



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



## **Embriologia, Apomixia e Poliembrionia em *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae – Mimosoideae)**

**Aluna:** Nayara Augusto Vieira de Araújo

**Orientadora:** Profa. Dra. Renata Carmo de Oliveira

Uberlândia, MG

2015



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



## **Embriologia, Apomixia e Poliembriónia em *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae – Mimosoideae)**

**Aluna:** Nayara Augusto Vieira de Araújo

**Orientadora:** Profa. Dra. Renata Carmo de Oliveira

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

Uberlândia, MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

A663 Araújo, Nayara Augusto Vieira de, 1990-  
2015 Embriologia, Apomixia e Poliembrionia em *Inga laurina* (Sw.) Willd  
(Fabaceae – Mimosoideae) / Nayara Augusto Vieira de Araújo. - 2015.  
120 f. : il.

Orientadora: Renata Carmo de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.  
Inclui bibliografia.

1. Biologia vegetal - Teses. 2. Inga (Botanica) - Teses. 3.  
Poliembrionia - Teses. I. Oliveira, Renata Carmo de. II. Universidade  
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.  
III. Título

CDU: 581

---

Palavras chave: Apomixia, *Inga*, ontogênese, poliembrionia, compostos fenólicos



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**Embriologia, Apomixia e Poliembrionia em *Inga laurina* (Sw.)  
Willd (Fabaceae - Mimosoideae)**

Nayara Augusto Vieira de Araújo

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:**

**Orientadora:** Dra. Renata Carmo de Oliveira – UFU

**Examinadores:**

Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira - UFMG

Dr. Clesnan Mendes Rodrigues - UFU

**Dissertação aprovada em:** 24/02/2015

Uberlândia, MG

2015

## Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, sem O qual nada existiria. Aos meus pais, Osmar e Edilene, por todo amor, carinho e compreensão dedicados durante essa trajetória. A minha irmã, Samilla, pela amizade e companheirismo durante todos esses anos. Ao Thiago, que mesmo distante se fez tão presente.

Agradeço em especial a Profa. Dra. Renata Carmo de Oliveira por todos esses anos de convívio e orientação, pelo seu empenho com o meu trabalho e pelas horas dedicadas na correção e revisão deste. O seu amor pela botânica contagia todos ao redor, e comigo não foi diferente. Obrigada por ter despertado em mim o prazer em estudar a biologia vegetal!

Ao prof. Dr. Paulo Eugênio de Oliveira por todas as discussões esclarecedoras que tivemos e pela ajuda durante a escrita dessa dissertação. As suas contribuições enriqueceram ainda mais esse trabalho.

A professora Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira, que desde o início trouxe grande auxílio para o nosso projeto, e agora em especial por ter aceitado participar da banca examinadora dessa dissertação, contribuindo ainda mais para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Dr. Clesnan Mendes Rodrigues, que contribui muito para a finalização deste trabalho. Obrigada pela sua prontidão, pelo auxílio com as análises estatísticas e pelas conversas no laboratório que sempre sanaram algumas duvidas, e agora, por ter aceitado participar da banca examinadora dessa dissertação.

Aos colegas do Lamovi e da Bioveg: Angélica, Jéssyca, Kleber, Lígia, Ludimila, Manoela, Mariana Alves, Mariana Duarte, Mariana Oliveira, Mariana Souza, Marília,

Myke, Pamella, Pacheco, Rafael, Renata, Stéphani, Taynara, Thais e Wesley, muito obrigada por todos esses anos de convívio, amizade e trabalho. Sem vocês minhas tardes no laboratório não teriam sido as mesmas!

A todos os professores da Bioveg que contribuíram com este trabalho durante esses dois anos de mestrado: Dra. Juliana Marzinek, Dra. Neuza Castro, Dra. Ana Silvia Pinheiro, Dra. Julia Costa, Dr. Dênis Oliveira, Dra. Denise Santana, Dr. Rogério Melo e Dr. Orlando Cavalari. Ao professor Dr. Jean Carlos pelo auxílio com os dados sobre as galhas. Obrigada pela orientação na organização deste trabalho.

A Nivia, secretária da Bioveg, pela prontidão, pelos e-mails que não deixavam esquecer datas importantes e pelo auxílio durante esses dois anos de mestrado.

Agradeço em especial doutoranda Raquel Sousa, do Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Uberlândia, pela paciência e dedicação em me auxiliar durante as análises dos compostos fenólicos. Obrigada por ter encontrado tempo em meio aos seus trabalhos do doutorado para contribuir com essa dissertação. Agradeço também aos professores Dr. Marcos Pivattu e Dr. Alberto Oliveira que prontamente me orientaram e disponibilizaram o Laboratório de Química para que eu pudesse realizar as análises das sementes.

Outro agradecimento especial a doutoranda Rafaela Cabral Marinho pela sua dedicação em me auxiliar com as análises de progénie que contribuíram grandemente para o resultado desse trabalho. Obrigada por estar sempre disponível e por todas as conversas esclarecedoras que tivemos. Aproveito para agradecer a professora Dra. Ana Maria Bonetti por ter disponibilizado o Laboratório de Genética para que este estudo fosse concretizado.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

## Índice Geral

Folha de rostro .....	ii
Página de aprovação.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Índice Geral .....	vi
Índice Capítulos.....	vii
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
Introdução Geral.....	1
Objetivos.....	8
Estrutura da Dissertação.....	9
Referências Bibliográficas .....	11
Capítulo 1 .....	19
Capítulo 2 .....	53
Capítulo 3 .....	76
Considerações finais .....	108

## Índice Capítulos

<b>Introdução Geral: Poliembrionia em <i>Inga laurina</i> Sw. (Willd) (Fabaceae-Mimosoideae) .....</b>	1
Objetivos da dissertação.....	8
Estrutura da dissertação.....	9
Referências Bibliográficas.....	11
<b>Capítulo I: Ontogênese da antera e dos óvulos de <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd (Fabaceae - Mimosoideae).....</b>	19
Resumo.....	21
Abstract.....	22
Introdução.....	23
Material e Métodos.....	25
Resultados.....	27
Discussão.....	32
Referências Bibliográficas.....	45
<b>Capítulo II: Sistema reprodutivo em <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd. (Fabaceae - Mimosoideae).....</b>	53
Resumo.....	55
Abstract.....	56
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	60
Resultados.....	62
Discussão.....	64
Referências Bibliográficas.....	71
<b>Capítulo III: Poliembrionia e Apomixia em <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd (Fabaceae - Mimosoideae).....</b>	76
Resumo.....	78

Abstract.....	79
Introdução.....	80
Material e Métodos.....	83
Resultados.....	87
Discussão.....	90
Referências Bibliográficas .....	101

## **Lista de Figuras (Títulos resumidos)**

### **Introdução geral**

**Figura 1:** *Inga laurina* (Sw.) Willd. Hábito, inflorescência, flores e fruto com quatro sementes envolvidas pela sarcotesta e, posteriormente, isoladas.....10

### **Capítulo I: Ontogênese da antera e dos óvulos de *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae – Mimosoideae)**

**Figura 1:** Inflorescência mostrando as pequenas flores com numerosos estames. Processo de diferenciação do microsporângio.....40

**Figura 2:** Divisões da célula-mãe de micrósporo e formação da políade.....41

**Figura 3:** Políades, presença de grãos de amido e compostos fenólicos na antera madura.....42

**Figura 4:** Ontogênese do óvulo, estrutura, compostos fenólicos e presença de grãos de amido no ovário.....43

### **Capítulo II: Sistema reprodutivo em *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fabaceae – Mimosoideae)**

**Figura 1:** Inflorescência com numerosos estames, antera com políades, fruto maduro aberto, germinação e crescimento do grão de pólen e frutos maduros resultantes dos tratamentos de polinização.....68

**Figura 2:** Frutos e sementes de *Inga laurina*.....69

### **Capítulo III: Poliembrionia e Apomixia em *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae - Mimosoideae)**

**Figura 1:** Fruto maduro e suas sementes. Cortes histológicos evidenciando o processo da fecundação e a formação dos embriões.....97

**Figura 2:** Desenvolvimento dos múltiplos embriões e a presença de compostos fenólicos no óvulo, cotilédone e na sarcotesta, galhas na sarcotesta e a germinação das sementes.....98

**Figura 3:** Sarcotesta da semente de *Inga laurina* evidenciando a presença de compostos fenólicos e galhas, germinação das sementes.....99

## **Lista de tabelas (Títulos resumidos)**

**Capítulo I: Ontogênese da antera e dos óvulos de *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae – Mimosoideae)**

**Tabela 1:** Número de inflorescências coletadas, flores isoladas e tamanho médio dessas flores de *Inga laurina*.....44

**Tabela 2: Tabela 2:** Número médio de grãos de pólen por flor, anteras por flor, políades por antera, grãos de pólen por políade, óvulos por flor e razão pólen/óvulo em *Inga laurina*.....44

**Capítulo II: Sistema reprodutivo em *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fabaceae – Mimosoideae)**

**Tabela 1:** Dados dos tratamentos de polinização controlada, número de frutos e sementes formadas em cada manipulação.....70

**Capítulo III: Poliembrionia e Apomixia em *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae - Mimosoideae)**

**Tabela 1:** Dados evidenciando a concentração de compostos fenólicos nas diferentes fases das sementes de *Inga laurina*. Comparativo utilizando o equivalente de ácido gálico por grama de extrato (EAG).....100

**Tabela 2:** Dados evidenciando a concentração de compostos fenólicos nas sementes de *Inga laurina*.....100

**Resumo:** Araújo, N. A. V. Poliembrionia em *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae – Mimosoideae). Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. Universidade Federal de Uberlândia – MG. 108p. A sistemática das Leguminosas é um tema bastante discutido, e alguns autores admitem três subfamílias que são distintas principalmente pela morfologia floral. Porém dados polínicos e embriológicos também auxiliam no posicionamento sistemático de grupos vegetais, especialmente os não monofiléticos como a tribo *Ingeae*. Dentre as espécies da tribo *Ingeae*, as do gênero *Inga* são caracterizadas por apresentar flores pequenas com numerosos estames que atraem os polinizadores. Apesar de essas características florais influenciarem o fluxo de pólen na polinização, muitas espécies apresentam sistemas de autoincompatibilidade para evitar ou reduzir a autofertilidade e posterior formação de frutos com sementes viáveis, dentre essas algumas do gênero *Inga*. *Inga laurina* é uma árvore comum na região do Cerrado, possui frutos do tipo legume com sementes poliembriônicas. Em muitas espécies do Cerrado, a poliembrionia está associada a eventos de poliploidia e também à apomixia, que é a reprodução assexuada via semente, influenciando a biologia da espécie. Além de vários embriões, essas sementes podem apresentar compostos fenólicos que auxiliam na proteção contra patógenos. Os objetivos deste trabalho foram descrever a ontogênese da antera e dos óvulos de *I. laurina*, verificar o sistema reprodutivo da espécie, descrever a origem e o desenvolvimento dos seus embriões, e quantificar a presença de compostos fenólicos nas sementes. O estudo foi realizado na área urbana de Uberlândia, MG, Brasil. Botões florais, flores e frutos em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados e fixados para análise anatômica e, sendo os últimos, também utilizados para análise química. Em *I. laurina*, a formação da parede do microsporângio (endotélio, camada média e tapete) enquadra-se dentro do desenvolvimento do tipo Dicotiledôneo. Quatro células-mãe de micrósporo são formadas dando origem a políades de 16 grãos de pólen cada. Os óvulos são anátropes, bitegumentados, e o desenvolvimento do gametófito feminino é do tipo *Polygonum*. Apesar do desenvolvimento embriológico aparentemente normal, os dados mostram que *I. laurina* é uma espécie apomíctica e pseudogâmica. Os embriões adventícios originam-se de células nucelares e se desenvolvem rapidamente podendo suprimir o embrião zigótico devido à competição por nutrientes. Os dados moleculares confirmam essa característica, mas evidenciam que embriões de origem sexuada podem eventualmente estar presentes na semente madura. A presença e a quantidade de compostos fenólicos na sarcotesta e nos embriões favorecem a proteção destes contra fungos e patógenos do ambiente, sua germinação e o estabelecimento das plântulas. O acúmulo de compostos fenólicos parece estar mais associado ao tamanho dos embriões do que com sua origem. Os resultados apresentados suportam o posicionamento mais derivado do gênero *Inga* dentro da tribo *Ingeae*, especialmente em relação às características polínicas, podendo assim contribuir o estudo da taxonômica da tribo. A ocorrência da apomixia e da poliembrionia podem ser consideradas estratégias para melhorar o sucesso reprodutivo, estabelecimento e ocupação do ambiente. Além disso, a presença dos compostos fenólicos nas sementes promovem a proteção destas favorecendo o processo de germinação e dispersão.

**Palavras-chave:** Apomixia, *Inga*, ontogênese, poliembrionia, compostos fenólicos.

**Abstract:** Araújo, N. A. V. Polyembryony in *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fabaceae: Mimosoideae. Master's dissertation. Universidade Federal de Uberlândia – Minas Gerais, Brazil. 108p. The systematics of Leguminosae is a very discussed topic. Some authors admit three subfamilies that can be distinguished mainly by floral morphology, however, the pollen and embryological data may be important to define the systematic position of a plant group, especially non-clearly monophyletic ones as the *Ingeae* tribe. Amongst *Ingeae*, the genus *Inga* species are characterized by having small flowers with numerous stamens that attract pollinators. Although these floral characteristics influence pollen flow in pollination, many species have self-incompatibility systems to prevent or reduce the self-fertilization and subsequent formation of fruits with viable seeds, among these, some of *Inga* genus. *Inga laurina* is a common tree in the Cerrado, which bears legume fruits with polyembryonic seeds. In many species of the Cerrado, polyembryony is associated with polyploidy events and also to apomixis, the asexual reproduction by seed, which influencing the biology of the species. In addition to several embryos, these seeds can produce phenolic compounds that protect them from pathogens. The objectives of this study were to describe the anther and ovule ontogeny of *I. laurina*, check the breeding system of this species, describe the embryos origin and development, and quantify the presence of phenolic compounds in the seeds. The study was carried out at an urban area in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Floral buds, flowers and fruits at initial development stages were collected and fixed for anatomical analysis, and the later also used for chemical analysis. In *I. laurina* the microsporangium wall formation (endothecium, middle layer and tapetum) falls within the development of Dicotyledonous type. Four pollen mother cells were formed that remained together to form a polyad with 16 grains. The ovules are anatropus, bitegmic and the gametophyte develops into a *Polygonum* type embryo sac. Despite the apparently normal early embryology, the data show that *I. laurina* is a pseudogamic and apomictic species. The adventitious embryos are nucellar and seem to develop more quickly and can suppress the zygotic embryo due to competition for nutrients. Molecular analyses seem to confirm this characteristic, although also indicated that sexual embryos may also develop in the mature seed. The presence and amount of phenolic compounds in embryos and sarcotesta can promote protection against fungi and environmental pathogens, the germination and the seedling establishment. Phenolic compounds seem to be associated with the size of the embryo and not with its origin. The results support a derived position of the *Inga* genus in *Ingeae* tribe, especially in relation to pollen characteristics, and this may contribute to the tribe taxonomic studies. The occurrence of apomixis and adventitious embryony can be considered a strategy to improve the reproductive success, establishment and occupation of the environment. Furthermore, the presence of phenolic compounds in seeds promotes their protection and favors the germination process and dispersion.

**Key words:** Apomixis, *Inga*, ontogeny, phenolic compounds and polyembryony.

## Introdução geral

A família Leguminosae (Fabaceae) compreende aproximadamente 19.325 espécies e 727 gêneros (Lewis *et al.* 2005; Souza & Lorenzi 2012) de distribuição geográfica mundial (Lorenzi 1998), sendo sua monofilia reconhecida por dados morfológicos e moleculares (Chappil 1995; Kajita *et al.* 2001; APG 2003; Lewis *et al.* 2005).

A organização taxonômica das Leguminosas é um tema bastante discutido e alguns autores como Lewis (1987), Judd *et al.* (1999), Smith *et al.* (2004) e Simpson (2006), admitem três subfamílias: Caesalpinoideae, Papilionoideae (Faboideae) e Mimosoideae, que podem ser distintas principalmente pela morfologia floral. Além dos caracteres morfológicos, a embriologia das espécies, abrangendo a investigação dos eventos relevantes à reprodução sexual (Pereira-Junior 2011) também pode diferir entre os grupos vegetais e é tida como um bom critério taxonômico (Barros *et al.* 2013; Martins-da-Silva *et al.* 2014).

Mimosoideae é a segunda maior subfamília de Leguminosae, com 3.270 espécies e 70 gêneros distribuídos nas tribos *Mimoseae*, *Mimozygantheae*, *Acacieae* e *Ingeae* (Lewis *et al.* 2005). Suas espécies são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais (Lorenzi 1998). O grupo é caracterizado por apresentar nectários extraflorais, flores com numerosos estames (Lewis *et al.* 2005).

*Ingeae* se distingue das demais tribos do grupo por apresentar espécies com caracteres morfológicos similares e exclusivos, como número e fusão de estames (Judd *et al.* 2009; Souza & Lorenzi 2012; Martins-da-Silva *et al.* 2014). Tais espécies apresentam também grãos de pólen reunidos em políades (Davis 1966; Johri 1984; Seijo & Neffa 2004; Teppner 2007; Martins-da-Silva *et al.* 2014).

Porém, tais características não sustentam a monofilia da tribo (Souza 2007), e alguns estudos não reconheceram metade das espécies até então posicionadas nessa tribo (Pennington 1997; Luckow *et al.* 2000; Luckow *et al.* 2003).

*Inga* Miller é um dos gêneros com maior número de espécies da tribo *Ingeae*, aproximadamente 300, de distribuição neotropical (Pennington 1997; Lorenzi 1998) e corresponde a aproximadamente 1,7% das leguminosas (Pennington 1997; Lorenzi 1998). Ele se destaca por apresentar flores reunidas em inflorescência do tipo espiga (Koptur 1983; Pennington 1997; Cruz-Neto *et al.* 2007; Judd 2009) e por ter sementes recobertas por uma polpa branca, adocicada e comestível (Corner 1976; Barroso *et al.* 1984; Poncy 1984) denominada sarcotesta (Oliveira & Beltrati 1993). Essa polpa que envolve as sementes confere a *Inga* um padrão estrutural não encontrado em qualquer outro gênero de Mimosoideae (Poncy 1985).

A espécie *Inga laurina* (Sw.) Willd, objeto desse estudo, ocorre desde a América Central até a América do Sul. No Brasil, está presente nos biomas cerrado, floresta amazônica, formações florestais do domínio da mata atlântica e restinga, em fitofisionomias campestres e mata ciliar (Filardil *et al.* 2007). Esta é uma espécie arbórea, com pequenas flores esbranquiçadas e frutos com sementes poliembrionicas (Mendes-Rodrigues *et al.* 2005), como pode ser verificado na Figura 1.

A grande diversidade morfológica observada nas neguminosas origina uma série de problemas taxonômicos que tornam ramos, folhas e flores, objetos da Sistemática tradicional, insuficientes para solucioná-los (Oliveira 1999). Estudos dos órgãos reprodutivos das espécies dessa família vêm sendo utilizados com grande eficiência para esse fim (Oliveira 1999), permitindo o esclarecimento de processos filogenéticos, evolutivos, ontogenéticos e ecológicos (Benth 1876; Pennington 1997).

Teppner (2007) e Martins-da-Silva *et al.* (2014) ressaltaram a importância dos caracteres polínicos para os estudos taxonômicos. Analisando espécies do grupo das Mimosoideae, estes autores observaram a presença de grãos de pólen reunidos em políades e a classificaram como principal unidade de dispersão dessas espécies, sendo comum a heterogeneidade no tamanho dos grãos de pólen e nos padrões de ornamentação (Barth & Yoneshigue 1965; Guinet 1981; Buril *et al.* 2010). Essa diversidade polínica é de grande valor taxonômico para a distinção das tribos e dos gêneros da subfamília Mimosoideae (Teppner 2007; Buril *et al.* 2010; Martins-da-Silva *et al.* 2014).

Características morfológicas das políades foram descritas para algumas espécies do gênero *Inga* (Mimosoideae – Ingeae), como *Inga striata* (Cruz-Neto *et al.* 2007), *Inga feuillei* (Teppner 2007) e *Inga vera* subsp. *Affinis* (Buril *et al.* 2010). A formação das políades e a quantidade de grãos de pólen presente variam de uma espécie para outra (Teppner 2007, Buril *et al.* 2010).

Além dos estudos palinológicos, as investigações morfológicas e embriológicas podem auxiliar no esclarecimento do posicionamento sistemático de um grupo vegetal (Shivaramiah 1998). Lima (1985) estudou os frutos e sementes dos gêneros da tribo Mimoseae (Mimosoideae) e enfatizou a estrutura do embrião como caráter de grande valor taxonômico para solucionar possíveis problemas de posicionamento das espécies dentro do grupo.

Além disso, o conhecimento do ciclo reprodutivo das espécies também pode contribuir para a classificação e a definição das relações filogenéticas de gêneros e famílias (Palser 1975; Bhojwani & Bhatnagar 1981). Os trabalhos de biologia reprodutiva vêm auxiliando na caracterização da reprodução sexual dos vegetais (Gibbs

& Bianchi 1993), relacionando tradicionalmente aspectos funcionais das interações pólen/estigma e sistemas de incompatibilidade (Gibbs 1990; 2014).

Os sistemas de autoincompatibilidade (SI) são sistemas genéticos que têm como objetivo evitar o processo de autofecundação (Seavy & Bawa 1986; Gibbs 2014). Normalmente 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, impedindo sua germinação e crescimento (Richards 1986; Nettancourt 1997; Gibbs 2014).

No sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI), o grão de pólen germina e o tubo polínico cresce ao longo do estilete, atingindo o ovário, podendo penetrar os óvulos e realizar a dupla fecundação (Richards 1986; Allen & Hiscock 2008; Gibbs 2014), porém, o aborto do pistilo autopolinizado ocorre pouco tempo após a autopolinização (Seavy & Bawa 1986; Richards 1986). Neste sistema, o reconhecimento e a rejeição do material genético do pólen parecem ser controlados geneticamente no óvulo (Gibbs & Bianchi 1999; Gibbs 2014).

Em algumas espécies de *Inga* foi verificada a autoincompatibilidade (Koptur 1984, Cruz-Neto 2007, Barros *et al.* 2013). A partir de estudos de polinizações controladas e do crescimento de tubos polínicos em espécies do gênero em regiões neotropicais, os autores constataram que embora os tubos polínicos provenientes de autopolinizações penetrem na micrópila dos óvulos, esses são abortados posteriormente (Koptur 1984, Cruz-Neto *et al.* 2007, Barros *et al.* 2013).

Embora a ocorrência de processo sexual de reprodução via semente seja predominante entre os vegetais, a reprodução assexuada via semente, conhecida como apomixia, vem sendo cada vez mais documentada entre as espécies (Costa *et al.* 2004; Bittencourt Jr. & Semir 2005; Mendes- Rodrigues *et al.* 2005; Mendes-Rodrigues 2010;

Sampaio 2010). Em algumas espécies apomíticas, também foi verificada a presença de mais de um embrião por semente, fenômeno chamado de poliembrionia (Costa *et al.* 2004; Bittencourt Jr. & Semir 2005; Mendes- Rodrigues *et al.* 2005).

A poliembrionia é definida pela formação de dois ou mais embriões numa mesma semente (Maheshwari 1950; Bhojwani & Bhatnagar 1986; Carman 1997), fenômeno comum nas Angiospermas (Johri *et al.* 1992; Uma Shaanker & Ganeshiah 1996). Múltiplos embriões podem ser formados sexuada ou assexuadaamente (Johri *et al.* 1992). Nos processos de reprodução sexuada, além do embrião zigótico, embriões podem se originar a partir de outras células do gametófito, como antípodas e sinérgides, ou por clivagem do zigoto ou suspensor (Koltunow 1993; Batygina & Vinogradova 2007). Assexuadaamente, os embriões podem ser formados a partir de células do nucelo ou dos tegumentos, sem haver fecundação, caracterizando o processo de apomixia por embrionia adventícia (Lakshmanan & Ambegaokar 1984; Koltunow 1993; Batygina & Vinogradova 2007; Mendes-Rodrigues 2010).

Nos sistemas de reprodução apomíticos, os embriões podem ser formados a partir de células não reduzidas do saco embrionário (gametófito), caracterizando a apomixia gametofítica, enquanto na esporofítica, os embriões são formados a partir de células somáticas da planta-mãe (esporófito adulto) ou do embrião e suspensor (esporófito jovem) (Koltunow 1993; Mendes-Rodrigues 2010). Espécies com apomixia esporofítica, como *Eriotheca pubescens* (Oliveira *et al.* 1992) e *Bombacopsis glabra* (Baker 1960; Duncan 1970), necessitam da fertilização e formação de endosperma para o desenvolvimento dos embriões adventícios, caracterizando a apomixia pseudogâmica (Müntzing 1928; Goldenberg & Sheperd 1998).

A formação de embriões apomíticos é considerada uma vantagem para o estabelecimento e colonização de algumas espécies em ambientes inóspitos como o

Cerrado (Goldenberg & Shepherd 1998; Goldenberg & Werbachowski 2004). Allem (2004) sugeriu que a associação entre os fenômenos da poliembrionia e da apomixia é uma forma de persistência para plantas submetidas a pressões de perturbações naturais ou antrópicas (Klink & Machado 2005). Além disso, a poliembrionia pode ser considerada também como uma tentativa de compensar a redução da progênie ocasionada pela competição por recursos e espaço dentro do mesmo fruto (Bawa *et al.* 1989; Uma Shannker & Ganeshiah 1996; 1997). No entanto, pode levar à formação de embriões de tamanho reduzido com problemas de estabelecimento, como observado em *Eriotheca pubescens* (Mendes-Rodrigues *et al.* 2005; Mendes-Rodrigues 2010).

No Cerrado, a poliembrionia é descrita para algumas famílias importantes como Vochysiaceae (Carmo-Oliveira 1998; Custódio 2008), Asteraceae (Goldenberg & Weroachowski 2004) e em Leguminosae, que inclui espécies lenhosas como dos gêneros *Hymenaea*, *Copaifera* e *Acacia* (Salomão & Allem 2001). Salomão & Allem (2001) verificaram a presença de poliembrionia em 14 espécies de leguminosas lenhosas do Cerrado e da Caatinga e sugeriram que a apomixia adventícia pode ser comum em espécies desse bioma, o que foi corroborado por Mendes-Rodrigues *et al.* (2005) para *Eriotheca pubescens* (Malvaceae) e por Costa *et al.* (2004) para *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae).

Porém, em espécies das famílias Vochysiaceae, algumas Leguminoseae e Bombacaceae, a presença de poliembrionia não está relacionada com a ocorrência obrigatória dos mecanismos de apomixia (Carmo-Oliveira 1998; 2000a; 2000b; Martins & Oliveira 2003; Custódio 2008; Mendes-Rodrigues 2010), indicando que não há uma relação obrigatória entre tais fenômenos.

Dentre as Leguminosae, além das citadas anteriormente, a presença de poliembrionia foi verificada nos gêneros *Mora*, *Cynometra*, *Peltogyne*, *Macrolobium*,

*Crudia*, *Swartzia*, *Dalbergia*, *Pentaclethra*, *Pithecellobium*, *Zygia* e *Inga* (Moreira & Moreira 1996). No gênero *Inga* as espécies *Inga fagifolia* (Oliveira & Beltrati 1993), *Inga uruguensis*, *Inga vera* e *Inga laurina* (Mendes-Rodrigues *et al.* 2005) também apresentaram tal fenômeno.

