



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA EM POPULAÇÕES DE
HANDROANTHUS OCHRACEUS (BIGNONIACEAE) COM SISTEMAS
REPRODUTIVOS E PLOIDIAS DISTINTOS**

Mariana Gonçalves Mendes

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Co-Orientadora: Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

UBERLÂNDIA - MG

2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA EM POPULAÇÕES DE
HANDROANTHUS OCHRACEUS (BIGNONIACEAE) COM SISTEMAS
REPRODUTIVOS E PLOIDIAS DISTINTOS**

Aluna: Mariana Gonçalves Mendes

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Co-Orientadora: Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA - MG

2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M538v Mendes, Mariana Gonçalves, 1988-
2013 Variabilidade genética e morfológica em populações de *handroanthus ochraceus* (bignoniaceae) com sistemas reprodutivos e ploidias distintos / Mariana Gonçalves Mendes. -- 2013.
111 p. il.
Orientadora: Ana Maria Bonetti.
Co-orientadora: Diana Salles Sampaio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Genética - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Sampaio, Diana Salles. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

Palavras-chave: apomixia esporofítica, área dos grãos de pólen, características morfológicas, diferenciação genética, ISSR, poliembrionia, sistema reprodutivo, *Tabebuia chrysotricha*, *Tabebuia ochracea*.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA EM POPULAÇÕES DE
HANDROANTHUS OCHRACEUS (BIGNONIACEAE) COM SISTEMAS
REPRODUTIVOS E PLOIDIAS DISTINTOS**

Mariana Gonçalves Mendes

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: _____

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Examinadores: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba - UFABC

Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira – UFU

Data da defesa: 29/07/2013

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas.

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus pais, Helena e Onilton,
a vocês meus exemplos de amor,
confiança e determinação! Amo vocês.
Muito obrigada por tudo!*



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, pela orientação e pela oportunidade de mais uma realização para o aprimoramento e progresso nesta vida.

Agradeço aos meus pais, Helena e Onilton, pelo amor incondicional, pelo apoio e incentivo constantes, pela compreensão e paciência em todos os momentos, por estarem sempre ao meu lado me ensinando e orientando desde os primeiros passos.

Aos meus familiares que de longe ou de perto, em presença física ou não, sempre me apoiaram e incentivaram neste caminho.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Ana Maria Bonetti, pelo apoio, incentivo, pela orientação e paciência durante estes anos aprendizado e desenvolvimento.

À minha co-orientadora Dra. Diana Salles Sampaio, por sua compreensão e paciência, sempre auxiliando e ensinando, sua paixão pelo trabalho é um incentivo para a continuação neste caminho.

Aos Professores Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira e Dr. Eduardo Leite Borba pela parceria e orientação na realização desta dissertação.

À Dra. Ana Paula de Oliveira e ao Dr. Vagner Santiago Vale pelo auxílio na concretização deste trabalho. Ao Dr. Clesnan Mendes Rodrigues pela ajuda concedida no decorrer do trabalho.

Ao meu namorado Kleber pelo auxílio, pela paciência e por ter estado ao meu lado me incentivando durante o desenvolvimento deste trabalho.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Aos companheiros de laboratório e de trabalho Carol, Rafaela, Naiara, Natália, Dênis, Annelise, Andressa pelos momentos divertidos e pela ajuda em diversos momentos. E aqueles que passaram pelo laboratório, mas sei que torceram pela realização deste trabalho, Bel, Célio, Carlos Júnior.

Aos colegas de Pós-Graduação pela ajuda e convivência no decorrer deste período.

Aos colegas da 66ª Turma de Ciências Biológicas, Danilo, Marcella, Paola, Kim, Jefferson, Sarah pelo auxílio e pelos momentos compartilhados no decorrer destes anos de trabalho.

Aos professores doutores, membros da banca examinadora pelo aceite do convite para a avaliação e correção desta dissertação de mestrado.

Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica pela ajuda em diversos momentos durante o período de trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Genética e Bioquímica e ao Instituto de Biologia por oferecer a oportunidade de utilização de suas instalações e laboratórios.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida, viabilizando a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela contribuição concedida no decorrer desta pesquisa.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho... Vocês também fazem parte desta conquista!

Muito Obrigada!



