Na depressão endogâmica o crescimento do tubo polínico deveria ser semelhante tanto em pistilos autopolinizados quanto em pistilos de polinização cruzada, uma vez que os efeitos decorrentes da depressão endogâmica só ocorrem após a fecundação. Já no LSI, o crescimento de tubos polínicos e a penetração dos óvulos geralmente são mais lentos em pistilos autopolinizados do que em pistilos de polinização cruzada, evidenciando a ação de um SI controlado geneticamente (Gibbs & Bianchi 1993, 1999; Bittencourt *et al.* 2003, 2011; Bittencourt & Semir 2005). Além disso, quando ocorre a ação da depressão endogâmica, o pistilo autopolinizado pode ser abortado em diferentes estádios de desenvolvimento, o endosperma e o zigoto podem apresentar malformações quando ocorre a autofecundação e existe uma variação no número de sementes produzidas em frutos decorrentes de autopolinizações em uma mesma população (Seavy & Bawa 1986). No LSI o aborto dos pistilos autopolinizados ocorre de maneira uniforme pouco tempo após a autopolinização e não há malformação do zigoto e do endosperma, além disso, se observa uma não produção, ou uma baixa produção de sementes por autopolinização pela maioria dos indivíduos da população (Seavy & Bawa 1986).

#### *Sistemas reprodutivos em Bignoniaceae*

Em Bignoniaceae, 34 de 50 espécies verificadas como auto-estéreis, foram avaliadas quanto ao crescimento de tubo polínico e apresentam indícios da ocorrência de LSI, sendo que as 16 restantes não foram avaliadas quanto a este parâmetro, o que faz com que todas as auto-estéreis possam apresentar LSI. Nestas espécies os pistilos autopolinizados são abortados de maneira uniforme nos estádios iniciais de desenvolvimento (Gibbs & Bianchi 1993, 1999; Bittencourt & Semir 2005; Gandolphi & Bittencourt 2010). A ocorrência de LSI na família parece ser uma

característica basal, por ser predominante entre as suas espécies e por ter sido verificada na maioria das espécies de *Jacaranda* avaliadas até o momento (Vieira 1992; Bittencourt & Semir 2006; Guimarães *et al.* 2008; Maués *et al.* 2008; Milet-Pinheiro & Schlindwein 2009; Sampaio 2010), o gênero mais basal da família (Olmstead *et al.* 2009).

Entretanto, a autofertilidade já foi verificada para algumas espécies (Bullock 1985; Gobatto-Rodrigues & Stort 1992; Singh & Chauhan 1996; Dutra & Machado 2001; Bittencourt & Semir 2005; Yanagizawa & Maiomni-Rodella 2007; Almeida-Soares *et al.* 2010; Bittencourt & Moraes 2010; Firetti-Leggieri *et al.* 2013; Sampaio *et al.* 2013a). A expressão da autofertilidade pode estar relacionada a diversos fatores como polinização de flores velhas (de Nettancourt 1977; Vikas *et al.* 2009), carência de polinizadores efetivos, populações pequenas ou com baixa variabilidade genética e ocorrência de poliploidia (Richards *et al.* 1986; Igic *et al.* 2008, Husband *et al.* 2008).

#### *Poliploidia e sistemas reprodutivos*

Sabe-se que a poliploidia está associada à quebra do GSI (de Nettancourt 1977; Richards 1986). Em espécies poliplóides o grão de pólen parece incapaz de expressar o fenótipo que provoca sua rejeição no pistilo, enquanto este continua capaz de reconhecer e inibir o crescimento de tubos polínicos de autopolinizações (Richards 1986).

A poliploidia também parece estar associada à expressão da apomixia (Whitton *et al.* 2008; Hörndl 2010). A apomixia ocorre quando existe produção de embriões clonais no interior das sementes, podendo ser gametofítica ou esporofítica (Koltunow 1993, Whitton *et al.* 2008). Na apomixia gametofítica o embrião clonal é originado a partir de um gametófito não reduzido (Koltunow 1993; Whitton *et al.* 2008). Pode ser classificada em aposporia quando o desenvolvimento do megagametófito não reduzido ocorre a partir de células do

nucelo diferentes da célula-mãe do megásporo (Koltunow 1993; Whitton *et al.* 2008). E em diplosporia, quando o megagametófito é originado diretamente de uma célula mãe do megásporo sem a ocorrência de meiose reducional (Whitton *et al.* 2008). Estas espécies podem possuir endosperma autônomo, mais comum em diplospóricas, ou não, e neste último caso, necessitariam da fecundação para o desenvolvimento do endosperma. Na apomixia esporofítica, o embrião clonal tem origem de células somáticas do nucelo ou do tegumento do óvulo e o megagametófito reduzido se forma normalmente, podendo ocorrer um embrião sexual e vários embriões assexuados na mesma semente (Koltunow 1993; Whitton *et al.* 2008). Espécies com apomixia esporofítica apresentam pseudogamia, ou seja, a necessidade da polinização e fecundação dos núcleos polares para produção de endospermas que irão manter os embriões adventícios e sexuados durante seu desenvolvimento (Richards 2003; Whitton *et al.* 2008; Hörndl 2010).

As espécies de Bignoniaceae apresentam predominantemente o número cromossômico  $2n=40$  (Goldblatt & Gentry 1979; Gentry 1980), no entanto, eventos de poliploidização já foram verificados para espécies dos gêneros *Anemopaegma*, *Dolichandra*, *Pyrostegia* e *Handroanthus*, com registro de  $2n=60$ , 80 e 120 cromossomos (Goldblat & Gentry 1979; Piazzano 1998; Sampaio 2010; Firetti-Leggieri *et al.* 2011; Sampaio *et al.* 2013b). Todas as espécies poliplóides de Bignoniaceae investigadas até o momento quanto ao sistema reprodutivo foram consideradas auto-férteis (Bittencourt & Moraes 2010, Sampaio *et al.* 2013a), com exceção de *Handroanthus serratifolius* (Alves *et al.* 2013). Além disso, todas as espécies poliplóides e auto-férteis apresentam apomixia esporofítica, a qual resulta em elevadas taxas de sementes poliembriônicas (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010; Firetti-Leggieri *et al.* 2013; Sampaio *et al.* 2013b), com exceção de *Pyrostegia venusta* que é monoembriônica e provavelmente não apomítica (Sampaio 2010).

Estudos indicam que em espécies auto-estéreis a presença de embriões adventícios seria responsável por permitir o desenvolvimento de pistilos autopolinizados, uma vez que estes embriões competiriam com a reação de autoincompatibilidade (Oliveira *et al.* 1992, Bittencourt & Semir 2005 e Bittencourt & Moraes 2010). Deste modo, tanto a poliploidia quanto o desenvolvimento de embriões adventícios poderiam promover o desenvolvimento de frutos de autopolinização (Oliveira 1992; Whitton, *et al.* 2008; Bittencourt & Moraes 2010).

*Handroanthus chrysotrichus*, *H. ochraceus* e *Anemopaegma acutifolium*, espécies poliplóides, auto-férteis e apomíticas esporofíticas, apresentaram elevadas taxas de sementes poliembriônicas (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010; Firetti- Leggieri *et al.* 2013; Sampaio *et al.* 2013a, b). A presença de elevadas taxas de poliembrionia também foi detectada para os poliplóides *Anemopaegma glaucum*, *A. arvense*, *A. scrabiusculum* (Firetti- Leggieri *et al.* 2013) e para algumas populações de *Handroanthus serratifolius* (Mendes- Rodrigues *et al.* 2012), o que leva a crer que estas espécies também apresentem este tipo de apomixia.

*A espécie Handroanthus serratifolius (Vahl) S. Grose*

*Handroanthus serratifolius*, conhecida popularmente como ipê-amarelo, ipê do ovo macuco e pau d'arco amarelo é encontrada em diferentes biomas, com ocorrência na Mata Atlântica, Amazônia e Cerrado (Gentry 1992), sendo a espécie de distribuição mais ampla no gênero e que recebeu o título de “árvore símbolo do Brasil” (Gentry 1982). A espécie apresenta floração maciça ocorrendo por cerca de um mês (floração do tipo “big bang” *sensu* Gentry 1974a). Também apresenta uma grande variabilidade morfológica, mas em geral é representada por árvores de grande porte, com folhas compostas de margem serrilhada, corola tubular amarelo-limão, fruto do tipo cápsula linear glabra com diversos nectários extraflorais

e estrias longitudinais (Gentry 1992). Estudos realizados com indivíduos de *H. serratifolius* em áreas de Cerrado mostram a existência de populações hexaplóides, com  $2n=120$  cromossomos, sendo que algumas apresentam sementes monoembriônicas e outras sementes poliembriônicas (Mendes-Rodrigues *et al.* 2012; Alves *et al.* 2013). A presença de populações com sementes poliembriônicas pode ser um indício da ocorrência de apomixia esporofítica na espécie.

Das espécies poliplóides já investigadas, *H. serratifolius* foi a única a apresentar populações poliembriônicas e monoembriônicas (Mendes-Rodrigues *et al.* 2012; Alves *et al.* 2013). Além disso, a população poliplóide e monoembriônica de *H. serratifolius* apresenta autoesterilidade (Alves *et al.* 2013) diferente de *H. ochraceus* que apresenta populações tetraploides, poliembriônicas e auto-férteis (Bittencourt & Moraes 2010) e populações diploides, monoembriônicas e auto-estéreis (Gibbs & Bianchi 1993, Sampaio 2010). O fato de populações hexaplóides de *H. serratifolius* apresentarem essa variação torna a espécie um bom modelo de estudo quanto aos efeitos da poliploidia no sistema reprodutivo.

Estes dados sugerem que nesta espécie a poliploidia não seja o principal fator responsável pela autofertilidade, e que a presença de embriões adventícios pode estar envolvida nesse processo, sendo responsável pela permanência do fruto autopolinizado na planta (Oliveira *et al.* 1992; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b). Embora a população monoembriônica de *H. serratifolius* apresente autoesterilidade, o sistema reprodutivo da população poliembriônica é desconhecido, não se tendo certeza se a poliembrionia é resultado de apomixia e nem o tipo de polinização necessária para o desenvolvimento de frutos.

## *Objetivos*

O presente trabalho visa investigar plantas hexaplóides poliembriônicas e monoembriônicas de *H. serratifolius* quanto ao seu sistema reprodutivo, a fim de verificar se se populações poliembriônicas são apomíticas esporofíticas e consequentemente auto-férteis como nas demais espécies poliembriônicas investigadas até o momento, e também se a população monoembriônica apresenta LSI.

O trabalho está dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo tem como objetivo investigar a origem dos embriões supranumerários em plantas poliembriônicas de *H. serratifolius*, a fim de saber se a poliembrionia está relacionada a algum tipo de apomixia, além de testar se seriam auto-férteis como as demais populações de espécies poliembriônicas e neopoliplóides da família. Tal confirmação nos permitiria afirmar que a autofertilidade na espécie estaria relacionada à ocorrência da poliembrionia, que pode ser um indicativo de apomixia esporofítica, e não estaria relacionada diretamente à poliploidia. O segundo capítulo tem como objetivo verificar se os eventos pós-polinização observados nos óvulos de plantas monoembriônicas e auto-estéreis de *H. serratifolius* fornecem evidências da ocorrência do LSI ou da ação da depressão endogâmica.

## **Referências Bibliográficas**

- Allen AM & Hiscok SJ. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In: Franklin-Tong VE (ed): Self-incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity and Mechanisms. Springer-Verlag, Berlin.
- Almeida-Soares S, Polatto LP, Dutra JCS & Torezan-Silingardi HM. 2010. Pollination of *Adenocalymma bracteatum* (Bignoniaceae): Floral Biology and Visitors. Neotropical Entomology 39: 941-948.

Alves MF, Duarte MO, Oliveira PE & Sampaio DS. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 714-722.

Bittencourt Junior NS, Gibbs PE & 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 Junior NS & Semir J. 2005. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). *International Journal of Plant Sciences* 166: 493-506.

Bittencourt Junior NS & Semir J. 2006. Floral biology and late-acting self-incompatibility system in *Jacaranda racemosa* (Bignoniaceae). *Australian Journal of Botany* 54: 315-324.

Bittencourt Junior NS & Moraes CIG. 2010. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae) a histological study of post-pollination events. *Plant Systematics and Evolution* 288: 59-76.

Bittencourt Junior NS, Pereira EJ, Sao-Thiago PS & Semir J. 2011. The reproductive biology of *Cybistax antisiphilitica* (Bignoniaceae), a characteristic tree of the South American savannah-like “Cerrado” vegetation. *Flora* 206: 872-886.

Bullock SH. 1985. Breeding systems in flora of tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 17: 287-301.

Charlesworth D & Willis JH. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews* 10: 783-796.

Costa ME, Sampaio DS, Paoli AAS & Leite SCAL. 2004 Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). Revista Brasileira de Botânica 27: 395-406.

Correia MCR, Pinheiro MCB & Lima HA. 2005. Biologia floral de *Arrabideae conjugata* (Vell.) Mart. (Bignoniaceae). Acta Botanica Brasilica 19: 501-510.

de Nettancourt D. 1977. Incompatibility Systems in Angiosperms. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

de Nettancourt D. 1997. Incompatibility Systems in Angiosperms. Sexual Plant Reproduction 10: 185-199.

Dutra JCS & Machado VLL. 2001. Entomofauna visitante de *Stenolobium stans* (Juss.) Seem (Bignoniaceae), durante seu período de floração. Neotropical Entomology 30: 43-53.

Firetti-Leggieri F, Costa IR, Lohman LG, Semir J & Forni-Martins ER. 2011. Chromossomes studies in *Anemopaegma*. (Bignonieae, Bignoniaceae) in Cytologia 76: 185-191.

Firetti-Leggieri F, Lohmann LG, Alcantara S, Costa IR & Semir J. 2013. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignonieae, Bignoniaceae). Plant Reproduction 26: 43-53.

Gandolphi G & Bittencourt Junior NS. 2010. Sistema reprodutivo do Ipe-Branco – *Tabebuia roseo-alba*. (Ridley) Sandwith. Acta Botanica Brasilica 24: 840-851.

Gentry AH. 1974a. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. Biotropica 6: 64-68.

Gentry AH. 1974b. Coevolutionary patterns in Central America Bignoniaceae. Annals of Missouri Botanical Garden 61: 728-759.

Gentry AH. 1980. Bignoniaceae. Part I (Crescentiae and Tourrettiae). Flora Neotropica 25: 1-130.

- Gentry AH. 1982. The cultivated species of *Tabebuia* with notes on other cultivated Bignoniaceae. In Flowering tree conference 3. p.52-79.
- Gentry AH. 1992. A synopsis of Bignoniaceae ethnobotany and economic botany. Annals of the Missouri Botanical Garden 79: 53-64.
- Gibbs PE & Bianchi MB. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. Botanica Acta 106: 64-71.
- Gibbs PE & Bianchi MB. 1999. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LST: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. Annals of Botany 84: 449-457.
- Gobatto-Rodrigues AA & Stort MN. 1992. Biologia floral e reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl) Miers (Bignoniaceae). Revista Brasileira de Botânica 15: 37-41.
- Goldblatt P & Gentry AH. 1979. Cytology of Bignoniaceae. Botaniska Notiser 132: 475-482.
- Gottsberger G & Silberbauer-Gottsberger I. 2006. Life in the Cerrado: a south American tropical seasonal ecosystem. Ulm: Reta Verlag, Germany.
- Guimarães E, Di Stasi CL & Maimoni-Rodella RCS. 2008. Pollination Biology of *Jacaranda oxyphylla* with an emphasis on staminode function. Annals of Botany 102: 699-711.
- Hörandl E. 2010. The evolution of self-fertility in apomitic plants. Sexual Plant Reproduction 23: 73-86.
- Husband BC, Ozimec B, Martin SL & Pollock L. 2008. Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. International Journal of Plant Sciences 169: 195-206.
- Igic B, Russell L & Joshua RK. 2008. Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. International Journal Plant of Sciences 169: 93-104.

Koltunow AM. 1993. Apomixis: embryo sac and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* 5: 1425-1437.

Lipow SR & Wyatt R. 1999. Floral morphology and late-actingin *Apocynum cannabinum* (Apocynaceae). *Plant Systematics and Evolution* 219: 99-109.

Machado IC & Vogel S. 2004. The North-east-Brazilian liana, *Adenocalymna dichilum* (Bignoniaceae) pollinated by bats. *Annals of Botany* 93: 609-613.

Maués MM, Oliveira PE & 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.

Mendes-Rodrigues C, Sampaio DS, Costa ME, Caetano APS, Ranal MA, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2012. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). *Flora* 207: 264-274.