Apesar de conhecida a presença da poliembrionia dentre as espécies de Cerrado e formação de Mata, os dados até então conhecidos, não descrevem os processos de desenvolvimento dos vários embriões e, raramente, relatam a frequência de formação de sementes poliembrionicas em grupos como as Leguminosae. Esse conhecimento poderá esclarecer o papel dos embriões supranumerários no sucesso reprodutivo dessas plantas e contribuir com os estudos sobre a reprodução de plantas do Cerrado.

Além da formação de vários embriões nas sementes de *Inga laurina*, verificou-se também a presença de compostos fenólicos nestas (Araújo 2012), assim como observado em *Inga fagifolia* (Oliveira & Beltrati 1993, 1994).

Estes compostos constituem um dos mais disseminados e diversificados grupos de metabólitos secundários das plantas, com mais de 8000 compostos já detectados (Brand-Williams *et al.* 1995). Sua presença no vegetal é superada apenas pelos carboidratos (Pridham 1965). Eles podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida ao órgão, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente (Brand-Williams *et al.* 1995).

Os compostos fenólicos podem ainda atuar no sistema enzimático (Henderson & Nitsch 1962), influenciando crescimento do vegetal e também os processos biológicos das sementes (Lodhi 1982). Sua presença também é registrada em processos de interações como revelado por Soares *et al.* (2000), em que altas concentrações destes compostos nas folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae) pode favorecer a

formação de galhas por *Coccoidea* (Brachyscelidae), que dependem de tais compostos para completarem seu ciclo de vida.

Diante deste conhecimento descrito para a família e para o gênero consideramos que dados sobre a embriologia, descrevendo o desenvolvimento das anteras e do óvulo bem como a formação dos gametófitos masculinos e femininos, sobre o sistema reprodutivo, o desenvolvimento dos múltiplos embriões e a presença dos compostos fenólicos serão de grande importância para o conhecimento e as características reprodutivas na espécie *Inga laurina*.

## **Objetivos da Dissertação**

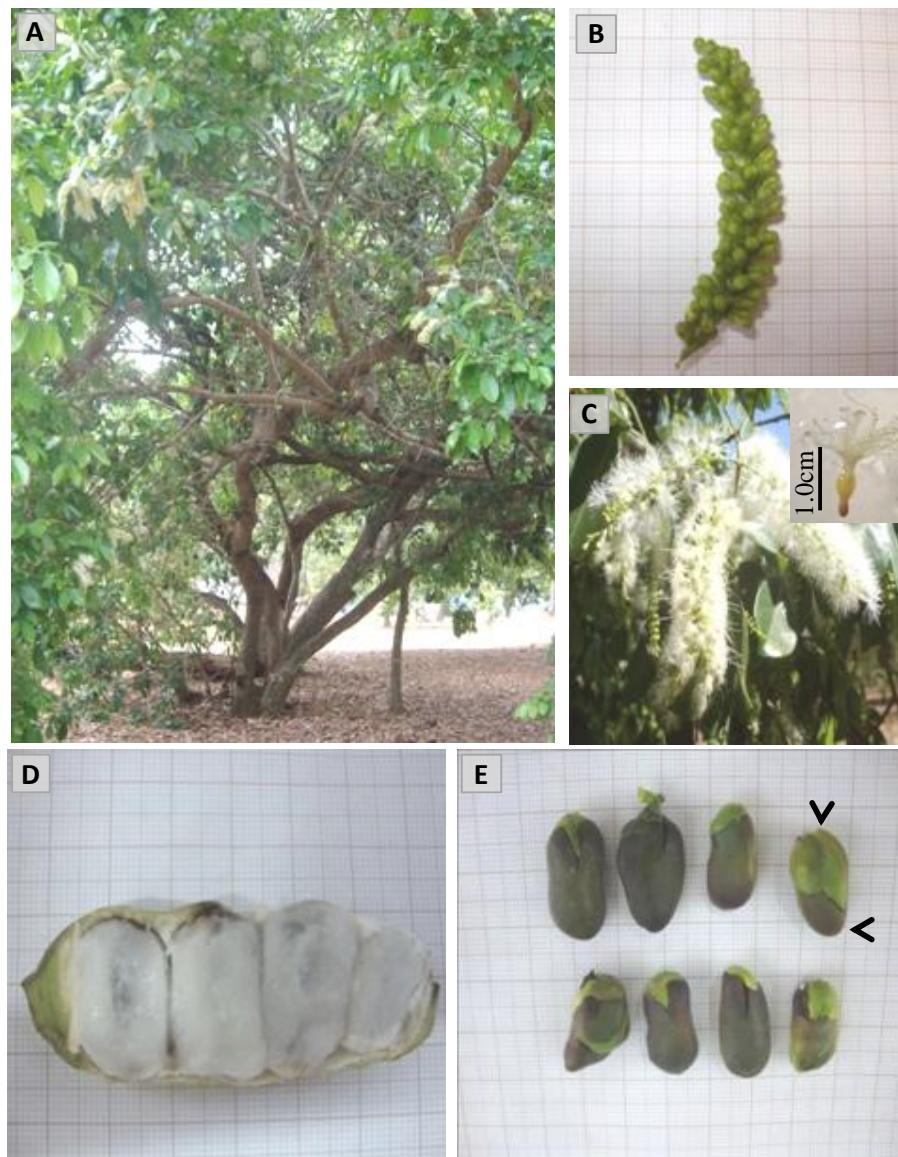
- Descrever a ontogenia da antera de *Inga laurina*, a formação das suas políades e caracterizar o desenvolvimento do óvulo dessa espécie. Tais informações poderão contribuir, junto aos dados existentes, para estudos taxonômicos da tribo *Ingeae* e da subfamília Mimosoideae.
- Verificar o sistema reprodutivo *Inga laurina* contribuindo assim, para os conhecimentos da reprodução da espécie, da família Leguminosae e de plantas arbóreas do bioma Cerrado.
- Descrever a origem e os processos de desenvolvimento dos vários embriões presentes nas sementes de *Inga laurina*, por meio de análises histológicas e moleculares.
- Verificar e quantificar a presença de compostos fenólicos nos embriões dessas sementes.

Tais estudos contribuirão com informações para o estudo da família Leguminosae e somarão aqueles já encontrados, ampliando o conhecimento da poliembrionia em plantas no Bioma Cerrado.

## Estrutura da Dissertação

A dissertação foi dividida em três capítulos, com os seguintes enfoques:

- Capítulo I: **Ontogênese da antera e dos óvulos de *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae - Mimosoideae)** – Para auxiliar no esclarecimento das relações taxonômicas da tribo *Ingeae*, estudou-se o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos de *Inga laurina*, iniciando pela ontogenia da antera, a formação das suas políades e o desenvolvimento do óvulo dessa espécie.
- Capítulo II: **Sistema reprodutivo em *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fabaceae - Mimosoideae)** – Para verificar a ocorrência da apomixia, o trabalho analisou o sistema reprodutivo *Inga laurina*. Tais dados poderão contribuir para os conhecimentos da reprodução da espécie, família e de plantas arbóreas do bioma Cerrado.
- Capítulo III: **Poliembrionia e Apomixia em *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae - Mimosoideae)** - A partir de uma avaliação da ocorrência da poliembrionia em *Inga laurina*, este trabalho descreveu a origem e os processos de desenvolvimento dos vários embriões presentes nas sementes dessa espécie, por meio de análises histológicas e moleculares, verificou e quantificou a presença de compostos fenólicos nos embriões dessas sementes.



**Figura 1:** *Inga laurina* Sw. (Willd). A- Hábito. B. Botões em pré antese. C- Inflorescência em espiga. D- Fruto aberto com a presença de quatro sementes envolvidas pela sarcotesta. E- Sementes poliembriônicas isoladas, removida a sarcotesta (ponta de seta: embriões).

## Referências Bibiográficas

- Allem, A.C. 2004. Optimization theory in plant evolution: Na overview of long-term evolutionary prospects in the Angiosperms. **The Botanical Review** 69 (3): 225-251.
- Allen, A.M. & Hiscok, S.J. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In: Franklin-Tong, V.E. (Eds): **Self-incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity and Mechanisms**. Springer-Verlag, Berlin.
- Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** 141: 399-436.
- Araújo, N.A.V. 2012. Poliembrionia em *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fabaceae: Mimoideae). **Monografia**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Baker, H.G. 1960. Apomixis and polyembryony in *Pachira oleaginea* (Bombacaceae). **American Jornal of Botanic** (47): 296-302.
- Barros, E.C.O.; Webber, A.C. & Machado, I.C. 2013. Limitação de polinizadores e mecanismos de autoincompatibilidade de ação tardia como causas da baixa formação de frutos em duas espécies simpátricas de *Inga* (Fabaceae – Mimoideae) na Amazônia Central. **Rodriguesia** 64(1): 37-47.
- Barroso, G.M.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F.; Costa, C.G.; Guimarães, E. F. & Lima, H.C. 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa Imprensa Universitária, Viçosa. 255p.
- Barth, O.M. & Yoneshigue, Y. 1964. Catálogo sistemático dos pólens das plantas arbóreas do Brasil Meridional. V. Leguminosae: Papilionaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 62:95-133.
- Batygina, T.B. & Vinogradova, G.Y.U. 2007. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. **Russian Journal of Developmental Biology** 3(38): 126-151.
- Bawa, K.S.; Hedge, S.G.; Ganeshiah, K.N. & Uma Shaanker, R. 1989. Embryo and seed abortion in plants. **Nature** 342: 625.

Bentham, G. 1876. Leguminosae – Mimosoideae. In: Martius, C.F.P.; Eichler, A.W. & Urban I. (Eds.) **Flora Brasiliensis**. Munchen, Wein, Leipzig 15(2): 456-458.

Bhojwani, S. & Bhatnagar, S. P. 1986. **The embryology of Angiosperms**. Vani Education Books. 284 p.

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

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie** 28: 25-30.

Buril, M.T.; Santos, F.A.R. & Alves, M. 2010. Diversidade polínica das Mimosoideae (Leguminosae) ocorrentes em uma área de caatinga, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 24(1): 53-64.

Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bisporic, tetrasporic, and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society** 61:51-94.

Carmo-Oliveira, R. 1998. Estudos embriológicos e aspectos da morfologia floral de Vochysiaceae. Departamento de Botânica. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Carmo-Oliveira, R. 2000a. Embriologia e reprodução das Vochysiaceae. In: Anais do 51º Congresso Nacional de Botânica. Brasilia, UNB. p.338.

Carmo-Oliveira, R. 2000b. Estudo do gametófito feminino em Vochysiaceae de florestas do Brasil Central. In: Anais do Congresso Nacional de Botânica. Brasilia, UNB. p.143.

Chappill, J.A. & Maslin, B.R. 1995. A phylogenetic assessment of tribe Acacieae. In: Crisp, M.D & Doyle, J.J. (Eds). **Advances in Legume Systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew.

Corner, E.J.H. 1951. The Leguminous seed. **Phytomorphology** 1: 117-150.

- Costa, M.E.; Sampaio, D.S.; Paoli, A.A.S. & Leite, S.C.A.L. 2004. Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 27: 395-406.
- Cruz-Neto, O.; Lopes, A.V.F. & Machado, I.C. 2007. Ecologia da Polinização de *Inga striata* (Benth.) (Leguminosae - Mimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 5:570-572.
- Custódio, N. L. 2008. Poliembrionia em espécies de *Callisthene* Mart. e *Qualea* Aubl. (Vochysiaceae). **Monografia** – Instituto de Biologia. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Davis, G. L. 1996. **Systematic Embryology of the Angiosperms**. John Wiley & Sons Inc, New York. 528 p.
- Duncan, E.J. 1970. Ovule and embryo ontogenesis in *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns. **Annals of Botany** 34: 677-683.
- Filardil, F.L.R.; Garcia, P.C.F.; Carvalho-Okano, R.M. & Rodrigues, C.M. 2007. Padrões de distribuição geográfica de espécies arbóreas de Leguminosae ocorrentes no Cerrado. **Revista Brasileira de Biociências** 5(2): 1116-1118.
- Gibbs, P.E. 1990. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revista Brasileira de Botânica** 13: 125-136.
- Gibbs, P.E. & Bianchi, M.B. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Acta Botânica** 106: 64-71.
- Gibbs, P.E. 2014. Late-acting self-incompatibility – the pariah breeding system in flowering plants. **New Phytologist** 203: 717-734.
- Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "Cerrado" vegetation. **Plant Systematics and Evolution** 211:13-29.
- Goldenberg, R & Werbachowski, J.S. 2004. Estudo comparativo da ocorrência de Apomixia em Melastomataceae e Asteraceae. In: Carneiro, V.T.C.; Dusi, D.M.A. (Ed.).

**Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 126p.

Guinet, P. H. 1981. Comparative account of pollen characters in the Leguminosae. Pp. 789-799. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (Eds.). **Advances in Legume Systematics - part 2.** Kew, Royal Botanic Gardens.

Henderson, J.H.M.; Nitsch, J.P. 1962. Effect of certain phenolic acids on the elongation of *Avena* first internodes in the presence of auxin and ryptophan. **Nature** 195(4843):780-782.

Johri, B.M & Ambegaokar, K.B. 1984. Embryology: then and now. p. 1-52. In: B.M. Johri (Ed.). **Embryology of Angiosperms.** Berlin, Springer-Verlag.

Johri, B.M.; Ambegaokar, K.B. & Srivastava, P.S. 1992. **Comparative Embryology of Angiosperms.** v.1, 1221p.

Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. 1999. **Plant systematics: a phylogenetic approach.** Sinauer, Sunderland. 567p.

Judd, W. S.; Campnelli, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2009. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 632p.

Kajita, T., Ohashi, H., Tateishi, Y., Bailey, C.D. & Doyle, J.J. 2001. rbcL and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettiaeae, and allies. **Systematic Botany** 26:515-536.

Klink, C.A. & Machado, R.B. 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology** 19(3): 707-713.

Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell** 5: 1425-1437.

Koptur, S. 1984. Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: breeding systems of neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). **Evolution** 38: 1130-1143.

Lankshmanan, K.K & Ambegaokar, H.B. 1984. Polyembryony. In: B.M. Johri (Eds.), **Embryology of Angiosperms**. Berlin, Springer-Verlag.

Lewis, G.P. 1987. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Gardens, Kew. 369p.

Lewis, G.P.; Schrire, B.D.; Mackinder, B. & Lock, M. 2005. **Legumes of the World**. The Royal Botanic Garden, Kew. 577p.

Lima, M.P.M. 1985. Morfologia dos frutos e sementes dos gêneros da tribo Mimoseae (Leguminosae - Mimosoideae), aplicada à sistemática. **Rodriguesia** 37:53-78.

Lodhi, M. A. K. 1982 Germination and decreased growth of *Kochia scoparia* in relation to its antoallelopathy. **Canadian Journal Botanic** 57: 1083-1088.

Lorenzi, H. 1998. **Árvores Brasileiras 2: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa, Plantarum. 368p.

Luckow, M. & Du Puy, D. 2000. A new species of *Gagnebina* (Leguminosae: Mimosoideae) and their utility for phylogenetic studies. **Systematic Botany** 27:29-40.

Luckow M.; Miller, J.T.; Murphy, D.J.; Livshultz, T. 2003. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. 197-220pp. In: Klitgaard, B.B. & Bruneau, A. (Eds.) **Advances in Legume Systematics**, Part 10, Higher Level Systematics, Royal Botanical Gardens, Kew. 197-220p.

Maheshwari, P. 1950. **An introduction to the embryology of Angiosperms**. New York: McGraw-Hill Book Company. 468p.

Martins, R.L. & Oliveira, P.E. 2003. RAPD evidence for apomixis and clonal populations in *Eriotheca* (Bombacaceae). **Plant Biology** 5:338-340.

Martins-da-Silva, R.C.V; Silva, A.S.L; Fernandes, M.M. & Margalho, L.F. 2014. **Noções Morfológicas e Taxonômicas para Identificação Botânica**. Embrapa, Brasília. 111p.

Mendes-Rodrigues, C. 2010. Ecologia de espécies poliembrionícas com ênfase no Bioma Cerrado. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG.

- Mendes-Rodrigues, C.; Carmo-Oliveira, R.; Talavera, S.; Arista, M.; Ortiz, P.L. & Oliveira, P.E. 2005. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae-Bombacoideae). **Plant Biology** 7(5): 533-540.
- Moreira, F.M.S & Moreira, F.W. 1996. Características da germinação de sementes de 64 espécies de leguminosas florestais nativas da Amazônia, em condições de viveiro. **Acta Amazonica** 26(1/2): 3-16.
- Müntzing, A. 1928. Pseudogamie in der gattung Potentilla. **Hereditas** 11:267-283.
- Nettancourt D. 1997. Incompatibility in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction** 10: 185-199.
- Oliveira, D.M.T. 1999. Morfo-anatomia de embrião de leguminosas arbóreas nativas. **Revista Brasileira de Botânica** 22(3): 413-427.
- Oliveira, D.M.T & Beltrati, C.M. 1993. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento de *Inga fagifolia* Willd. (Fabaceae: Mimosoideae). **Revista Brasileira de Biologia** 53(4): 625-636.
- Oliveira, D.M.T & Beltrati, C.M. 1994. Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de *Inga fagifolia* Willd. (Fabaceae: Mimosoideae). **Revista Brasileira de Biologia**. 54:91-100.
- Oliveira, P.E.; Gibbs, P.E.; Barbosa, A.A. & Talavera, S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. **Plant Systematics and Evolution** 179: 207-219.
- Palser, B. F. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: Embryology. **Annual Missouri Botanic Garden** 62:620-646.
- Pennington, T.D. 1997. **The genus Inga**. The Royal Botanic Garden. Kew. 839p.
- Pereira-Junior, E. J. 2011. Ontogenia do óvulo e da antera de *Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, São José do Rio Preto, SP.

- Poncy, O. 1984. Graines, germinations et plantules dans lês genre *Inga* (Légumineuses, Mimosoideae): étude morphologique chez quelques espéces de Guyane Française. **Bulletin de La Société d'Histoire Naturelle de Toulouse** 120: 35-42.
- Poncy, O. 1985. Le genre *Inga* (Légumineuses, Mimosoideae) em Guyane Française – systématique, morphologiw dês formes juvéniles écologie. “Studies on the flora of the Guianas”, **Mémoires Du Muséum National d'Histoire Naturelle, Serie B. Botanique** 31: 1-124.
- Pridham, J.B. 1965. Low molecular weight phenols in higher plants. **Annual Review Plant Physiol** 16:13-36.
- Richards, A.J. 1986. **Plant Breeding Systems**. London, George Allen & Unwin. 529p.
- Salomão, A.N. & Allem, A.C. 2001. Polyembryony in Angiosperms: trees of the Brazilian cerrado and caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica** 15(3): 369-378.
- Sampaio, D.S. 2010. Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações nos sistema de autoincompatibilidade. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Seavey, S.R. & Bawa, K.S. 1986. Late-acting self-incompatibility. **Botanical Review** 52:196-217.
- Seijo, G. & Neffa, V. G. S. 2004. The cytological origin of the polyads and their significance in the reproductive biology of *Mimosa bimucronata*. **Botanical Journal of the Linnean Society** 144: 343-349.
- Shivaramiah, G. 1998. Endosperm development in Bignoniaceae. **Phytomorphology** 48:45-50.
- Simpson, M.G. 2006. **Plant Systematics**. Elsevier, Amsterdam. 579p.
- Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson, A.; Stevenson, D.W. & Heald, S.V. 2004. Flowering Plants of the Neotropics. **New York Botanical Garden** 151-156.
- Soares, G.L.G.; Isaias, R.M.S.; Gonçalves, S.J.M.R. & Christiano, J.C.S. 2000. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea: Brachyscelidae)

em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdlt. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Zoociências** 2:103-116.

Souza, E. R. 2007. Estudos filogenéticos na tribo *Ingeae* (Leguminosae: Mimosoideae) com ênfase em *Calliandra* Benth. e gêneros afins. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.

Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2012. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. 3ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 768p.

Teppner, H. 2007. Polyad development and karyology in *Inga* and *Calliandra* (Mimosaceae-Ingeae): a reply to a recent paper in Flora. **Phyton Annales Rei Botanicae**. 47:1-46.

Uma Shaanker, R. & Ganeshiah, K.N. 1996. Polyembryony in plants: a weapon in the war over offspring numbers? **Trends in Ecology & Evolution** 11(1): 26-27.

Uma Shaanker, R. & Ganeshiah, K.N. 1997. Conflict between parent and offspring in plants: predictions, processes and evolutionary consequences. **Current Science** 72(12): 932-939.

## Capítulo I<sup>1</sup>

### Ontogenia da antera e dos óvulos de *Inga laurina* (Sw.) Willd.

---

<sup>1</sup>Texto formatado de acordo com as diretrizes da revista Acta Botanica Brasilica

Ontogenia da antera e dos óvulos de *Inga laurina* (Sw.) Willd.

Ontogenia da antera e dos óvulos de *Inga laurina*

Nayara Augusto Vieira de Araújo<sup>2</sup>

Renata Carmo de Oliveira<sup>2,3</sup>

---

<sup>2</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia, Rua Ceará s/n, Bloco 2D, Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Autor para correspondência: carmooliveira@ufu.br

**RESUMO:** (Ontogenia da antera e dos óvulos de *Inga laurina* (Sw.) Willd.). A sistemática das Leguminosas é um tema bastante discutido, e alguns autores admitem três subfamílias que são distintas principalmente pela morfologia floral. Porém dados polínicos e embriológicos também auxiliam no posicionamento sistemático de grupos vegetais, especialmente os não monofiléticos como a tribo *Ingeae*. Dentre as espécies da tribo *Ingeae*, as do gênero *Inga* são caracterizadas por apresentar flores pequenas com numerosos estames e grãos de pólen reunidos em políades, classificada como a sua principal unidade de dispersão. Juntamente com dados moleculares, os caracteres palinológicos e embriológicos podem ser usados para reconstruir a história evolutiva das Angiospermas, em especial do grupo das Mimosoideae, além de auxiliar no conhecimento sobre o sistema reprodutivo e a formação de sementes. Assim, os objetivos desse trabalho são descrever a ontogenia da antera de *Inga laurina* até a formação das políades e caracterizar o desenvolvimento do óvulo, em especial do gametófito feminino dessa espécie. O estudo foi realizado na área urbana de Uberlândia, MG, Brasil. Para o estudo da microsporogênese e da microgametogênese foram coletados botões florais e flores em diferentes fases de desenvolvimento e fixados para análise histológica. Flores em antese foram abertas e suas anteras isoladas para determinação do número de grãos de pólen e de políades por antera. Em *I. laurina*, a formação da parede do microsporângio (endotécio, camada média e tapete) enquadra-se dentro do desenvolvimento do tipo Dicotiledôneo. Quatro células-mãe de micrósporo são formadas dando origem a políades de 16 grãos de pólen cada. Os óvulos de *I. laurina* são anátropes, crassinucelados, bitegumentados, e o desenvolvimento do gametófito feminino é do tipo *Polygonum*. As análises da ontogenia dos gametófitos masculino e feminino revelam que não há anomalias durante o desenvolvimento embriológico inicial. Os resultados apresentados suportam o posicionamento mais derivado do gênero *Inga* dentro da tribo *Ingeae*, especialmente em relação às características polínicas, podendo assim contribuir o estudo da taxonômica da tribo.

**Palavras chave:** *Inga*, Leguminosae e políades.

**ABSTRACT:** (Ovule and anther ontogeny of *Inga laurina* (Sw) Willd.). The systematics of Leguminosae is a very discussed topic. Some authors admit three subfamilies that can be distinguished mainly by floral morphology, however, the pollen and embryological data may be important to define the systematic position of a plant group, especially non-clearly monophyletic ones as the *Ingeae* tribe. Amongst *Ingeae*, the genus *Inga* species are characterized by having small flowers with numerous stamens and pollen gathered in polyads, ranked the main unit dispersion. Along with molecular data, palynological and embryological characters can be used to reconstruct the evolutionary history of angiosperms, especially the group of Mimosoideae, and assist in the understanding of the system reproductive and seeds formation. The objectives of this study are to describe the anther ontogeny of *Inga laurina*, until the formation of polyads, and characterize the development of the ovule, especially the female gametophyte of this species. The study was carried out at an urban area in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. To study the Microsporogenesis and Microgametogenesis, flower buds and flowers in different stages of development were collected and fixed for histological analysis. Flowers in anthesis were opened and their anthers was isolated to determine the number of pollen grains per anther and polyads. In *I. laurina* the microsporangium wall formation (endothecium, middle layer and tapetum) falls within the development of Dicotyledonous type. Four pollen mother cells were formed that remained together to form a polyad with 16 grains. The ovules are anatropus, crassinucelate, bitegmic and the gametophyte develops into a *Polygonum* type embryo sac. The analysis of the ontogeny of male and female gametophytes reveal no abnormalities during early embryogenesis. The results support a derived position of the *Inga* genus in *Ingeae* tribe, especially in relation to pollen characteristics, and this may contribute to the tribe taxonomic studies.

**Key words:** *Inga*, Leguminosae and polyads.

## Introdução

A família Leguminosae (Fabaceae) compreende aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies de distribuição geográfica mundial (Lewis *et al.* 2005; Souza & Lorenzi 2012), sendo sua monofilia confirmada por dados morfológicos e moleculares (Chappil 1995; Kajita *et al.* 2001; APG 2003; Lewis *et al.* 2005).

A organização taxonômica das Leguminosas é um tema bastante discutido e alguns autores como Lewis (1987), Judd *et al.* (1999), Smith *et al.* (2004) e Simpson (2006), admitem três subfamílias: Caesalpinoideae, Papilioideae (Faboideae) e Mimoideae, que podem ser distintas principalmente pela morfologia floral. Além dos caracteres morfológicos, a embriologia das espécies, abrangendo a investigação dos eventos relevantes à reprodução sexual (Pereira-Junior 2011), também pode diferir entre os grupos vegetais e é tida como um bom critério taxonômico (Barros *et al.* 2013; Martins-da-Silva *et al.* 2014).

Teppner (2007) e Martins-da-Silva *et al.* (2014) ressaltaram a importância dos caracteres polínicos para os estudos taxonômicos. Analisando espécies do grupo das Mimoideae, estes autores observaram a presença de grãos de pólen reunidos em políades e a classificaram como principal unidade de dispersão dessas espécies, sendo comum a heterogeneidade no tamanho dos grãos de pólen e nos padrões de ornamentação (Guinet 1981). Essa diversidade polínica é de grande valor taxonômico para a distinção das tribos e dos gêneros da subfamília Mimoideae (Teppner 2007; Buril *et al.* 2010; Martins-da-Silva *et al.* 2014).

*Ingeae* (Mimoideae) se distingue das demais tribos do grupo por apresentar espécies com caracteres morfológicos similares e exclusivos, como número e fusão de estames (Judd *et al.* 2009; Souza & Lorenzi 2012; Martins-da-Silva *et al.* 2014). Porém, tais características não sustentam a monofilia da tribo (Souza 2007). Novos

estudos não reconheceram metade das espécies até então posicionadas nessa tribo (Pennington 1997; Luckow *et al.* 2000; Luckow *et al.* 2003), ressaltando a importância de estudos embriológicos e reprodutivos que possam colaborar com a identificação e com o esclarecimento das relações dentro da tribo Ingeae e do grupo das Mimosoideae.