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. CERRADO	6
3. BIGNONIACEAE.....	7
4. POLIPLOIDIA	8
5. SISTEMAS REPRODUTIVOS	9
6. APOMIXIA	10
7. POLIEMBRIONIA.....	12
8. APOMIXIA, POLIEMBRIONIA E POLIPLOIDIA	13
9. VARIABILIDADE GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES	15
10. VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E POLIPLOIDIA	15
11. <i>HANDROANTHUS OCHRACEUS</i> (CHAM.) MATTOS E <i>H. CHRYSOTRICHUS</i> (MART. EX DC.) MATTOS	16
12. OBJETIVO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	19
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO I: Variabilidade e estrutura genética de populações apomíticas e não apomíticas de <i>Handroanthus ochraceus</i> (Bignoniaceae)	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

2.1	ESPÉCIE ESTUDADA E ÁREAS DE ESTUDO	33
2.2	EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	37
2.3	ANÁLISE DE DADOS	40
3.	RESULTADOS	41
4.	DISCUSSÃO.....	51
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
CAPÍTULO II: Análises morfológicas auxiliam a separação de diferentes populações de <i>Handroanthus ochraceus</i> e <i>H. chrysotrichus</i> (Bignoniaceae).....		62
RESUMO		63
ABSTRACT		64
1.	INTRODUÇÃO.....	65
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1	ESPÉCIES ESTUDADAS E ÁREAS DE ESTUDO	66
2.2	CARACTERÍSTICAS AVALIADAS.....	71
2.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	73
3.	RESULTADOS	75
4.	DISCUSSÃO.....	86
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS		94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		96



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1: Mapa da distribuição das populações estudadas..... 18

CAPÍTULO I

Figura 1: Indivíduos em flor de *Handroanthus ochraceus*. 36

Figura 2: Localização das populações estudadas. 36

Figura 3: Gráfico de barras com a distribuição das frequências do número de locos diferentes por par de indivíduos. 45

Figura 4: Dendrograma neighbor-joining..... 46

Figura 5: Representação dos pontos nos três primeiros eixos da análise de coordenadas principais (PCO)..... 47

Figura 6: Análise bayesiana de 117 indivíduos das seis populações de *Handroanthus ochraceus* baseada em 104 bandas polimórficas de ISSR..... 50

CAPÍTULO II

Figura 1: Mapa de distribuição das populações estudadas..... 70

Figura 2: Detalhes da folha, flor e fruto de *Handroanthus ochraceus* coletados em Uberlândia, MG, Brasil 72

Figura 3: Dendrograma de distância de cinco populações de *Handroanthus ochraceus* e uma população de *H. chrysotrichus* baseado nas características morfológicas quantitativas florais e foliares utilizando o coeficiente de Bray-Curtis através do método de ligação UPGMA..... 79

Figura 4: Dendrograma de distância de cinco populações de *Handroanthus ochraceus* e uma população de *H. chrysotrichus* baseado nas características morfológicas qualitativas e quantitativas florais e foliares utilizando o coeficiente de Gower através do método de ligação UPGMA.. 80



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Figura 5: Dendrograma de distância das diferentes populações de <i>Handroanthus ochraceus</i> , Uberlândia (OM1), Pires do Rio (OM2) e São José do Rio Preto (OP1) e <i>H. chrysotrichus</i> (CP) baseado nas características morfológicas quantitativas de frutos utilizando o coeficiente de Bray-Curtis através do método de ligação UPGMA.....	82
Figura 6: Análises de componentes principais (PCA) para características morfológicas quantitativas das populações de <i>Handroanthus ochraceus</i> e <i>H. chrysotrichus</i>	83



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Município e coordenadas geográficas do local de coleta; n°. de espécime em Herbário; porcentagem de sementes poliembriônicas e n°. de indivíduos avaliados por Sampaio (2010); caracterização quanto à ocorrência de poliembria e apomixia, código adotado para cada população, n°. de indivíduos amostrados; ploidia registrada para a população e n°. de indivíduos avaliados por Sampaio (2010).....	35
Tabela 2: Primers ISSR utilizados para a amplificação do DNA de <i>Handroanthus ochraceus</i> , temperatura de anelamento, número de bandas e porcentagem de bandas polimórficas (P%) por <i>primer</i>	39
Tabela 3: Parâmetros de diversidade genética das seis populações de <i>Handroanthus ochraceus</i> baseados em 104 bandas obtidas a partir dos marcadores ISSR. As populações não apomíticas são NA1, NA2 e NA3, e as apomíticas são A1, A2 e A3.	44
Tabela 4: Análise de Variância Molecular (AMOVA) para níveis diferentes de hierarquia genética baseada em 104 bandas polimórficas de ISSR dos 117 indivíduos de <i>Handroanthus ochraceus</i>	49