Milet-Pinheiro P & Schlindwein C. 2009. Pollination in *Jacaranda rugosa* (Bignoniaceae): euglossine pollinators, nectar robbers and low fruit set. *Plant Biology* 11: 131-141.

Oliveira PE, Gibbs PE, Barbosa AA & Talavera S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. *Plant Systematics and Evolution* 197: 207-219.

Olmstead RG, Zjhra ML, Lohmann LG, Grose SO & Eckert AJ. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *American Journal of Botany* 96: 1731-1743.

Piazzano M. 1998. Números cromosómicos en Bignoniaceae de Argentina. *Kurtziana* 26: 179-189.

Richards AJ. 1986. *Plant Breeding Systems*. London, George Allen & Unwin.

- Richards AJ. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions Royal Society* 358: 1085-1093
- Sampaio DS. 2010. Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações nos sistema de autoincompatibilidade. Tese de doutorado. 239p.
- Sampaio DS, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2013a. Mating in the pseudogamic apomictic *Anemopaegma acutifolium* DC: another case of pseudo-self-compatibility in Bignoniaceae? *Plant Biology* 15: 919-924.
- Sampaio DS, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2013b. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from Central Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 173: 77-91.
- Seavey SR & Bawa KS. 1986. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *The Botanical Review* 52: 195-219.
- Schemske DW. 1983. Breeding system and habitat effects on fitness components in three neotropical *Costus* (Zingiberaceae). *Evolution* 37: 523-539.
- Singh J & Chauhan SVS. 1996. Morphological changes in the stigma of seasonally transient sterile *Tecoma stans*. L. *Phytomorphology* 46: 1-7.
- Vieira MF, Meira RMSA, Queiroz LP & Meira Neto JAA. 1992. Polinização e reprodução de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. (Bignoniaceae) em área de Cerrado do sudeste brasileiro. *Anais do 8º Congresso da Sociedade de Botânica de São Paulo* 13: 19.
- Vikas GM, Tandon R & Ram HYN. 2009. Pollination ecology and breeding system of *Oroxylum indicum* (Bignoniaceae) in the foothills of the Western Himalaya. *Journal of Tropical Ecology* 25: 93-96.
- Whitton J, Sears CJ, Baack EJ & Otto SP. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 169: 169-182.

Yanagizawa YANP & Maiommi-Rodella RCS. 2007. Floral visitors and reproductive strategies in five melittophilous species of Bignoniaceae in southeastern Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology 50: 1043-1050.

## **Capítulo 1**

**APOMIXIA ESPOROFÍTICA E AUTOFERTILIDADE EM POPULAÇÃO  
HEXAPLÓIDE E POLIEMBRIÔNICA DE *HANDROANTHUS SERRATIFOLIUS*  
(VAHL) S. GROSE (BIGNONIACEAE)**

**RESUMO: (Apomixia esporofítica e autofertilidade em população hexaplóide e poliembriônica de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae))** Espécies poliplóides e poliembriônicas de Bignoniaceae veem sendo identificadas como apomíticas esporofíticas e pseudogâmicas. Estas espécies são auto-férteis numa família que apresenta predominantemente um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI). Embora a autofertilidade possa ser causada pela quebra do LSI em espécies poliplóides, o desenvolvimento de embriões adventícios também pode ser o responsável pela manutenção dos pistilos autopolinizados. *Handroanthus serratifolius* mostrou-se auto-estéril numa população poliplóide e monoembriônica, levando a crer que a poliploidia não seja capaz de quebrar o LSI. Este estudo teve como objetivo investigar a origem da poliembrionia e determinar o sistema reprodutivo de uma população hexaplóide e poliembriônica de *H. serratifolius*. Para isso, foram realizadas análises histológicas da megaesporogênese, da megagametogênese e dos eventos pós-polinização, bem como realizados tratamentos de polinização experimental. A megaesporogênese e a megagametogênese em indivíduos poliembriônicos de *H. serratifolius* foi semelhante ao encontrado para as espécies sexuadas da família, resultando em um megagametófito reduzido. As células precursoras de embrião adventício (PEA) tiveram origem em células da hipóstase e de células do tegumento da região micropilar, caracterizando a presença de apomixia esporofítica como nas demais espécies poliembriônicas da família. As PEA foram observadas a partir de 48 horas após a polinização e no mesmo intervalo de tempo em pistilos não polinizados. Foram formados 6,4% de frutos provenientes de autopolinização indicando que a população apomítica também é auto-fértil. Nossos resultados indicam que o desenvolvimento de embriões adventícios seja responsável pela manutenção dos pistilos autopolinizados em *H. serratifolius*, mesmo se desenvolvendo tardiamente em relação a outras espécies do gênero.

**Palavras-chave:** apomixia, autofertilidade, poliembrionia

## Introdução

*Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose, conhecida popularmente como ipê amarelo, é encontrada em diferentes biomas, sendo a espécie de distribuição mais ampla no gênero e que recebeu o título de “árvore símbolo do Brasil” (Gentry 1992). *Handroanthus serratifolius* foi verificada como hexaplóide, apresentando  $2n=120$  cromossomos, com registro de populações monoembriônicas (Alves *et al.* 2013) e populações poliembriônicas (Mendes-Rodrigues *et al.* 2012). A poliembrionia é a ocorrência de mais de um embrião por óvulo ou semente (Maheshwari 1963, Johri *et al.* 1992). Pode ter origem sexuada, quando existe a presença de mais de um megagametófito reduzido em um mesmo óvulo ou pode ser apomítica (Koltunow 1993; Whitton *et al.* 2008).

A apomixia ocorre quando existe produção de embriões clonais a partir de células não reduzidas do gametófito (Koltunow 1993). A apomixia pode ser classificada como gametofítica quando os embriões clonais tem origem num gametófito não reduzido (Whitton *et al.* 2008). Este tipo de apomixia resultaria em sementes poliembriônicas caso mais de um megagametófito não reduzido estivesse presente no mesmo óvulo, ou no caso de megagametófitos reduzidos e não reduzidos coexistirem, o que é comum em espécies apospóricas (Whitton *et al.* 2008). A apomixia também pode ser classificada como esporofítica, quando os embriões clonais, também conhecidos como embriões adventícios, se originam a partir de células somáticas do nucelo ou do tegumento do óvulo, geralmente se desenvolvendo concomitantemente ao embrião sexual no interior de um mesmo megagametófito reduzido (Whitton *et al.* 2008).

Em Bignoniaceae, foi verificada a presença de apomixia esporofítica em *Handroanthus ochraceus*, *H. chrysotrichus* e *Anemopaegma acutifolium* (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b), as quais apresentam elevadas taxas de poliembrionia (Mendes-Rodrigues *et al.* 2012; Sampaio *et al.* 2013b). Em estudo realizado

com populações poliembriônicas, foram encontradas de 35 a 88% de sementes poliembriônicas para *Handroanthus ochraceus*, de 18 a 61% de sementes poliembriônicas para *H. chrysotrichus* e para *H. serratifolius* foram encontradas de 17 a 88% de sementes poliembriônicas (Mendes-Rodrigues *et al.* 2012), o que leva a crer que *H. serratifolius* também seja uma espécie apomítica.

De forma geral, as espécies com apomixia esporofítica apresentam pseudogamia, ou seja, a necessidade da polinização e fecundação dos núcleos polares para o desenvolvimento do endosperma, o qual suprirá nutricionalmente os embriões adventícios e sexuados (Richards 2003; Whitton *et al.* 2008; Hörandl 2010). Dessa forma, as espécies apomíticas esporofíticas também podem ser classificadas como auto-férteis ou auto-estéreis.

Cerca de 77% das espécies de Bignoniaceae que tiveram o sistema reprodutivo investigado são auto-estéreis e parecem apresentar um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia – LSI (Gibbs & Bianchi 1993, 1999; Bittencourt *et al.* 2003; Bittencourt & Semir 2005; Gandolphi & Bittencourt 2010). Os motivos pelos quais algumas espécies da família apresentam-se auto-férteis são pouco conhecidos, no entanto, podem estar ligados à presença de poliploidia, a alterações fisiológicas e a mutações fixadas por diferentes fatores ambientais (Richards 1986; Igic *et al.* 2008; Husband *et al.* 2008). Todas as espécies poliplóides de Bignoniaceae avaliadas quanto ao sistema reprodutivo apresentaram-se auto-férteis (Bittencourt & Semir 2005; Bittencourt & Moraes 2010; Firetti-Leggieri *et al.* 2013; Sampaio *et al.* 2013a) com exceção da população monoembriônica de *H. serratifolius* (Alves *et al.* 2013).

*Handroanthus ochraceus*, *H. chrysotrichus* e *Anemopaegma acutifolium*, são tetraploides (Piazzano 1998; Sampaio 2010; Firetti-Leggieri *et al.* 2011; Sampaio *et al.* 2013b), auto-férteis e apomíticas esporofíticas (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010; Firetti-Leggieri *et al.* 2013; Sampaio *et al.* 2013a, b). Apesar da poliploidia poder causar a

quebra do sistema de autoincompatibilidade gametofítico (Richards 1986; de Nettancourt 1997), acredita-se que a autofertilidade nestas espécies não seja um reflexo direto da poliploidia. Ela seria causada pelo desenvolvimento dos embriões adventícios nos pistilos autopolinizados, os quais enviariam um sinal hormonal para a planta mãe impedindo que estes fossem abortados (Oliveira *et al.* 1992; Bittencourt & Semir 2005; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b). O fato de a população hexaplóide, monoembriônica e supostamente não apomíctica de *H. serratifolius* apresentar autoesterilidade sugere que nesta espécie, e talvez nas Bignoniaceae como um todo, a poliploidia isoladamente não leve à quebra do LSI, corroborando a ideia de que a presença de embriões adventícios seja responsável pela autofertilidade (Oliveira *et al.* 1992; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b).

O objetivo deste trabalho foi verificar se a poliembrionia em *H. serratifolius* também é decorrente de apomixia, através da análise dos processos de megaesporogênese, megagametogênese e dos eventos pós-polinização no óvulo e na semente em desenvolvimento. Embora outras espécies de Bignoniaceae tenham sido classificadas como apomíticas esporofíticas, os processos de megaesporogênese e megagametogênese não foram investigados, gerando dúvidas quanto à ausência da apomixia gametofítica. Além disso, hipotetizamos que a população poliembrionica de *H. serratifolius* seja apomítica esporofítica e, consequentemente, auto-fértil, o que corrobora a ideia de que o desenvolvimento de embriões adventícios na família promoveria a autofertilidade.

## **Material e Métodos**

*Espécie estudada e áreas de estudo-* *Handroanthus serratifolius*, é uma árvore de grande porte, possui folhas compostas de margem serrilhada, corola tubular amarelo-limão e fruto linear do tipo cápsula com estrias longitudinais e nectários extraflorais (Gentry 1992). A

espécie foi reportada como hexaplóide, apresentando 2n=120 cromossomos (Sampaio 2010), tendo sido verificadas populações monoembriônicas (Alves *et al.* 2013) e poliembriônicas de (Mendes-Rodrigues *et al.* 2012).

Os estudos foram realizados nos anos de 2012 e 2013 utilizando 10 árvores poliembriônicas (Sampaio 2010; Mendes-Rodrigues *et al.* 2012) de ocorrência natural localizadas no município de Luziânia (GO) ( $16^{\circ}14'14.4''$  S,  $47^{\circ}56'31.8''$  W). Além de três árvores também poliembriônicas (com 78,3% de sementes poliembriônicas, n=60 sementes) cultivadas localizadas no município de Uberlândia (MG) ( $18^{\circ}55'04.43''$  S,  $48^{\circ}15'38.40''$  W). Os espécimes foram depositados no *Herbarium Uberlandense* da Universidade Federal de Uberlândia (Luziânia - HUFU 48937).

*Análises histológicas*- Para analisar se a megasporogênese e a megagametogênese em populações hexaplóides e poliembriônicas de *H. serratifolius* transcorrem como nas espécies sexuadas de Bignoniaceae, nove botões florais de 1 a 6 cm de comprimento e flores no primeiro dia de antese foram coletados em quatro indivíduos localizados no município de Luziânia e em um indivíduo do município de Uberlândia.

Para detectar a origem dos embriões supranumerários, um pistilo proveniente de autopolinização manual e um de polinização manual cruzada foram coletados 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a polinização, além de um pistilo de autopolinização manual coletado 144 e 168 horas após a polinização em 2 árvores de Luziânia (a metodologia utilizada para a realização das polinizações manuais será descrita abaixo). Além disso, um pistilo de flores não polinizadas foi coletado 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o início da antese em 4 árvores de Luziânia. Dez frutos em diferentes estádios de desenvolvimento (de 1 cm a 12,5 cm) foram coletados em duas árvores localizadas em Luziânia e em uma árvore de Uberlândia.

Os pistilos e os frutos foram fixados em solução de gluteraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Mc Dowell & Trump 1976). Os ovários tiveram suas paredes retiradas com auxílio de pinças e bisturi sob microscópio estereoscópico Olympus SZX12, de forma a expor os óvulos presos ao septo. Os óvulos foram desidratados em série etílica e passaram por uma série etanol:clorofórmio (3:1, 1:1, 3:1) para a retirada de ceras epicuticulares. A inclusão foi realizada em hidroxietilmacrilato (Gerrits & Smid 1983). Cortes seriados de 3  $\mu\text{m}$  de espessura para óvulos e 5  $\mu\text{m}$  para sementes em desenvolvimento foram obtidos em micrótomo de rotação (RM2135, Leica) equipado com navalha de vidro de 8 mm. O material foi corado com Azul de Toluidina O 0,05% em tampão benzoato de sódio, pH 4,4 (Feder & O'Brien 1968) e as lâminas montadas com Permount®. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX40 e fotografadas com auxílio de câmera digital Olympus DP70.

*Polinizações experimentais-* Dado o grande porte das plantas estudadas foi utilizado caminhão equipado com caçamba para o acesso e manipulação das flores. Além disso, utilizamos escadas de alumínio de três a quatro metros de altura para acesso à plantas mais baixas. Para o estudo do sistema reprodutivo foram realizados tratamentos de polinização controlada em 10 indivíduos hexaplóides e poliembriônicos de ocorrência natural localizados no município de Luziânia, GO, em agosto e setembro de 2012 e em três indivíduos hexaplóides e poliembriônicos cultivados em Uberlândia, MG, em outubro de 2013.

Botões florais em pré-antese foram ensacados com sacos de organza para evitar o contato com possíveis visitantes florais. Em flores de primeiro dia de antese foram realizados testes de autopolinização manual (o pólen foi retirado da antera e colocado no estigma da mesma flor) e polinização manual cruzada (o pólen foi retirado de anteras de flores de um indivíduo e colocado no estigma de flores de indivíduos diferentes) após a retirada das

anteras. Para verificar se ocorre autopolinização espontânea, botões em pré-antese foram marcados e ensacados até a possível formação do fruto e para verificar a presença de apomixia com desenvolvimento de endosperma autônomo, botões florais tiveram as suas anteras removidas e foram ensacados para verificar a possível formação de frutos. Para registrar a eficiência da polinização natural, botões em pré-antese e flores abertas foram marcados e não ensacados. As flores utilizadas nos tratamentos de polinização experimental foram acompanhadas até a maturação do fruto ou a queda da corola. Nos indivíduos cultivados de Uberlândia, foram realizadas apenas autopolinizações manuais e na população de Luziânia foram realizados todos os cinco tratamentos descritos acima.

Para verificar o tamanho dos ovários após a polinização, foram realizadas autopolinizações e polinizações cruzadas adicionais. Pistilos de autopolinização manual e de polinização manual cruzada foram coletados 24 (auto: n=4, cruzada: n=3), 48 (auto: n=4, cruzada: n=5), 72 (auto: n=6, cruzada: n=4), 96 (auto: n=5, cruzada: n=4) e 120 (auto: n=3, cruzada: n=4) após as polinizações. O comprimento e a largura de cada ovário foi medido utilizando-se paquímetro digital Digimess (300 mm/12' - 0.01).

*Analises estatísticas*- O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar o número de óvulos fecundados entre pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada, utilizando-se o programa BioEstat (Ayres 2007). Para comparar o comprimento e largura dos ovários nos diferentes tratamentos e entre os diferentes intervalos após a polinização, foi utilizada ANOVA de um fator após ter sido testada a normalidade dos dados (Lilliefors Probability p<0.05) utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira 2000).

## Resultados

### *Megaesporogênese e Megagametogênese*

*Handroanthus serratifolius* apresenta óvulos anátropes, unitegumentados e tenuinucelados (Figura 1A). A célula mãe de megáspero (CMM) aumenta seu volume assumindo uma forma alongada, com núcleo evidente (Figura 1B). Neste estádio, as células da epiderme nucelar e da região calazal do nucelo apresentam paredes celulares ligeiramente espessadas (Figuras 1A, B).