Características morfológicas das políades foram descritas para algumas espécies do gênero *Inga* (Mimosoideae – Ingeae), como *Inga striata* (Cruz-Neto *et al.* 2007), *Inga feuillei* (Teppner 2007) e *Inga vera* subsp. *Affinis* (Buril *et al.* 2010). A formação das políades e a quantidade de grãos de pólen presente variam de uma espécie para outra (Teppner 2007, Buril *et al.* 2010), e essa heterogeneidade observada auxilia na organização taxonômica das espécies de Mimosoideae (Buril *et al.* 2010).

Além das análises palinológicas, estudos embriológicos podem contribuir para o entendimento do sistema de reprodução predominante nas espécies (Shivaramiah 1998). Análises dos frutos e sementes dos gêneros da tribo Mimoseae (Mimosoideae) enfatizaram a estrutura do embrião como caráter de grande valor para solucionar possíveis problemas taxonômicos dentro do grupo (Lima 1985). Além disso, anomalias no processo embriológico, gerando inviabilidade polínica ou poliembrionia têm sido associadas à ocorrência de apomixia, que é a reprodução assexuada via semente (Koltunow 1993; Goldenberg & Shepherd 1998; Mendes-Rodrigues *et al.* 2005). A poliembrionia e possível apomixia têm sido relatadas para espécies de *Inga* (Araújo & Carmo-Oliveira, dados não publicados) e os estudos embriológicos podem permitir entender a origem destes processos.

A espécie objeto deste estudo, *Inga laurina* (Sw.) Wild. ocorre desde a América Central até a América do Sul. No Brasil está presente nos biomas Cerrado, Floresta Amazônica, formações florestais do domínio da Mata Atlântica e Restinga, em fitofisionomias Campestres e Mata Ciliar (Filardil *et al.* 2007). Esta é uma espécie

arbórea, com pequenas flores esbranquiçadas reunidas em inflorescência, seu fruto do tipo legume é indeiscente (Koptur 1983; Cruz-Neto *et al.* 2007) com sementes poliembriônicas (Mendes-Rodrigues *et al.* 2005). A formação de mais de um embrião por semente foi descrita e quantificada para a espécie e averiguar a embriologia básica pode ajudar a entender a origem destes processos (Araujo & Carmo-Oliveira, dados não publicados).

Juntamente com dados moleculares, caracteres palinológicos e embriológicos podem ser usados para reconstruir a história evolutiva das Angiospermas (Plachno & Swiatek 2009), em especial do grupo das Mimosoideae (Buril *et al.* 2010), além de auxiliar no conhecimento sobre o sistema reprodutivo e a formação de sementes. Assim, os objetivos desse trabalho são descrever a ontogenia da antera de *Inga laurina* até a formação das políades e caracterizar o desenvolvimento do óvulo, em especial do gametófito feminino dessa espécie. Tais dados poderão contribuir para as análises com relação ao posicionamento da tribo *Ingeae* nas Mimosoideae, bem como oferecer informações relacionadas à biologia reprodutiva da espécie.

## **Material e Métodos**

O estudo foi realizado nos anos de 2013 e 2014 e o material botânico foi coletado de oito indivíduos situados na área urbana da cidade, sendo quatro destes no Parque do Sabiá em Uberlândia situado na coordenada 18°54'52"S e 48°14'02"W e altitude de 890m (Vieira 2008). O fragmento de vegetação florestal do Parque corresponde uma área com cerca de 30 hectares compostos por matas de galeria, mesófila e cerradão (Guilherme *et al.* 1998). Os outros quatro indivíduos estão no Praia Clube de Uberlândia, que possui aproximadamente 300 mil m<sup>2</sup> de extensão, localizado as margens do Rio Uberabinha (18°93'45" S - 48°29'15" W) e encontra-se numa

altitude aproximada de 775,29 m (Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável 2008). O fragmento de vegetação no clube corresponde a uma área de mata ciliar, com aproximadamente 78 mil m<sup>2</sup>, composta por 95 espécies vegetais sendo 15 nativas do bioma Cerrado (Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável 2008), dentre estas *Inga laurina*. A mata ciliar apresenta remanescentes alterados, empregada nas áreas marginais ao leito do rio Uberabinha (Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável 2008).

Para o estudo da microsporogênese e da microgametogênese foram coletados botões florais em fases iniciais de desenvolvimento (1,0 - 5,0 mm), em pré-antese (5,5 mm) e flores abertas (6,0 mm) e posteriormente foram fixados em FGAA (Lertsten & Curtis 1988). As amostras foram submetidas à desidratação em série etanólica (Kraus & Arduin 1997), passaram por uma série de etanol:clorofórmio (3:1, 1:1, 1:3, 1:1) para a retirada de cera epicuticular e incluídas em 2-hidroxietil-metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit) (Feder & O'Brien 1968). As séries de secções transversais e longitudinais foram montadas em lâminas de vidro e submetidas à coloração com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1964). Algumas destas lâminas foram separadas para realização de testes histoquímicos com Lugol (Kraus & Arduin 1997), observadas em luz polarizada para verificar a presença de grãos de amido e em outras foram realizados testes com sulfato ferroso 2 % (Jensen 1962) para verificar a presença de compostos fenólicos.

Foi mensurado o diâmetro da flor (da base do cálice ao estigma) (Tabela 1), estimado o número de políades e de grãos de pólen por antera e também o número de óvulos por flor (Tabela 2) (Kearns & Inouye 1993). Para mensurar o diâmetro, para contagem das políades e dos grãos de pólen foram isoladas anteras de 10 flores de inflorescências distintas. As anteras foram colocadas em lâminas de vidro e abertas com

auxilio de pinças em estereomicroscópio, posteriormente foram observadas em microscópio para contagem das políades e dos grãos de pólen. O número de grãos de pólen por flor foi estimado através da multiplicação do número médio de grãos de pólen por antera pelo número médio de anteras por flor (Silva-Souza *et al.* 2004). A razão pólen/óvulo (P/O) foi determinada através da divisão do número médio de grãos de pólen por flor pelo número médio de óvulos por flor (Cruden 1977).

Os resultados foram registrados por meio de imagens obtidas em microscópio Axioplan Zeiss com luz polarizada utilizando-se câmera fotográfica modelo DP70 e o programa DPController.

O material botânico foi depositado no *Herbarium Uberlandense* (HUFU), do Instituto de Biologia, UFU – Uberlândia, sob o número de registro HUFU 60.327.

## Resultados

### Ontogênese da Antera

*Inga laurina* apresenta inflorescência em espiga com aproximadamente 70 flores esbranquiçadas com  $1,35 \pm 0,05$  cm de comprimento (Figura 1.A). As flores são perfeitas com androceu formado por cerca de 35 estames com anteras bitecas com deiscência longitudinal, localizada na porção terminal do filete.

O processo de diferenciação da antera e dos microsporângio se inicia juntamente com a diferenciação dos botões florais e, em botões de 1,0-2,0 mm observa-se o contorno bilobado da antera e a presença do conectivo bem desenvolvido (Figura 1.B) que separa as duas tecas.

Nos botões em fases iniciais de desenvolvimento (1,0 - 2,0 mm), a antera biteca consiste da protoderme que reveste os grupos de células arquesporiais, do lado ventral, e do lado dorsal o conectivo (Figura 1.B). Com o desenvolvimento deste primórdio de

antera, em cada teca da antera se diferenciam quatro microporângios separados por parênquima, caracterizando a antera como poliesporangiada.

Nos estágios seguintes, ocorrem as divisões periclinais nas células subepidérmicas que dão origem à camada parietal primária e as células do tecido esporógeno. A camada parietal primária se divide e dá origem a duas camadas parietais secundárias, uma externa e outra interna (Figura 1.C). A camada parietal secundária externa se divide, dando origem ao endotélio e à camada média, enquanto que a camada interna se diferencia diretamente em tapete (Figura 1.D). Com as divisões das células esporógenas e nas de origem parietal, a antera aumenta de volume.

Em botões com aproximadamente 3,0 mm, observa-se que as células epidérmicas encontram-se achatadas acompanhando o eixo de expansão da antera (Figura 1.D), e ao longo da maturação dos grãos de pólen estas células se apresentam comprimidas. As células que revestem a região do conectivo apresentam citoplasma corado fortemente pelo Azul de toluidina e em preto quando tratadas com sulfato ferroso, indicando a presença de compostos fenólicos.

Nos botões com 3,5 mm as células subepidérmicas já sofreram divisões periclinais (Figura 1.E). No próximo estágio (botões com 4,0 mm) foi possível observar o endotélio. As células desta camada unicelular, durante o desenvolvimento da antera, aumentam o seu volume tornando-se alongadas anticlinalmente, e em botões com 5,0 mm já apresentam o espessamento nas paredes anticlinais em forma de barras que partem da parede periclinal interna para externa (Figura 1.F). Na região entre as tecas, as células do endotélio se apresentam levemente achatadas (Figura 1.F).

As células da camada média se diferenciam a partir das células do estrato parietal secundário externo. São células radialmente curtas que com o crescimento do botão elas são comprimidas e, à medida que a antera se expande, estas células vão sendo

colapsadas, como observado em botões com 5,0 mm (Figura 1.F) e em pré-antese (5,5 mm).

As primeiras divisões que darão origem ao tapete podem ser observadas em botões com aproximadamente 3,0 mm (Figura 1.D). Sua diferenciação forma um conjunto de células entre as células-mãe de micrósporo (CMMi) e as células da camada média. O tapete se desenvolve como um tecido glandular, com células radialmente dispostas e uninucleadas (Figura 1.E).

### **Ontogênese da Políade**

O desenvolvimento do gametófito masculino se inicia em botões com cerca de 1,5 a 2,0 mm . Nesta fase observa-se que as células do tecido esporógeno primário sofrem divisão e posteriormente se diferenciam em CMMi (Figura 2.A). Estas se distinguem das demais por ocupar a porção central do esporângio, pelo seu tamanho, paredes delgadas, citoplasma denso e núcleo proeminente. Uma única célula arquesporial se diferencia e divide mitoticamente formando primeiramente duas CMMi (Figura 2.B), que posteriormente sofrem outra divisão mitótica formando quatro CMMi (Figura 2.C).

Cada CMMi se divide por meiose (Figura 2.D), resultando na formação de quatro células, formando assim uma políade com dezesseis micrósporos cada, que permanecem unidos e envolvidos pela camada de calose, até o processo de dispersão dos grãos (Figura 2.E).

Em botões em pré-antese (5,5 mm) tem-se o gametófito masculino formado por uma célula maior, a vegetativa, e outra menor, a geradora (Figura 2.F). A célula vegetativa, nesta fase, apresenta um grande vacúolo e em posição mais central, e frequentemente se observa a presença de dois nucléolos (Figura 2.F), enquanto a célula geradora apresenta-se na lateral do grão de pólen, comprimida pela célula vegetativa,

com núcleo comparativamente menor, de forma esférica, cromatina condensada e com nucléolo distinto. Nesta fase, cada grão de pólen maduro bicelular, da políade, apresenta-se preenchido por grãos de amido (Figura 3.A).

Na antera madura, as células do conectivo se mostram totalmente preenchidas pelos compostos fenólicos. (Figura 3.B). Em cada teca observou-se a presença de oito políades por antera (Figura 3.C), totalizando assim cerca de 128 grãos de pólen por antera e 4.480 grãos de pólen por flor. Nessa fase, as células epidérmicas de ambos os lados do sítio de ruptura são diferenciadas em células estomiais, próximo a região de deiscência da antera (Figura 3.D). A liberação dos grãos de pólen múltiplos das políades se dá através da abertura da teca por uma fenda longitudinal, caracterizando a deiscência do tipo longitudinal (Figura 3.D).

### Ontogênese do óvulo

O ovário de *Inga laurina* é súpero e revestido por tricomas. Apresenta-se formado por um carpelo, unilocular e com cerca de  $10,35 \pm 1,03$  óvulos dispostos em fileira, com a placenta disposta na margem do ovário, caracterizando placentação sutural marginal (Figura 4.A). Na flor aberta observou-se que a região da placenta do ovário é revestida por um tecido glandular contínuo com o tecido transmissor, definido como obturador placentário (Figura 4.A).

Nas fases iniciais de desenvolvimento (botões com 2,0-3,0 mm) observa-se o início da curvatura do óvulo. O aumento no número de células da região entre o funículo e a base dos tegumentos leva a uma curvatura que resulta num óvulo anátropo, mas sua curvatura não completa os 180° como em um típico óvulo anátropo (Figura 4.A).

Os óvulos de *Inga laurina* são bitementados (Figura 4.A). Os tegumentos externo e interno se formam a partir de divisões das células da epiderme nucelar, sendo

a diferenciação do externo anterior a do interno. Durante o crescimento do óvulo, o tegumento externo ultrapassa o interno e a micrópila se forma apenas pelo tegumento externo e se apresenta voltada para a região do obturador placentário (Figura 4.A).

Os óvulos maduros apresentam o tegumento externo formado por três a quatro camadas de células, com epiderme unisseriada, com células cubóides de tamanho irregular (Figura 4.A). O tegumento interno é formado por duas camadas e não reveste a porção apical do nucelo. Durante o desenvolvimento dos óvulos observa-se que as células da epiderme externa do tegumento externo aumentam de tamanho e tornam-se preenchidas por compostos fenólicos que se coram fortemente pelo Azul de toluidina (Figura 4.A) e também em estes com sulfato ferroso.

A presença de amido foi observada no nucelo e no gametófito já diferenciado, em flores após antese (Figura 4.B).

O arquespório é simples, com uma única célula esporógena que se diferenciará em célula-mãe de megáspero (CMMg) (Figura 4.C). As divisões nas células arquesporiais primárias subepidérmicas formam até cinco camadas células nucelares caracterizando um óvulo crassinucelado (Figura 4.C), e essas camadas se mantêm durante o desenvolvimento do óvulo.

### **Ontogênese do gametófito feminino**

Nos botões com cerca de 3,0 mm, observa-se a célula esporógena, que apresenta citoplasma denso e núcleo proeminente. No estágio seguinte ela se diferencia em CMMg (Figura 4.C). Esta se encontra imersa ao tecido nucelar e se diferencia das demais do nucelo pelo tamanho e por apresentar conteúdo denso, revelando um arquespório simples.

Em botões com 4,0 mm observa-se a diáde de megáspero (Figura 4.D) resultante da primeira fase da divisão meiótica da célula-mãe de megáspero. A segunda fase da

divisão meiótica dá origem a uma tétrade linear de megásporos. O megásporo calazal se torna funcional e é possível observar os resquícios dos demais megásporos da tétrade (Figura 4.E).

Em botões com 5,0 mm, em pré-antese, já se tem o estágio tetranuclear do gametófito feminino, totalmente diferenciado e organizado com duas sinérgides, uma oosfera, a célula média binucleada e as três antípodas, caracterizando um desenvolvimento do tipo *Polygonum* (Figura 4.F).

O número médio de óvulos, de grãos de pólen e de anteras por flor, grãos de pólen por políades e políade por antera e a razão (P/O) de *Inga laurina* estão resumidos na Tabela 1.

## **Discussão**

A organização de numerosas flores com muitos estames em inflorescências, observado em *Inga laurina*, ilustram as características florais apresentadas pelas espécies de Mimosoideae (Souza *et al.* 2011). Arroyo (1981) considera que a unidade básica de reprodução das Mimosoideae são as inflorescências e não as flores individuais, pois as flores tendem a ser pequenas e formam uma estrutura compacta que muitas vezes é pouco atrativa aos polinizadores. Como nas outras Mimosoideae, os estames são a parte mais atrativa das flores, sendo a corola relativamente pequena e inconspícua (Lewis 1987; Judd *et al.* 1999; Smith *et al.* 2004; Simpson 2006; Cruz-Neto *et al* 2007).

*Inga laurina* apresenta antera multiesporangiada, epiderme com células achataidas e persistentes, endotécio fibroso e tapete glandular persistente, características comuns ao descrito para espécies das subfamílias de Leguminosae (Davis 1966; Johri 1992). Os grãos de pólen compactados e dispersos em políades também são

característicos do gênero *Inga* (Barth & Yoneshigue 1965; Seijo & Neffa 2004; Buril *et al.* 2010), assim como a formação de 16 grãos por políade (Buril *et al.* 2010).

A formação da parede da antera (endotécio, camada média e tapete), enquadra-se dentro do desenvolvimento do tipo Dicotiledôneo proposta do Davis (1966), como descrito para o grupo das Mimosoideae pelo autor e por Johri *et al.* (1992) e Watson & Dallwitz (1992). Já para o gênero *Inga*, não há relatos prévios quanto ao desenvolvimento do microsporângio ou da microsporogênese, mas descrições quanto à formação das políades com base em estudos citogenéticos em *Acacia* (Newman 1933), *Mimosa bimucronata* (Seijo & Neffa 2004), e em outras espécies de *Inga* como *Inga edulis*, *Inga letiscifolia*, *Inga marginata* Willd. (Barth & Yoneshigue 1965), *Inga feuillei* (Teppner 2007) e *Inga vera* (Buril *et al.* 2010).

A presença da epiderme com células achatadas e do endotécio do tipo fibroso com uma camada de células grandes e com espessamento em forma de barras, caracterizando o tipo radial de espessamento (Manning 1996), também coincidem com o descrito para as Mimosoideae (Corner 1951; Davis 1966; Johri 1992; Manning 1996). A persistência de algumas células epidérmicas na região de deiscência da antera sugere que estas também podem estar envolvidas na sua abertura, como no caso da *Tabebuia pulcherrima* (Mariath *et al.* 2006). A presença de compostos fenólicos na células do conectivo não é registrada para outras espécies gênero ou mesmo para a tribo Ingeae e para a subfamília. Considerando a função de proteção contra patógenos, atribuída aos compostos fenólicos (Henderson & Nitsch 1962; Brand-Williams *et al.* 1995), a presença destes na região do conectivo pode conferir tal função e pode, até mesmo, sugerir uma proteção contra a predação da estrutura da antera como um todo incluindo as políades.

O endotécio é tido como o promotor na ruptura do estômio, levando à abertura da antera (Johri 1984; Manning 1996). O espessamento do endotécio é uma adaptação significativa para esse processo e é amplamente distribuído dentro das Angiospermas e no grupo das Mimosoideae (Davis 1966; Manning 1996). O padrão de espessamento do endotécio pode ou não variar dentro das famílias, que podem ser caracterizadas por apenas um tipo ou por vários (Davis 1966; Johri 1984; Manning 1966); porém, em se tratando de gênero, o espessamento do endotécio é usualmente conservado (Manning 1996).

A presença de uma única camada média na parede da antera é uma característica de espécies mais derivadas e sua degeneração, durante o desenvolvimento da antera, é comum para esse tipo de tecido (Johri *et al.* 1992; Batygina & Vinogradova 2007; Buril *et al.* 2010). Tal característica é descrita para a subfamília Mimosoideae e seu caráter conservador (Bhandari 1984) sugere a possibilidade desta ser uma característica presente no gênero *Inga*.

As células do tapete das anteras de *Inga laurina* são uninucleadas, uma característica comum para Angiospermas e para as espécies de Mimosoideae (Davis 1966; Johri 1984; Pacini 1997; Buril *et al.* 2010). Johri (1984) e Pacini & Franchi (1997) descrevem que a função principal do tapete de fornecer nutrientes para o desenvolvimento do pólen ocorre tanto em tapetes binucleados quanto em uninucleados, sendo esta ultima considerada uma característica mais derivada (Buril *et al.* 2010).

As células do tapete permanecem adjacentes à parede do lóculo, circundando-o, e se mantêm integras até a maturação da antera, sendo assim classificado como tecido glandular (Maheshwari 1963; Rutishauser 1969; Johri 1984; Pancini & Franchi 1997). O tipo secretor aqui descrito é o tipo mais simples de tapete e é predominante na

maioria das plantas terrestres e em Angiospermas basais (Johri 1984; Pacini & Franchi 1997).

Em todo o desenvolvimento da antera observou-se a presença de quatro esporângios, distintos, por teca. Em cada esporângio, uma célula arquesporial, após dois ciclos mitóticos, forma quatro células-mãe de micrósporo, garantindo a formação de quatro políades por teca. Em seus estudos com *Inga feuillei*, Teppner (2007) verificou a presença de vários ciclos mitóticos nas células esporógenas que resultam em várias CMMi e a formação de várias políades por esporângio.

A presença de uma única célula esporógena que dará origem a quatro CMMi, como observado em *Inga laurina*, não é registrada para outras espécies de *Inga* ou mesmo para outros gêneros de Ingeae. Para as espécies da subfamília Mimosoidae, tem-se o registro de várias células esporógenas que dariam origem a várias CMMi como observado em *Acacia* (Newman 1933; Kenrick & Knox, 1979), *Mimosa bimucronata* (Seijo & Neffa 2004) e *Inga feuillei* (Teppner 2007). O número de grãos de pólen por políades é determinado pelo número de CMMi em cada esporângio (Newman 1933, Kenrick & Knox 1979; Seijo & Neffa 2004; Teppner 2007; Buril *et al* 2010). Em *Inga laurina*, a formação de quatro CMMi produziu políade de 16 grãos de pólen, totalizando 128 grãos de pólen por antera, assim como observado em *Pithecelobium diversifolium* (Buril *et al.* 2010); já em espécies de *Mimosa*, foram observadas políades com oito ou 16 grãos (Sorsa 1969), em *Acacia* o número de grãos de pólen na políade pode variar de oito a 32 grãos (Seijo & Neffa 2004) e, em *Mimosa arenosa*, elas são formadas por oito grãos de pólen cada.

Grãos de pólen formados em estruturas compostas como no gênero *Inga*, ocorrem somente em 52 famílias vegetais (Guinet & Le Thomas 1973; Grant *et al.*

1994; Seijo & Neffa 2004), porém a formação de políades com 16 ou mais grãos de pólen é comum a outros gêneros da tribo *Ingeae* (Niezgoda *et al.* 1983; Caccavari & Dome 2000). Estudos relacionados à morfologia polínica demonstraram que os grãos de pólen menos derivados são aqueles com mônades tricolpadas e mais derivados aqueles com políades (Buril *et al.* 2010).

A transferência de pólen por meio de políades apresenta vantagens e desvantagens, quando comparada aos sistemas mais basais de polinização, com grãos de pólen isolados (Seijo & Neffa 2004; Buril *et al.* 2010). A vantagem é que uma única políade viável é capaz de fecundar todos os óvulos, porque no ovário o número de óvulos é igual ou inferior ao número total de grãos de pólen (Newman 1933; Seijo & Neffa 2004; Teppner 2007). No caso de *Inga laurina*, são dez óvulos por ovário e dezesseis grãos de pólen em cada políade, sendo assim considerada uma característica evolutiva importante para solucionar a baixa eficiência da polinização natural no grupo (Newman 1933; Teppner 2007; Barros *et al.* 2013).

A desvantagem, segundo os autores supracitados, seria em razão da presença de autoincompatibilidade, já que a maioria das espécies estudadas até então são autoincompatíveis (Teppner 2007; Barros *et al.* 2013). Porém, vale ressaltar que a presença de outros mecanismos como a apomixia (Koltunow 1993), pode ocorrer em espécies com políades e favorecer a ocorrência de autocompatibilidade (Koptur 1984; Mendes-Rodrigues 2010; Barros *et al.* 2013).

Alguns autores demonstraram que, frequentemente, o número de grãos de pólen que compõem uma políade é igual ou superior ao de óvulos no ovário (Bernhardt *et al.* 1984). A razão entre o número de grãos de pólen e de óvulos (P/O) em *Inga laurina* é de  $437,7 \pm 42,98$  grãos/óvulo. Essa baixa razão P/O também foi observada em outras espécies que agrupam seus micrósporos em políades, como no caso de *Calliandra*

Benth. e *Asclepias* L. (Cruden 1977), na maioria das espécies do gênero *Inga* (Koptur 1984; Barros *et al* 2013) . Isto sugere que as políades possuem considerável vantagem seletiva, sendo uma unidade altamente eficiente (Teppner 2007; Barros *et al* 2013).

Outra característica frequente dentro do grupo das plantas é a presença de grãos de amido no grão de pólen maduro, que são hidrolisados pela célula vegetativa durante a maturação e germinação do grão de pólen (Maheshwari 1950; Johri 1984; Souza & Silva 1992). O processo de desenvolvimento do grão de pólen requer energia para favorecer seu crescimento, e o acúmulo desses grãos é elevado durante o desenvolvimento do botão floral até a antese (Souza & Silva 1992).

Durante todo o desenvolvimento do ovário de *Inga laurina* foi possível observar tricomas o revestindo, como observado por Lewis & Elias (1981) para espécies de Mimosoideae, em *Inga fagifolia* Oliveira & Beltrati (1993). A presença e tipos de tricomas no ovário e fruto podem auxiliar no esclarecimento do posicionamento taxonômico dos grupos vegetais (Pate & Kuo 1981), podendo assessorar o delineamento das espécies da tribo *Ingeae*.

A presença de um único carpelo com 10 óvulos dispostos em fileira e placentação sutural marginal são características descritas para as Leguminosae (Joly 1976; Johri *et al.* 1992; Judd 1999).

Em *Inga laurina* o obturador de origem placentária dá continuidade do tecido transmissor do estilete. A presença deste tecido é frequente nas Euphorbiaceae, Rosaceae, Liliaceae (Tilton & Horner 1980), Vochysiaceae (Carmo-Oliveira 1998) e Leguminosae (Owens 1986). Como observado na espécie estudada, o obturador placentário está relacionado com a nutrição e direcionamento do tubo polínico durante o seu crescimento. Sua origem varia entre os grupos, podendo ser a partir da placenta, do funículo ou dos tegumentos (Carmelillo-Guerreiro & Paoli 1999; Tilton & Horner 1980).

Os óvulos anátropes observados em *Inga laurina* são comuns para o gênero e para a subfamília Mimosoideae (Corner 1951; Davis 1966; Johri *et al.* 1992). A curvatura do óvulo não completa totalmente 180°, diferenciando-o dos óvulos tipicamente anátropo (Johri *et al.* 1992). Oliveira & Beltrati (1993) observaram essa mesma característica nos óvulos de *Inga fagifolia*, e consideraram que estes possuem uma leve tendência à campilotropia, mas não o suficiente para que sejam classificados como campilótropos.

A condição bitegumentada dos óvulos de *Inga laurina* é considerada um caráter mais primitivo dentro das Angiospermas, assim como a presença de tegumentos multisseriados (Palser 1975). Oliveira & Beltrati (1993) também observaram a presença de dois tegumentos em *Inga fagifolia* e Davis (1966) descreveu esta como uma característica do grupo das Mimosoideae. O tegumento externo com epiderme unisseriada, formada por células cubóides de tamanho irregular preenchidas por compostos fenólicos, observada em *Inga laurina*, também é semelhante ao descrito para *Inga fagifolia*, (Oliveira & Beltrati 1993; 1994).