A CMM, ao entrar em meiose, apresenta placa metafásica perpendicular ao eixo originando uma diáde de megásperos (Figuras 1C, D). As células da diáde podem apresentar o mesmo tamanho, mas em alguns casos a célula calazal apresenta um maior volume quando comparada à micropilar (Figura 1D). A meiose II foi sincrônica em quase todos os óvulos observados, mas um óvulo dos cinco analisados no estádio de tétrade (antes do início da degeneração dos megásperos) apresentou meiose assincrônica entre as células da diáde, a qual ocorreu primeiro na célula calazal (Figura 1E), não se podendo excluir a possibilidade de ter ocorrido apenas na célula calazal da diáde. As placas metafásicas da segunda divisão meiótica também são perpendiculares ao eixo, originando uma tétrade linear (Figura 1F). Foi observada a deposição de calose nas paredes transversais de todos os megásperos, sendo mais proeminente nas paredes que separam os dois megásperos calazais entre si e estes dos megásperos micropilares (Figuras 1F, G). Foram observados três megásperos se degenerando, enquanto o calazal continuou intacto (Figura 1G). Dos 63 óvulos observados com tétrades de megásperos em estádio de degeneração, um apresentou os dois megásperos calazais intactos (Figura 1H).

Durante a expansão do megáspero calazal e sua diferenciação em megagametófito, observou-se a presença de pequenos vacúolos no citoplasma (Figura 1I). Após a primeira cariocinese, os dois núcleos formados logo foram afastados para os polos calazal e micropilar

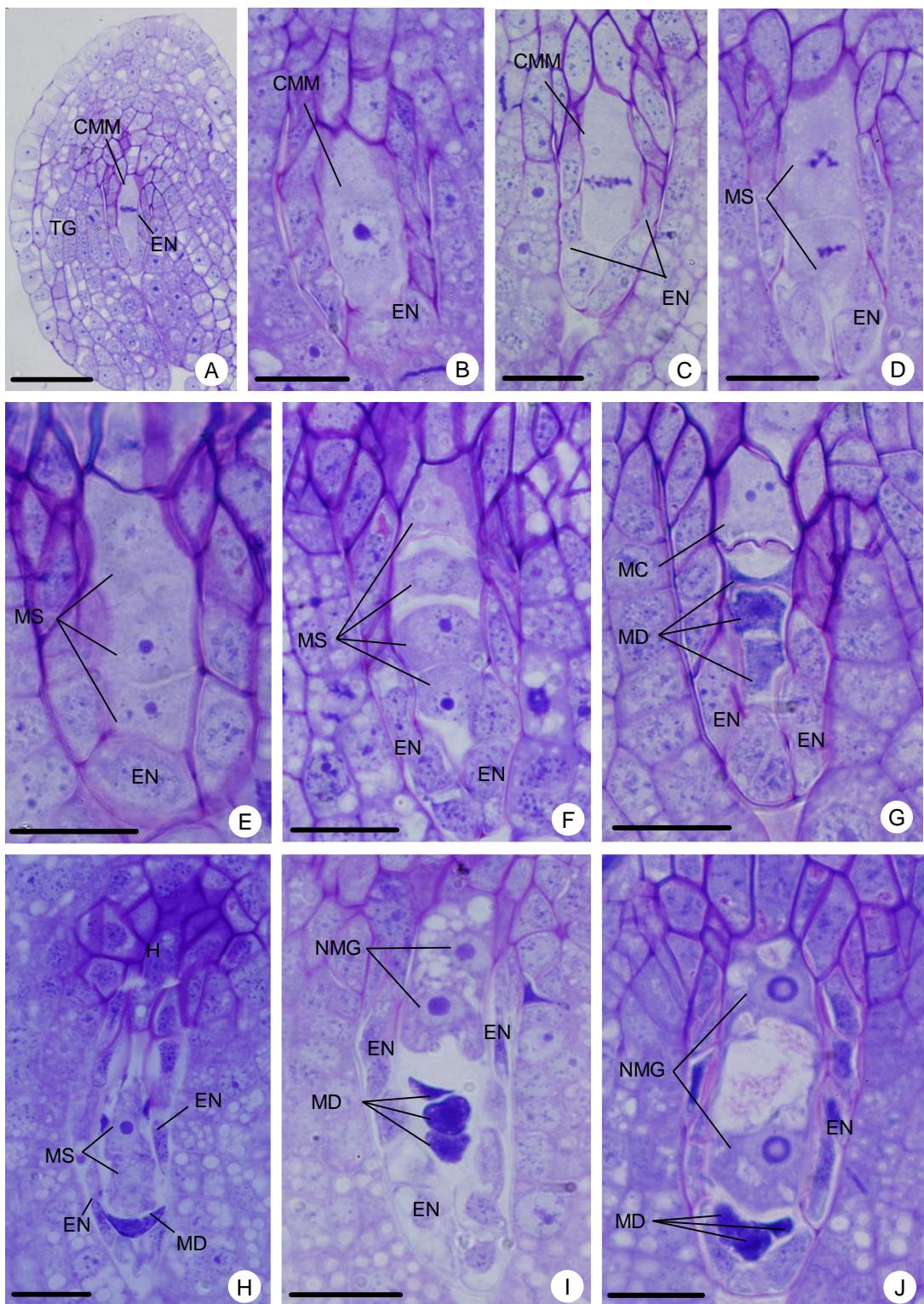


Figura 1. Fotomicrografias de óvulos de *Handroanthus serratifolius* em secção longitudinal. A-C, E. Botão de 1 cm de comprimento. D,F. Botão de 2,5 cm de comprimento. A. Vista geral do óvulo anátropo, unitegumentado e tenuinucelado. B. Célula mãe de megáspero. C. Célula mãe de megáspero durante a meiose I. D. Diáde de megásperos durante a meiose II. E. Tríade. Botão de 1 cm de comprimento. F. Tetrade linear de megásperos. Observar deposição diferencial de calose entre os megásperos. G. Degeneração de um megáspero calazal e dois micropilares. Observar calota de calose sobre o megáspero calazal. Botão de 3 cm de comprimento. H. Tetrade de megásperos apresentando dois megásperos calazais intactos e um megáspero microplilar degenerando. O segundo megáspero micropilar também está se degenerando, no entanto aparece em um corte sequencial a este e não foi apresentado. Botão de 3,5 cm de comprimento. I. Megagametófito em estádio binucleado. Observa-se três megásperos se degenerando na região micropilar. Botão de 5 cm de comprimento. J. Megagametófito binucleado com volumoso vacúolo central que polariza cada um dos núcleos em uma extremidade. Botão de 4 cm de comprimento. CMM: célula mãe de megáspero; EN: epiderme nucelar; MC: megáspero calazal; MD: megáspero degenerando; MG: megagametófito; MS: megáspero; NMG: núcleo do megagametófito; TG: tegumento. Barras= 20 $\mu$ m.

do megagametófito pela formação de um grande vacúolo central (Figuras 1I, J). No interior deste grande vacúolo central, observa-se uma substância de coloração rosada com a utilização do Azul de Toluidina, podendo ser identificada como algum tipo de polissacarídeo (Figuras 1J, 2A). Os remanescentes dos três megásporos voltados para a região micropilar são observados até este estádio (Figuras 1I, J).

Desde o início da expansão do megagametófito, as células da porção micropilar e lateral da epiderme nucelar começam a se degenerar (Figuras 1H, I, J). Nos estádios subsequentes da megagametogênese, são observados apenas os vestígios da epiderme nucelar na região calazal do óvulo. Aparentemente, a expansão do megagametófito em desenvolvimento pode ter contribuído para o colapso dessa camada de células na região micropilar (Figura 2A). Os dois núcleos do megagametófito passam, simultaneamente, pela segunda divisão mitótica, dando origem ao estádio tetranucleado (Figuras 2A, B, C). A terceira e última divisão mitótica dos quatro núcleos originou um megagametófito octonucleado (embora o momento dessa divisão não tenha sido observado).

Desde o início da divisão meiótica observam-se grãos de amido nas camadas mais internas do tegumento na região micropilar (Figuras 1C, F, H, I, J), entretanto, a partir do estádio de megagametófito tetranucleado, o número de grãos de amido observado aumentou consideravelmente (Figuras 2B-F).

Um dos núcleos presentes na porção micropilar e um dos presentes na porção calazal, migram para o centro do megagametófito, os quais passam a ser identificados como núcleos polares (Figura 2D). Durante a celularização do megagametófito, as duas sinérgides e a oosfera se organizam em um arranjo triangular para formar o aparelho oosférico (Figuras 2D-G), tais células passam, posteriormente, por uma pronunciada expansão (Figura 2H). Gradativamente, as sinérgides apresentam um grande vacúolo voltado para a porção calazal (Figura 2H), e um pequeno vacúolo adjacente ao núcleo na região micropilar (não ilustrado).

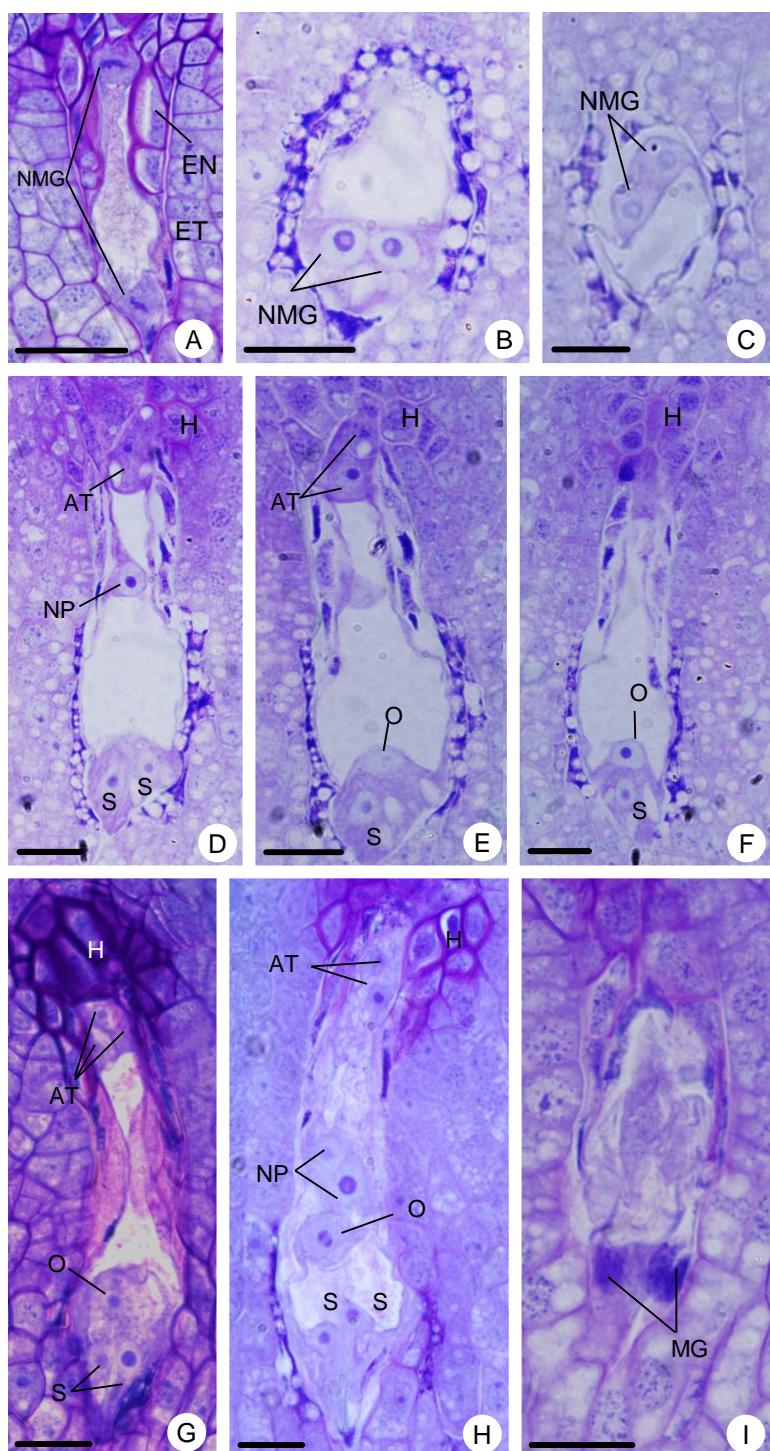


Figura 2. Fotomicrografias de óvulos de *Handroanthus serratifolius* em secção longitudinal. A. Megagametófito em desenvolvimento, passando pela segunda divisão mitótica. Botão de 3 cm de comprimento. B e C. Cortes sequenciais de um mesmo óvulo. Botão de 5cm de comprimento. B. Região micropilar de um megagametófito em estádio tetranucleado. C. Região calazal do megagametófito em estádio tetranucleado. D-F. Cortes sequenciais do mesmo óvulo mostrando a organização e o início da celularização do megagametófito após a terceira divisão mitótica. Botão de 5 cm. G. Megagametófito onde observa-se a organização triangular do aparelho oosférico e das antípodas. Flor em primeiro dia de antese. H. Megagametófito maduro 24h após a abertura de uma flor emasculada. I. Óvulo com dois megagametófitos. Botão de 2,8 cm de comprimento. AT: antípodas; EN: epiderme nucelar, ET: endotélio, H: hipóstase; MG: megagametófito; NMG: núcleo do megagametófito; NP: núcleo polar; O: oosfera; S: sinérgide. Barras=20μm.

Já a oosfera, apresenta a maior parte de citosol e o núcleo na extremidade calazal (Figura 2H) e um grande vacúolo na extremidade micropilar da célula. Os três núcleos da região calazal, por sua vez, celularizam-se, para formar as antípodas, na maioria das vezes, num arranjo triangular (Figura 2G, H). De 89 óvulos analisados em estádio de megagametogênese ou megagametófito maduro, apenas um apresentou mais de um megagametófito (Figura 2I).

#### *Dupla fecundação e desenvolvimento inicial do endosperma*

Foram considerados fecundados óvulos com sinérgide penetrada e/ou aqueles que apresentaram alça citoplasmática da sinérgide penetrada entre a célula média e o pólo calazal da oosfera. Óvulos dos pistilos provenientes de autopolinizações manuais e polinizações manuais cruzadas, coletados 24 e 48 horas após a polinização, não foram fecundados por tubos polínicos (Figura 3A) (Tabela 1). Óvulos fecundados começaram a ser observados 72 horas após a polinização (Figura 3B). Após a penetração do óvulo, o tubo polínico descarrega seu conteúdo citoplasmático em uma das sinérgides, a qual passa a apresentar citoplasma de coloração densa (Figuras 3B, C, D).

Após a fusão tripla, a célula primária do endosperma passa por uma cariocinese seguida por citocinese. Esta primeira divisão foi transversal e originou duas células, uma na câmara micropilar e uma na câmara calazal (Figuras 3C, D). A célula da câmara calazal apresenta citoplasma denso, já adquirindo características de haustório, posteriormente, se divide longitudinalmente, dando origem a duas células que formam o haustório calazal do endosperma (Figura 3D-F). A célula da câmara micropilar passou, na maioria das vezes, por uma divisão longitudinal, originando endosperma com quatro células (figura não apresentada). Algumas vezes, a divisão das células da câmara micropilar e calazal foi assincrônica, originando um endosperma com três células (Figura 3E). Após uma divisão transversal das duas células da câmara micropilar, forma-se um endosperma bisseriado de

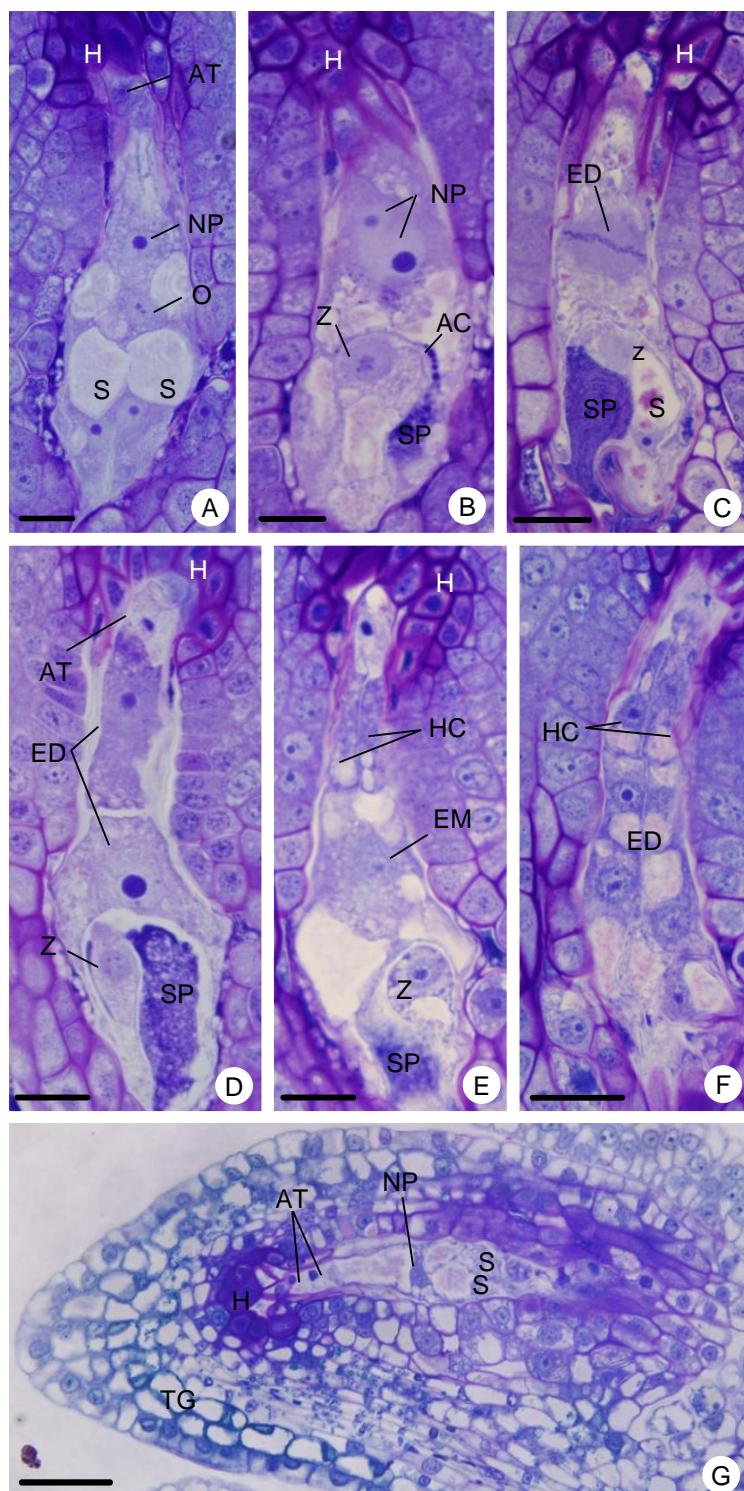


Figura 3. Fotomicrografias de óvulos e sementes jovens de *Handroanthus serratifolius* em secção longitudinal. A. Sinérgides não penetradas em pistilo coletado 48h após a autopolinização. B. Sinérgide penetrada e alça citoplasmática em óvulo de pistilo coletado 72h após a polinização cruzada. Núcleos polares ainda não fusionados. C. Sinérgide penetrada, sinérgide não penetrada, zigoto e célula do endosperma apresentando placa metafásica transversal 96h após a polinização cruzada. D. Sinérgide penetrada, zigoto e endosperma com duas células 96h após a autopolinização. E. Sinérgide penetrada, zigoto e três células do endosperma 120h após a polinização cruzada. Células calazais do endosperma diferenciadas em haustório calazal do endosperma. F. Endosperma com seis células 144h após a autopolinização. G. Óvulo 120h após a abertura da flor. Notar que as sinérgides, núcleos polares, antípodas e tegumento apresentam aspecto degenerativo. AC: alça citoplasmática; AT: antípodas; ED: endosperma; EM: câmara micropilar do endosperma; H: hipóstase; HC: haustório calazal do endosperma; NP: núcleo polar; O: oosfera; S: sinérgide; SP: sinérgide penetrada; TG: tegumento. Z: zigoto. Barras= 20µm.

Tabela 1. Número e porcentagem de óvulos maduros fecundados ou em diferentes estádios de desenvolvimento do endosperma em pistilos coletados 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após as polinizações experimentais em *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose em Luziânia (GO). Foram considerados óvulos fecundados aqueles com uma das sinérgides penetrada pelo tubo polínico, sem que houvesse o desenvolvimento do endosperma. Auto=autopolinização; Cruz=polinização cruzada; Fec=óvulos fecundados; E=óvulos com endosperma. Os números após a letra E nos diferentes estádios indicam o número de células do endosperma.

Estádio	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas		168 horas	
	Auto (1)	Cruz (1)	Auto (1)	Cruz (1)	Auto (1)	Cruz (1)	Auto (1)	Cruz (1)	Auto (1)	Cruz (1)	Auto (1)	Cruz (1)	Auto (1)	Auto (1)
Fec	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (7,3%)	18 (27,7%)	26 (27,7%)	23 (28,4%)	0 (0%)	13 (11,9%)	6 (6%)	8 (7,7%)		
E2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	14 (17,3%)	0 (0%)	15 (13,7)	5 (5%)	3 (2,9%)		
E3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (2,8%)	10 (10,1%)	3 (2,9%)		
E4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (11%)	11 (11,1%)	8 (7,7%)		
E5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,92%)	2 (2%)	5 (4,8%)		
E6	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (2,8%)	4 (4%)	1 (0,96%)		
E7	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2%)	0 (0%)		
E8	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (3,8%)	
E9	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
E10	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,96%)	
E11	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,96%)	
Nº Óvulos	92	79	87	92	55	65	94	81	72	109	99	104		

seis células (Figura 3F). As células centrais passam por divisões transversais sucessivas, incrementando o número de células do endosperma bisseriado. Após a fecundação e a formação do endosperma, as antípodas começaram a apresentar o citoplasma com aspecto degenerativo (Figuras 3D, E).

Quase todos os óvulos (84 de 86 óvulos analisados) de pistilos não polinizados em flores no primeiro dia de antese apresentaram megagametófito maduro (Figura 2H) e, nos demais intervalos, todos os óvulos apresentaram megagametófito maduro e inalterado. Os núcleos polares em pistilos não polinizados continuaram intactos em todos os intervalos após a abertura da flor, mostrando que a fusão só ocorre após a polinização (n= 395 óvulos) (Figura 2H). A partir do quarto dia de antese (96h após a abertura da flor) as antípodas começam a apresentar o citoplasma com sinais de degeneração e, no quinto dia de antese, as demais células do megagametófito também apresentam aspecto degenerativo (Figura 3G).

Em 72 horas após a polinização, óvulos de pistilos de polinização cruzada apresentam mais óvulos fecundados do que óvulos de pistilos autopolinizados ( $\chi^2 = 8,067$ ,  $p= 0,0045$ ) (Tabela 1). No intervalo de 96 horas após a autopolinização, ainda não havia óvulos com endosperma em desenvolvimento, enquanto 17,3% dos óvulos apresentavam endosperma com duas células no tratamento de polinização cruzada (Tabela 1). No intervalo de 120 horas após a autopolinização nenhum óvulo foi penetrado, enquanto 31,22% dos óvulos de pistilos de polinizações cruzadas já apresentavam endosperma, sendo que 2,8% já possuíam endospermas de seis células neste intervalo (Tabela 1). No intervalo de 144 horas após a autopolinização foram encontrados óvulos com endosperma de no máximo sete células e, 168 horas após a autopolinização foram encontrados óvulos com endosperma de, no máximo, 11 células (Tabela 1). A maioria dos óvulos, tanto penetrados como não penetrados, de pistilos autopolinizados e de polinização cruzada apresentaram aspecto degenerativo a partir de 72 horas após a polinização.

### *Origem dos embriões supranumerários*

Células volumosas foram observadas na hipóstase (Figuras 4A, D, E, F, G) e também na região micropilar do tegumento (Figuras 4B, C,) de óvulos fecundados ou não fecundados, e estes de pistilos polinizados e não polinizados. Essas células apresentaram uma parede celular espessa e rosada, tornaram-se alongadas e invadiram o interior do megagametófito, podendo ser consideradas células precursoras de embrião adventício (PEA).

Foi observada a presença de 25 PEA em 1.370 óvulos analisados. As PEA foram observadas 24 horas após a polinização cruzada (n=2 óvulos), 24 horas após a autopolinização (n=3 óvulos), 48h após a autopolinização (n=2 óvulos), 48 horas após a polinização cruzada (n=2 óvulos), 96h após a autopolinização (n=2 óvulos), 96h após a polinização cruzada (n=3 óvulos), 120h após a autopolinização (n= 4 óvulos), e 144h após a autopolinização (n=2 óvulos). Em pistilos não polinizados as PEA foram observadas 48h após a abertura da flor (n=1 óvulo), 96h após a abertura da flor (n=2 óvulos) e 120h após a abertura da flor (n=2 óvulos).

Os frutos jovens de *H. serratifolius* apresentaram embriões adventícios provenientes tanto da região calazal quanto da micropilar. Em frutos de 1 cm foram observados o tubo pró-embriônico, um endosperma bisseriado, além da presença do haustório calazal em contato com as células da hipóstase, mas nenhum embrião adventício pode ser observado (Figura 5A). Em frutos maiores que 2 cm as células do endosperma se dividiram periclinalmente, tornando o tecido multisseriado (Figuras 5B-G). O haustório calazal formado por duas células volumosas e de conteúdo citoplasmático denso aumentou de tamanho (Figuras 5B, C, F, G), e um haustório micropilar também pode ser observado a partir deste estádio (figura não apresentada). O pró-embrião zigótico foi observado em meio às células do endosperma (Figuras 5B-F). Em algumas sementes, também foi observada a presença de embriões adventícios que tinham seus suspensores voltados tanto para a região calazal (Figuras 5B, F,

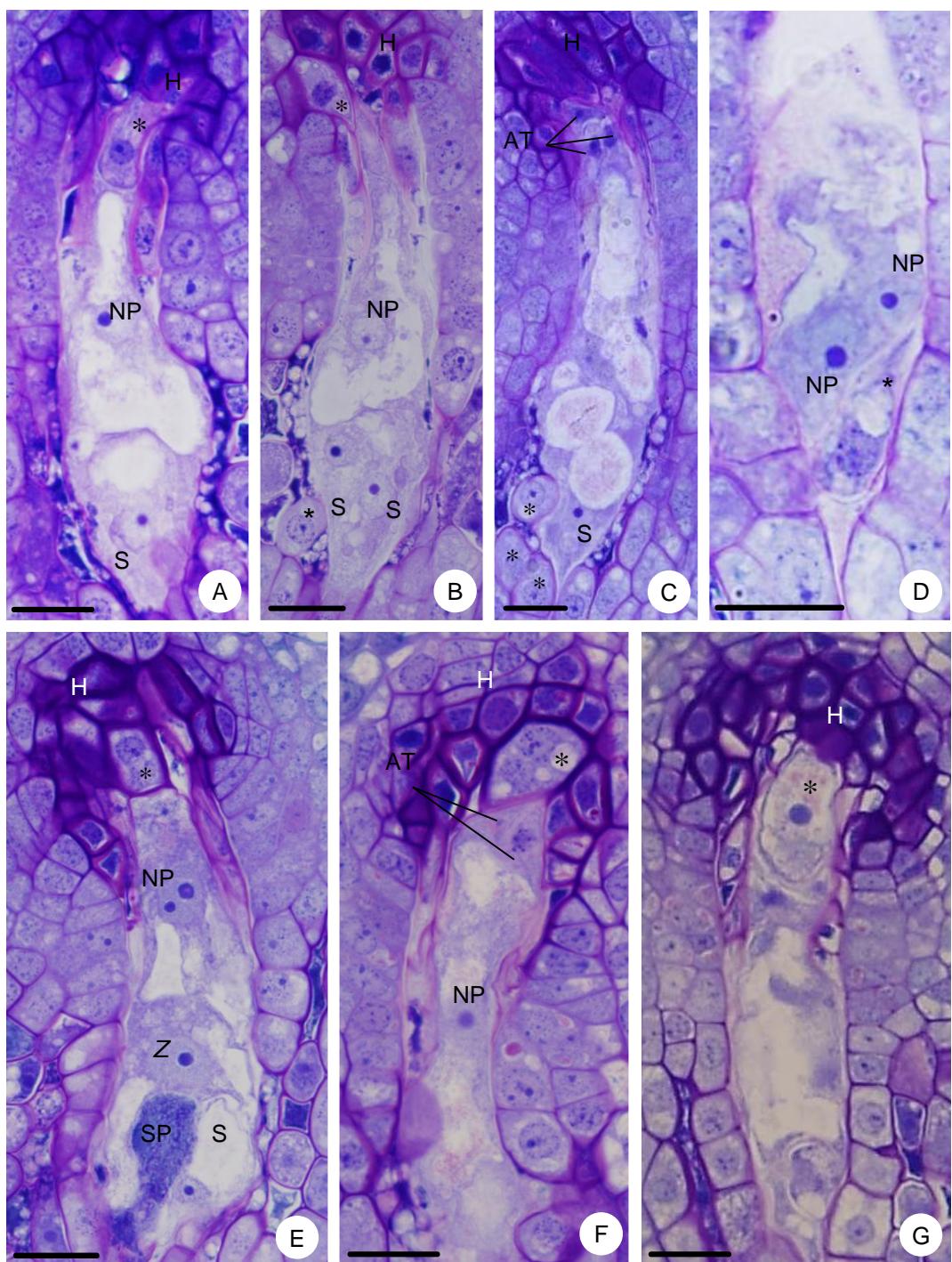


Figura 4. Fotomicrografias de óvulos e sementes jovens de *Handroanthus serratifolius* em secção longitudinal. A. Célula precursora de embrião adventício (PEA) diferenciada na hipóstase e alongando-se para o interior do saco embrionário de pistilo não polinizado 48h após a abertura da flor. B. PEA se desenvolvendo na região calazal em óvulo de um pistilo não polinizado 48h após a abertura da flor. C. PEA se desenvolvendo na região micropilar de óvulo 48h após a autopolinização. O óvulo autopolinizado não foi fecundado. D. PEA se desenvolvendo a partir da região calazal em óvulo de um pistilo 48h após polinização cruzada. O óvulo polinizado não foi penetrado. E. PEA se desenvolvendo na região calazal em óvulo fecundado de um pistilo 96h após a polinização cruzada. Sinérgide penetrada e oosfera/zigoto visíveis. F. PEA se desenvolvendo na região calazal em óvulo de um pistilo não polinizado 96h após a abertura da flor. G. PEA se desenvolvendo na região calazal de óvulo 144h após a autopolinização. O óvulo de pistilo autopolinizado não foi fecundado. AT: antípodas; H: hipóstase; NP: núcleo polar; S: sinérgide; SP: sinérgide penetrada; Z: zigoto. \* indicam células precursoras de embrião adventício. Barras= 20µm.