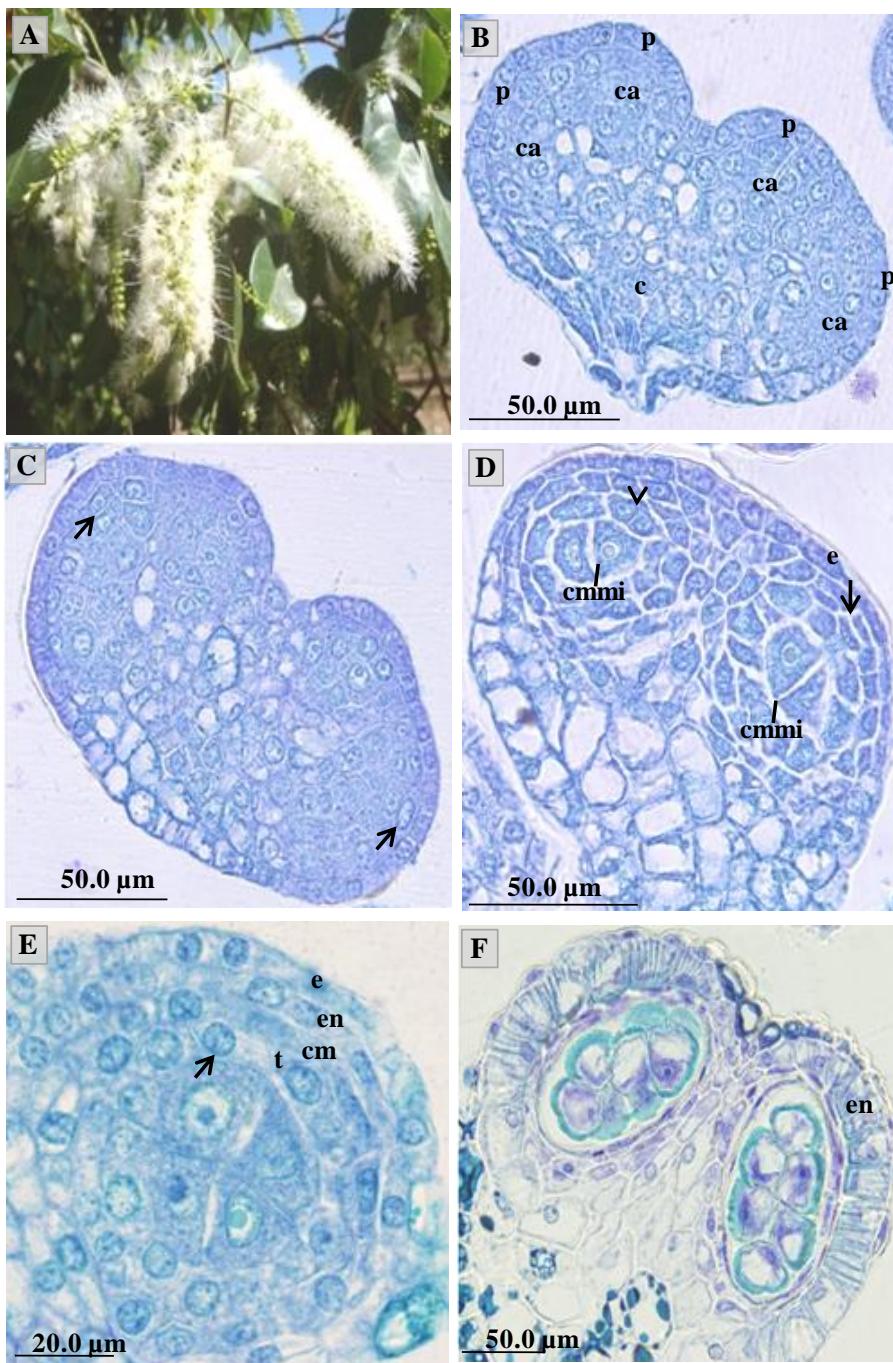
A micrópila é formada apenas pelo tegumento externo, como em *Inga fagifolia* (Oliveira & Beltrati 1993). Johri *et al.* (1992) observaram que a micrópila formada por um tegumento é considerada por alguns autores como derivada, apesar de não considerarem essa característica consistente para delimitar um grupo vegetal.

O desenvolvimento de apenas uma célula-mãe de megásporo (CMMg) caracterizando um arquespório simples é a condição mais comum entre as Angiospermas (Maheshwari 1950). Em *Inga laurina* foi observado que a CMMg se encontra separada da epiderme nucelar por cerca de cinco camadas células, caracterizando o óvulo como crassinucelado, frequente dentre as Mimosoideae (Davis 1966; Johri 1984).

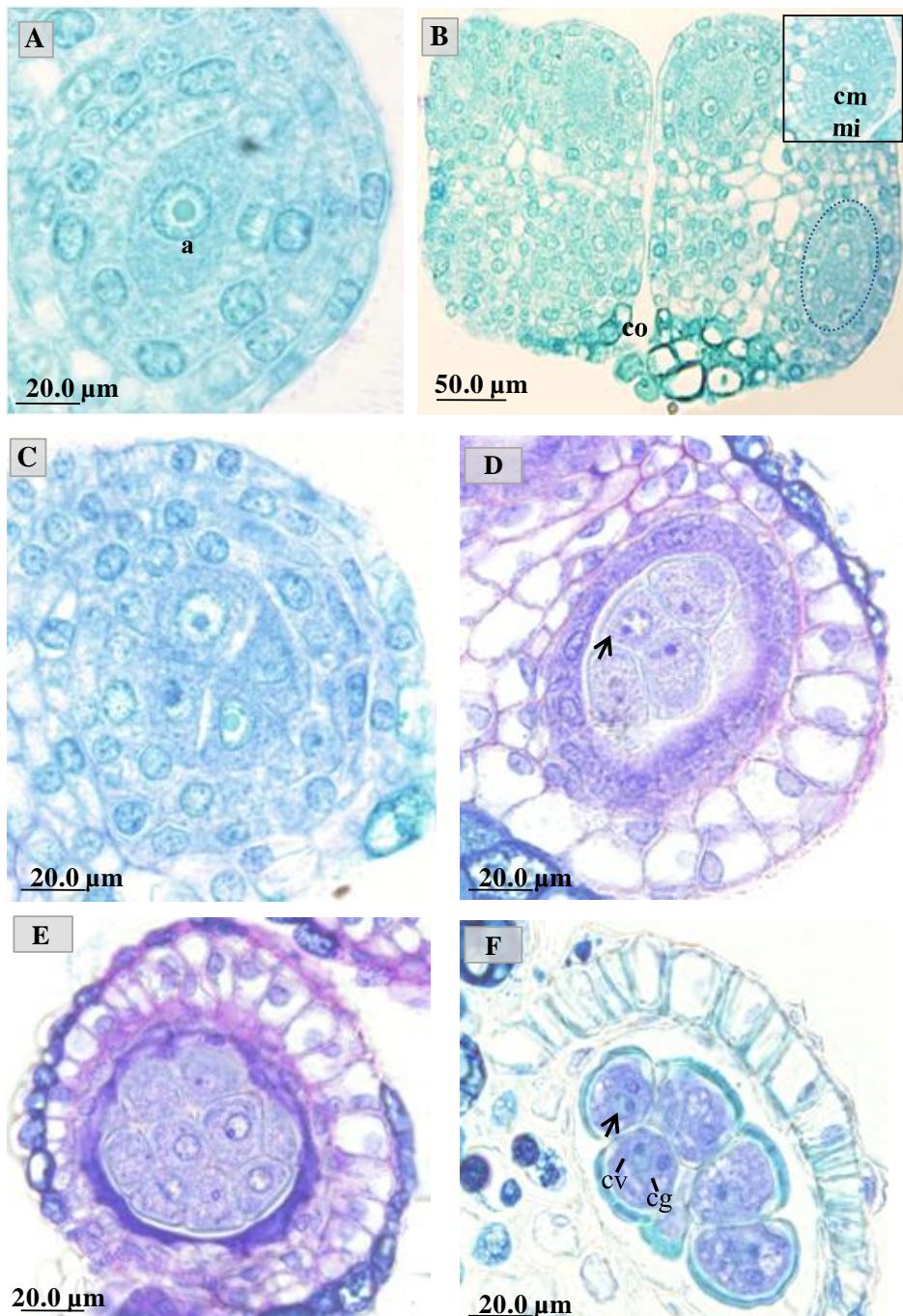
Durante o desenvolvimento do megagametófito, observou-se a presença de grãos de amido no interior do saco embrionário e também no nucelo, o que comumente ocorre nas espécies de Fabaceae (Oliveira & Beltrati 1993). O amido desempenha um importante papel no processo reprodutivo, pois influenciam no desenvolvimento das estruturas ovulares, do gametófito feminino e no desenvolvimento do embrião (Arbeloa & Herrero 1991; Johri 1992; Herrero & Hormanza 1996).

Os dados apresentados neste trabalho mostram que *Inga laurina* apresenta características que, somadas às de outras espécies de *Inga*, podem auxiliar no esclarecimento do posicionamento mais derivado do gênero na tribo *Ingeae*. A formação da parede do microsporângio com desenvolvimento do tipo Dicotiledôneo, a presença de uma única camada média que se degenera durante o amadurecimento da antera, os caracteres polínicos, como grãos de pólen agrupados em políades, comuns entre as espécies do gênero e a micrópila formada apenas pelo tegumento externo são critérios frequentemente utilizados no esclarecimento do posicionamento taxonômico das espécies (Wojciechowski *et al.* 2004).

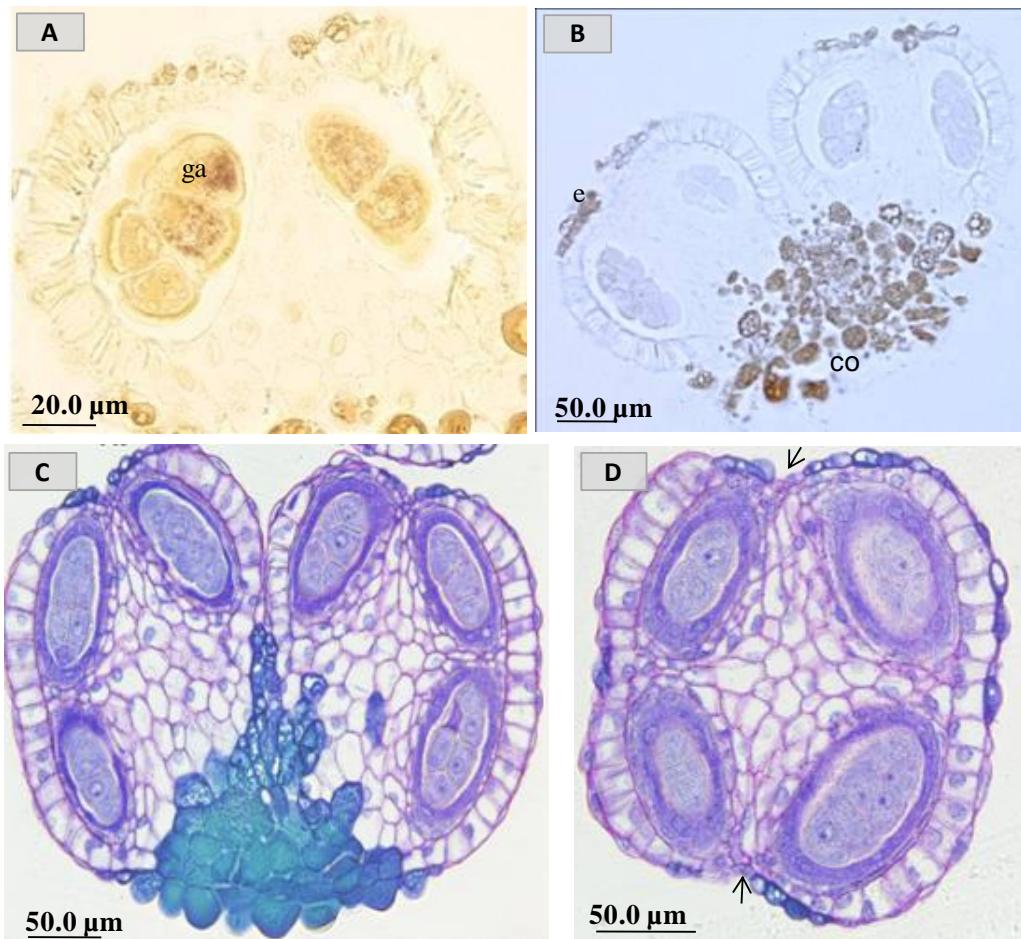
E por fim, os dados apresentados sobre a ontogenia dos gametófitos masculino e feminino, revelam que, apesar de *Inga laurina* ser um espécie poliembrionica e apomítica, não há anomalias durante o desenvolvimento embriológico inicial.



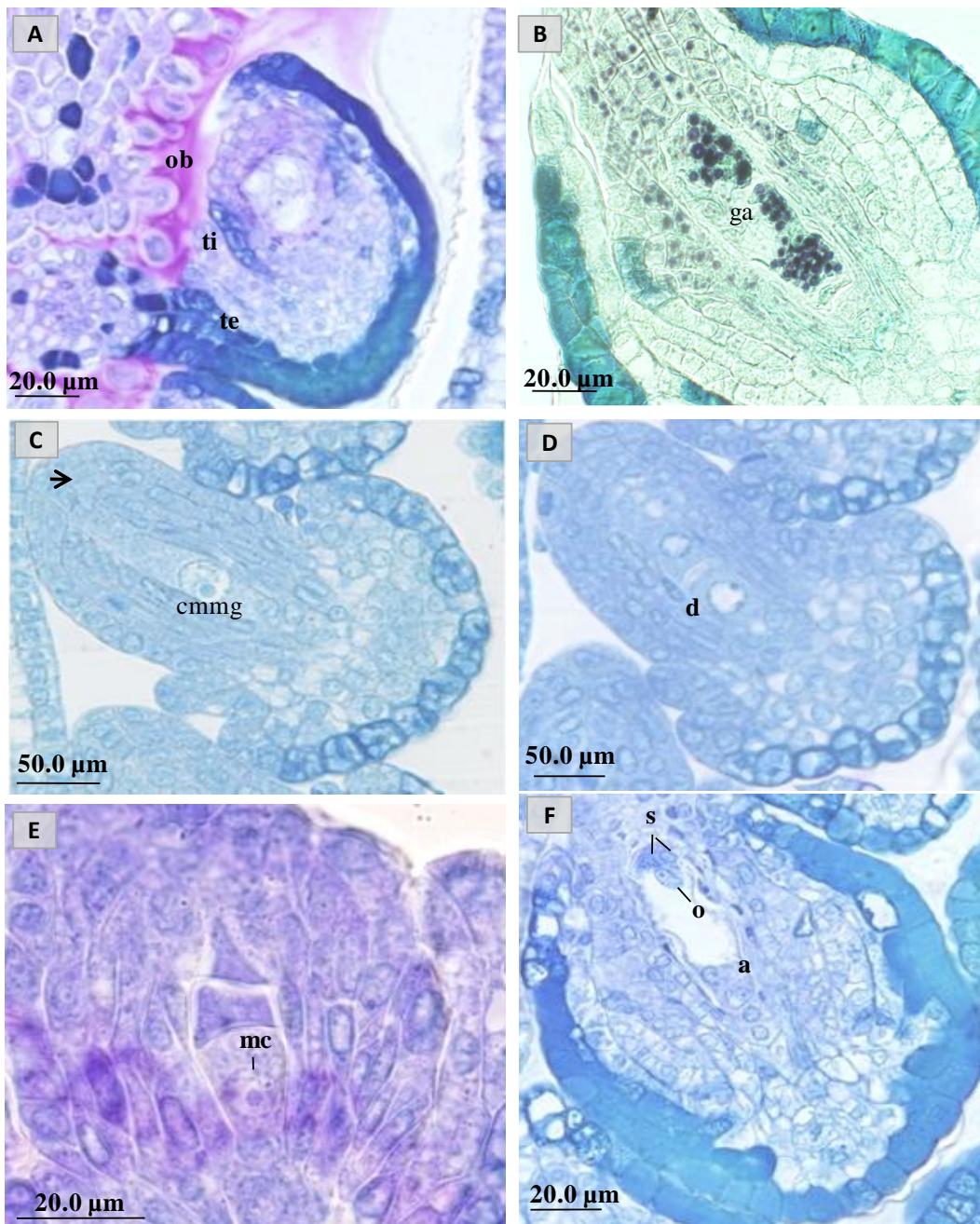
**Figura 1:** Ontogênese da antera de *Inga laurina*. A- Inflorescência em espiga com aproximadamente 70 flores esbranquiçadas com média de 1,3 cm cada. B- Corte transversal da antera de botão floral com 1,5 mm evidenciando contorno bilobado e conectivo já bem desenvolvendo. A antera bitema consiste de uma protoderme que reveste os grupos de células arquesporiais. C- Corte transversal da antera de botão floral com 2,0 mm evidenciando divisões periclinais nas células subepidérmicas (setas). D- Corte transversal da teca da antera de botão floral com 3,0 mm evidenciando divisão periclinal da camada parietal secundária externa (seta) e anticlinal da camada parietal secundária interna (ponta de seta). Observa-se também duas células-mãe de micrósporos em cada esporângio e as células da epiderme achatadas acompanhando o eixo de expansão da antera. E- Detalhe evidenciando a organização da parede da antera caracterizando o desenvolvimento do tipo Dicotiledôneo. Observa-se as células binucleadas do tapete (setas). F- Corte transversal da teca de botão floral com 5,0 mm evidenciando espessamento nas paredes do endotécio em forma de barras. (ca: células arquesporiais; cmmi: célula-mãe de micrósporo; e: epiderme; em: endotécio; cm: camada média; p: protoderme; t: tapete).



**Figura 2:** Ontogênese da políade de *Inga laurina*. A- Corte transversal de um esporângio de botão com 1,5 mm evidenciando célula-mãe de micrósporo. . B-. Corte transversal da antera evidenciando a formação de duas células-mãe de microsporo na região central de cada esporângio. C- Detalhe do esporângio evidenciando a formação de quatro células-mãe de micrósporo.. D- Detalhe do esporângio evidenciando divisões das células-mãe de micrósporo (seta) que resultarão na formação das políades. Observa-se também à calose, em azul claro, envolta dos grãos de pólen E- Detalhe da antera e políade, evidenciando a disposição circular dos grãos de polén, estes envoltos por camada de calose. F- Detalhe da políade evidenciando disposição dos grãos de pólen em quatro grãos centrais e dois laterais, envoltos por camada de calose. Observa-se dentro do grão de polén uma célula maior, a vegetativa, que frequentemente apresenta dois nucléolos (seta), e outra menor, a geradora (a: célula arquesporial; cg: célula geradora; co: conectivo; cv: célula vegetativa).



**Figura 3:** Resultados dos testes histoquímicos e antera madura de *Inga laurina*. A- Corte transversal da teca evidenciando a presença de grãos de amido, corados em preto, nos grãos de polén da políade. B-. Corte transversal da antera evidenciando as células do conectivo e da epiderme próxima a região de abertura, totalmente preenchidas por compostos fenólicos, evidenciados pela coloração enegrecida resultante do teste com sulfato ferroso. C- Corte transversal da antera madura evidenciando a disposição das políades. D- Detalhe da antera evidenciado quatro políades. Observa-se também as células epidérmicas de ambos os lados do sítio de abertura da antera diferenciadas em células estomiais (setas). (co: conectivo; e: epiderme. ga: grãos de amido).



**Figura 4:** Ontogênese do óvulo e do gametófito de *Inga laurina*. A- Corte longitudinal do ovário evidenciando óvulo com placentação sutural marginal, o tecido obturador placentário, os tegumentos externo e interno, a curvatura do óvulo e as células epidérmicas do tegumento externo coradas fortemente em azul de toluidina. B- Detalhe de óvulo de flores em pós antese evidenciando a presença de grãos de amido no nucelô e no gametófito já diferenciado. C- Corte de óvulo evidenciando o arquespório simples, com uma única célula-mãe de megáspero. Observa-se divisão das células arquesporiais primárias subepidérmicas (seta). D- Detalhe do nucelô do óvulo evidenciando a diáde de megáspero. E- Detalhe do nucelô evidenciando o megáspero calazal que se torna funcional. É possível observar também resquícios dos demais megásperos F- Detalhe do óvulo evidenciando o gametófito feminino, organizado com duas sinérgides, uma oosfera e as três antípodas, caracterizando um desenvolvimento do tipo *Polygonum*. (a: antípodas; cmmg: célula-mãe de megáspero; d: diáde de megásperos; ga: grãos de amido; mc: megáspero calazal; o: oosfera; ob: obturador placentário; s: sinérgides; te: tegumento externo; ti: tegumento interno).

**Tabela 1:** Número de inflorescências coletadas, flores isoladas e tamanho médio dessas flores de *Inga laurina*.

Espécie	n inflorescências	n flores	Tamanho médio (cm)
<i>Inga laurina</i>	10	10	1,35± 0,05

**Tabela 2:** Número médio de grãos de pólen por flor, anteras por flor, políades por antera, grãos de pólen por políade, óvulos por flor e razão pólen/óvulo em *Inga laurina*.

Espécie	n	Pólen/ flor	Antera/ flor	Políades/ Antera	Grãos/ Políade	Óvulos/ flor	P/O
<i>Inga laurina</i>	10	4480	35	8	16	10,35 ± 1,03	437,7 ± 42,98

## Referências Bibliográficas

- Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** 141: 399-436.
- Arbeola, A & Herrero, M. 1991. Development of the ovular structures in peach (*Prunus persica*(L.) Batsch). Oxford. **New Phytologist** 4 (118): 527-534.
- Arroyo, M.T.K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (Eds.) **Advances in legume systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew, p.723-769.
- Barros, E.C.O.; Webber, A.C. & Machado, I.C. 2013. Limitação de polinizadores e mecanismos de autoincompatibilidade de ação tardia como causas da baixa formação de frutos em duas espécies simpátricas de *Inga* (Fabaceae – Mimosoideae) na Amazônia Central. **Rodriguésia** 64(1): 37-47.
- Barroso, G.M.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F.; Costa, C.G.; Guimarães, E. F. & Lima, H.C. 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa Imprensa Universitária, Viçosa. 255p.
- Barth, O.M. & Yoneshigue, Y. 1964. Catálogo sistemático dos pólens das plantas arbóreas do Brasil Meridional. V. Leguminosae: Papilionaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 62:95-133. Batygina, T. B. & Vinogradova, G. Y.U. 2007. Phenomenon of Polyembryony. Genetic Heterogeneity of Seeds. **Russian Journal of Developmental Biology** 3(38): 126–151.
- Bernhardt, P.; Kenrick, J. & Knox, R.B. 1984. Pollination biology and the breeding system of *Acacia retinodes* (Leguminosae: Mimosoideae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 71: 17–29.
- Bhandari, N.N. 1984. The microsporangium. In: Johri, B.M (Eds.) **Embryology of Angiosperms**. Springer Verlag, Berlin, p.53-121.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie** 28: 25-30.

- Buril, M.T.; Santos, F.A.R. & Alves, M. 2010. Diversidade polínica das Mimosoideae (Leguminosae) ocorrentes em uma área de caatinga, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 24(1): 53-64.
- Caccavari, M.A. & Dome, E. 2000. An account of morphological and structural characterization of American Mimosoideae pollen. Part I: Tribe Acacieae. **Palynology** 24: 231-248.
- Carmello-Guerreiro, S. M.; Paoli, A. A.S. 1999. Aspectos morfológicos e anatômicos da semente de aroeira (*Myracrodrodon urundeuva* Fr. Allem.-Anacardiaceae), com notas sobre paquicalaza. **Revista Brasileira de Sementes** 21(1): 222-228.
- Carmo-Oliveira, R. 1998. Estudos embriológicos e aspectos da morfologia floral de Vochysiaceae. Departamento de Botânica. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Chappill, J.A. & Maslin, B.R. 1995. A phylogenetic assessment of tribe Acacieae. In: Crisp, M.D & Doyle, J.J. (Eds). **Advances in Legume Systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Corner, E.J.H. 1951. The Leguminous seed. **Phytomorphology** 1: 117-150.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution** 31:32-46.
- Cruz-Neto, O.; Lopes, A.V.F. & Machado, I.C. 2007. Ecologia da Polinização de *Inga striata* (Benth.) (Leguminosae - Mimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 5:570-572.
- Davis, G. L. 1996. **Systematic Embryology of the Angiosperms**. John Wiley & Sons Inc, New York. 528 p.
- Feder N, & O'Brien T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany** 55(1):123-142.
- Fernandes, J.M. 2011. *Ingeae* Benth. (Leguminosae, Mimosoideae) no estado de Minas Gerais, Brasil: Taxonomia, morfoanatomia de nectários extraflorais e padrões de

distribuição geográfica. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Filardil, F.L.R.; Garcia, P.C.F.; Carvalho-Okano, R.M. & Rodrigues, C.M. 2007. Padrões de distribuição geográfica de espécies arbóreas de Leguminosae ocorrentes no Cerrado. **Revista Brasileira de Biociências** 5(2): 1116-1118.

Gerrits, P. O. & Smid, L. 1983 A bew, 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.

Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "Cerrado" vegetation. **Plant Systematics and Evolution** 211:13-29.

Grant, J.E.; Moran, G.F.; Moncur, M.W. 1994. Pollination studies and breeding system in *Acacia mearnsii*. In: Brown, A.G. (Eds.) **Australian tree species research in China**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 165-170p.

Guilherme, F.A.G.; Nakajima, J.N.; Lima, C.A.P. & Vanini, A. 1998. As fitofisionomias e a flora lenhosa nativa do Parque do Sabiá, Uberlândia, MG. **Daphne** 8:17-30.

Guinet, P. & Le Thomas, A. 1973. Interprétation de la répartition dissymétrique des couches de l'exine dans le pollen composés. **Comptes Rendus de L'Academie des Science** 276: 1545-8.

Guinet, P. H. 1981. Comparative account of pollen characters in the Leguminosae. Pp. 789-799. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (Eds.). **Advances in Legume Systematics - part 2**. Kew, Royal Botanic Gardens.

Henderson, J.H.M.; Nitsch, J.P. 1962. Effect of certain phenolic acids on the elongation of *Avena* first internodes in the presence of auxin and ryptophan. **Nature** 195(4843):780-782.

Herrero, M. & Hormaza, J.I. 1996. Pistil strategies controlling pollen tube growth. **Sexual Plant Reproduction** 9:343-347.

Jensen, W.A. **Botanical histochemistry, principles and practice.** San Francisco: Freeman, 1962. 480p.

Johri, B.M & Ambegaokar, K.B. 1984. Embryology: then and now. p. 1-52. In: B.M. Johri (Ed.). **Embryology of Angiosperms.** Berlin, Springer-Verlag.

Johri, B.M.; Ambegaokar, K.B. & Srivastava, P.S. 1992. **Comparative Embryology of Angiosperms.** v.1, 1221p.

Joly, A.B. 1976. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.** Companhia Editora Nacional, São Paulo. 634p.

Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. 1999. **Plant systematics: a phylogenetic approach.** Sinauer, Sunderland. 567p.

Judd, W. S.; Campnell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2009. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 632p.

Kajita, T., Ohashi, H., Tateishi, Y., Bailey, C.D. & Doyle, J.J. 2001. rbcL and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. **Systematic Botany** 26:515-536.

Kearns, C.A. e Inouye, D.W. 1993. **Techniques for pollination biologists.** University Press of Colorado, Colorado. 630 p.

Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell** 5: 1425-1437.

Koptur, S. 1984. Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: breeding systems of neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). **Evolution** 38: 1130-1143..

Kraus, J & Arduin, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Seropédia, Edur. 198 p.

Lersten, N.R & Curtis, J.D. 1988. Secretory reservois (ducts) of two kinds in giant ragweed (*Ambrosia trifida*; Asteraceae). **American Jornal of Botany** 75(9):1313-1323.

- Lewis, G.P. & Elias, T.S. 1981. Mimoseae Brunn. In: Polhill, R. M. & Raven, P. H. (Eds.) **Advances in legume systematic**. Kew, Crown Copyright, 1: 155-68pp.
- Lewis, G.P. 1987. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Gardens, Kew. 369p.
- Lewis, G.P.; Schrire, B.D.; Mackinder, B. & Lock, M. 2005. **Legumes of the World**. The Royal Botanic Garden, Kew. 577p.
- Lima, M.P.M. 1985. Morfologia dos frutos e sementes dos gêneros da tribo Mimoseae (Leguminosae - Mimosoideae), aplicada à sistemática. **Rodriguesia** 37:53-78.
- Luckow, M. & Du Puy, D. 2000. A new species of *Gagnebina* (Leguminosae: Mimosoideae) and their utility for phylogenetic studies. **Systematic Botany** 27:29-40.
- Luckow M.; Miller, J.T.; Murphy, D.J.; Livshultz, T. 2003. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. 197-220pp. In: Klitgaard, B.B. & Bruneau, A. (Eds.) **Advances in Legume Systematics**, Part 10, Higher Level Systematics, Royal Botanical Gardens, Kew. 197-220p.
- Maheshwari, P. 1950. **An introduction to the embryology of Angiosperms**. New York: McGraw-Hill Book Company. 468p.
- Maheshwari, P. 1963. **Recent advances in the embryology of angiosperms**. Catholic Press, Ranchi. 467p.
- Manning, J.C. 1996. Diversity of endothelial patterns in the angiosperms. In: D'Arcy, W. G., & Keating, R. C. (Eds.) **The Anther, Form, Function and Phylogeny**. Cambridge: Cambridge University Press. 136–158pp.
- Mariath, J.E.A.; Santos, R.P. & Bitterncourt-Junior, N.S. 2006. Flor. In: Apuzzato-d Gloria, B.; Carmello-Guerreiro, S. M. (Eds.) **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV. 438 p.
- Martins-da-Silva, R.C.V; Silva, A.S.L; Fernandes, M.M. & Margalho, L.F. 2014. **Noções Morfológicas e Taxonômicas para Identificação Botânica**. Embrapa, Brasília, DF. 111p.

Mendes-Rodrigues, C. 2010. Ecologia de espécies poliembriônicas com ênfase no Bioma Cerrado. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG.

Mendes-Rodrigues, C.; Carmo-Oliveira, R.; Talavera, S.; Arista, M.; Ortiz, P.L. & Oliveira, P.E. 2005. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae-Bombacoideae). **Plant Biology** 7(5): 533-540.

Newman, I.V. 1933. Studies in the australian acacias. III. Supplementary observations on the habit, carpel, spore production and chromosomes of *Acacia baileyana* F.V.M. **Proceedings of the Linnean Society** 59: 237–251.

Niezgoda, C.J.; Feuer, S.M. & Nevling, L.I. 1983. Pollen ultrastructure of the tribe *Ingeae* (Mimosoideae: Leguminosae). **American Journal of Botany** 70: 650-667.

O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O Protoplasma** 59: 368-373.

Oliveira, D.M.T & Beltrati, C.M. 1993. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento de *Inga fagifolia* Willd. (Fabaceae: Mimosoideae). **Revista Brasileira de Biologia** 53(4): 625-636.

Oliveira, D.M.T & Beltrati, C.M. 1994. Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de *Inga fagifolia* Willd. (Fabaceae: Mimosoideae). **Revista Brasileira de Biologia**. 54:91-100.

Owens, S.J. & Stirton, C.H. 1989. Pollen, stigma and style interactions in the leguminosae. In: Stirton, C.H. & Zarucchi, J.L. (Eds.) **Advances in legume biology**. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, St Louis. 105–112pp.

Palser, B. F. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: Embryology. **Annual Missouri Botanic Garden** 62:620-646.

Pancini, E. & Franchi, G.G. 1997. Some cytological, ecological and evolutionary aspects of pollination. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 65(1-2): 11-16p.

- Pate, J.S. & Kuo, J. 1981. Anatomical studies of legume pods - a possible tool in taxonomic research. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (Eds.) **Advances in legume systematics**. Part 2.Crown Copyright, Kew, 903-912pp.
- Pennington, T.D. 1997. **The genus Inga**. The Royal Botanic Garden. Kew. 839p.
- Pereira-Junior, E. J. 2011. Ontogenia do óvulo e da antera de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, São José do Rio Preto, SP.
- Planchno, B.J. & Swiatek, P. 2009. Functional anatomy of the ovule in *Genlisea* with marks on ovule evolution in Lentibulariaceae. **Protoplasma** 236(1-4): 39-48.
- Rutshauser, A. 1982. **Introducción a La Embriología y Biología de La Reproducción de las Angiospermas**. Editora Hemisfério Sur. 185p.
- Santos, R.P; Mariaht, J.E.A, Hesse, M. 2003. Pollenkitt formation in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). **Plant Systematics and Evolution** 237(3): 185-198.
- Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **Licenciamento Ambiental Praia Clube S/C**. Uberlândia, 2008. 17p. Relatório.
- Seijo, G. & Neffa, V. G. S. 2004. The cytological origin of the polyads and their significance in the reproductive biology of *Mimosa bimucronata*. **Botanical Journal of the Linnean Society** 144: 343-349.
- Shivaramiah, G. 1998. Endosperm development in Bignoniaceae. **Phytomorphology** 48:45-50.
- Silva-Souza, D.A.; Lenzi, M. & Orth, A.I. 2004. Contribuição à ecologia de polinização de *Tabebuia pulcherrima* (Bignoniaceae) em área de restinga, no sul de Santa Catarina. **Biotemas** 17(2): 47-66.
- Simpson, M.G. 2006. **Plant Systematics**. Elsevier, Amsterdam. 579p.
- Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson, A.; Stevenson, D.W. & Heald, S.V. 2004. Flowering Plants of the Neotropics. **New York Botanical Garden** 151-156.
- Sorsa, P. 1969. Pollen morphological studies on the Mimosaceae. **Annales Botanici Fennici** 6: 1-34.

- Souza, E. R. 2007. Estudos filogenéticos na tribo *Ingeae* (Leguminosae: Mimosoideae) com ênfase em *Calliandra* Benth. e gêneros afins. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.
- Souza, J. S. Bastos, M. N. C & Gurgel, E. S. C. 2011. O gênero *Inga* (Leguminosae-Mimosoideae) na Província Petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas, Brasil. **Rodriguésia** 62(2): 283-297.
- Souza, J.G. & Silva, J.V. 1992. Partição de assimilados no algodoeiro e o crescimento do fruto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 27(9): 1303-1309.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2012. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. 3ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 768p.
- Teppner, H. 2007. Polyad development and karyology in *Inga* and *Calliandra* (Mimosaceae-Ingeae): a reply to a recent paper in Flora. **Phyton Annales Rei Botanicae**. 47:1-46.
- Tilton, V.R & Horner, H.T. 1980. Stigma, style and obturator of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in reproductive process. **American Jornal of Botanic** 67: 1113-1131.
- Vieira, A. B. 2008. Variações morfométricas e anatômicas nas folhas de *Mapronea* Aubl. (Euphorbiaceae) em ambientes de Cerrado (*sensu stricto*) e floresta estacional semideciduall. Uberlândia. **Monografia**. Universidade Federal de Uberlândia.
- Watson, L.; Dallwitz, M. J. 1992. **The Families of Flowering Plants**: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>. (Acesso em: 20/01/2015).
- Wojciechowski, M.F.; Lavin, M. & Sanderson, M.J. 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany** 91(11): 1846-1862.

**Capítulo II<sup>1</sup>****Sistema reprodutivo em *Inga laurina* (Sw.) Willd.****(Fabaceae - Mimosoideae)**

---

<sup>1</sup> Texto formatado de acordo com as diretrizes da revista Acta Botanica Brasilica.

Sistema reprodutivo em *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fabaceae- Mimosoideae)

Sistema reprodutivo em *Inga laurina*

Nayara Augusto Vieira de Araújo<sup>2</sup>

Renata Carmo de Oliveira<sup>2,3</sup>

---

<sup>2</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia, Rua Ceará s/n, Bloco 2D, Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Autor para correspondência: carmooliveira@ufu.br

**RESUMO:** (Sistema reprodutivo em *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fabaceae-Mimosoideae)). Nas angiospermas a reprodução sexuada depende do transporte de polén por vetores comumente bióticos. As características florais influenciam o fluxo de pólen na polinização, e muitas espécies apresentam sistemas de autoincompatibilidade para evitar ou reduzir a autofertilidade e posterior formação de frutos com sementes viáveis. No sistema de autoincompatibilidade de ação tardia, observado em algumas espécies de *Inga*, o grão de pólen germina e o tubo polínico cresce ao longo do estilete podendo penetrar e realizar a dupla fecundação, porém, o aborto desse pistilo ocorre pouco tempo após a autopolinização. A presença de fenômenos como a poliploidia e a poliembrionia podem induzir a quebra desses sistemas de autoincompatibilidade, permitindo a formação de frutos autopolinizados. *Inga laurina*, objeto desse estudo, é uma espécie poliplóide e apresenta elevada taxa de sementes poliembrionicas. Diante disso, o objetivo deste estudo foi verificar o sistema reprodutivo da espécie contribuindo assim, para os conhecimentos quanto a sua reprodução. O estudo foi realizado na área urbana de Uberlândia, MG, Brasil. Foram realizados tratamentos de polinização controlada, e algumas das flores tratadas foram coletadas para evidenciar o desenvolvimento dos tubos polínicos. As flores de *I. laurina* são pequenas, estão reunidas em inflorescências com numerosos estames. A análise dos pistilos em microscopia de fluorescência permitiu observar tubos polínicos germinando e crescendo 24 horas após os tratamentos no estilete de flores de polinização aberta, autopolinização manual e polinização cruzada. A penetração dos óvulos ocorreu 24 horas após antese no controle e em polinização cruzada, já em autopolinização manual, a penetração ocorreu apenas após 48 horas. Pistilos de polinização cruzada e autopolinização espontânea formaram frutos que atingiram a maturidade e sementes viáveis, indicando autofertilidade na espécie. Estes resultados sugerem que *I. laurina*, uma espécie poliploide e que apresenta poliembrionia adventícia, seja também uma espécie apomítica, semelhante ao verificado em outras espécies apomíticas esporofíticas, e se contrapõem aos resultados para espécies congenéricas autoincompatíveis. Este parece ser um caminho evolutivamente mais vantajoso, pois se essas espécies fossem autoestéreis não poderiam usufruir das vantagens da apomixia no caso de precariedade de polinizadores, populações pequenas ou geneticamente empobrecidas.

**Palavras chave:** Apomixia, *Inga* e poliembrionia.

**ABSTRACT:** (System reproductive in *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae – Mimosoideae)). In angiosperms sexual reproduction depends on the transport of pollen by commonly biotic vectors. The floral characteristics influence pollen flow in pollination, and many species have self-incompatibility systems to prevent or reduce the autofertilidade and subsequent formation of fruits with viable seeds. In the late-acting self-incompatibility mechanism, observed in some species of *Inga*, the pollen grain germinates and the pollen tube grows along the stylus may enter and perform the double fertilization, however, that abortion pistil occurs shortly after self-pollination. The presence of phenomena such as polyploidy and polyembryony can induce the self-incompatibility of these systems, allowing the formation of fruit of self-pollination. *Inga laurina*, object of this study, is a polyploid species and has a high rate of polyembryonic. Thus, the aim of this study was to evaluate the reproductive system of the species thus contributing to the knowledge about reproduction. The study was carried out at an urban area in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Controlled pollination treatments were used, and some of the treated flowers were collected to evidence the development of pollen studies. *I. laurina* flowers are small, are gathered in inflorescences with numerous stamens. The analysis of the pistils in fluorescence microscopy allowed to observe pollen tubes germinating and growing 24 hours after the treatments in the style of open-pollinated control flowers, self and cross-pollination. The penetration of the ovule 24 hours after anthesis occurred in control and cross-pollination, in self-pollination, the penetration occurred only after 48 hours. Pistils of cross-pollination and spontaneous self-pollination fructification, which have reached maturity and viable seeds, indicating self-fertility in this species. These results suggest that *I. laurina*, a polyploid species that has polyembryony adventitia, is also an apomictic species, similar to that seen in other sporophytic apomictic species and the results are opposed to self-compatible congeneric species. This seems like a way more evolutionarily advantageous because if those species were self-incompatible could not take advantage of apomixis of benefits if precariousness of pollinators, small populations or genetically impoverished.

**Key words:** Apomixis, *Inga* and polyembryony.

## Introdução

Nas Angiospermas a reprodução sexuada depende do transporte de polén por vetores comumente bióticos, como insetos e outros grupos de animais (Raven *et al* 2001). Apesar das características florais influenciarem no fluxo de pólen e na qualidade da polinização, muitas espécies vão apresentar mecanismos fisiológicos que permitem evitar ou reduzir a autopolinização (Richards 1986, Tabla & Bullock 2002). Este conjunto de mecanismos é parte do sistema reprodutivo da planta e são chamados de sistemas de autoincompatibilidade (Arroyo 1981; Gibbs 1990; Oliveira e Marayuma 2014; Gibbs 2014).

A família Leguminosae (Fabaceae) compreende aproximadamente 727 gêneros, 19.325 espécies (Lewis *et al.* 2005) e comumente é dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Papilioideae (Faboideae) e Mimosoideae, distintas principalmente pela morfologia floral (Lewis 1987; Judd *et al.* 1999; Smith *et al.* 2004; Simpson 2006). A autoincompatibilidade dentro das Leguminosae é mais frequente em espécies arbóreas e com grande número de flores (Arroyo 1981). Para a mesma autora, tal fenômeno surgiu em resposta a geitonogamia excessiva.

Os sistemas de autoincompatibilidade (SI) são mecanismos controlados geneticamente que têm como objetivo evitar o processo de autofecundação (Seavey & Bawa 1986, Gibbs 2014; Oliveira e Marayuma 2014). Normalmente 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, impedindo sua germinação e crescimento (Richards 1986; Nettancourt 1997; Gibbs 2014; Oliveira & Marayuma 2014).

No sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI), o grão de pólen germina e o tubo polínico cresce ao longo do estilete, atingindo o ovário, podendo

penetrar os óvulos e realizar a dupla fecundação (Richards 1986; Allen & Hiscock 2008; Gibbs 2014; Oliveira & Marayuma 2014), porém, o aborto do pistilo autopolinizado ocorre pouco tempo após a autopolinização (Seavey & Bawa 1986; Richards 1986). Neste sistema, também o reconhecimento e a rejeição do material genético do pólen parecem ser controlados geneticamente no óvulo (Gibbs & Bianchi 1999; Gibbs 2014).

Dentre as espécies da tribo *Ingeae* (Mimosoideae), muitas do gênero *Inga* são autoincompatíveis (Koptur 1984, Cruz-Neto *et al.* 2007, Barros *et al.* 2013). A partir de polinizações controladas e do crescimento de tubos polínicos em espécies do gênero *Inga* de regiões neotropicais, os autores constataram que embora os tubos polínicos provenientes de autopolinizações penetrem na micrópila dos óvulos, esses são abortados posteriormente (Koptur 1984, Cruz-Neto *et al.* 2007, Barros *et al.* 2013).

O gênero *Inga* Miller (Leguminosae - Mimosoideae) possui cerca de 300 espécies, com distribuição neotropical (Pennington 1997; Lorenzi 1998) e corresponde a aproximadamente 1,7% das leguminosas (Pennington 1997; Lorenzi 1998). Muitas espécies de *Inga* apresentam flores com numerosos estames reunidas em inflorescências do tipo espiga (Koptur 1983; Cruz-Neto *et al.* 2007).

Considerando que a maioria das espécies do gênero, até o momento estudadas, são autoincompatíveis, Koptur (1984) considerou que um bom polinizador para *Inga* é aquele com tamanho grande o suficiente para tocar os verticilos reprodutivos enquanto coleta néctar, e que apresente comportamento de forrageio e tendência de se locomover entre árvores diferentes. Cruz-Neto *et al.* (2007) e Amorim (2012) registraram visitas por esfingídeos e morcegos durante a noite, bem como beija-flores durante o dia em espécies do gênero *Inga*. Johnson & Steiner (2000) verificaram que espécies com

síndromes de esfingofilia ou quiropterofilia ocupam posição extrema no espectro de especialização-generalização no sistema planta-polinizador.

A presença de polinizadores mais eficientes que garantam a polinização cruzada e todo um controle genético impedindo a ocorrência do processo da autofecundação podem garantir fluxo de pólen e alogamia. Por outro lado, fenômenos como a multiplicação cromossômica, poliploidia, pode induzir a quebra desse sistema de autoincompatibilidade (Richards 1986; Igic *et al.* 2008, Husband *et al.* 2008). Estudos mostraram que em espécies nas quais ocorre a poliploidia, o grão de pólen parece não expressar o fenótipo que provoca sua rejeição no pistilo, podendo ocorrer germinação em direção ao óvulo e autofecundação (Richards 1986).

A poliploidia, em algumas espécies, pode ainda estar associada ao fenômeno da apomixia (Whitton *et al.* 2008; Hörandl 2010). A apomixia, por sua vez está usualmente relacionada com a formação de embriões adventícios (Asker & Jerling 1992; Koltunow 1993; Whitton *et al.* 2008). A formação de embriões clonais podem se dar a partir de células do gametófito feminino ou então do tecido somático do óvulo, como do nucelo e/ou dos tegumentos (Koltunow 1993; Whitton *et al.* 2008). Para algumas espécies a formação de embriões somáticos depende da polinização e fecundação do óvulo, com a formação do zigoto e endosperma que irá nutrir os embriões adventícios e sexuados durante seu desenvolvimento. Estas espécies são denominadas de pseudogânicas, ou seja, necessitam da polinização e da fecundação (Richards 2003; Whitton *et al.* 2008; Hörandl 2010).

Estudos em Bignoniaceae revelaram que as espécies poliploides estudadas são autoférteis e apresentaram apomixia esporofítica, a qual resulta em elevadas taxas de sementes poliembrionicas (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010; Firetti-

Leggieri *et al.* 2013; Sampaio *et al.* 2013), revelando que pode haver uma associação entre tais fenômenos.

Análises citotaxonômicas realizadas em espécies de *Inga* no nordeste brasileiro confirmaram a ocorrência da poliploidia, verificada inicialmente por Hanson (1995). Enquanto o número cromossômico básico de *Inga* é  $n=13$ , os estudos encontraram números bem mais altos, até  $2n=52$  em *Inga laurina* Sw. (Willd), o que caracteriza a espécie como poliploide (Mata 2009). Hanson (1995) estudou 17 espécies do gênero *Inga* e verificou que 15 destas eram diplóides com  $2n=26$  e duas tetraplóides, incluindo *Inga laurina*.

*Inga laurina* é uma espécie poliplóide (Mata 2009) e apresenta elevada taxa de sementes poliembriônicas (Mendes-Rodrigues *et al.* 2007). Além disso, análises histológicas revelaram a presença de embriões originados a partir do nucelo (Araújo & Carmo-Olivera, dados não publicados), indicando a presença da apomixia esporofítica. Diante disso, o objetivo deste estudo é verificar o sistema reprodutivo da espécie contribuindo assim, para os conhecimentos da reprodução da espécie, da família Fabaceae e de plantas arbóreas do bioma Cerrado.

## **Material e Métodos**

O estudo foi realizado nos anos de 2013 e 2014 e o material botânico foi coletado de cinco indivíduos situados no Praia Clube de Uberlândia. O clube possui aproximadamente 300 mil m<sup>2</sup> de extensão, localizado às margens do Rio Uberabinha entre as coordenadas 18°93'45" S – 48°29'15" W e encontra-se numa altitude aproximada de 775,29 m (Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável 2008). O fragmento de vegetação neste corresponde a uma área de mata ciliar, com aproximadamente 78 mil m<sup>2</sup>, composta por 95 espécies vegetais sendo 15

nativas do bioma Cerrado (Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável 2008), dentre estas a espécie *Inga laurina*. A mata ciliar apresenta remanescentes alterados, empregada nas áreas marginais ao leito do rio Uberabinha (Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável 2008). O clima da região é tipo Aw Megatérmico de acordo com a classificação de Köppen, e apresenta duas estações bem definidas, o verão é quente e chuvoso e o inverno é frio e seco (Vieira 2008).

Para o estudo do sistema reprodutivo foram realizados tratamentos de polinizações controladas em cinco indivíduos. 85 inflorescências em pré-antese foram ensacadas com sacos de organza para evitar o contato com possíveis visitantes florais. Em flores de primeiro dia 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). Para cada tratamento foram isoladas 25 inflorescências. 10 inflorescências em pré antese foram ensacadas para verificar a ocorrência de autopolinização espontânea. Para registrar a eficiência da polinização natural, 25 inflorescências em pré-antese foram marcadas e não ensacadas (controle). As flores utilizadas nos tratamentos de polinização experimental foram acompanhadas e coletadas até a maturação do fruto ou a queda da corola.

As flores dos tratamentos de polinização foram coletadas com 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a realização dos tratamentos. Os pistilos dessas flores foram isolados com auxilio de pinças e esteromicroscópio e colocados em placas de petri com NaOH 8N e, posteriormente, em estufa a 25 °C por 15 minutos. Os pistilos foram lavados com água destilada por três vezes e mantidos na água até a sua transferência para uma lâmina com uma gota de solução de azul de anilina 0,1% em K3PO4 (0,1M) (Martin 1959). As

lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX40 e fotografadas com auxílio de câmera digital Olympus DP70.

Os frutos formados a partir dos tratamentos realizados foram marcados com auxílio de fitas coloridas e observados até a maturação. Nesta fase, estes foram medidos e suas sementes isoladas com auxílio de lâminas de aço.

O material botânico testemunho foi depositado no *Herbárium* Uberlandense (HUFU), do Instituto de Biologia, UFU – Uberlândia, sob o número de registro HUFU – com número de registro 60.327.

## Resultados

*Inga laurina* apresenta inflorescência em espiga com aproximadamente 70 flores esbranquiçadas, e cada uma destas com cerca de  $1,35 \pm 0,05$  cm de comprimento (Figura 1.A). As flores são perfeitas com androceu formado por cerca de 35 estames com anteras bitecas localizadas na porção terminal do filete e com deiscência longitudinal e grãos de pólen reunidos em políades (Figura 1.B). O gineceu é unicarpelar, unilocular e ovário apresenta cerca de 10 óvulos dispostos em fileira. As primeiras flores a abrirem são as da base da inflorescência, seguidas das flores do ápice. A antese se inicia por volta das 12 horas finalizando por volta das 14 horas, com todas as flores abertas. Os frutos são do tipo legume, com sementes poliembriônicas envoltas por uma sarcotesta (Figura 1.C).

Observou-se que a conversão de flores em frutos é pequena e, 72 horas após antese, muitos pistilos caem. Abelhas e insetos foram observados visitando as flores principalmente por volta das 15 horas, logo após a sua abertura.

A análise dos pistilos em microscopia de fluorescência permitiu observar tubos polínicos germinando e crescendo no estilete de flores de polinização aberta (controle)

(Figura 1.D-E), autopolinização manual (Figura 1.F) e polinização cruzada (Figura 1.G). Tubos polínicos de polinização cruzada e autopolinização manual apresentaram crescimento semelhante.

Tanto em flores de polinizações aberta (controle) e flores de polinização cruzada observou-se a presença de uma políade por estigma com grãos de pólen germinando 24 horas após a antese (Figuras 1.E e 1.G). As análises dos pistilos dessas flores em fluorescência revelaram o crescimento e a chegada dos tubos polínicos ao ovário e a penetração destes nos óvulos 24 horas após antese (detalhe Figura 1.E) As análises dos pistilos autopolinizados, vistos sob fluorescência revelaram o crescimento e a chegada dos tubos polínicos ao ovário 24 horas após antese, mas a penetração destes nos óvulos ocorreu apenas 48 horas após a antese.

Em 24 horas após a polinização, os pistilos provenientes de polinização aberta e polinização cruzada apresentaram mais óvulos penetrados do que pistilos de autopolinização. Em 48 horas após a polinização este resultado também se manteve, porém, houve maior número de óvulos penetrados em pistilos oriundos de polinização aberta. Nos pistilos de tratamento de autopolinização manual foram observados óvulos penetrados somente 48 horas após a polinização e com 72 horas após o tratamento estes caíram. Em algumas flores não foi possível observar políades depositadas no estigma.

Os tratamentos foram acompanhados até o desenvolvimento dos frutos, 105 dias após as polinizações (Tabela 1). A partir das 25 inflorescências marcadas para polinizações abertas, observou-se a formação de oito frutos maduros (Figura 2.A) com tamanho médio de 5,5 cm, assimétricos, com poucas sementes e as sarcotestas que as envolvem tiveram seu desenvolvimento comprometido devido à presença de galhas (Figuras 2.B e D).

Das 25 inflorescências manipuladas para o tratamento de polinização cruzada observou-se a formação de cinco frutos maduros (Figura 2.A) com tamanho médio de 3,3 cm, assimétricos e com poucas e pequenas sementes. Nestes frutos também se verificou que a sarcotesta teve seu desenvolvimento comprometido devido à presença de galhas (Figura 2.C).

As 10 inflorescências isoladas para verificar a ocorrência de autopolinização espontânea foram mantidas ensacadas até que os frutos estivessem maduros (Figura 2.A). Estes tiveram tamanho médio de 7,4 cm, simétricos, com maior número de sementes quando comparado aos frutos dos outros tratamentos. Estas apresentavam sarcotesta sadia e bem desenvolvida (Figura 2.D).

## Discussão

A ocorrência de flores com abertura em tempo variado, tanto no mesmo indivíduo quanto numa mesma inflorescência, também foi verificada em outras espécies de *Inga* (Koptur 1984) e de *Acacia* (Tybirk 1997). Essa característica pode aumentar as chances de polinização durante o dia (Koptur 1984), especialmente em espécies em que há um fluxo restrito de pólen, ‘pollen limitation’ (Horvitz & Schemske 1988; Amorim 2012), devido à escassez de polinizadores, como ocorre em espécies de *Inga* (Koptur 1984; Cruz-Neto *et al.* 2007).

A unificação do pólen em políades maximiza a eficiência de coleta transporte (e coleta) pelos visitantes (Koptur 1983), como observado em *Acacia mearnsii* Willd. (Stiehl-Alves & Martins 2008) e em *Piptadenia moniliformis* Benth (Amorim 2012). Isso torna as espécies de Mimosoideae interessantes para estudos de diferentes aspectos relacionados à biologia reprodutiva de leguminosas (Amorim 2012).

Pistilos de polinização cruzada e autopolinização espontânea formaram frutos que atingiram a maturidade e sementes viáveis, indicando autofertilidade na espécie. Como *Inga laurina* é poliploide e apresenta poliembrionia adventícia, estes resultados são semelhantes aqueles encontrados para espécies apomíticas esporofíticas como *Handroanthus serratifolius*, *H. chrysotrichus* e *H. ochraceus* (Bittencourt & Semir 2005; Bittencourt & Moraes 2010), e se contrapõem aos resultados para espécies congenéricas autoincompatíveis como *Inga vera*, *Inga striata* e *Inga ingoides* (Cruz-Neto *et al.* 2007).