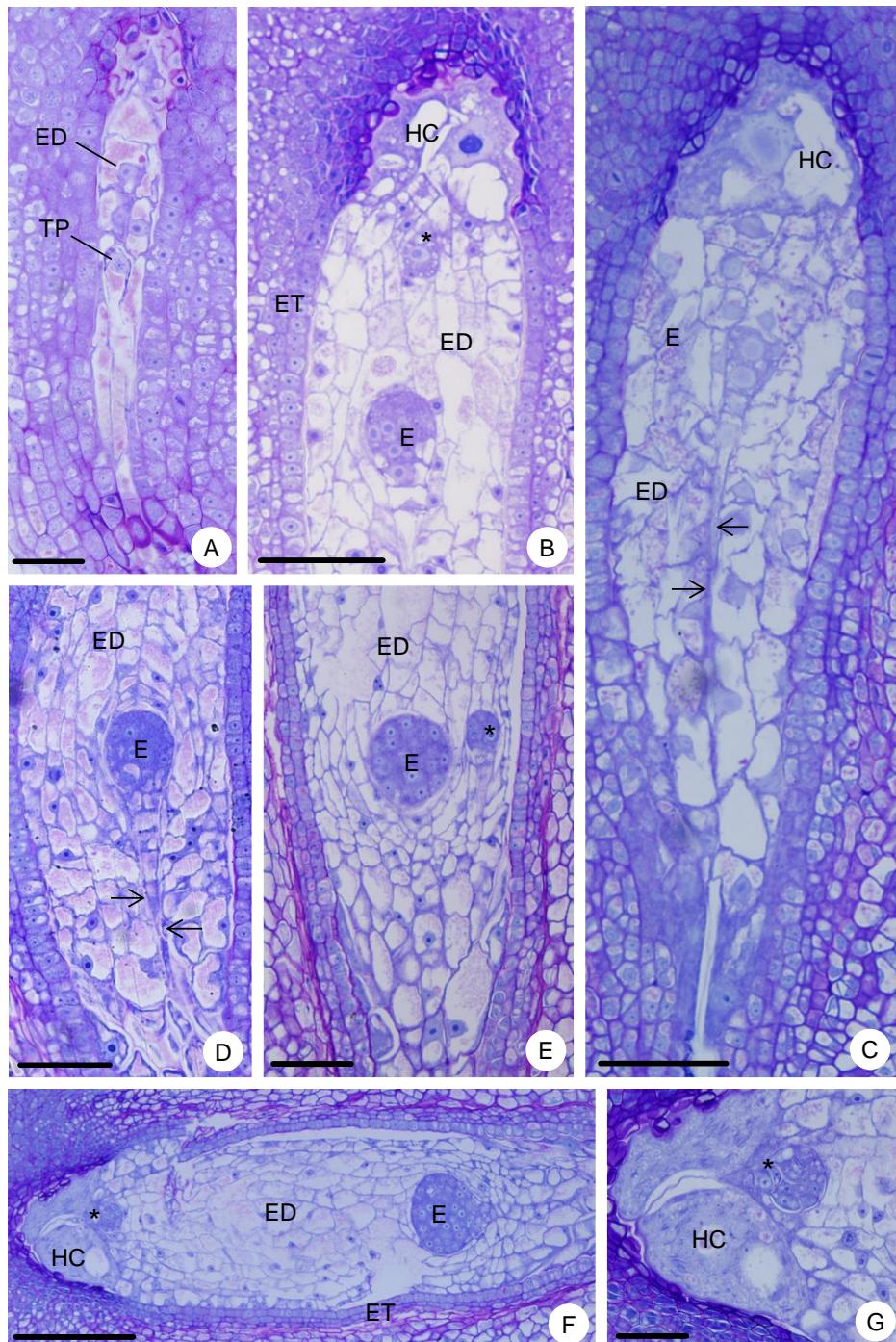


Figura 5. Secções longitudinais de sementes jovens oriundas de frutos de *Handroanthus serratifolius* desenvolvidos naturalmente. A. Semente de fruto de 1 cm de comprimento evidenciando endosperma bisseriado e tubo próembriônico. B. Semente de fruto de 4,5 cm de comprimento evidenciando haustório calazal com células volumosas e citoplasma denso e detalhe do pró-embrião globular zigótico. Notar a presença de um pró-embrião adventício em meio ao endosperma da região calazal. C. Semente de fruto de 6,5 cm de comprimento evidenciando haustório calazal, pró-embrião zigótico com suspensor. D. Semente de fruto de 4 cm evidenciando pró-embrião com suspensor. E-G Seções de sementes de um fruto de 12,5 cm de comprimento. E. Pró-embrião zigótico e pró-embrião adventício oriundo da região micropilar. F. Pró-embrião zigótico e pró-embrião adventício oriundo da região calazal. G. Detalhe da figura 5F evidenciando pró-embrião adventício na região calazal. E: pró-embrião zigótico; ED: endosperma; ET: endotélio; HC: haustório calazal; TP: tubo proembriônico. \*indicam embrião adventício. As setas indicam suspensor. Barras= 20µm.

G) quanto para a região micropilar da semente (Figura 5E), indicando sua origem das PEA diferenciadas na hipóstase ou na região micropilar do tegumento. Embriões adventícios apresentaram um menor tamanho em relação ao embrião zigótico em todos os casos (Figuras 5B, E, F). A identificação do embrião zigótico foi pautada no fato de até 144 horas após a polinização o zigoto já se encontrar proeminente no interior da semente jovem, enquanto as PEA ainda se diferenciavam lentamente no tecido somático. Nos embriões adventícios que tiveram origem na região calazal da semente, pôde-se observar o seu contato direto com as células do tegumento dessa região (Figura 5G).

### *Sistema reprodutivo*

No tratamento de autopolinização manual dois frutos começaram a se desenvolver, mas foram abortados antes de atingirem a maturidade (Tabela 2). No tratamento de polinização cruzada apenas um fruto começou a se desenvolver e chegou à maturidade (Tabela 2). Três frutos do tratamento de polinização natural começaram a se desenvolver, mas apenas um fruto chegou à maturidade (Tabela 2). O fruto de polinização cruzada apresentou 22,5 cm com 70 sementes e o fruto de polinização natural apresentou 21,5 cm com 91 sementes. Nas polinizações experimentais realizadas em Uberlândia no ano de 2013, foram formados cinco frutos no tratamento de autopolinização manual (Tabela 2). Os frutos apresentaram em média  $24,5 \pm 4,5$  cm (n=5) e  $123 \pm 18,9$  sementes por fruto (n=5).

Foi possível detectar um aumento do comprimento dos ovários de 96 para 120 horas após a polinização ( $F_{4,46}= 11,17$ ,  $p<0,0001$ ). Entretanto, não houve diferença no comprimento dos ovários entre os diferentes tratamentos de polinização experimental ( $F_{2,46}=1,33$ ,  $p=0,27$ ). Os ovários também apresentaram um aumento da largura a partir de 72 horas após polinização ( $F_{4,46}=3,58$ ,  $p=0,0126$ ). Os ovários provenientes de pistilos de polinização cruzada ( $1,81\text{cm}\pm0,02$ ) e autopolinização ( $1,79\text{cm}\pm0,02$ ) foram maiores quanto à largura

Tabela 2. Resultados dos tratamentos de polinização experimental em *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose nos municípios de Luziânia (GO) e Uberlândia (MG).

Tratamento de polinização experimental	Luziânia (GO)-2012			Uberlândia (MG)-2013	
	Nº de flores	Dias após a polinização		Nº de flores	Dias após a polinização
		15 dias	30 dias		30 dias
		Nº de frutos (%)	Nº de frutos (%)		Nº de frutos (%)
Autopolinização espontânea	100	0 (0%)	0 (0%)	-	-
Autopolinização manual	104	2 (1,92%)	0 (0%)	78	5 (6,4%)
Emasculação	104	0 (0%)	0 (0%)	-	-
Polinização manual cruzada	101	1(0,9%)	1 (0,9%)	-	-
Polinização natural	119	3 (2,52%)	1(0,84%)	-	-

quando comparados com ovários de pistilos de flores emasculadas ( $1,70 \pm 0,02$ ) ( $F_{2,46}=5,34$ ,  $p=0,0082$ ).

## Discussão

Os resultados mostraram que a presença de elevadas taxas de sementes poliembriônicas em *Handroanthus serratifolius* é decorrente da expressão da apomixia esporofítica como reportado para outras espécies de *Handroanthus* (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010) e *Anemopaegma* (Sampaio *et al.* 2013b). Embora a população de Luziânia tenha apresentado problemas para a formação de frutos no ano de 2012, os indivíduos avaliados em Uberlândia indicam que plantas poliplóides e apomíticas esporofíticas de *H. serratifolius* são auto-férteis, o que parece ser um padrão para populações apomíticas de espécies de Bignoniacées (Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013a). O fato de plantas monoembrônicas e hexaplóides dessa espécie terem se mostrado auto-estéreis indica que a poliploidia não seria o fator determinante para levar à autofertilidade (Alves *et al.* 2013), mas que o desenvolvimento de embriões adventícios deve ser responsável pela manutenção dos pistilos autopolinizados nas plantas (Oliveira *et al.* 1992; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013a, b).

### *Megasporogênese, megagametogênese e origem dos embriões supranumerários*

A megaesporogênese e a megagametogênese em indivíduos poliembriônicos de *H. serratifolius* foi semelhante ao encontrado para as espécies sexuadas da família, com meiose regular, uma tétrade linear e um megagametófito reduzido do tipo *Polygonum* (Govindu 1950; Bittencourt & Mariah 2002b). Essa regularidade confirma a ausência de apomixia gametofítica em *H. serratifolius*, a qual envolveria a supressão da meiose e a produção de um

megagametófito não reduzido (Koltunow 1993; Koltunow & Grossniklaus 2003; Whitton *et al.* 2008).

O megáspero calazal se diferencia em megagametófito e este se alonga durante os estádios uni-, bi- e tetranucelado, devido à expansão do vacúolo central, como o observado em outras espécies de angiospermas (Huang & Russell 1992; Bittencourt & Mariah 2002b). A presença de um óvulo que com apenas dois megásperos em degeneração e dois intactos poderia levar à ocorrência de dois megagametófitos reduzidos em um mesmo óvulo, embora em baixas proporções (1.6%, 2 óvulos) como observado em estudo de plantas monoembriônicas de *H. serratifolius* (Capítulo 2).

A ocorrência de mais de um megagametófito reduzido no óvulo seria uma das explicações para a presença de sementes poliembriônicas com apenas embriões sexuados (Koltunow 1993; Carmo-Oliveira 1998; Koltunow & Grossniklaus 2003; Whitton *et al.* 2008). Entretanto, isso parece ser um caso isolado como observado para *Anemopaegma acutifolium*, (Sampaio *et al.* 2013b) e não justificaria a elevada taxa de poliembrionia nas espécies.

As células precursoras de embrião adventício tiveram origem em células da hipóstase e de células da região do tegumento micropilar, como encontrado para *H. chrysotrichus*, *H. ochraceus* e *A. acutifolium* (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b), caracterizando a presença de apomixia esporofítica também em *H. serratifolius*. As análises indicam que a formação das PEA não depende da fertilização e do inicio da formação do endosperma, pois são formadas em óvulos de pistilos não polinizados. Entretanto, os resultados obtidos nos tratamentos de polinização experimental mostraram que pistilos de flores emasculadas sequer iniciam o seu desenvolvimento, evidenciando a ocorrência de pseudogamia, a necessidade da fecundação e do desenvolvimento de endosperma para evitar o

aborto dos pistilos autopolinizados como observado em outras Bignoniaceae (Richards 2003; Whitton *et al.* 2008; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b).

Em *H. serratifolius* as PEA apresentaram-se pouco desenvolvidas tanto em flores que foram polinizadas, quanto em flores emasculadas. O desenvolvimento destas PEA foi diferente do observado para *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus*, onde PEA oriundas da hipóstase já se encontram atingindo o aparelho oosférico em flores de primeiro dia de antese (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010). Além disso, *H. serratifolius* apresentou um menor número de óvulos com PEA após a polinização ou inicio da antese quando comparado ao observado para *H. chrysotrichus*, onde cerca de 80% dos óvulos/semences apresentavam PEA 168 horas após a polinização (Bittencourt & Moraes 2010).

Em *H. chrysotrichus* foi observado que embora haja o desenvolvimento de PEA em óvulos de flores não polinizadas, estas células eram encontradas em maior número em óvulos fecundados com produção de endosperma (Bittencourt & Moraes 2010). É possível que em *H. serratifolius* a presença de um endosperma mais desenvolvido seja mais importante para o desenvolvimento das PEA que o observado em *H. chrysotrichus*, de forma que estas células só consigam se desenvolver plenamente após o endosperma ter atingido um determinado estádio de desenvolvimento. O mesmo pode ser verdade para *A. acutifolium*, onde as PEA só começam a ser observadas 120 horas após a polinização ou início da antese, o que não teria relação com o maior tempo de maturação de seus frutos (cerca de 1 ano) como sugerido anteriormente (Sampaio *et al.* 2013b), mas sim com o estádio de desenvolvimento do endosperma.

O desenvolvimento do embrião sexuado foi iniciado muito antes do desenvolvimento dos embriões adventícios, o que não deixa dúvidas quanto ao embrião mais robusto no interior da semente corresponder ao embrião sexuado, lhe conferindo maiores chances de sucesso na germinação e no estabelecimento enquanto plântula (Mendes-Rodrigues *et al.*

2012). O mesmo foi encontrado em *Anemopaegma acutifolium* (Sampaio *et al.* 2013b) comprovando o que foi relatado que estes embriões podem coexistir no interior das sementes e que o embrião sexuado teria vantagens em situações de competição (Mendes-Rodrigues *et al.* 2012). Já em *H. chrysotrichus* e *H. ochraceus* as PEA podem se desenvolver antes do embrião sexuado, assim o embrião adventício pode ser maior que o sexuado ou as sementes podem apresentar apenas embriões adventícios (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010, Mendes-Rodrigues *et al.* 2012).

#### *Autofertilidade em espécies poliplóides e apomíticas esporofíticas*

Na população de *H. serratifolius* de Luziânia (GO), com 15 dias após as polinizações, havia apenas pistilos de polinizações naturais, autopolinizações e polinizações cruzadas, sendo que desses, menos de 1% de polinização cruzada e natural chegaram à maturidade. Não se sabe ao certo o motivo pelo qual tantos pistilos foram abortados na população de Luziânia em 2012. As polinizações experimentais nesta população foram realizadas num segundo *boom* de floração, quando vários frutos já estavam se desenvolvendo na planta. Dessa forma, o aborto dos pistilos polinizados deve estar relacionado a uma escassez de nutrientes para a formação de novos frutos.

Embora tenha ocorrido o aborto dos pistilos autopolinizados no ano de 2012, 6,4% dos pistilos autopolinizados no ano de 2013 em Uberlândia (MG) formaram frutos que atingiram a maturidade, indicando autofertilidade em espécimes poliplóides e apomíticos esporofíticos de *H. serratifolius*, como observado para *H. chrysotrichus* e *H. ochraceus* (Bittencourt & Semir 2005; Bittencourt & Moraes 2010). Embora a poliploidia seja considerada capaz de quebrar sistemas de autoincompatibilidade gametofíticos (Richards 1986; de Nettancourt 1997), uma população poliplóide e monoembriônica (supostamente não apomítica) de *H. serratifolius* não foi capaz de formar frutos maduros de autopolinizações com sementes

viáveis (Alves *et al.* 2013), levando a crer que a poliploidia não seja a principal responsável pela autofertilidade nesta espécie.

Acredita-se que o desenvolvimento de embriões adventícios seria capaz de impedir o aborto de pistilos autopolinizados, o que só seria viável devido à presença do sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI), o qual permite o desenvolvimento inicial do endosperma que supre nutricionalmente os embriões (Oliveira *et al.* 1992; Bittencourt & Semir 2005; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b). Dessa forma, a autofertilidade nas espécies apomíticas esporofíticas e poliplóides de Bignoniaceae estaria sendo causada pelo desenvolvimento dos embriões adventícios em espécies com LSI e não pela poliploidia.

O incremento no número de estudos de embriologia que comprovam que as elevadas taxas de poliembrionia (17 a 91%) em espécies de Bignoniaceae são resultado da apomixia esporofítica consolida um padrão para a família. A causa da expressão da apomixia esporofítica parece estar relacionada à aloploidizações, como normalmente descrito para espécies apomíticas gametofíticas (Carman 2007; Hörandl 2010).

A ocorrência de autofertilidade em espécies poliplóides e apomíticas pseudogânicas parece um caminho evolutivamente mais vantajoso, pois se fossem auto-estéreis não poderiam usufruir das vantagens da apomixia no caso de precariedade de polinizadores, populações pequenas ou geneticamente empobrecidas (Hörandl 2010). Acarretando também em complicações para a reprodução e estabelecimentos dos aloploplóides fundadores de novas populações ou que estivessem em meio aos seus parentais diplóides (Hörandl 2010). A aloploidia seria o gatilho para a expressão da apomixia esporofítica e o desenvolvimento dos embriões adventícios seria o fator chave para evitar a queda dos pistilos autopolinizados em espécies de Bignoniaceae com LSI como *H. serratifolius*.

## Referências Bibliográficas

- Alves MF, Duarte MO, Oliveira PE & Sampaio DS. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 714-722.
- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL & Santos AA. 2007. BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas. Sociedade Civil Mamirauá CNPQ/Belém.
- Bittencourt Junior NS & Mariath JEA. 2002a. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): megasporogenesis and integument development. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 103-115.
- Bittencourt Junior NS & Mariah JEA. 2002b. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): embryo sac development. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 117-127.
- Bittencourt Júnior NS, Gibbs PE & 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 Junior NS & Semir J. 2005. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). *International Journal of Plant Sciences* 166: 493-506.
- Bittencourt Junior NS & Moraes CIG. 2010. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae) a histological study of post-pollination events. *Plant Systematics and Evolution* 288: 59-76.
- Carman JG. 2007. Do duplicate genes cause apomixis? In: Hörndl E, Grossniklaus U, van Dijk PJ, Sharbel TF, eds. *Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives*. Rugell: A. R. G. Gantner Verlag, 63–91.