Os frutos formados a partir de flores dos experimentos de autopolinização espontânea eram mais vistosos, maiores e sem a presença de insetos galhadores. O sucesso no desenvolvimento desses frutos pode ser explicado pelo fato destes terem sido mantidos ensacados desde o período de pré antese das flores, evitando o contato com agentes externos. Talvez esta exposição e, eventualmente, falhas durante a manipulação possam explicar a ausência de frutos nas inflorescências submetidas à autopolinização manual. As flores de *Inga laurina* são pequenas e encontram em grande número em uma única inflorescência (Cruz-Neto *et al.* 2007), dificultando as manipulações experimentais e, ao mesmo tempo, atraindo predadores.

A formação de frutos nos tratamentos citados anteriormente sugere que *Inga laurina* seja uma espécie autocompatível. Sabe-se que a poliploidia está associada à quebra dos mecanismos de autoincompatibilidade (Nettancourt 1977; Richards 1986), permitindo, assim, a formação de frutos oriundos dos tratamentos de autopolinização. Nas espécies poliploidas o grão de pólen pode não expressar o fenótipo que provocaria a sua rejeição, permitindo o crescimento dos tubos polínicos de autopolinizações (Richards 1986) e a formação de frutos. Num certo sentido, isto poderia ser facilitado pela autoincompatibilidade de ação tardia, comum no gênero *Inga* (Amorim *et al.*

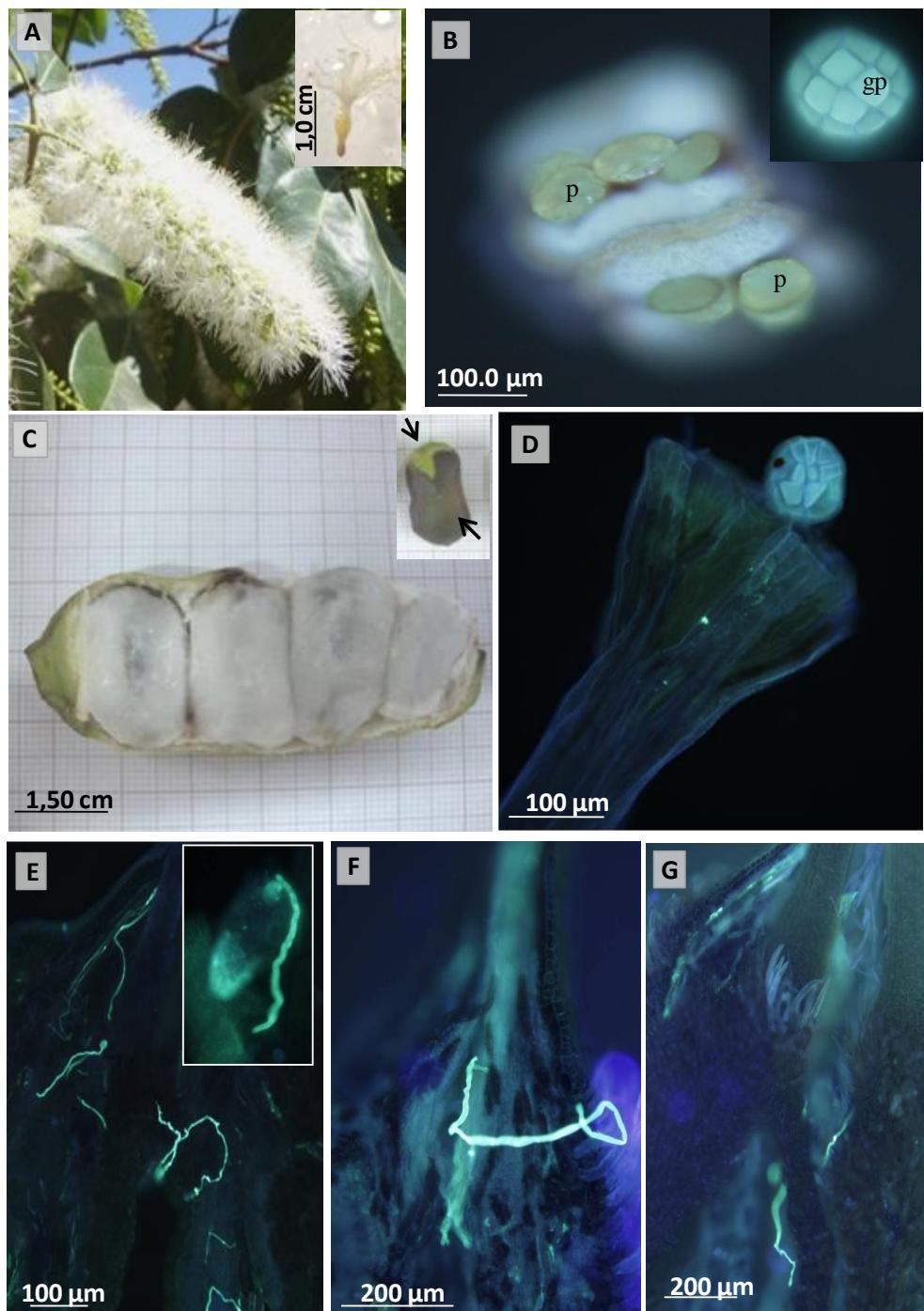
2012). Nestas espécies os tubos polínicos se desenvolvem até os óvulos, independentemente do tipo de polinização, e a reação de incompatibilidade ocorre comumente após a fertilização, com restrições ao desenvolvimento dos pistilos autopolinizados (Gibbs 2014, Sampaio *et al.* 2010).

Outra hipótese que explicaria a quebra da autoincompatibilidade seria presença dos embriões adventícios. Estes podem ser responsáveis por permitir o desenvolvimento de pistilos autopolinizados, uma vez que os embriões adventícios compensariam as restrições ao desenvolvimento de embriões sexuados impostas pelos mecanismos de autoincompatibilidade tardia (Oliveira *et al.* 1992; Bittencourt & Semir 2005; 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).

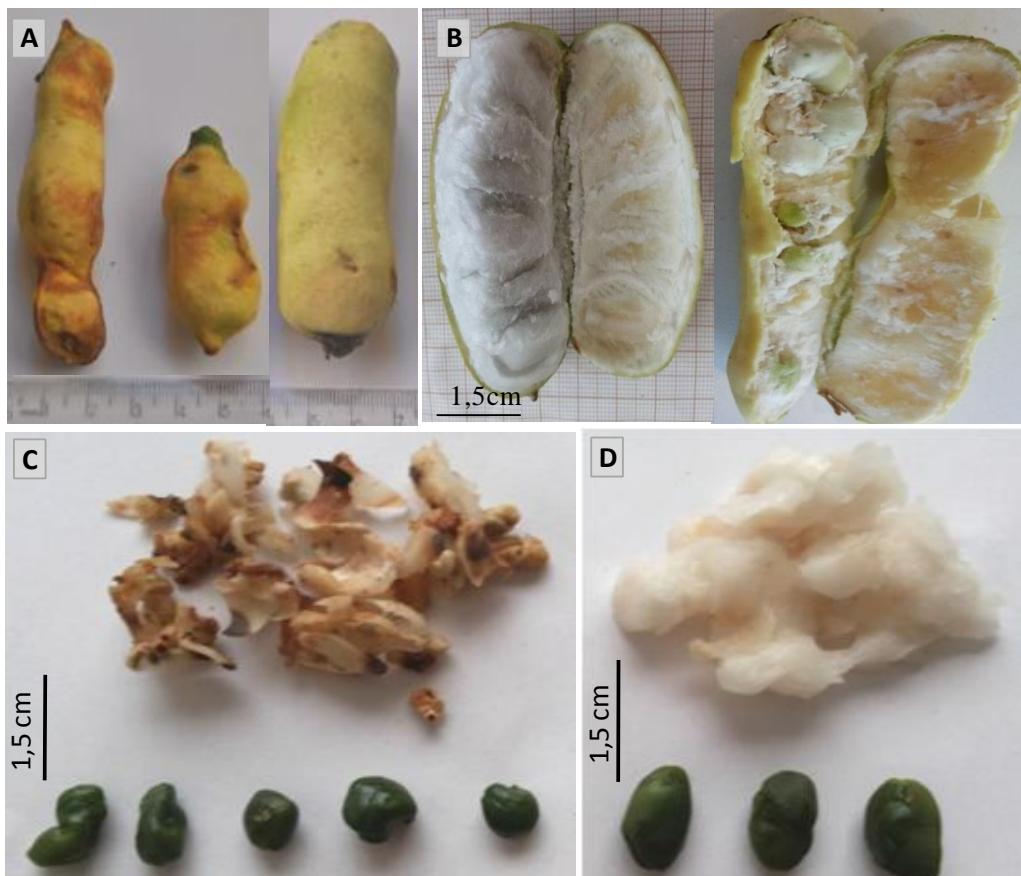
Espécies poliploides de Bignoniaceae investigadas até o momento quanto ao sistema reprodutivo foram consideradas autoférteis (Bittencourt & Moraes 2010, Sampaio *et al.* 2013a), com exceção de *Handroanthus serratifolius* (Alves *et al.* 2013). Além disso, todas as espécies poliploides e autoférteis estudadas apresentam apomixia esporofítica, a qual resulta em elevadas taxas de sementes poliembrionícas (Costa *et al.* 2004; Bittencourt & Moraes 2010; Firetti-Leggieri *et al.* 2013; Sampaio *et al.* 2013b), como observado em *Inga laurina*.

A autofertilidade, a poliploidia e presença da poliembrionia adventícia com embriões formados a partir do tecido somático do óvulo (nucelo), corroboram o encontrado para outras espécies poliplóides e poliembrionícas (Koltunow 1993; Mendes-Rodrigues *et al.* 2007). Estes dados confirmam a possibilidade de correlação entre a ampla distribuição geográfica, poliploidia e apomixia (Mendes-Rodrigues 2010).

Assim, sugere-se que *Inga laurina*, espécie poliploide e com alto índice de poliembrionia, seja também uma espécie pseudogâmica e apomítica esporofítica, corroborando as análises histológicas quanto à origem nucelar dos embriões supranumerários (Araujo & Carmo-Oliveira, dados não publicados). A correlação entre os fenômenos citados anteriormente parece ser um caminho evolutivamente mais vantajoso, pois se essas espécies fossem autoestéreis não poderiam usufruir das vantagens da apomixia no caso de precariedade de polinizadores, populações pequenas ou geneticamente empobrecidas (Hörandl 2010).



**Figura 1:** Inflorescência, antera, políade e fruto de *Inga laurina*. Germinação e crescimento do tubo polínico. A- Inflorescência com aproximadamente 70 flores esbranquiçadas com média de 1,3 cm cada. B- Foto da antera em fluorescência, evidenciando as quatro políades por teca e detalhe dos grãos de pólen da políade madura. C- Fruto aberto evidenciando as sementes recobertas pela sarcotesta e em detalhe sementes isoladas evidenciando os vários embriões. (setas).D- Foto evidenciando políade germinando em estigma de flor mantida como controle (polinização aberta) 24 horas após antese. E- Tubos polínicos crescendo em direção aos óvulos 24 horas após antese de flores de polinização aberta, evidenciados pela fluorescência. Em detalhe o tubo polínico penetrando óvulo 48 horas após antese. F Tubo polínico no ovário de flor de autopolinização manual 24 horas após o tratamento. G- Tubo polínico no ovário de flor de polinização cruzada 24 horas após o tratamento. (gp: grão de pólen; p: políade)



**Figura 2:** Frutos e sementes de *Inga laurina*. A- Frutos formados a partir dos tratamentos de polinização controlada. O primeiro, a esquerda, foi resultado de polinização aberta (controle). Observa-se que este apresenta tamanho irregular e com pequenos pontos escuros resultado da perfuração do ovopositor do galhador. O segundo fruto, do meio, foi resultado de polinização cruzada. Este apresenta tamanho reduzido e as cicatrizes (pontos escuros) da perfuração do ovopositor do galhador. O ultimo fruto, da direita, foi resultado de autopolinização espontânea. Este é maior que os demais , simétrico e não foram observadas cicatrizes das perfurações do ovopositor do galhador. B- Fruto aberto da esquerda: resultado da autopolinização espontânea. Evidencia-se sementes grandes recobertas por sarcotesta sadia. Fruto aberto da direita: resultado da polinização aberta. Evidencia-se sementes pequenas recobertas por sarcotesta com desenvolvimento afetado pela presença do galhador. C- Sarcotestas isoladas de sementes de frutos galhados, evidenciando coloração escura e o comprometimento do seu desenvolvimento, e também o tamanho reduzido das amêndoas. D- Sarcotestas isoladas de sementes de frutos sadios, com coloração mais clara e amêndoas maiores.

**Tabela 1:** Dados referentes aos resultados dos tratamentos de polinização.

Tratamento de polinização	Número inflorescências (~70 flores cd)	Número de frutos maduros	Número de sementes formadas	Sementes poliembrionicas	Sementes monoembrionicas
Polinização cruzada	25	5	12	75%	25%
Autopolinização manual	25	0	0	0	0
Autopolinização espontânea	10	7	35	83%	17%
<b>Controle</b>	<b>25</b>	<b>8</b>	<b>28</b>	<b>78%</b>	<b>22%</b>

## Referências Bibliográficas

- Allen, A.M. & Hiscok, S.J. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In: Franklin-Tong, V.E. (Eds): **Self-incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity and Mechanisms**. Springer-Verlag, Berlin.
- Alves, M.F. 2013. Populações hexaplóides e apomíticas de *Handroanthus serratifolius* (Vahl.) Grose (Bignoniaceae) com diferentes sistemas reprodutivos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Amorim, F.W. 2012. A flora esfingófila de uma floresta ombrófila densa Montana no sudeste Brasileiro e relações mutualísticas com a fauna de Sphingidae. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Amorim, F.W.; Galetto, M. & Sazima, M. 2012. Beyond the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). **Plant Biology** 15:317-327.
- Arroyo, M.T.K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (Eds.) **Advances in legume systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew, p.723-769.
- Asker, S.E.; & Jerling, L. 1992. **Apomixis in plants**. 2th ed., CRC Press, Boca Raton. 298p.
- Barros, E.C.O.; Webber, A.C. & Machado, I.C. 2013. Limitação de polinizadores e mecanismos de autoincompatibilidade de ação tardia como causas da baixa formação de frutos em duas espécies simpátricas de *Inga* (Fabaceae – Mimosoideae) na Amazônia Central. **Rodriguésia** 64(1): 037-047.
- Bittencourt Junior, N.S. & Moraes, C.I.G. 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-Júnior, N.S. & Semir, J. 2005. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Sciences** 166:493-506.

Costa, M.E.; Sampaio, D.S.; Paoli, A.A.S. & Leite, S.C.A.L. 2004. Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 27: 395–406.

Cruz-Neto, O; Lopes, A.V.F. & Machado, I.C. 2007. Ecologia da Polinização de *Inga striata* (Benth.) (Leguminosae-Mimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 570-572.

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

Gibbs, P.E. 1990. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revista Brasileira de Botânica** 13: 125-136.

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

Gibbs, P.E. 2014. Late-acting self-incompatibility – the pariah breeding system in flowering plants. **New Phytologist** 203: 717-734.

Hanson, L. 1995. Some new chromosome counts in the genus *Inga* (Leguminosae: Mimosoideae). **Kew Bulletin** 50(4): 801-804.

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

Horvitz, C. C. & Schemske, D. W. 1988. A test of the pollinator limitation hypothesis for a neotropical herb. **Ecology** 69: 200-206.

Husband, B.C.; Ozimec, B.; Martin, S.L. & 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, R.K. 2008. Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. **International Journal of Plant Sciences** 169: 93-104.

Johnson, S.D. & Steiner, K.E. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. **Trends in Ecology and Evolution** 15: 140-143.

Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. 1999. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer, Sunderland. 567p.

Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell** 5: 1425-1437.

Koptur, K.H. 1984. Experimental evidence for defence of *Inga* (Mimosoideae) saplings by ants. **Ecology** 65: 1787-1793.

Koptur, S. 1983. Flowering phenology and floral biology of *Inga* (Mimosoideae). **Systematic Botanic** 8(4): 354-368.

Lewis, G.P. 1987. Legumes of Bahia. **Royal Botanic Gardens**, Kew. 369p.

Lewis, G.P.; Schrire, B.D.; Mackinder, B. & Lock, M. 2005. **Legumes of the World**. The Royal Botanic Garden, Kew. 577p.

Lorenzi, H. 1998. **Árvores Brasileiras 2: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum. 368p.

Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology** 34: 125-128.

Mata, M.F. 2009. O gênero *Inga* (Leguminosae, Mimosoideae) no Nordeste do Brasil: citogenética, taxonomia e tecnologia de sementes. Departamento de Agronomia. **Tese de doutorado**. Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

Mendes-Rodrigues, C. 2010. Ecologia de espécies poliembrionícas com ênfase no Bioma Cerrado. **Tese Doutorado**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG.

Mendes-Rodrigues, C.; Carmo-Oliveira, R.; Talavera, S.; Arista, M.; Ortiz, P.L. & Oliveira, P.E. 2005. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae-Bombacoideae). **Plant Biology** 7(5): 533-540.

Mendes-Rodrigues, C.; Ferreira, R. W.; Lima, J. A.; Dornelles, M. C.; Ranal, M. & Santana, D. G. 2007. Germinação de embriões de duas espécies de *Inga* (Mimosaceae) Porto Alegre. **Revista Brasileira de Biociências** 5(2): 561-563.

Nettancourt D. 1997. Incompatibility in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction** 10: 185–199.

Oliveira, P.E. & Maruyama, P.K. 2014. Sistemas de reprodução. In: Rech, A. R., Agostini, K., Oliveira, P.E.A.M. & Machado, I.C.S.. (Eds.). **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Editora Projeto Cultural 1: 71-94.

Oliveira, P.E.; Gibbs, P.E.; Barbosa, A.A. & Talavera, S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. **Plant Systematics and Evolution** 179: 207-219.

Pennington, T.D. 1997. **The genus Inga**. The Royal Botanic Garden. Kew. 839p.

Raven, P.H.; Evert R.F.; Eichhorn S.E. 2001. A composição molecular das células vegetais. In: Raven P.H.; Evert R. F. & Eichhorn S.E. (Eds). **Biologia Vegetal**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 17-39p.

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

Richards, A.J. 1986. **Plant Breeding Systems**. London, George Allen & Unwin. 529p.

Sampaio DS. 2010. Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações nos sistema de autoincompatibilidade. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

- Sampaio, D.S.; Bittencourt Júnior, N.S. & Oliveira, P.E. 2013a. Mating in the pseudogamic apomictic *Anemopaegma acutifolium* DC: another case of pseudo-self-compatibility in Bignoniaceae? **Plant Biology** 15: 919-924.
- Sampaio, D.S.; Bittencourt Júnior, N.S. & Oliveira, P.E. 2013b. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from Central Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** 173: 77-91.
- Seavey, S.R. & Bawa, K.S. 1986. Late-acting self-incompatibility. **Botanical Review** 52:196-217.
- Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **Licenciamento Ambiental Praia Clube S/C**. Uberlândia, 2008. 17p. Relatório.
- Simpson, M.G. 2006. **Plant Systematics**. Elsevier, Amsterdam, Holanda. 579p.
- Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson, A.; Stevenson, D.W. & Heald, S.V. 2004. Flowering Plants of the Neotropics. **New York Botanical Garden** 151-156.
- Stiehl-Alves, E.M. & Martins, M.P. 2008. Biologia reprodutiva de *Acacia mearnsii* De Wild.: receptividade de estigmas. **Revista Árvore** 32(4): 599-606.
- Tabla, V.P. & Bullock, S.H. 2002. La polinización em la selva tropical de Chamela. In: Nogueira, F.A.; Vega Rivera, J.H.; Garcia Aldrete, A.N. & Quesada, M.A. (Eds.) **História Natural de Chamela**. Mexico: Instituto de Biología, UNAM 499-515.
- Tybirk, K. 1997. Reproductive biology and evolution of the genus *Acacia*. **Bulletin of the International Group for the Study of Mimosoideae** 20: 45-53.
- Vieira, A. B. 2008. Variações morfométricas e anatômicas nas folhas de *Mapronea* Aubl. (Euphorbiaceae) em ambientes de Cerrado (*sensu stricto*) e floresta estacional semidecidual. **Monografia**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG.
- Whitton, J.; Sears, C.J.; Baack, E.J. & Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixes in the angiosperms. **International Journal of Plant Sciences** 169: 169-182.

## Capítulo III<sup>1</sup>

**Poliembrionia e Apomixia em *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fabaceae:  
Mimosoideae)**

---

<sup>1</sup>Texto formatado de acordo com as diretrizes da revista Acta Botanica Brasilica

Embriologia, Apomixia e Poliembriónia em *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae – Mimosoideae)

Embriologia, Apomixia e Poliembriónia em *Inga laurina*

Nayara Augusto Vieira de Araújo<sup>2</sup>

Renata Carmo de Oliveira<sup>2,3</sup>

---

<sup>2</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia, Rua Ceará s/n, Bloco 2D, Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Autor para correspondência: carmooliveira@ufu.br

**RESUMO:** (Poliembrionia e Apomixia em *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae: Mimosoideae)). A presença de poliembrionia em espécies do Cerrado é descrita em importantes famílias como as Leguminosae, e também no gênero *Inga*. *Inga laurina* é uma leguminosa arborea do Cerrado, com pequenas flores brancas e frutos indeiscentes, com até oito sementes recobertas por uma sarcotesta. Os objetivos deste trabalho foram verificar a poliembrionia em *Inga laurina*, analisar a origem e o desenvolvimento dos embriões por meio de análises histológicas e moleculares, verificar e quantificar a presença de compostos fenólicos nos embriões dessas sementes, visando contribuir com informações sobre aspectos reprodutivos da família no bioma Cerrado. O estudo foi realizado na área urbana de Uberlândia, MG, Brasil. Flores e frutos em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados e fixados para análise histológica. Sementes foram retiradas dos frutos maduros, contadas e dissecadas de modo a obter o número de embriões. Outras sementes foram utilizadas nas análises de progênie e também para verificação de compostos fenólicos. A espécie apresentou 80,9% de sementes poliembrionicas, e a maioria delas com dois embriões. Os dados mostram que *Inga laurina* é uma espécie apomítica e pseudogâmica. Os embriões adventícios são de origem nucelar e se desenvolvem mais rapidamente podendo suprimir o embrião zigótico devido a competição pelos nutrientes do endosperma, e em sementes maduras é rara a presença destes. Os dados moleculares, preliminares, parecem confirmar essa característica. A presença e a quantidade de compostos fenólicos na sarcotesta e nos embriões favorecem a proteção destes contra fungos e patógenos do ambiente, sua germinação e o estabelecimento das plântulas. A poliembrionia em *Inga laurina* pode ser considerada uma estratégia para melhorar o sucesso reprodutivo, estabelecimento e ocupação do ambiente, já que a espécie está bem representada em áreas de Cerrado.

**Palavras chave:** Compostos fenólicos, embrionia adventícia, Leguminosae, sementes.

**ABSTRACT: (Polyembryony and Apomixis in *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fabaceae: Mimosoideae)).** The presence of polyembryony in Cerrado species have been described for some important plant families including the Leguminosae and in the genus *Inga*. *Inga laurina* is a Cerrado tree with small whitish flowers and indehiscent fruits, with up to eight seeds surrounded by a fleshy sarcotesta. The objectives of this work were to verify the polyembryony in *Inga laurina*, analyzing the origin and development of embryos by histological and molecular analysis, to verify and quantify the presence of phenolic compounds in the embryos of the seed. Furthermore, we aimed to contribute with information on the reproductive aspects of the family in the Cerrado Biome. The study was carried out at an urban area in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Flowers and fruits at different stages of development were collected and fixed for histological analysis. Seeds were removed from mature fruits, counted and dissected in order to obtain the embryo number. Other seeds were used in progeny tests and also to check phenolic compounds. The species presented 80.9 % of polyembryonic, and most of them with two embryos. The data show that *Inga laurina* is a pseudogamic apomictic species. The adventitious embryos are nucellar and may develop more quickly and they can suppress the zygotic embryo due to competition for nutrients endosperm. In mature seeds is rare the presence of these, and early molecular analysis seem to confirm this characteristic. The presence and amount of phenolic compounds in embryos and sarcotesta can promote protection against fungi and environmental pathogens, the germination and the seedling establishment. The presence of adventitious embryony in *Inga laurina* can be considered a strategy to improve the reproductive success, establishment and occupation of the environment, since the species is well represented in Cerrado areas.

**Key words:** Embryony adventitia, Fabaceae, phenolic compounds and seeds.

## Introdução

O estudo das sementes é um tema que vem sendo muito abordado, e a maioria das estudadas até então apresentam apenas um embrião, as chamadas monoembriônicas (Maheshwari 1963; Carman 1997; Goldenberg & Shepherd 1998). Porém, em algumas sementes pode ocorrer a formação de mais de um embrião originando o fenômeno da poliembrionia (Maheshwari 1950; Bhojwani & Bhatnagar 1986; Carman 1997).

Esse múltiplos embriões podem ser formados sexuada ou assexuadaamente (Koltunow 1993). Nos processos de reprodução sexuada, além do embrião zigótico, embriões podem se formar a partir da fecundação de outras células do gametófito (Koltunow 1993; Batygina & Vinogradova 2007). Assexuadaamente, os embriões podem ser formados a partir de células do nucelo, óvulo ou dos tegumentos, sem haver a fecundação, caracterizando um processo de apomixia (Lakshmanan & Ambegaokar 1984; Koltunow 1993; Batygina & Vinogradova 2007). Esse processo apomítico não é exclusivo, podendo ocorrer juntamente com a fecundação da oosfera formando sementes sexuadas e assexuadas (Asker & Jerling 1992).

A apomixia pode ser classificada em gametofítica, quando os embriões são formados a partir de células não reduzidas do saco embrionário (gametófito), e esporofítica, quando os embriões são formados a partir de células somáticas da planta mãe (esporófito adulto) ou do embrião e suspensor (esporófito jovem) (Johri 1992; Koltunow 1993; Mendes-Rodrigues 2010). Espécies com apomixia esporofítica, como *Eriotheca pubescens* (Oliveira *et al.* 1992) e *Bombacopsis glabra* (Baker 1960; Duncan 1970), necessitam da fertilização e formação de endosperma para que haja desenvolvimento dos embriões adventícios, caracterizando a apomixia pseudogâmica (Müntzing 1928; Goldenberg & Shepherd 1998).

A formação de embriões apomíticos é considerada uma vantagem para o estabelecimento e colonização de algumas espécies em ambientes inóspitos como o Cerrado (Goldenberg & Shepherd 1998; Goldenberg & Werpachowski 2004). Allem (2004) sugeriu que a associação entre os fenômenos da poliembrionia e da apomixia, que para Klink & Machado (2005) seria uma forma de persistência para plantas submetidas a pressões de perturbações naturais ou antrópicas. Além disso, a poliembrionia pode ser considerada também como uma tentativa de compensar a redução da progênie ocasionada pela competição por recursos e espaço dentro do mesmo fruto (Bawa *et al.* 1989; Uma Shannker & Ganeshaiah 1996; 1997), que pode levar à formação de embriões de tamanho reduzido com problemas de estabelecimento, como observado em *Eriotheca pubescens* (Mendes-Rodrigues *et al.* 2005; Mendes-Rodrigues 2010).

Apesar da presença da poliembrionia estar usualmente relacionada aos sistemas de reprodução apomíticos em plantas lenhosas do Cerrado, nas Vochysiaceae, em algumas Leguminoseae e Bombacaceae, a poliembrionia não está relacionada com a ocorrência obrigatória dos mecanismos de apomixia (Carmo-Oliveira 1998; 2000a; 2000b; Martins & Oliveira 2003; Custódio 2008; Mendes-Rodrigues 2010).

A família Leguminosae (Fabaceae) compreende aproximadamente 19.325 espécies e 727 gêneros (Lewis *et al.* 2005; Souza & Lorenzi 2012) de distribuição geográfica mundial (Lorenzi 2008). Dentre as Leguminosae lenhosas do Cerrado, a presença de poliembrionia foi verificada em espécies com *Hymenaea*, *Copaifera* e *Acacia* (Salomão & Allem 2001), e em outros gêneros como *Mora*, *Cynometra*, *Peltogyne*, *Macrolobium*, e *Inga* (Moreira & Moreira 1996).

O gênero *Inga* (Leguminosae, Mimosoideae), que ocorre desde o México até o sul do Brasil (Lorenzi 1998), destaca-se por apresentar flores reunidas em inflorescência

do tipo espiga (Koptur 1983; Pennington 1997; Cruz-Neto *et al* 2007; Judd 2009), grãos de pólen reunidos em políades (Koptur 1983) e por ter sementes recobertas por uma polpa branca, adocicada e comestível (Corner 1976; Barroso *et al* 1984; Poncy 1984) denominada sarcotesta (Oliveira & Beltrati 1993). Essa polpa que envolve as sementes confere a *Inga* um padrão estrutural não encontrado em qualquer outro gênero de Mimosoideae (Poncy 1985).

Dentro do gênero *Inga* as espécies *Inga fagifolia* (Oliveira & Beltrati 1994), *Inga uruguensis* Hook. & Arn, *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* e *Inga laurina* (Sw.) Willd (Mendes-Rodrigues *et al.* 2007, 2008) foram registradas como poliembriônicas. A espécie *Inga laurina*, objeto desse estudo, ocorre em diversos biomas brasileiros, dentre eles o Cerrado (Filardil *et al.* 2007). É uma espécie arbórea, com pequenas flores esbranquiçadas e seu fruto do tipo legume é indeiscente (Koptur 1983; Cruz-Neto *et al.* 2007; Judd 2009). Estudos sobre a germinação de sementes em espécies poliembriônicas de *Inga* mostraram taxas de germinação acima de 90% para *Inga affinis* (Lieberg & Joly 1993) e 75% de emergência de plântulas em *Inga laurina* (Zamith & Scarano 2004; Mendes-Rodrigues *et al.* 2007).

Oliveira & Beltrati (1993, 1994) chamaram a atenção para a presença de compostos fenólicos nos embriões em *Inga fagifolia*, como foi observado também por Araújo & Carmo-Oliveira (dados não publicados) em *Inga laurina*. Estes compostos constituem um dos mais disseminados e diversificados grupos de metabólitos secundários das plantas, com mais de 8000 compostos já detectados (Brand-Williams *et al.* 1995). Sua presença no vegetal é superada apenas pelos carboidratos (Pridham 1965). Eles podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos órgãos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente (Brand-Williams *et al.* 1995).

Os compostos fenólicos podem ainda atuar no sistema enzimático (Henderson & Nitsch 1962), influenciando crescimento do vegetal e também os processos biológicos das sementes (Lodhi 1982). Sua presença também é registrada em processos de interações como revelado por Soares *et al.* (2000), em que altas concentrações destes compostos nas folhas de *Rollinia laurifolia* Schdlt. (Annonaceae) pode favorecer a formação de galhas por *Coccoidea* (Brachyscelidae), que dependem de tais compostos para completarem seu ciclo de vida.

Diante do exposto sobre a ocorrência de poliembrionia, sua importância e relação com os sistemas de reprodução em espécies do Cerrado, este trabalho tem por objetivos descrever a origem e os processos de desenvolvimento dos vários embriões presentes nas sementes de *Inga laurina* (Leguminosae), por meio de análises histológicas e moleculares, e, bem como verificar e quantificar a presença de compostos fenólicos nos embriões dessas sementes.

## **Material e Métodos**

O estudo foi realizado nos anos de 2013 e 2014 e o material botânico foi coletado de oito indivíduos situados na área urbana da cidade, sendo quatro destes no Parque do Sabiá em Uberlândia, situado na coordenada 18°54'52"S e 48°14'02"W e altitude de 890 m (Vieira 2008). O fragmento de vegetação florestal do Parque corresponde uma área com cerca de 30 hectares compostos por matas de galeria, mesófila e cerradão (Guilherme *et al.* 1998). Os outros quatro indivíduos estão no Praia Clube de Uberlândia. O clube possui aproximadamente 300 mil m<sup>2</sup> de extensão, localizado as margens do Rio Uberabinha na coordenada 18°93'45"S – 48°29'15"W e encontra-se numa altitude aproximada de 775,29 m (Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável 2008). O fragmento de vegetação neste

corresponde a uma área de mata ciliar, com aproximadamente 78 mil m<sup>2</sup>, composta por 95 espécies vegetais sendo 15 nativas do bioma Cerrado (Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável 2008), dentre estas a espécie *Inga laurina*. O clima da região é tipo Aw Megatérmico de acordo com a classificação de Köppen, e apresenta duas estações bem definidas, o verão é quente e chuvoso e o inverno é frio e seco (Vieira 2008).

### **Contagem dos embriões**

A contagem do número de embriões foi realizada em 120 frutos maduros, com 13 semanas após antese, coletados de quatro plantas adultas localizadas no Parque do Sabiá. Estes foram abertos, suas sementes retiradas e dissecadas para o isolamento do aglomerado de embriões encontrado em cada uma. Foi apurado o número de sementes que apresentaram mais de um embrião. Estes foram separados, identificados pelo eixo de inserção dos cotilédones (Oliveira & Beltrati 1993) e, posteriormente, contados separadamente.

### **Análises histológicas**

Para o estudo da origem e do desenvolvimento dos embriões foram coletados flores e frutos em diferentes estágios de desenvolvimento. As sementes foram isoladas e tiveram parte da testa retirada para posteriormente serem fixadas em FGAA Lertsten & Curtis 1988). As amostras foram submetidas à desidratação em série etanólica (Kraus & Arduin 1997), passaram por uma série de etanol:clorofórmio (3:1, 1:1, 3:1) para a retirada de cera epicuticular e incluídas em 2-hidroxietil-metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit) (Feder & O'Brien 1968). As séries de secções transversais e longitudinais foram montadas em lâminas de vidro e submetidas à coloração com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1964).

Testes histoquímicos foram realizados com Lugol para detectar a presença de grãos de amido (Johansen (1940), e com sulfato ferroso 2% para verificar a presença de compostos fenólicos (Jensen 1962).

### Análises moleculares

De modo a caracterizar a variabilidade genética e origem da progênie, 25 sementes maduras de *Inga laurina* tiveram seus embriões isolados para serem submetidos a análises utilizando marcadores moleculares tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeated*) (Reddy *et al.* 2002). Foram utilizadas inicialmente cinco destas sementes, sendo extraídos e isolados um total de 19 embriões (por limitações logísticas os embriões das outras sementes foram extraídos e estocados para posterior análise). Estes foram macerados, separadamente, com auxílio de nitrogênio para extração de DNA, seguindo o protocolo Doyle & Doyle (1987). O mesmo processo de maceração foi feito para folhas da planta mãe. Aos macerados produzidos anteriormente, foi adicionado tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%, 1,4M NaCL, 100mM Tris-HCl pH 8,20mM EDTA pH 8 e 2,5 % PVP) e 2% de β-mercaptoetanol. Após a extração o DNA foi diluído em 130 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA), e foi utilizado o kit de extração DNeasyPlant (Qiagen), seguindo recomendações do fabricante.

A qualidade e concentração do DNA foram verificadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. A diluição ideal do DNA para amplificação dos fragmentos ISSR foi determinada a partir de testes de diluição (1:10; 1:50; 1:100). A diluição foi testada em função da qualidade da amplificação, sendo que a diluição de 1:50 apresentou melhores resultados.

### **Amplificação dos fragmentos *ISSR* (*Inter simple sequence repeat*)**

Dentre os oito primers ISSR testados, cinco foram escolhidos (MAO, Omar, 840, John e Manny) por gerarem a menor quantidade de bandas inespecíficas e maior quantidade de bandas polimórficas. As temperaturas de anelamento dos primers foram otimizadas para cada lócus *ISSR*.

Os fragmentos obtidos por amplificação foram avaliados quanto à presença e ausência de bandas, e as bandas inespecíficas foram descartadas das análises. As análises de progênie foram realizadas no Laboratório de Genética (Labgen) da Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil.

### **Quantificação dos compostos fenólicos**

Para verificar e quantificar os compostos fenólicos totais foram utilizados embriões de 150 sementes de frutos em diferentes fases de desenvolvimento, divididos em classes. Classe I: frutos com 4-6 cm com sementes cujos embriões, em fase inicial de desenvolvimento, ainda não podem ser separados; classe II: frutos com 7-8 cm cujas sementes possuem embriões maiores que podem ser isolados; e classe III: frutos com 9-10 cm, com sementes maduras e embriões desenvolvidos, de fácil separação. Os embriões das sementes da classe I tiveram a testa da semente retirada e foram macerados em nitrogênio líquido formando um pó fino. Os embriões das sementes das classes II e III foram separados e em seguida agrupados por semelhança da coloração (embriões mais escuros e embriões mais claros). Os macerados das classes II e III resultaram em quatro diferentes amostras, A: embriões escuros da classe II; B: embriões claros da classe II; C: embriões escuros da classe III e amostra D: embriões claros da classe III. Tais amostras foram liofilizadas, para a produção dos extratos brutos, mantidos estocados em congelamento a -20 °C, para posterior quantificação utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteau (Folin & Ciocalteau 1927), que utiliza como

padrão o ácido gálico. A quantificação de fenóis totais também foi feita para as sarcotestas das sementes maduras utilizando os mesmos procedimentos. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil.

Para avaliar o percentual de germinação e desenvolvimento dos embriões 50 sementes maduras foram colocadas para germinar em laboratório, em gerbox com uma fina camada de algodão e papel filtro. Outras 50 sementes foram colocadas para germinar em terra comum para jardinagem, sem adição de substratos, em estufa de vegetação.

Os resultados foram registrados por meio de imagens obtidas em microscópio Axioplan Zeiss com luz polarizada, microscópio Olympus com fluorescência, utilizando-se câmera fotográfica modelo DP70 e o programa DPController, câmeras digitais Sony DSC-S50 e Sony W30.

O material botânico testemunho foi depositado no *Herbarium* Uberlandense (HUFU), do Instituto de Biologia, UFU – Uberlândia, sob o número de registro HUFU-60.327.

## Resultados

Os frutos de *Inga laurina* são do tipo legume e apresentam em média 5,3 cm de comprimento. As sementes estão dispostas em fileira, sendo as mais próximas da base do fruto, junto à região do pecíolo, maiores que as da região apical. Em alguns frutos verificou-se que nesta região apical não houve formação de sementes (Figura 1.A).

Nos 120 frutos analisados foram encontradas 373 sementes, resultando numa média de 3,13 sementes por fruto. O número médio de sementes por fruto variou de acordo com o tamanho dos frutos e observou-se que as sementes com maior número de

embriões se encontravam nos frutos menores, com menos sementes. Considerando que são encontrados cerca de 10 óvulos por ovário, os resultados mostraram uma porcentagem de conversão de óvulos em sementes de  $31,34\% \pm 2,64$  (Tabela 1).

Devido à origem e desenvolvimento assincrônicos dos vários embriões, na semente madura estes se dispõem entrelaçados formando um aglomerado (Figura 1.B). Das 373 sementes dissecadas, 302 apresentaram mais de um embrião, totalizando um percentual de 80,9% de sementes poliembriônicas e uma maior frequência de sementes com dois embriões (Tabela 1).

As análises histológicas mostraram, nos óvulos de ovários com 72 horas após a antese, a presença do tubo polínico descarregando o material genético na região das sinérgides e o núcleo endospérmico primário (Figura 1.C). Nesta fase, observa-se grande quantidade de grãos de amido no citoplasma da célula média.

Em sementes jovens, de frutos com duas semanas pós antese, tem-se as primeiras divisões do embrião zigótico, na região micropilar (Figura 1.D). Nesta fase observou-se também a presença do endosperma já em fase nuclear. Algumas células nucelares, próximas da micrópila, se apresentam em processo de divisão celular (Figura 1.D). Tais células darão origem aos embriões nucelares que em sementes jovens, com quatro semanas, se apresentam com várias células que começam a se organizar em forma globular (Figura 1.E). Estes se desenvolvem rapidamente, ocupando a região central em meio ao endosperma (Figura 2.A).

Em várias sementes desta fase e nas sequenciais, observou-se uma desorganização celular na região micropilar (Figura 2.B), na qual se encontrava o embrião zigótico. A presença de um espaço nesta região, que foi observada em várias secções analisadas, nos sugere que o embrião zigótico pode se degenerar enquanto que os embriões nucelares continuam seu desenvolvimento.

A formação de novos embriões nucleares ocorre com o desenvolvimento das diferentes sementes do fruto, sendo possível observar em uma mesma semente embriões mais desenvolvidos que outros (Figuras 2.B e 2.C).

As análises utilizando marcadores moleculares tipo ISSR mostraram que, dos 19 embriões analisados, 18 não apresentaram variabilidade genética, sendo aparentemente idênticos à planta-mãe, apenas um embrião mostrou diferença genética em relação à planta-mãe e aos outros embriões. Este era o maior embrião da semente e apresentava coloração verde intensa.

Nas sementes maduras, os embriões maiores apresentam uma coloração verde intensa e os menores, que se encontram próximos a região micropilar, são verdes mais claros (Figuras 1.B e 2.D). Tal coloração está relacionada com a concentração de compostos fenólicos presentes nos embriões, que foram identificados por meio do sulfato ferroso (Figura 2.E). Testes com Lugol verificaram também a presença de grãos de amido nos embriões (Figura 2.F).

As análises das sementes submetidas à extração de fenóis totais mostraram que há diferença na quantidade destes compostos nos embriões durante o seu desenvolvimento. Os embriões em estágio inicial de desenvolvimento já apresentam fenóis. Em fases mais avançadas do desenvolvimento dos embriões, esta quantidade aumenta gradativamente e observa-se diferença expressiva da concentração de fenóis nos embriões maiores e mais escuros quando comparados com os menores e mais claros (Tabela 2).

Os fenóis, detectados pelo azul intenso na coloração com Azul de toluidina e em negro ou marrom escuro nas preparações com sulfato ferroso, estão presentes nas células da camada externa do tegumento externo dos óvulos maduros (Figura 2.G) e na testa das sementes maduras (Figura 3.A).

Em algumas sementes maduras observou-se também a presença de galhas na região da sarcotesta (Figuras 3.B e C). A quantificação dos fenóis nessa estrutura mostrou que sarcotestas galhadas apresentam maior concentração de compostos fenólicos quando comparadas as sarcotestas sadias (Tabela 2).

O estudo da emergência das sementes de *Inga laurina* mostrou que mais de uma plântula pode se desenvolver por semente (Figura 3.D). Os embriões maiores, de coloração mais acentuada e que apresentam maior concentração de compostos fenólicos cresceram mais rapidamente, três dias após as sementes terem sido colocadas para germinar. Alguns embriões menores, de coloração mais clara e com menor concentração de compostos fenólicos demoraram até dois meses para manifestar algum crescimento (Figura 3.D). Esse longo tempo de exposição ao ambiente natural, ou mesmo no laboratório, possibilitou o desenvolvimento de fungos que, muitas vezes, impediram o desenvolvimento destes.

## **Discussão**

Em *Inga laurina*, o número de sementes por fruto maduro, em média 3,10, revela que há uma redução na conversão de óvulos em sementes, como verificado em outras espécies poliembriônicas (Mendes-da-Glória *et al.* 2001; Custódio 2008). Esta redução pode ser resultado de diversos fatores, desde a ação de agentes polinizadores (Wiens *et al.* 1987) até a competição por recursos limitados dentro de um mesmo fruto (Bawa *et al.* 1989; Uma Shaanker & Ganeshiah 1988). Como em outras leguminosas que apresentam frutos do tipo legume, as sementes de *Inga laurina* são submetidas a uma competição por recursos (Bawa *et al.* 1989; Uma Shaanker & Ganeshiah 1988). A disposição dos óvulos em uma única fileira possibilita, àqueles que se encontram mais próximos da base do fruto, receberem primeiro os recursos (Bawa *et al.* 1989),

limitando o repasse nutricional às sementes do ápice, que muitas vezes têm seu desenvolvimento comprometido (Bawa *et al.* 1989).

A ocorrência de poliembrionia entre as Angiospermas é registrada para grande número de espécies (Uma Shaanker & Ganeshiah 1996; Salomão & Allem 2001; Mendes-Rodrigues 2010). No bioma Cerrado, Salomão & Allem (2001) revelaram que 18,67% das espécies estudadas apresentam poliembrionia. Dados recentes (Mendes-Rodrigues 2010) apontam até 30,3% de espécies poliembrionícas entre as espécies de Cerrado, confirmando a alta frequência de embriões múltiplos. Dentre estas, Salomão & Allem (2001) verificaram a presença de poliembrionia em 14 espécies de leguminosas lenhosas, incluindo *Hymenaea*, *Copaifera* e *Acacia*. Tais dados indicam ser esse fenômeno uma característica reprodutiva importante entre as Angiospermas (Goldenberg & Shepherd 1998; Salomão & Allem 2001; Klink & Machado 2005).

A poliembrionia em espécies de *Inga* já é conhecida entre aquelas que ocorrem tanto em matas (Oliveira & Beltrati 1994; Moreira & Moreira 1996) como em formações de Cerrado (Salomão & Allem 2001; Mendes-Rodrigues *et al.* 2007), mas ainda não havia dados quanto à frequência de sementes poliembrionícas em espécies do gênero. Essa alta frequência de sementes com mais de um embrião deixa clara a importância da poliembrionia para a biologia da espécie em estudo, como observado por Salomão & Allem (2001) em espécies do Cerrado.

Em *Inga laurina*, 80% das sementes maduras apresentam pelo menos dois embriões, o que sugere que a planta-mãe consegue compensar, na sua progênie, a perda na taxa de conversão de óvulos em sementes, que foi de apenas de 31,34% nos frutos analisados.

Com relação à origem dos embriões, as análises histológicas evidenciaram a ocorrência do processo da fecundação com a formação do embrião zigótico, do

endosperma, além de embriões de origem nucelar. A formação de múltiplos embriões adventícios em uma semente, caracterizada como apomixia, pode estar relacionada ao processo de reprodução assexuada, onde não há fecundação da oosfera (Lakshmanan & Ambegaokar 1984; Koltunow 1993; Batygina & Vinogradova 2007), ou sexuada, onde mesmo com a formação de um zigoto há formação de embriões de origem somática (Koltunow 1993; Batygina & Vinogradova 2007). Tais embriões se formam devido ao forte potencial embriogênico do tecido nucelar para originar múltiplos embriões geneticamente idênticos à planta-mãe, junto do embrião sexual (Koltunow 1993; Johri 1984; Uma Shaanker & Ganeshiah 1996, Rodrigues *et al.* 1999).

Em *Inga laurina*, a apomixia pode ser caracterizada como esporofítica e pseudogâmica, em que há fecundação para a formação do endosperma e dos embriões adventícios (Koltunow 1993; Mendes-Rodrigues 2010), visto que os resultados dos tratamentos de polinização revelaram a formação de sementes em todos os tipos de cruzamentos (Araujo & Carmo-Oliveira, dados não publicados). A apomixia esporofítica pseudogâmica também é encontrada em outras espécies de Cerrado como *Eriotheca pubescens* (Mendes-Rodrigues *et al.* 2005), no gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae) (Bittencourt & Semir 2005) e em *Anemopaegma acutifolium* DC (Sampaio *et al.* 2013).

A formação e o desenvolvimento do endosperma nuclear em *Inga laurina* corroboram os dados para as leguminosas (Davis 1966; Johri 1984) e para *Inga*, como observado por Oliveira & Beltrati (1993). O endosperma, embora transitório, garante o desenvolvimento dos embriões, gaméticos e adventícios, formados na semente como observado em espécies com sementes poliembrionícas (Bacchi 1944; Koltunow 1993; Mendes-Rodrigues 2010; Sampaio *et al.* 2013).

Usualmente a poliembrionia é relacionada a mecanismos de apomixia (Allem 2004) o que seria uma forma de persistência ao ambiente para plantas submetidas a pressões de perturbações naturais ou antrópicas (Allem 2004), sendo, portanto, alternativas reprodutivas importantes em ambientes inóspitos e transformados pela agricultura como o Cerrado (Klink & Machado 2005). Salomão & Allem (2001) verificaram que, das 75 espécies estudadas por eles, ocorrentes nos biomas Cerrado e Caatinga, 18,67% apresentavam poliembrionia e possivelmente apomixia, indicando que esses fenômenos são mais frequentes do que se supunha (Mendes-Rodrigues 2010).

Apesar da presença da fecundação e formação do embrião zigótico, em *Inga laurina*, os embriões que se desenvolvem com mais vigor são os apomíticos, haja vista que as análises histológicas mostraram que em várias sementes o zigoto embrionário, formado na região micropilar, tem seu desenvolvimento comprometido após o início do desenvolvimento dos embriões nucelares. Isso pode ser indicado pela desorganização de células na região da micrópila, verificada nas sementes com mais de quatro semanas. A partir desta fase, apenas os embriões de origem nucelar podem ser observados nas análises histológicas. Ao contrário, em espécies das famílias Bombacaceae (Baker 1960), Melastomataceae (Goldenberg 2000), e Bignoniaceae (Sampaio *et al.* 2013), os embriões zigóticos se desenvolvem até a maturidade, mas os embriões apomíticos formados ao redor são mais vigorosos e se desenvolvem mais rapidamente. É sugerido que estes assimilam mais nutrientes e competem pelo espaço dentro da semente, podendo assim inibir o desenvolvimento do embrião sexuado (Baker 1960;; Soares Filho *et al.* 2000; Mendes-Rodrigues *et al.* 2005).

Em *Inga laurina*, os indícios de falha no desenvolvimento do embrião zigótico também podem ser reconhecidas pelas análises moleculares, que revelaram a presença

de apenas um embrião com diferença genética em relação à planta mãe e aos outros embriões em toda amostra estudada.

Como a espécie é apomítica pseudogâmica, os embriões sexuados, que seriam os menos vigorosos, podem ter sido formados a partir de um grão de pólen com menor viabilidade que resultaria em má formação do zigoto e consequente falha no desenvolvimento, o que explicaria os poucos embriões zigóticos encontrados na semente madura (Soares Filho *et al.* 2000; Mendes-Rodrigues 2010), como verificado nas análises de progênie de *Inga laurina*. Neste contexto, o desenvolvimento dos embriões apomíticos em *Inga laurina* poderia superar o crescimento do embrião zigótico, favorecendo o crescimento dos primeiros pela captação de recursos do endosperma. Tem-se ainda, para a espécie a formação dos embriões adventícios em diferentes fases do desenvolvimento da semente, inclusive na região micropilar após a degeneração do embrião zigótico, o que resulta na presença de embriões de distintos tamanhos na semente madura, como observado também em outras espécies poliembrionícas como *Glycine max* (L.) Merrill (Fernando 1999), *Vitis* spp (Passos *et al.* 1999) e em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Mendes-da-Glória *et al.* 2001).

O resultado da análise molecular, apesar de ainda pouco conclusivo, que revelou um único embrião zigótico, na amostra de embriões clonais bem desenvolvidos, indica que a pseudogamia pode levar a formação de embriões zigóticos com potencial para se estabelecerem e garantir a variabilidade genética na espécie.

Dados mais conclusivos sobre o tipo de sistema de reprodução da espécie e moleculares poderão esclarecer melhor a origem e o desenvolvimento dos tipos de embriões encontrados nas sementes de *Inga laurina*.

O vigor dos embriões maiores nas sementes parece estar associado à maior quantidade de fenóis totais encontrado nestes. As análises histoquímicas e a

quantificação de fenóis evidenciaram um acréscimo de compostos fenólicos durante o crescimento do embrião. Nas fases iniciais de desenvolvimento não foi observada diferença expressiva entre as concentrações de compostos fenólicos dos vários embriões de *Inga laurina*.

Na semente madura, têm-se os embriões nucelares que se formaram primeiro, maiores e com maior concentração de fenóis totais, e por isto, uma coloração verde intensa a olho nu. Já os embriões formados mais tarde e aquele originado após o embrião zigótico ter se degenerado, são menores, mais membranáceos e apresentam menor concentração de fenóis totais e, por isto, uma coloração mais clara. Os poucos embriões zigóticos que conseguem atingir a maturidade, provavelmente também apresentam estas características de tamanho e concentração de compostos fenólicos tornando assim, difícil a sua diferenciação dos demais.

Os compostos fenólicos, dentre os fenóis totais, estão intimamente associados às estratégias de defesa das plantas (Pridham 1965; Nass 2007). Estes podem ser encontrados em diferentes estruturas da semente, como nos tegumentos e nos embriões, no angico-vermelho (*Piptadenia macrocarpa*) e no jacarandá caviuna (*Dalbergia nigra*) (Maciel *et al.* 1992), da família Leguminosae, e sua atuação nas sementes é variável de acordo com sua localização nesta estrutura, conferindo proteção quando encontrados nos tegumentos e nos embriões (Maciel *et al.* 1992).