- Carmo-Oliveira R. 1998. Estudos embriológicos e aspectos da morfologia floral de Vochysiaceae. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 151p.
- Costa ME, Sampaio DS, Paoli AAS & Leite SCAL. 2004 Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). Revista Brasileira de Botânica 27: 395–406.
- de Nettancourt D. 1997. Incompatibility in angiosperms. Sexual Plant Reproduction 10: 185–199.
- Feder N & O'brien TP. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. American Journal of Botany 55: 123-142.
- Ferreira DF. 2000. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. 45<sup>a</sup> Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos: 255-258.
- Firetti-Leggieri F, Costa IR, Lohman LG, Semir J & Forni-Martins ER. 2011. Chromossomes studies in *Anemopaegma*. (Bignonieae, Bignoniaceae) in Cytologia 76: 185-191.
- Firetti-Leggieri F, Lohmann LG, Alcantara S, Costa IR & Semir J. 2013. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignonieae, Bignoniaceae). Plant Reproduction 26: 43-53.
- Gandolphi G & Bittencourt Junior NS. 2010. Sistema reprodutivo do Ipe-Branco – *Tabebuia roseo-alba*. (Ridley) Sandwith. Acta Botanica Brasilica 24: 840-851.
- Gentry AH. 1992. A synopsis of Bignoniaceae ethnobotany and economic botany. Annals of the Missouri Botanical Garden 79: 53-64.
- Gerrits PO & Smid L. 1983. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. Journal of Microscopy 132: 81-85.

Gibbs PE & Bianchi MB. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. *Botanica Acta* 106: 64-71.

Gibbs PE & Bianchi MB. 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.

Govindu HC. 1950. Studies in the embryology of some members of Bignoniaceae. *Proceedings of the Indian Academical Science* 32: 164-178.

Hörndl E. 2010. The evolution of self-fertility in apomitic plants. *Sexual Plant Reproduction* 23: 73-86.

Huang BQ & Russell SD. 1992. Female germ unit: organization, isolation, and function. *International Review of Cytology* 140: 293-332.

Husband BC, Ozimec B, Martin SL & Pollock L. 2008. Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. *International Journal of Plant Sciences* 169: 195-206.

Igic B, Russell L & Joshua RK. 2008. Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *International Journal Plant of Sciences*. 169: 93-104.

Johri BM, Ambegaokar KB & Srivastava PS. 1992. *Embryology of Angiosperms*. Germany. Springer-Verlag.

Kapil RN & Bhatnagar AK. 1982. Ultrastructure and biology of female gametophyte in flowering plants. *International Review of Cytology* 70: 291-341.

Koltunow AM 1993. Apomixis: embryo sac and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* 5: 1425-1437.

Koltunow AM & Grossniklaus U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 547-574.

Lersten NR. 2004. Flowering plant embryology, with emphasis on economic species. Oxford: Blackwell Publishing.

Maheshwari, P., 1963. Recent Advances in the Embryology of Angiosperms. Catholic Press, Ranchi.

Mc Dowel EM & Trump B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100: 517-527.

Mendes-Rodrigues C, Sampaio DS, Costa ME, Caetano APS, Ranal MA, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2012. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). *Flora* 207: 264-274.

Oliveira PE, Gibbs PE, Barbosa AA & Talavera S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. *Plant Systematics and Evolution* 197: 207-219.

Piazzano M. 1998. Números cromosómicos en Bignoniaceae de Argentina. *Kurtziana* 26: 179-189.

Richards, AJ. 1986. Plant Breeding Systems. London, George Allen & Unwin.

Richards AJ. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London* 358: 1085-1093.

Sampaio DS, Costa ME & Paoli AAS. 2007. Ontogenia da semente de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 30: 289–302.

Sampaio DS. 2010. Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações nos sistema de autoincompatibilidade. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil.

Sampaio DS, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2013a. Mating in the pseudogamic apomictic *Anemopaegma acutifolium* DC: another case of pseudo-self-compatibility in Bignoniaceae? *Plant Biology* 15: 919-924.

Sampaio DS, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2013b. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from Central Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 173: 77-91.

Von Teichman I & Van Wyk AE. 1991. Trends in evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachychalazy and recalcitrance. *Botanical Journal of the Linnean Society* 105: 211-237.

Whitton J, Sears CJ, Baack EJ & Otto SP. 2008. The dynamic nature of apomixes in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 169: 169-182.

## **Capítulo 2**

# **AUTOINCOMPATIBILIDADE DE AÇÃO TARDIA E MONOEMBRIONIA EM *HANDROANTHUS SERRATIFOLIUS* (VAHL) S. GROSE (BIGNONIACEAE), UMA ESPÉCIE POLIPLÓIDE**

**Resumo (Autoincompatibilidade de ação tardia e monoembrionia em *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae), uma espécie poliplóide)** O sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI) parece predominar nas espécies de Bignoniaceae, embora sua distinção da ação da depressão endogâmica seja complicada. O objetivo do trabalho foi obter indícios da atuação de um LSI ou da depressão endogâmica nos pistilos autopolinizados de uma população hexaplóide, auto-estéril e monoembriônica de *H. serratifolius*. Para isso, foram realizadas análises histológicas dos eventos posteriores à polinização de pistilos autopolinizados e pistilos submetidos à polinização cruzada. Apesar de tubos polínicos penetrarem e fecundarem a maioria dos óvulos em pistilos autopolinizados, em 48, 72 e 96h após a polinização, a fecundação e o desenvolvimento do endosperma são mais lentos nestes óvulos que em óvulos de pistilos de polinização cruzada. Foi observado a presença de células precursoras de embrião adventício indicando que os indivíduos estudados apresentam um potencial para a expressão de apomixia esporofítica. O fato do desenvolvimento do endosperma ter sido mais lento em alguns intervalos após a autopolinização, associado ao fato de que não há má formação do zigoto e endosperma e que a abscisão dos pistilos autopolinizados ocorre de maneira uniforme após a polinização, indica que o aborto destes pistilos seja decorrente da ação do LSI.

**Palavras-chave:** autoesterilidade, hexaplóide, monoembrionia

## Introdução

Bignoniaceae é uma das famílias mais diversas de plantas lenhosas, apresentando cerca de 82 gêneros e 827 espécies (Olmstead *et al.* 2009). Das 65 espécies estudadas quanto ao sistema reprodutivo, em 77% foi constatada autoesterilidade, acarretada por um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia – LSI (Gibbs & Bianchi 1993; Bittencourt *et al.* 2003; 2011; Bittencourt & Semir 2005; Gandolphi & Bittencourt 2010). Nas espécies de Bignoniaceae com LSI investigadas, o pistilo autopolinizado é abortado com zigoto e endosperma em estádio inicial de desenvolvimento (Richards 1986; de Nettancourt 1997; Allen & Hiscock 2008).

O controle genético do LSI ainda não é conhecido e pesquisas tentando entender essa questão vêm sendo realizadas (Lipow & Wyatt 1999). Este fato permite que muitas vezes o LSI seja confundido com a ação da depressão endogâmica, a qual se expressa através de alelos recessivos deletérios que, quando em homozigose, podem levar ao aborto de pistilos autopolinizados em diferentes estádios de desenvolvimento (Gibbs & Bianchi 1999; Bittencourt *et al.* 2011).

Embora conceitualmente a discriminação entre LSI e depressão endogâmica seja simples, experimentalmente pode ser difícil. Assim, alguns critérios vêm sendo utilizados para determinar se o aborto do pistilo autopolinizado é decorrente do LSI ou da ação da depressão endogâmica. Em plantas com LSI observa-se que os pistilos sofrem um aborto uniforme pouco tempo após a autopolinização e que não há malformações do zigoto e/ou do endosperma, além da não produção ou baixa produção de sementes pela maioria dos indivíduos da população (Seavy & Bawa 1986). Uma menor velocidade do crescimento de tubos polínicos em pistilos autopolinizados quando comparado a pistilos de polinização cruzada e, consequentemente, um atraso na penetração dos óvulos, bem como um atraso no desenvolvimento inicial do endosperma, também foram características que apontam para a

ocorrência de LSI em Bignoniacées (Gibbs & Bianchi 1993, Bittencourt *et al.* 2003; Bittencourt & Semir 2005; Gandolphi & Bittencourt 2010). Já na depressão endogâmica, existe uma variação no tempo em que ocorre o aborto, podendo ocorrer em diferentes estádios da vida da planta. Além disso, o zigoto e/ou o endosperma podem apresentar malformações quando ocorrem autofecundações e uma variabilidade na produção de sementes resultantes de autopolinizações entre indivíduos seria observada (Seavy & Bawa 1986).

A poliploidia é associada à quebra do sistema de autoincompatibilidade gametofítico – GSI (Richards 1986; de Nettancourt 1997). Como todas as espécies poliplóides e apomíticas da família que tiveram o sistema reprodutivo investigado se mostraram auto-férteis (Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013a, b), seria possível que a poliploidia também fosse capaz de quebrar o LSI. Entretanto, a investigação de uma população hexaplóide e supostamente não apomítica (não poliembrionica) de *Handroanthus serratifolius* evidenciou a ocorrência de autoesterilidade (Alves *et al.* 2013), indicando que a poliploidia não foi capaz de gerar autofertilidade em *H. serratifolius*.

A probabilidade da depressão endogâmica agir sobre espécies poliplóides é menor do que em espécies diplóides, especialmente quando se trata de alopoliplóides (Husband *et al.* 2008), mas essa possibilidade não deve ser excluída. No caso da atuação da depressão endogâmica sobre os indivíduos hexaplóides de *H. serratifolius* (Alves *et al.* 2013), poderia se considerar a possibilidade da poliploidia também ser capaz de quebrar os LSI e dos pistilos não formarem frutos graças à atuação da depressão endogâmica.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar os eventos pós-polinização em indivíduos auto-estéreis e monoembriônicos de *H. serratifolius*, a fim de obter indícios da atuação de um LSI ou da depressão endogâmica nos pistilos autopolinizados, permitindo definir os efeitos da poliploidia sobre o sistema reprodutivo da espécie.

## Material e Métodos

*Espécie estudada e áreas de estudo-* *Handroanthus serratifolius*, conhecida como ipê amarelo, é uma árvore de grande porte que apresenta uma grande variabilidade morfológica, mas em geral é representada por plantas com folhas compostas de margem serrilhada, corola tubular amarelo-limão, fruto do tipo cápsula linear glabra com diversos nectários extraflorais e estrias longitudinais (Gentry 1992). A espécie apresenta floração maciça que ocorre por cerca de um mês e meio e os frutos levam de 30 dias para maturação. *Handroanthus serratifolius* é reportada como hexaplóide, apresentando  $2n=120$  cromossomos. Possui populações poliembriônicas, apomíticas esporofíticas e auto-férteis (Mendes-Rodrigues *et al.* 2012; Capítulo 1) e populações monoembriônicas e auto-estéreis (Alves *et al.* 2013).

As plantas estudadas são auto-estéreis e monoembriônicas, ou seja, supostamente não apomíticas (Alves *et al.* 2013). As polinizações experimentais foram realizadas em quatro árvores cultivadas localizadas no município de Uberlândia, MG ( $18^{\circ}58'25.11''S$ ,  $48^{\circ}17'26.10''W$ ;  $18^{\circ}53'15.03''S$ ,  $48^{\circ}15'37.35''W$ ; e  $18^{\circ}55'01.09''S$ ,  $48^{\circ}14'58.13''W$ ), nos anos de 2010 e 2013 e em duas árvores cultivadas localizadas no município de Uberaba, MG ( $19^{\circ}39'51.27''S$ ,  $47^{\circ}58'05.40''W$ ) no ano de 2010. Os espécimes foram depositados no *Herbarium Uberlandense* da Universidade Federal de Uberlândia (Uberaba HUFU 60075; Uberlândia HUFU 5286, 52590, 52591).

*Análises histológicas dos eventos pós-polinização-* Foram realizadas autopolinizações manuais (o pólen foi retirado da antera e colocado no estigma da mesma flor) e polinizações manuais cruzadas (o pólen foi retirado de anteras de flores de um indivíduo e colocado no estigma de flores de indivíduos diferentes). Quatro pistilos provenientes de autopolinizações e quatro provenientes de polinizações cruzadas foram coletados 24, 48, 72, 96 e 120 horas após

as polinizações, exceto para o intervalo de 72 horas após as autopolinizações, quando foram coletados 3 pistilos.

Os pistilos foram fixados em solução de gluteraldeído 1% e formaldeído 4% (Mc Dowell & Trump 1976) em tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2. Os ovários tiveram suas paredes retiradas com auxílio de pinças e bisturi sob microscópio estereoscópico Olympus SZX12, de forma a expor os óvulos presos ao septo. Os óvulos foram desidratados em série etílica e passaram por uma série de etanol:clorofórmio (3:1, 1:1, 3:1) para a retirada de ceras epicuticulares. A inclusão foi realizada em hidroxietilmacrilato (Gerrits & Smid 1983). Cortes seriados de 3  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos em micrótomo de rotação (RM2135, Leica) equipado com navalha de vidro de 8 mm. O material foi corado com Azul de Toluidina O 0,05% em tampão benzoato de sódio, pH 4,4 (Feder & O'Brien 1968) e as lâminas montadas com Permount<sup>®</sup>. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX40 e fotografadas com auxílio de câmera digital Olympus DP70.

*Análises estatísticas*- O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar o número de óvulos penetrados, fecundados e de óvulos com endosperma em diferentes estádios do desenvolvimento entre pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada, utilizando-se o programa BioEstat (Ayres 2007).

## Resultados

*Handroanthus serratifolius* apresenta saco embrionário do tipo *Polygonum*, com duas sinérgides, oosfera, uma célula média com dois núcleos polares e três antípodas (Figuras 1A, B). Após penetrar o óvulo, o tubo polínico descarrega seu conteúdo citoplasmático em uma das sinérgides, que passa a apresentar citoplasma de coloração densa (Figuras 1B, C, D). Não foi possível observar a movimentação dos gametas masculinos e sua fusão ao núcleo

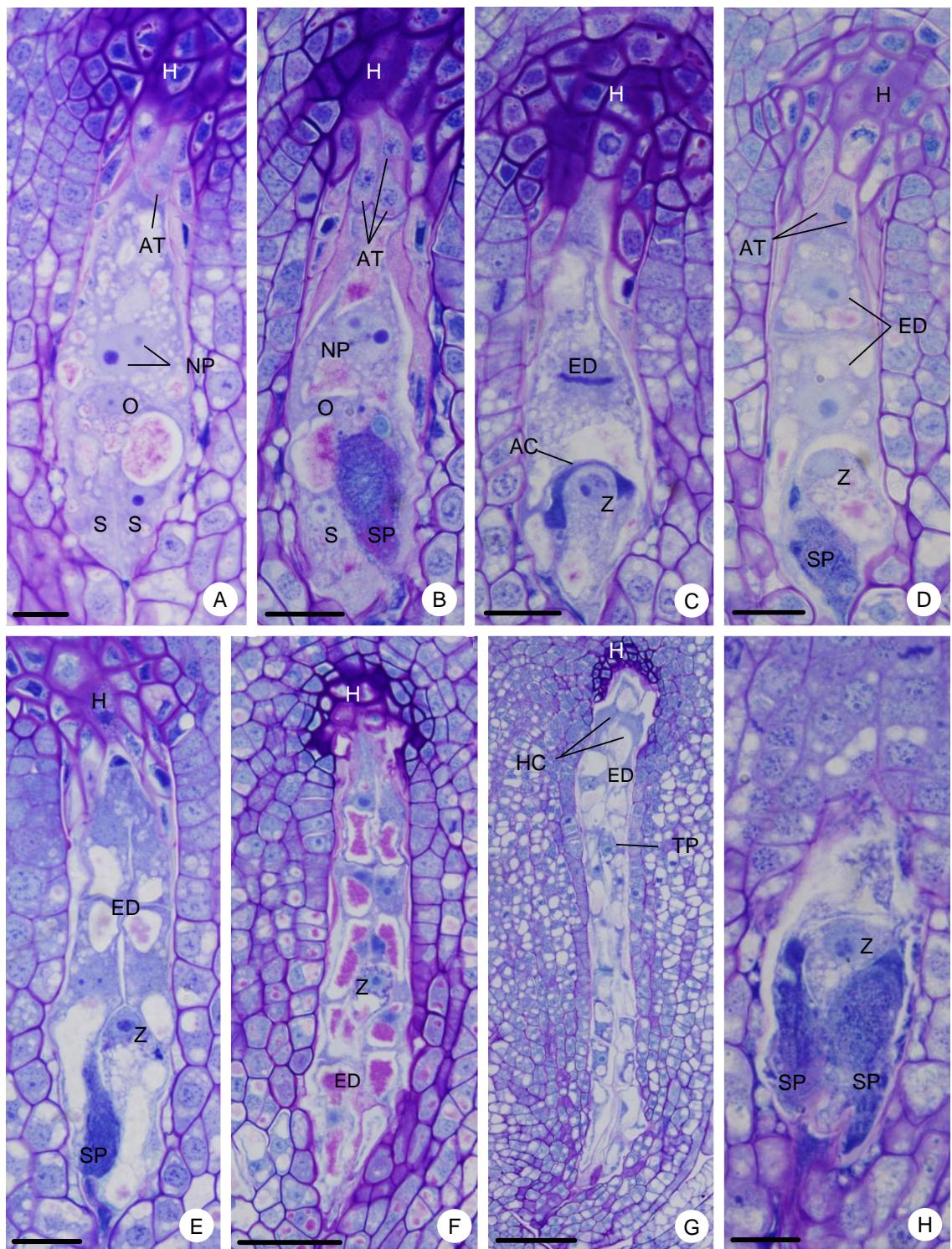


Figura 1. Fotomicrografias de óvulos e sementes jovens de *Handroanthus serratifolius* em secção longitudinal. A. Saco embrionário apresentando sinérgides não penetradas e núcleos polares não fusionados em óvulo de pistilo coletado 24h após a polinização cruzada. B. Saco embrionário apresentando sinérgide penetrada pelo tubo polínico em óvulo de pistilo coletado 24h após a autopollinização. Os núcleos polares ainda não se fusionaram. C. Alça citoplasmática da sinérgide penetrada, zigoto e célula primária do endosperma em cariocinese, com placa metafásica evidente 48h após a polinização cruzada. D. Sinérgide penetrada, zigoto e endosperma com duas células em pistilo coletado 48h após a polinização cruzada. E. Sinérgide penetrada, zigoto e endosperma com quatro células em pistilo coletado 72h após a polinização cruzada. F. Zigoto e endosperma com 10 células 96h após a polinização cruzada. G. Tubo proembriônico e endosperma com 16 células 120h após a autopollinização. Células da câmara calazal diferenciadas em haustório calazal do endosperma. H. Duas sinérgides penetradas e zigoto em pistilo coletado 48h após a polinização cruzada. AC: alça citoplasmática; AT: antípodas; ED: endosperma; H: hilóspase; HC: haustório calazal; O: oosfera; NP: núcleos polares; S: sinérgide; SP: sinérgide penetrada; TP: tubo proembriônico; Z: zigoto. Barras= 20µm.

da oosfera e da célula média, assim, foram considerados fecundados óvulos com sinérgide penetrada e/ou aqueles que apresentaram uma alça citoplasmática entre a célula média e o polo calazal da oosfera (Figura 1C).

Após a fusão tripla, o endosperma passa por uma cariocinese seguida por citocinese. Essa primeira divisão é transversal originando uma célula na câmara micropilar e uma na câmara calazal (Figura 1C, D). A segunda divisão do endosperma, na maioria das vezes, é longitudinal, podendo ocorrer simultaneamente nas células da câmara calazal e micropilar, originando um endosperma com quatro células (Figura 1E), mas também pode ocorrer de forma assincrônica, originando um endosperma de três células (figura não apresentada).

A terceira divisão do endosperma é transversal e ocorre nas células da câmara micropilar, originando um endosperma com seis células. As células do endosperma podem apresentar-se binucleadas e até mesmo trinucleadas (Figuras 1D, E, F). Do estádio de seis células até os últimos estádios da endospermogênese analisados, com 24 células (120 horas após a polinização), a divisão nas células do endosperma foi transversal, exceto as duas células calazais que não se dividem mais, e o mesmo permaneceu bisseriado em todos os intervalos analisados (Figuras 1F, G). Depois do quarto dia após a polinização (96h) observou-se a diferenciação das duas células da região calazal do endosperma, que passa a apresentar citoplasma denso, adquirindo características de haustório calazal (Figuras 1F, G). Foram observadas as duas sinérgides penetradas pelo tubo polínico em menos de 1% (2 de 2.307 dos óvulos analisados) (Figura 1H).

Em 24 horas após a polinização os pistilos provenientes de autopolinização apresentaram mais óvulos penetrados ou em estádios posteriores do que pistilos de polinização cruzada ( $\chi^2=3,96$ ,  $p=0,0465$ ). No entanto, 48 horas após a polinização, pistilos de polinização cruzada apresentaram mais óvulos fecundados e em estádios posteriores do que pistilos de autopolinização ( $\chi^2=22,616$ ,  $p<0,0001$ ), bem como mais óvulos com endosperma

de duas ou mais células que óvulos de pistilos autopolinizados ( $\chi^2=10,06$ ,  $p=0,0011$ ) (Tabela 1). Nos demais intervalos após a polinização (72 a 120 horas), de 30 a 60% dos óvulos não foram penetrados (Tabela 1).

No intervalo de 72 horas após a polinização, não houve diferença no número de células do endosperma entre pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada. Porém, um óvulo proveniente de polinização cruzada apresentou 10 células no endosperma, enquanto em óvulos de pistilos autopolinizados foram encontradas no máximo oito células do endosperma (Tabela 1).

Em 96 horas após a polinização, observou-se que pistilos de polinização cruzada apresentam mais óvulos com oito ou mais células do endosperma do que pistilos autopolinizados ( $\chi^2=5,46$ ,  $p=0,0194$ ) (Tabela 1). Fica claro que neste intervalo pistilos de autopolinização ainda apresentam a maioria dos óvulos nos estádios de 3-4 ou 5-6 células do endosperma, enquanto os de polinização cruzada apresentam a maioria dos óvulos nos estádios de 7-8 células do endosperma (Figuras 2A, B). Em 120 horas após a polinização, pistilos autopolinizados apresentam mais óvulos com endospermas de 12 ou mais células que óvulos de pistilos de polinização cruzada ( $\chi^2=15,13$ ,  $p<0,0001$ ) (Tabela 1), no entanto, em todos os pistilos de autopolinização foram observados óvulos em degeneração, o que não foi observado em pistilos de polinização cruzada.

Células volumosas foram encontradas na região da hipóstase (10 células em 10 óvulos de 2.307 analisados). Estas células se alongaram para o interior do saco embrionário (Figuras 3A-C) tanto em óvulos fecundados (Figura 3D) quanto em óvulos de pistilos que foram polinizados, porém não foram penetrados e fecundados (Figuras 3A, B, C). Estas células foram consideradas células precursoras de embrião adventício (PEA) por se assemelharem muito às encontradas em plantas apomíticas esporofíticas e poliembrioníca

Tabela 1. Número e porcentagem média de óvulos não penetrados, penetrados, fecundados e em diferentes estádios de desenvolvimento do endosperma em pistilos coletados 24, 48, 72, 96 e 120 horas após as polinizações experimentais em plantas auto-estéreis de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose. Foram considerados óvulos penetrados aqueles penetrados pelo tubo polínico, mas que não tiveram uma das sinérgides penetrada. Foram considerados óvulos fecundados aqueles com uma das sinérgides penetrada pelo tubo polínico, sem que houvesse o desenvolvimento do endosperma. Auto=autopolinização; Cruz=polinização cruzada; E=óvulos com endosperma; Fec=óvulos fecundados; N Pen=óvulos não penetrados; Pen=óvulos penetrados. Os números após a letra E nos diferentes estádios indicam o número de células do endosperma. Os números entre parênteses ao lado de cada tratamento de polinização indicam o número de pistilos analisados.

Estádio	24 horas (%)		48 horas (%)		72 horas (%)		96 horas (%)		120 horas (%)	
	Auto (4)	Cruz (4)	Auto (4)	Cruz (4)	Auto (3)	Cruz (4)	Auto (4)	Cruz (4)	Auto (4)	Cruz (4)
N Pen	258(91.5%)	246(95.7%)	173(69.2%)	110(47.8%)	103(42.4%)	140(59.3%)	141(59.0%)	54(31.0%)	51(39.5%)	148(55.4%)
Pen	2 (0.7%)	2 (0.8%)	1 (0.4%)	0	0	2 (0.8%)	2 (0.8%)	0	0	0
Fec	20 (7.1%)	7 (2.7%)	16 (6.4%)	77 (33.5%)	11 (4.5%)	5 (2.1%)	12 (5.0%)	4 (2.3%)	6 (4.7%)	9 (3.4%)
E2	2 (0.7%)	2 (0.8%)	30 (12%)	35 (15.2%)	20 (8.2%)	10 (4.2%)	11 (4.6%)	0	3 (2.3%)	7 (2.6%)
E3	0	0	13 (5.2%)	2(0.9%)	10 (4.1%)	7 (3.0%)	10 (4.2%)	6 (3.4%)	1 (0.8%)	12 (4.5%)
E4	0	0	17 (6.8%)	6 (2.6%)	33 (13.6%)	22 (9.3%)	19 (7.9%)	16 (9.2%)	3 (2.3%)	10 (3.7%)
E5	0	0	0	0	19 (7.8%)	11 (4.7%)	3 (1.3%)	7 (4.1%)	1 (0.8%)	11 (4.1%)
E6	0	0	0	0	27 (11.1%)	21 (8.9%)	16 (6.7%)	26(14.9%)	5 (3.8%)	17 (6.4%)
E7	0	0	0	0	14 (5.8%)	9 (3.8%)	1 (0.4%)	9 (5.2%)	2 (1.6%)	2 (0.7%)
E8	0	0	0	0	6 (2.5%)	8 (3.4%)	17 (7.1%)	33(19.0%)	7 (5.4%)	7 (2.6%)
E9	0	0	0	0	0	0	2 (0.8%)	6 (3.4%)	4 (3.1%)	5 (1.9%)
E10	0	0	0	0	0	1 (0.4%)	4 (1.7%)	13 (7.5%)	7 (5.4%)	15 (5.6%)
E11	0	0	0	0	0	0	1 (0.4%)	0	5 (3.8%)	2 (0.8%)
E12	0	0	0	0	0	0	0	0	11 (8.5%)	11 (4.1%)
E13	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.6%)	1 (0.4%)
E14	0	0	0	0	0	0	0	0	5 (3.9%)	8 (3.0%)
E15	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.8%)	1 (0.4%)
E16	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (2.3%)	0
E17	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.6%)	0
E18	0	0	0	0	0	0	0	0	5 (3.8%)	1 (0.4%)
E20	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.6%)	0
E21	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.6%)	0
E24	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.8%)	0
Nº Ovulos	282	257	250	230	243	236	239	174	129	267

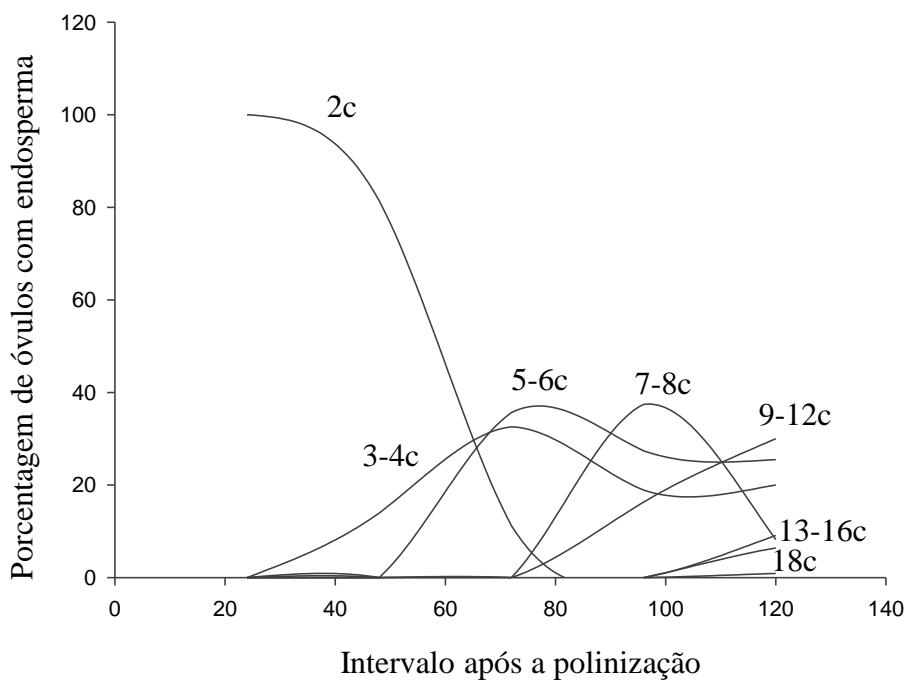
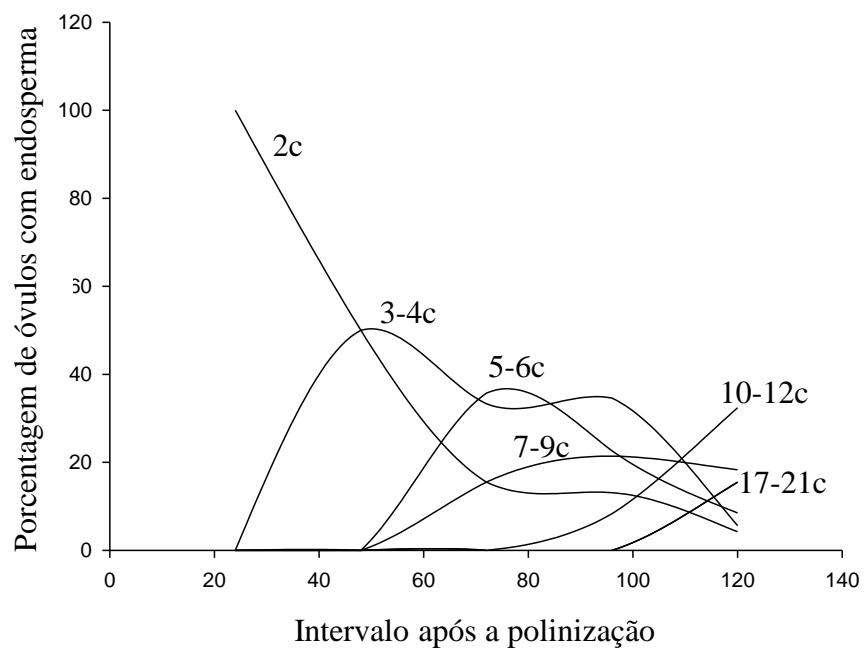


Figura 2. Porcentagem média de óvulos com endosperma em diferentes estádios de desenvolvimento provenientes de pistilos coletados nos intervalos de 24 a 120h após a polinização em *Handroanthus serratifolius*. A. pistilos autopolinizados. B. Pistilos de polinização cruzada. Os números seguidos pela letra c indicam o número de células do endosperma.

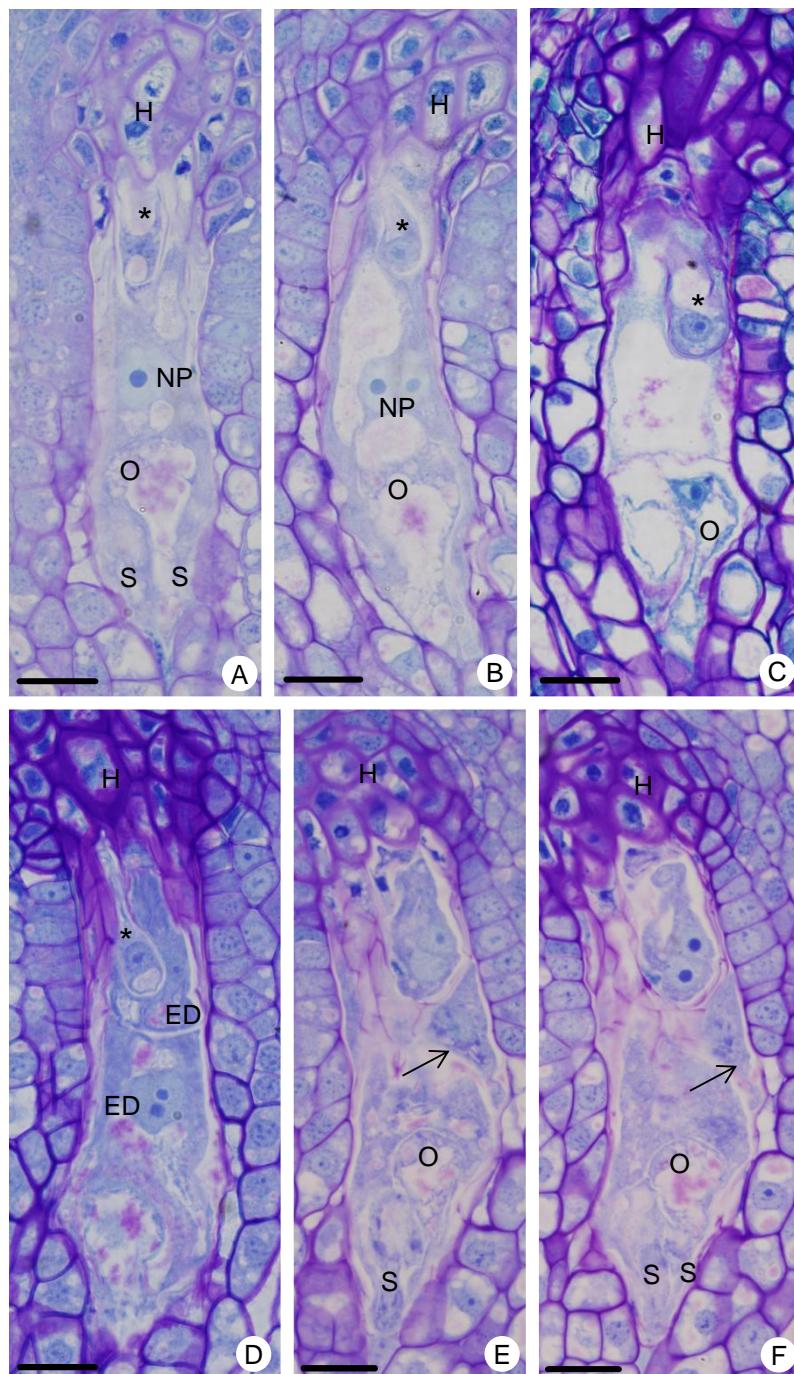


Figura 3. Fotomicrografias de óvulos e sementes jovens de *Handroanthus serratifolius* em seção longitudinal. A-C. Óvulos não penetrados ou fecundados. A. Célula precursora de embrião adventício (PEA) com origem na hipóstase alongando-se para o interior do saco embrionário em óvulo de pistilo coletado 72h após a autopolinização. B. PEA alongando-se para o interior do saco embrionário em pistilo coletado 72h após a polinização cruzada. C. PEA alongando-se para o interior do saco embrionário de um pistilo coletado 120h após a autopolinização, com óvulos em processo degenerativo. D. PEA alongando-se para o interior do saco embrionário de um óvulo com endosperma de três células coletado 48h após a autopolinização. E. F. Cortes sequenciais de um óvulo de pistilo coletado 72h após a polinização cruzada. Nota-se a presença de um megagametófito maduro, de um megagametófito provavelmente em estádio tetranucleado, e de um terceiro o qual não se pode definir o estádio de desenvolvimento. ED: endosperma; H: hipóstase; O: oosfera; NP: núcleos polares; S: sinérgide. \* indicam células precursoras de embrião adventício. Setas indicam o megagametófito em estádio tetranucleado. Barras=20µm.