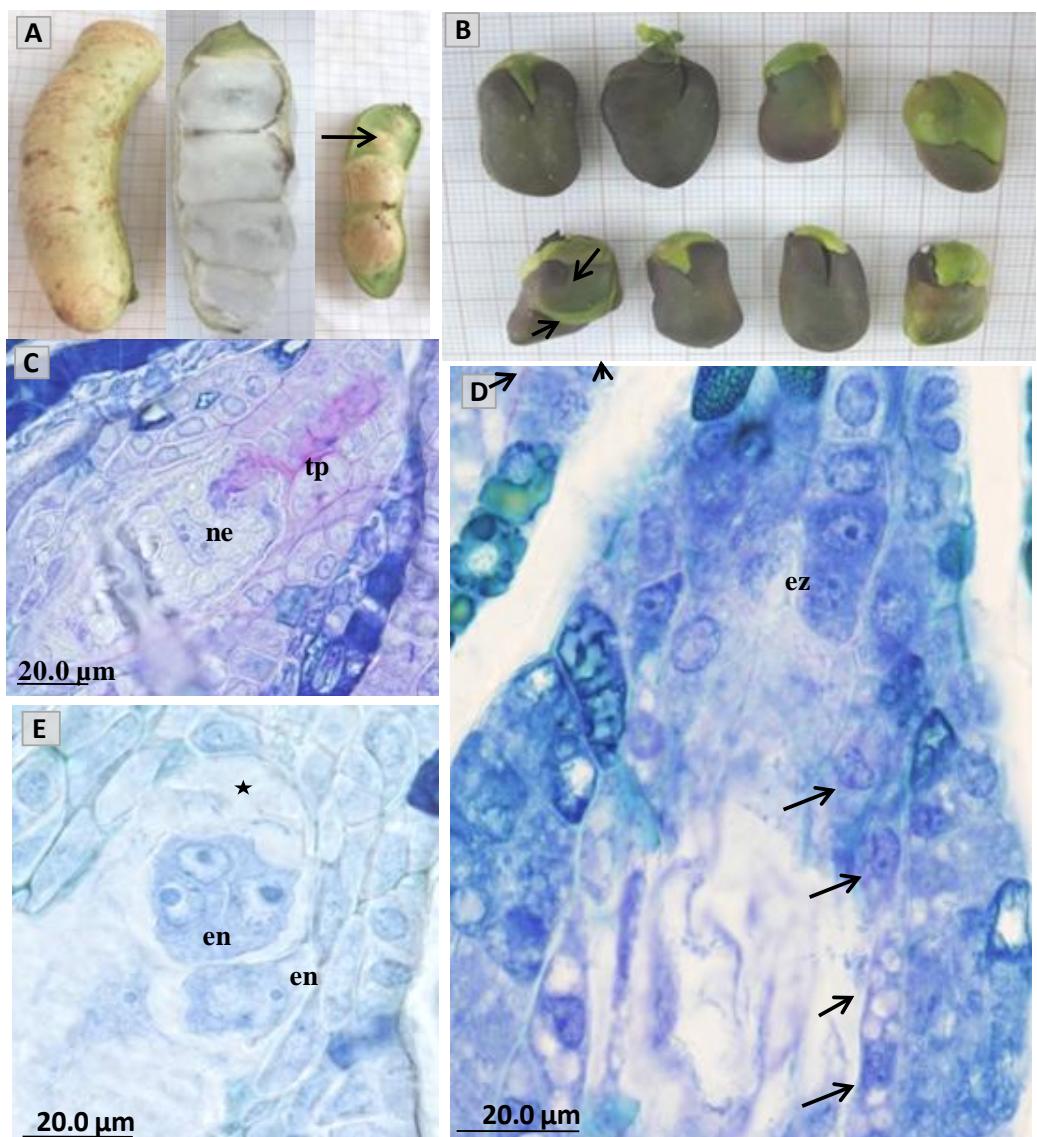
Em *Inga laurina*, a presença de compostos fenólicos nos tegumentos e, na maturidade, na sarcotesta, como verificado também em *Inga fagifolia* (Oliveira & Beltrati 1994), indica a relação destes com a proteção das estruturas da semente bem como do embrião durante o desenvolvimento do fruto.

Os embriões das sementes de *Inga laurina* que são maiores e com maior concentração de fenóis germinam mais rapidamente que os embriões menores e com

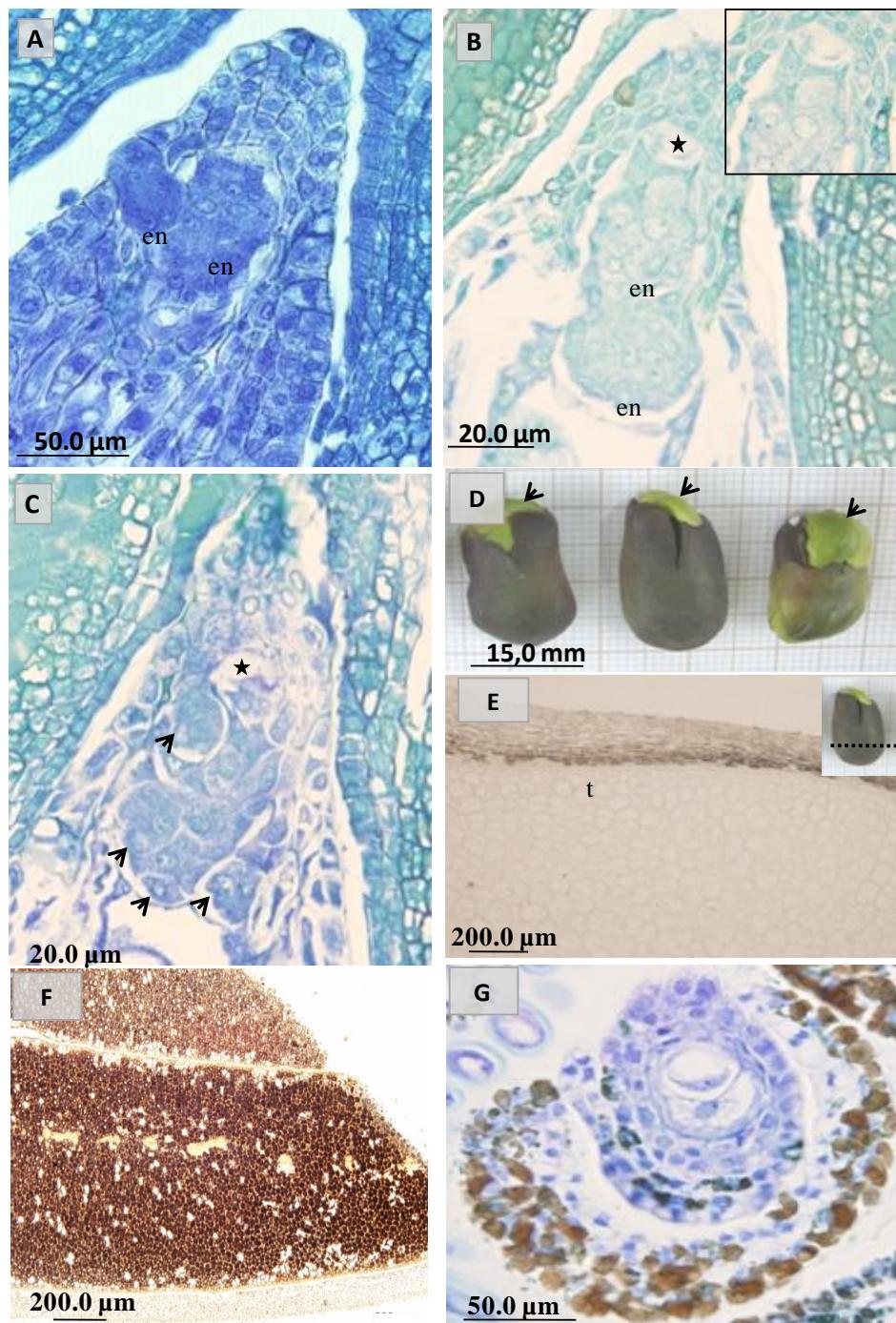
menor concentração destes compostos. As plântulas resultantes destes embriões menores se mostraram menos resistentes aos fungos e patógenos encontrados no ambiente de germinação. Esse fato corrobora os dados que demonstram que os fenóis têm grande influência na proteção da semente favorecendo o processo da germinação e o estabelecimento das plântulas. Henderson & Nitsch (1962), Einhelling *et al.* (1982), Lodhi (1982) e Brand-Williams *et al.* (1995) verificaram os efeitos sinergísticos dos fenóis no alongamento de radicelas, crescimento de plântulas e germinação de sementes, evidenciando que esses fenômenos sofrem, em diferentes graus, a influência desses compostos.

Os dados sobre a ontogênese e desenvolvimento dos poliembriões em *Inga laurina*, apresentados neste trabalho, somados àqueles sobre os sistemas de polinização (Araújo & Carmo-Oliveira, dados não publicados), nos revelam que a espécie apresenta apomixia pseudogâmica. Os embriões adventícios são de origem nucelar e se desenvolvem mais rapidamente e vigorosamente, o que suprime o embrião zigótico na competição pelos nutrientes do endosperma (Baker 1960; Goldenberg 2000; Soares Filho *et al.* 2000; Mendes-Rodrigues *et al.* 2005). A provável degeneração do embrião zigótico, observada em várias sementes jovens ou a competição por nutrientes, podem explicar a rara presença destes embriões nas sementes maduras. Os dados moleculares parecem confirmar essa característica.

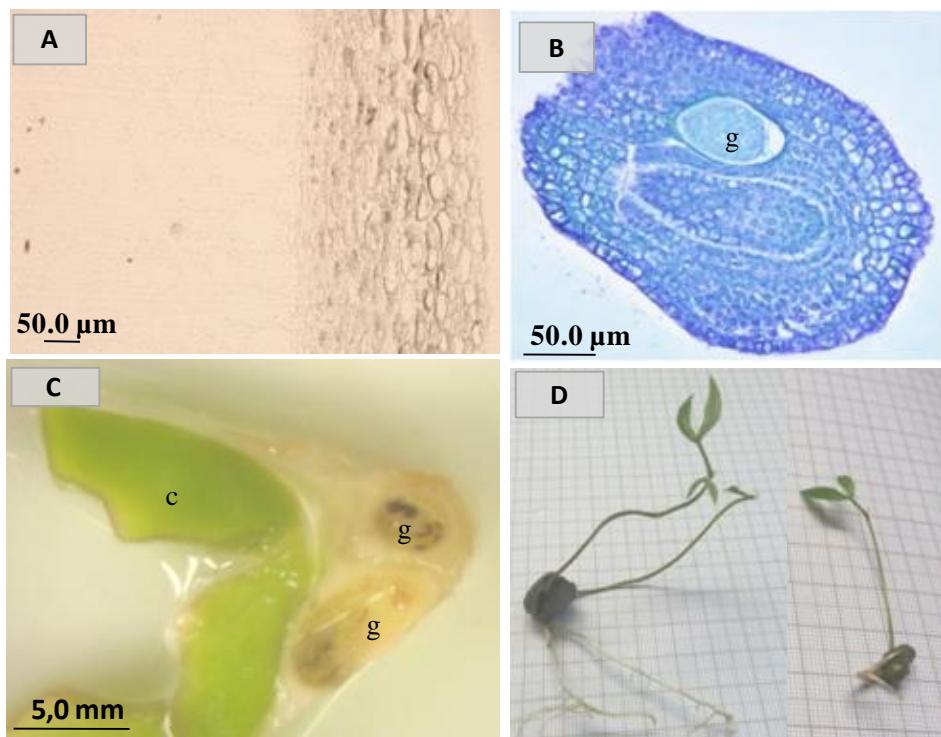
Tais dados somam-se a informações sobre a biologia reprodutiva já encontrada para o grupo das leguminosas e para as espécies do Cerrado bem como apresentam dados relativos à relação da presença de fenóis totais e o desenvolvimento dos embriões e das sementes de uma espécie deste Bioma.



**Figura 1:** Frutos, sementes e desenvolvimento dos embriões de *Inga laurina*. A- Primeiro fruto, a esquerda, sadio e com várias sementes. Fruto aberto mostrando as sementes envolvidas pela sarcotesta. Terceiro fruto, da direita, observa-se próxima ao ápice do fruto uma região onde não houve formação de sementes. B- Sementes de frutos maduros evidenciando o aglomerado de embriões (setas). C- Corte longitudinal de óvulo de ovário com 72 horas após antese evidenciando a presença do tubo polínico, corado em rosa, e o núcleo endospérmico primário. D- Semente jovem de fruto com duas semanas. Observa-se as primeiras divisões do embrião zigótico na região micropilar, o endosperma nuclear e células nucleares próximas a micróplia em processo de divisão (setas). E- Corte longitudinal de sementes com quatro semanas, evidenciando embriões nucleares em formato globular. ( en: embrião nuclear; ez: embrião zigótico; ne: núcleo endospérmico primário; tp: tubo polínico)



**Figura 2:** Desenvolvimento dos embriões de *Inga laurina* e testes histoquímicos para verificar a presença de compostos fenólicos A- Corte longitudinal de semente evidenciando embriões nucleares ocupando a região central em meio ao endosperma. B- Corte longitudinal de semente evidenciando desorganização celular na região micropilar (estrela). Observa-se também embriões nucleares na região central em meio ao endosperma. C- Corte longitudinal de semente evidenciando a presença de vários embriões nucleares com diferentes tamanhos. Observa-se também a desorganização celular na região micropilar (estrela). D- Sementes maduras evidenciando embriões menores de coloração verde claro (setas) e embriões maiores verde intensa. (traço) . E- Corte transversal de semente madura fixada em sulfato ferroso, evidenciando a testa da semente com coloração mais enegrecida, indicando a presença de compostos fenólicos. F- Corte do cotilédone evidenciando a presença de grãos de amido corados por Lugol. G- Detalhe de ovulo evidenciando a presença de compostos fenólicos, de coloração marrom escuro, na camada externa do tegumento externo. (en: embrião nuclear; t: testa)



**Figura 3:** Sarcotesta da semente de *Inga laurina* evidenciando a presença de compostos fenólicos, galhas na sarcotesta e germinação das sementes. A- Corte evidenciando a presença de compostos fenólicos na testa da semente madura fixada com sulfato ferroso. B- Corte longitudinal de semente evidenciando a fase inicial de desenvolvimento da galha. C- Corte de semente evidenciando galhas somente na região da sarcotesta da semente. D- Germinação das sementes. Na primeira semente, a esquerda, observa-se duas plântulas se desenvolvendo em uma única semente. Esta apresenta maior concentração de compostos fenólicos e plântulas mais desenvolvidas. Na segunda semente, a direita, observa-se uma plântula se desenvolvendo por semente. Esta apresenta menor concentração de compostos fenólicos e é menor, quando comparada a anterior. (c: cotilédone; g: galha)

**Tabela 1:** Dados evidenciando a quantidade e o tamanho de frutos analisados para a contagem de sementes poliembriônicas e o número médio de embriões formados por semente.

Quantidade de frutos analisados (por classe)	Tamanho médio dos frutos (cm)	Número de sementes encontradas	Número de sementes poliembriônicas	Média do número de embriões por semente
A: 40 frutos	3,31	53	42	3,45
B: 40 frutos	4,62	205	164	2,58
C: 40 frutos	5,88	115	96	2,26

**Tabela 2:** Dados evidenciando a concentração de compostos fenólicos nas diferentes fases de desenvolvimento das sementes de *Inga laurina*. Comparativo utilizando o equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato.

	Média (EAG/g de extrato)	Desvio padrão (EAG/g de extrato)
Embriões escuros (jovens)	7,2	0,5
Embriões claros (jovens)	5,4	0,7
Embriões escuros (intermediários)	6,0	0,2
Embriões claros (intermediários)	5,8	0,0
Embriões escuros (maduros)	14,9	0,8
Embriões claros (maduros)	13,5	0,1
Sarcotesta (com galha)	38,3	0,7
Sarcotesta (sadia)	5,2	0,3

## Referências Bibliográficas

- Allem, A.C. 2004. Optimization theory in plant evolution: Na overview of long-term evolutionary prospects in the Angiosperms. **The Botanical Review** 69 (3): 225-251.
- Asker, S.E. & Jerling, L. 1992. **Apomixis in plants**. CRC Press, Boca Raton. 298p.
- Bacchi, O. 1944. Observações citológicas em *Citrus*: Ill. megasporogênese, fertilização e poliembrionia. **Bragantia** 4(7):405-412.
- Baker, H.G. 1960. Apomixis and polyembryony in *Pachira oleaginea* (Bombacaceae). **American Jornal of Botany** (47): 296-302.
- Barroso, G.M.; Morim, M.P.; Peixoto, A.L. & Ichasso, C. L.F. 1999. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa, MG. Imprensa Universitaria, 443p.
- Batygina, T.B. & Vinogradova, G.Y.U. 2007. Phenomenon of Polyembryony. Genetic Heterogeneity of Seeds. **Russian Journal of Developmental Biology** 3(38): 126–151.
- Bawa, K.S.; Hedge, S.G.; Ganeshiah, K.N. & Uma Shaanker, R. 1989. Embryo and seed abortion in plants. **Nature** 342: 625.
- Bhojwani, S. & Bhatnagar, S. P. 1986. **The embryology of Angiosperms**. Vani Education Books. 284 p.
- Bittencourt-Júnior, N.S. & Semir, J. 2005. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Sciences** 166:493-506.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, 28: 25-30.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bisporic, tetrasporic, and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society** 61:51-94.

Carmo-Oliveira, R. 1998. Estudos embriológicos e aspectos da morfologia floral de Vochysiaceae. Departamento de Botânica. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Carmo-Oliveira, R. 2000a. Embriologia e reprodução das Vochysiaceae. In: Anais do 51<sup>º</sup> Congresso Nacional de Botânica. Brasilia, UNB. p.338.

Carmo-Oliveira, R. 2000b. Estudo do gametófito feminino em Vochysiaceae de florestas do Brasil Central. In: Anais do Congresso Nacional de Botânica. Brasilia, UNB. p.143.

Corner, E.J.H. 1951. **The seeds of dicotyledons**. Cambridge, Cambridge University Press. v.1. 331p.

Cruz-Neto, O; Lopes, A.V.F. & Machado, I.C. 2007. Ecologia da polinização de *Inga striata* (Benth.) (Leguminosae-Mimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 570-572.

Custódio, N. L. 2008. Poliembrionia em espécies de *Callisthene Mart.* e *Qualea Aubl.* (Vochysiaceae). **Monografia** – Instituto de Biologia. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Davis, G.L. 1966. **Systematic Embryology of the Angiosperms**. New York. 528p.

Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12:13–15.

Duncan, E.J. 1970. Ovule and embryo ontogenesis in *Bombacopsis glabra* )Pasq.) A. Robyns. **Annals of Botany** 34: 677-683.

Einhellig, F.A.; Schon, M.K.; Rasmussen, J. A. 1982. Synergistic effects of four cinnamic acid compounds on grain sorghum. **Jornal Plant Growth Regulation** 1: 251-258.

Fernando, J.A. 1999. Estudos anatômicos da embriogênese somática *in vitro* em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- Filardil, F.L.R.; Garcia, P.C.F.; Carvalho-Okano, R.M. & Rodrigues, C. M. 2007. Padrões de distribuição geográfica de espécies arbóreas de Leguminosae ocorrentes no Cerrado. **Revista Brasileira de Biociências** 5(2): 1116-1118.
- Folin, C.; Ciocalteu, V. 1927. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. **Journal of Biological Chemistry** 73:627-650.
- Goldenberg, R. 2000. O gênero *Miconia* (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. 18(4): 927-947.
- Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "Cerrado" vegetation. **Plant Systematics and Evolution** 211:13-29.
- Goldenberg, R & Werpachowski, J.S. 2004. Estudo comparativo da ocorrência de Apomixia em Melastomataceae e Asteraceae. In: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Eds.) **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia. Brasilia**. 126p.
- Guilherme, F.A.G.; Nakajima, J.N.; Lima, C.A.P. & Vanini, A. 1998. As fitofisionomias e a flora lenhosa nativa do Parque do Sabiá, Uberlândia, MG. **Daphne** 8:17-30.
- Henderson, J.H.M.; Nitsch, J.P. 1962. Effect of certain phenolic acids on the elongation of *Avena* first internodes in the presence of auxin and ryptophan. **Nature** 195(4843):780-782.
- Jensen, W.A. 1962. **Botanical histochemistry, principles and practice**. San Francisco: Freeman. 480p.
- Johri, B.M & Ambegaokar, K.B. 1984. Embryology: then and now. p. 1-52. In: B.M. Johri (Eds.). **Embryology of Angiosperms**. Germany, Springer-Verlag.
- Judd, W.S & Olmstead, R.G. 2004. A survey of tricolpate (eudicot) phylogenetic relationships. **American Jornal of Botanic** 91: 1627-1644.
- Klink, C.A. & Machado, R.B. 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology** 19(3): 707-713.

- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell** 5: 1425-1437.
- Koptur, S. 1983. Flowering phenology and floral biology of *Inga* (Mimosoideae). **Systematic Botanic** 8(4): 354-368.
- Kraus, J. & Arduin, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédia, Edur. 198 p.
- Lankshmanan, K.K & Ambegaokar, H.B. 1984. Polyembryony. In: B.M. Johri (Eds.), **Embryology of Angiosperms**. Germany, Springer-Verlag.
- Lewis, G.P.; Schrire, B.D.; Mackinder, B. & Lock, M. 2005. **Legumes of the World**. The Royal Botanic Garden, Kew. 577p.
- Lieberg, S.A. & Joly, C.A. 1993. *Inga affinis* DC (Mimosaceae): germinação e tolerância de plântulas à submersão. **Revista Brasileira de Botânica** 16(2):175-179.
- Lodhi, M. A. K. 1982 Germination and decreased growth of *Kochia scoparia* in relation to its antoallelopathy. **Canadian Journal Botanic** 57: 1083-1088.
- Lorenzi, H. 1998. **Árvores Brasileiras 2: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum. 368p.
- Maciel, A.S.; Borges, E.E.L.; Borges, R.C.G. 1992. Determinação da presença de fenóis em sementes de espécies florestais e sua relação com inibidores de germinação. **Revista Brasileira de Sementes** 14(1): 1-8.
- Maheshwari, P. 1950. **An introduction to the embryology of Angiosperms**. New York: McGraw-Hill Book Company. 468p.
- Maheshwari, P. 1963. **Recent advances in the embryology of angiosperms**. Catholic Press, Ranchi. 467p.
- Martins, R.L. & Oliveira, P.E. 2003. RAPD evidence for apomixis and clonal populations in *Eriotheca* (Bombacaceae). **Plant Biology** 5:338-340.

- Mendes-da-Glória, F.J.; Mourão-Filho, F.A.A. & Apezzato-da-Glória, B. 2001. Morfologia de embriões nucelares de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Acta Botanica Brasilica** 15(1) 17-25.
- Mendes-Rodrigues, C. 2010. Ecologia de espécies poliembrionícas com ênfase no Bioma Cerrado. **Tese Doutorado**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG.
- Mendes-Rodrigues, C.; Carmo-Oliveira, R.; Talavera, S.; Arista, M.; Ortiz, P.L. & Oliveira, P.E. 2005. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae-Bombacoideae). **Plant Biology** 7(5): 533-540.
- Mendes-Rodrigues, C.; Ferreira, R. W.; Lima, J. A.; Dornelles, M. C.; Ranal, M. & Santana, D. G. 2007. Germinação de embriões de duas espécies de *Inga* (Mimosaceae) Porto Alegre. **Revista Brasileira de Biociências** 5(2): 561-563.
- Moreira, F.M.S & Moreira, F.W. 1996. Características da germinação de sementes de 64 espécies de leguminosas florestais nativas da Amazônia, em condições de viveiro. **Acta Amazonica** 26(1/2): 3-16.
- Müntzing, A. 1928. Pseudogamie in der gattung. **Hereditas** 11:267-283.
- Nass, L.L. 2007. **Recursos genéticos vegetais**. Brasilia: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 858p.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O Protoplasma** 59: 368-373.
- Oliveira, D.M.T & Beltrati, C.M. 1993. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento de *Inga fagifolia* Willd. (Fabaceae: Mimosoideae). **Revista Brasileira de Biologia** 53(4): 625-636.
- Oliveira, D.M.T & Beltrati, C.M. 1994. Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de *Inga fagifolia* Willd. (Fabaceae: Mimosoideae). **Revista Brasileira de Biologia**. 54:91-100.

Oliveira, P.E.; Gibbs, P.E.; Barbosa, A.A. & Talavera, S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. **Plant Systematics and Evolution** 179: 207-219.

Passos, I.; Apuzzato-da-Glória, B. & Vieira, M. L. C. 1999. Embryogenic responses of *Vitis* spp: effects of genotype and polyvinylpyrrolidone. **Vitis** 38(2): 47-50.

Pennington, T.D. 1997. **The genus Inga**. The Royal Botanic Garden. Kew. 839p.

Poncy, O. 1984. Graines, germinations ET plantules dans les genre *Inga* (Légumineuses, Mimosoideae): étude morphologique chez quelques espèces de Guyane Française. **Bulletin de La Société d'Histoire Naturelle de Toulouse** 120: 35-42.

Poncy, O. 1985. Le genre *Inga* (Légumineuses, Mimosoideae) em Guyane Française – systématique, morphologique des formes juvéniles écologie. “Studies on the flora of the Guianas”, Mémoires Du Muséum National d’Histoire Naturelle, Serie B. **Botanique** 31: 1-124.

Pridham, J.B. 1965. Low molecular weight phenols in higher plants. **Annual Review Plant Physiol** 16:13-36.

Reddy, M.P.; Sarla, N. & Siddiq, E.A. 2002. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica** 120: 9-16.

Rodrigues, L.R.; Dornelles, A.L. & Schifino-Wittmann, M.T. 1999. Poliembrionia e número de sementes por fruto de quatro cultivares de tangerineira. **Ciência Rural** 29(3): 469-474.

Salomão, A.N. & Allem, A.C. 2001. Polyembryony in Angiosperms: trees of the brazilian cerrado and caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica** 15(3): 369-378.

Sampaio, D.S.; Bittencourt Júnior, N.S. & Oliveira P.E. 2013. Mating in the pseudogamic apomictic *Anemopaegma acutifolium* DC: another case of pseudo-self-compatibility in Bignoniaceae? **Plant Biology** 15: 919-924.

Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável.  
**Licenciamento Ambiental Praia Clube S/C**. Uberlândia, 2008. 17p. Relatório.

Soares, G.L.G.; Isaias, R.M.S.; Gonçalves, S.J.M.R. & Christiano, J.C.S. 2000. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea: Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdlt. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Zoociências** 2:103-116.

Soares-Filho, W.S.; Moreira, C.S.; Cunha, M.A.P.; Cunha Sobrinho, A.P. & Passos, O.S. 2000. Poliembrionia e freqüência de híbridos em *Citrus spp.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35: 857-864.

Souza, V.C.; Lorenzi, H. 2012. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. 3ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum. 768p.

Uma Shaanker, R. & Ganeshiah, K.N. 1988. Parent offspring conflict, sibling rivalry and brood size patterns in plants. **Annual Review of Ecology and Sysrematics** 19: 177-205.

Uma Shaanker, R. & Ganeshiah, K.N. 1996. Polyembryony in plants: a weapon in the war over offspring numbers? **Trends in Ecology & Evolution** 11(1): 26-27.

Uma Shaanker, R. & Ganeshiah, K.N. 1997. Conflict between parent and offspring in plants: predictions, processes and evolutionary consequences. **Current Science** 72(12): 932-939.

Vieira, A. B. 2008. Variações morfométricas e anatômicas nas folhas de *Mapronea* Aubl. (Euphorbiaceae) em ambientes de Cerrado (*sensu stricto*) e floresta estacional semidecidual. **Monografia**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG.

Wiens, J.A.; Addicott, J.F.; Case, T.J. & Diamond, J. 1986. Overview: the importance of spatial and temporal scale in ecological investigations. In: Dimond, J. & Case, T. J. (Eds.) **Community Ecology**. New York: Harper and Row.

Zamith, L.R.; Scarano, F.R. 2004. Produção de mudas de espécies das Restingas do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 18:161-176.

## Considerações Finais

Os dados sobre a ontogênese e desenvolvimento dos poliembrionados em *Inga laurina*, apresentados neste trabalho, somados àqueles sobre os sistemas de polinização, nos revelam que a espécie apresenta apomixia pseudogâmica. Os embriões adventícios são de origem nuclear e se desenvolvem mais rapidamente e vigorosamente, o que suprime o embrião zigótico na competição pelos nutrientes do endosperma. A provável degeneração do embrião zigótico, observada em várias sementes jovens ou a competição por nutrientes, podem explicar a rara presença destes embriões nas sementes maduras. Os dados moleculares parecem confirmar essa característica.

Apesar de *Inga laurina* ser uma espécie poliembrônica, e possivelmente apomíctica, não há anomalias durante o desenvolvimento embriológico inicial. Além disso, observou-se maior concentração de compostos fenólicos nos embriões mais desenvolvidos, podendo estar relacionado à proteção da semente.

Tais dados somam-se a informações sobre a biologia reprodutiva já encontrada para o grupo das leguminosas e para as espécies do Cerrado bem como apresentam dados relativos à relação da presença de fenóis totais e o desenvolvimento dos embriões e das sementes de uma espécie deste Bioma.