As PEA foram encontradas em óvulos de pistilos coletados 48 (n=1 óvulo), 96 (n=3 óvulos) 120 (n=1 óvulo) horas após a autopolinização e 24 (n=2 óvulos), 48 (n=2 óvulos), 72 (n=1 óvulo) horas após a polinização cruzada. Também foi observado um óvulo apresentando três megagametófitos, sendo um maduro, um provavelmente em estádio tetranucleado e outro em que não foi possível identificar o estádio de desenvolvimento (Figuras 3E, F).

## Discussão

O fato de os óvulos provenientes de autofecundações não apresentarem malformações do endosperma ou do zigoto, além de terem a fecundação e um desenvolvimento do endosperma mais lento em 48, 72 e 96 horas após a polinização, indicam que o aborto dos pistilos autopolinizados em *Handroanthus serratifolius* não esteja relacionado à ocorrência de depressão endogâmica, mas sim à ação de um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia – LSI, como nas demais Bignoniaceae investigadas até o momento quanto a este caráter (Gibbs & Bianchi 1993; 1999; Bittencourt *et al.* 2003; 2011; Gandolphi & Bittencourt 2010). O aborto dos pistilos autopolinizados verificado entre 6 e 13 dias após a polinização (Alves *et al.* 2013) também é um fator que corrobora a presença de um LSI. A presença de PEA, mesmo que tenham aparecido apenas ocasionalmente, indica um potencial para expressão da apomixia esporofítica, como verificado para populações poliembriônicas desta e de outras espécies de Bignoniaceae (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b, Capítulo 1). Entretanto, neste trabalho a presença de PEA não resulta em sementes poliembriônicas, sendo as plantas estudadas já descritas como exclusivamente monoembriônicas (Alves *et al.* 2013).

A fecundação e o desenvolvimento do endosperma em *H. serratifolius* foram similares ao observado em outras espécies de Bignoniaceae (Govindu 1950; Bittencourt *et al.* 2003; Bittencourt & Semir 2005; Sampaio *et al.* 2007; Bittencourt & Moraes 2010; Gandolphi &

Bittencourt 2010). O endosperma é celular, apresentando haustório calazal nos estádios iniciais de desenvolvimento, e se enquadrando no tipo *Catalpa* (Mauritzon 1935).

Em 24 horas após a polinização, pistilos autopolinizados apresentaram mais óvulos penetrados do que pistilos de polinização cruzada, situação que foi invertida 48 horas após a polinização, o que demonstra não haver ação do LSI durante o crescimento dos tubos polínicos. Em *Tabebuia roseo-alba* foi verificada uma situação similar na qual 24 horas após polinização, o numero de óvulos penetrados e fecundados foi maior em pistilos autopolinizados, no entanto, nos demais intervalos analisados, os pistilos submetidos à polinização cruzada sempre apresentaram maior numero de óvulos fecundados quando comparados a pistilos autopolinizados (Gandolphi & Bittencourt 2010).

Este resultado foi diferente do encontrado para *Dolichandra cynanchoides* (Gibbs & Bianchi 1999), *Tabebuia nodosa* (Gibbs & Bianchi 1999), *Spathodea campanulata* (Bittencourt *et al.* 2003), *Zeyheria montana* (Bittencourt & Semir 2004), *Handroanthus umbellatus*, *H. impetiginosus*, *H. vellosoi* (Bittencourt & Semir 2005), *Jacaranda racemosa* (Bittencourt & Semir 2006) e *Cybistax antisyphilitica* (Bittencourt *et al.* 2011), espécies auto-estéreis que apresentaram maior incidência de penetração e fecundação em pistilos de polinização cruzada quando comparados a pistilos autopolinizados. É provável que o LSI comece agir mais precocemente nestas espécies, interferindo no crescimento de tubos polínicos provenientes de autopolinizações.

As análises histológicas mostraram que de 30 a 60% dos óvulos não foram penetrados por tubos polínicos até o intervalo de 120 horas, o que poderia explicar o menor número de sementes em relação ao número de óvulos encontrado por Alves *et al.* (2013). *Handroanthus serratifolius* apresentou  $204.27 \pm 18.33$  óvulos por ovário e  $147.3 \pm 59.6$  sementes em frutos desenvolvidos naturalmente nos mesmos indivíduos aqui avaliados (Alves *et al.* 2013), ou seja, cerca de 70% dos óvulos são convertidos em sementes.

Embora os óvulos de pistilos autopolinizados tenham apresentado um maior número de células do endosperma do que os de pistilos de polinização cruzada 120 horas após a polinização, todos os pistilos de autopolinização analisados neste intervalo possuíam óvulos com células de aspecto degenerativo. Tal aspecto degenerativo indica o processo de aborto dos pistilos autopolinizados que seria acarretado por determinada quantidade de óvulos autofecundados enviarem um tipo de sinal hormonal à planta mãe, provocando a rejeição do pistilo (Gibbs & Bianchi 1993).

Células precursoras de embrião adventício (PEA) foram observadas em óvulos fecundados e não fecundados provenientes de pistilos de autopolinização e polinização cruzada. A presença destas PEA, mesmo que ocasionalmente, indica que mesmo apresentando sementes monoembriônicas os indivíduos estudados parecem apresentar um potencial para a expressão da apomixia esporofítica.

Acredita-se que a autofertilidade observada nas espécies apomíticas esporofíticas de Bignoniaceae e Malvaceae-Bombacoideae seja ocasionada pela presença de embriões adventícios, a qual evitaria a queda dos pistilos autopolinizados (Oliveira *et al.* 1992; Bittencourt & Semir 2005; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b). Dessa forma, a única explicação para que os indivíduos estudados não apresentem autofertilidade, seria fato de poucas PEA se diferenciarem e delas não se desenvolverem em embriões em tempo hábil para a manutenção dos pistilos autopolinizados. O fato de dois frutos (1,8% das flores autopolinizadas) terem sido formados em tratamentos de autopolinização no ano de 2010, os quais apresentaram tamanho reduzido e sementes pequenas, degeneradas e sem embrião desenvolvido (Alves *et al.* 2013) podem ter sido mantidos nas plantas devido à ocorrência de PEA que não foram capazes de se desenvolver em embriões. Não tendo relação com a ação da depressão endogâmica como hipotetizado anteriormente (Alves *et al.* 2013).

Nossos resultados apontam que a poliploidia tem uma relação direta com a expressão da apomixia esporofítica. Entretanto, nem sempre a presença desse tipo de apomixia levaria à autofertilidade como sugerido em outros trabalhos com espécies de Bignoniaceae (Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013a), já que a manutenção dos pistilos autopolinizados parece ser dependente do desenvolvimento de embriões adventícios a partir das PEA. Assim, *H. serratifolius* parece manter o LSI predominante dentre as Bignoniaceae, como observado para *Anemopaegma acutifolium* (Sampaio *et al.* 2013b), que também apresentou o desenvolvimento inicial do endosperma de pistilos autopolinizados mais lento que o observado em pistilos de polinização cruzada.

## Referências Bibliográficas

- Allen AM & Hiscok SJ. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In: Franklin-Tong VE (ed): Self-incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity and Mechanisms. Springer-Verlag, Berlin
- Alves MF, Duarte MO, Oliveira PE & Sampaio DS. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 714-722.
- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL & Santos AA. 2007. BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas. Sociedade Civil Mamirauá CNPQ/Belém.
- Bittencourt Junior NS, Gibbs PE & 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 Junior NS & Semir J. 2004. Pollination biology and breeding system of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae). *Plant Systematics and Evolution* 247: 241-254.

Bittencourt Junior NS & Semir J. 2005. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). International Journal of Plant Sciences 166: 493-506.

Bittencourt Junior NS & Semir J. 2006. Floral biology and late-acting self-incompatibility system in *Jacaranda racemosa* (Bignoniaceae). Australian Journal of Botany 54: 315-324.

Bittencourt Junior NS & Moraes CIG. 2010. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae) a histological study of post-pollination events. Plant Systematics and Evolution 288: 59-76.

Bittencourt Junior NS, Pereira EJ, Sao-Thiago PS & Semir J. 2011. The reproductive biology of *Cybistax antisiphilitica* (Bignoniaceae), a characteristic tree of the South American savannah-like “Cerrado” vegetation. Flora 206: 872-886.

Costa ME, Sampaio DS, Paoli AAS & Leite SCAL. 2004 Poliembriónia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). Revista Brasileira de Botânica 27: 395-406.

de Nettancourt D. 1997. Incompatibility in angiosperms. Sexual Plant Reproduction 10: 185-199.

Feder N & O'Brien TP. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. American Journal of Botany 55: 123-142.

Firetti-Leggieri F, Lohmann LG, Alcantara S, Costa IR & Semir J. 2013. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignonieae, Bignoniaceae). Plant Reproduction 26: 43-53

Gadolphi G & Bittencourt Junior NS. 2010. Sistema reprodutivo do Ipê-Branco – *Tabebuia roseo-alba*. (Ridley) Sandwith. Acta Botanica Brasilica 24: 840-851.

Gentry AH. 1992. A synopsis of Bignoniaceae ethnobotany and economic botany. Annals of the Missouri Botanical Garden 79: 53-64.

Gerrits PO & Smid L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of softtissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. Journal of Microscopy 132: 81-85.

Gibbs PE & Bianchi MB. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. Botânica Acta 106: 64-71.

Gibbs PE & Bianchi MB. 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.

Govindu HC. 1950. Studies in the embryology of some members of Bignoniaceae. Proceedings of the Indian Academical Science 32: 164-178.

Husband BC, Ozimec B, Martin SL & Pollock L. 2008. Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. International Journal of Plant Sciences 169: 195-206.

Lipow SR & Wyatt R. 1999. Floral morphology and late-acting in *Apocynum cannabinum* (Apocynaceae). Plant Systematics and Evolution 219: 99-109.

Mauritzon J. 1935. Etwas über die embryologie der Bignoniaceen. Botaniska Notser. 1935: 60-77.

Mc Dowel EM & Trump B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 100: 517-527.

Mendes-Rodrigues C, Sampaio DS, Costa ME, Caetano APS, Ranal MA, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2012. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also

enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). *Flora* 207: 264-274.

Oliveira PE, Gibbs PE, Barbosa AA & Talavera S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. *Plant Systematics and Evolution* 197: 207-219.

Olmstead RG, Zjhra ML, Lohman LG, Grose SO & Eckert, AJ. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *American Journal of Botany* 96: 1731-1743.

Richards AJ. 1986. *Plant Breeding Systems*. London, George Allen & Unwin.

Sampaio DS, Costa ME & Paoli AAS. 2007. Ontogenia da semente de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 30: 289-302.

Sampaio DS, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2013a. Mating in the pseudogamic apomictic *Anemopaegma acutifolium* DC: another case of pseudo-self-compatibility in Bignoniaceae? *Plant Biology* 15: 919-924.

Sampaio DS, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2013b. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from Central Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 173: 77-91.

Seavey SR & Bawa KS. 1986. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *The Botanical Review* 52: 195-219.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Handroanthus serratifolius* apresentou uma variação interpopulacional quanto ao sistema reprodutivo: uma população hexaplóide, monoembriônica e auto-estéril (Alves *et al.* 2013) e uma população hexaplóide, poliembriônica e auto-fértil (Capítulo 1).

A população hexaplóide e poliembriônica de *H. serratifolius* apresenta megaesporogênese e megagametogênese regular, originando um saco embrionário reduzido como nas demais espécies estudadas até o momento (Govindu 1950; Bittencourt & Mariah 2002a e b). As células precursoras de embrião adventício tiveram origem na hipóstase e em células do tegumento da região micropilar, caracterizando a presença de apomixia esporofítica em *H. serratifolius*. Além disso, os tratamentos de polinização experimental indicaram que a população poliembriônica analisada é auto-fértil.

A população monoembriônica de *H. serratifolius* apresenta-se auto-estéril, diferente de todas as espécies poliplóides de Bignoniaceae investigadas até o momento. As análises histológicas dos eventos posteriores à polinização apresentam evidências da ação de um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia, já que o zigoto e endosperma não apresentaram malformação em óvulos de pistilos autofecundados. Além disso, óvulos provenientes de autopolinizações apresentaram o início do desenvolvimento do endosperma mais lento quando comparados aos de fecundação cruzada na maioria dos casos. O que é reforçado pelo registro do aborto uniforme dos pistilos autopolinizados (Alves *et al.* 2013). Embora a população estudada seja monoembriônica, a presença de células precursoras de embrião adventício foi observada, indicando um potencial para a expressão da apomixia esporofítica na população.

A poliploidia parece estar intimamente relacionada à expressão da apomixia em Bignoniaceae (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b),

entretanto, não parece ser a principal causa para a autofertilidade nestas espécies apomíticas, mas sim o desenvolvimento de embriões adventícios (Oliveira *et al.* 1992; Bittencourt & Semir 2005; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.* 2013b). A análise histológica de frutos em desenvolvimento de populações hexaplóides e monoembriônicas de *H. serratifolius* poderia confirmar que as PEA não se desenvolvem ou ainda uma possível degeneração dos embriões adventícios.

Estes resultados são relevantes, pois ajudam a entender quais os efeitos a poliploidia e a apomixia esporofítica podem causar no sistema reprodutivo de uma espécie auto-estéril com LSI. Além disso, as diferenças encontradas quanto ao sistema reprodutivo nas populações de *H. serratifolius*, são úteis para a compreensão da causa da autofertilidade em algumas espécies de Bignoniaceae.

### **Referências Bibliográficas:**

- Alves MF, Duarte MO, Oliveira PE & Sampaio D S. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 714-722.
- Bittencourt Junior NS & Mariath JEA. 2002a. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): megasporogenesis and integument development. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 103-115.
- Bittencourt Junior NS & Mariah JEA. 2002b. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): embryo sac development. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 117-127.

Bittencourt Junior NS & Semir J. 2005. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). International Journal of Plant Sciences 166: 493-506.

Bittencourt Junior NS & Moraes CIG. 2010. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae) a histological study of post-pollination events. Plant Systematics and Evolution 288: 59-76.

Costa ME, Sampaio DS, Paoli AAS & Leite SCAL. 2004 Poliembriónia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). Revista Brasileira de Botânica 27: 395-406.

Govindu HC. 1950. Studies in the embryology of some members of Bignoniaceae. Proceedings of the Indian Academical Science 32: 164-178.

Oliveira PE, Gibbs PE, Barbosa AA & Talavera S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. Plant Systematics and Evolution 197: 207-219.

Sampaio DS, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2013a. Mating in the pseudogamic apomictic *Anemopaegma acutifolium* DC: another case of pseudo-self-compatibility in Bignoniaceae? Plant Biology 15: 919-924.

Sampaio DS, Bittencourt Júnior NS & Oliveira PE. 2013b. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from Central Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society 173: 77-91.