CAPÍTULO II

Tabela 1: Populações de <i>Handroanthus ochraceus</i> e <i>H. chrysotrichus</i> avaliadas no presente estudo. Espécie (código adotado para a população); embria, porcentagem de sementes poliembriônicas para cada população e número de indivíduos avaliados por Sampaio (2010); ploidia e número de indivíduos avaliados por Sampaio (2010); município, estado e localidade onde estão as populações analisadas; coordenadas geográficas do local de coleta; número do material testemunho depositado em Herbário... ..	69
Tabela 2: Características quantitativas e qualitativas de flor, folha e fruto de três populações monoembriônicas e duas poliembriônicas de <i>Handroanthus ochraceus</i> e de uma população poliembriônica de <i>H. chrysotrichus</i>	76

RESUMO

A apomixia é um mecanismo de reprodução assexuada através da formação de sementes com embriões clonais. A elevada taxa de sementes poliembriônicas é um indicativo da ocorrência da apomixia esporofítica e, em Bignoniaceae a expressão da apomixia esporofítica parece estar vinculada à poliploidia. *Handroanthus ochraceus* e *H. chrysotrichus* são duas espécies arbóreas de Bignoniaceae morfologicamente semelhantes, o que normalmente ocasiona problemas de identificação. *Handroanthus ochraceus* apresenta populações autoincompatíveis, não apomíticas e monoembriônicas, e populações autoférteis, apomíticas esporofíticas e poliembriônicas. Já *H. chrysotrichus* apresenta apenas populações autoférteis, apomíticas esporofíticas e poliembriônicas conhecidas. Para compreender as consequências genéticas e fenotípicas deste mosaico reprodutivo foram realizadas análises moleculares e morfológicas. As análises moleculares tiveram por objetivos determinar a variabilidade genética de populações de *H. ochraceus*, comparar os parâmetros de diversidade genética, averiguar a possível relação entre os sistemas reprodutivos e a diversidade genética na espécie e ainda compreender as possíveis relações entre populações apomíticas e não apomíticas. Os dez *primers* ISSR utilizados resultaram em 104 bandas e os parâmetros de diversidade genética apresentaram uma média elevada para as populações ($P = 66,35\%$, $I = 0,341$ e $H_e = 0,227$). Não foram detectados clones nas amostras populacionais. O cálculo da AMOVA demonstrou alta variação genética dentro das populações (61%), semelhante a populações alógamas. A análise de agrupamento e a análise Bayesiana de atribuição genética determinaram a formação de dois grupos distintos, um constituído por duas populações não apomíticas, Pires do Rio e Biribiri, e o outro reunindo as populações apomíticas e a não apomítica de Uberlândia. A forte relação entre a população autoincompatível de Uberlândia e as apomíticas indica origens distintas para as populações não apomíticas de *H. ochraceus*. Esta relação entre a população autoincompatível de Uberlândia e as populações autoférteis permite supor que os indivíduos não apomíticos dessa população apresentem a mesma constituição genética de uma possível população ancestral das populações autoférteis. As análises morfológicas tiveram por objetivo buscar diferenças entre populações mono e poliembriônicas de *H. ochraceus* e determinar características morfológicas que auxiliam na separação de *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus*, para isso populações reconhecidamente monoembriônicas não apomíticas e poliembriônicas apomíticas de *H. ochraceus* e uma população

poliembriônica apomítica de *H. chrysotrichus* foram analisadas. Características qualitativas e quantitativas de folha, flor e fruto foram avaliadas utilizando análises estatísticas univariadas e multivariadas. As características área do grão de pólen, comprimento do pedicelo, largura do estigma e número de nectários extraflorais no cálice apresentaram maiores valores para populações poliembriônicas de *H. ochraceus* e poderiam ser uma evidência de poliploidia em *H. ochraceus*, pois, podem estar associadas ao aumento do volume celular geralmente acarretado pela poliploidia. Diferentes características morfológicas separaram as populações de *H. ochraceus* da população de *H. chrysotrichus*, as quais podem auxiliar na identificação de indivíduos e na distinção das espécies. Assim as análises morfométricas determinaram que características morfológicas de alguma forma podem distinguir populações mono e poliembriônicas de *H. ochraceus*, e em conjunto com análises de biologia reprodutiva podem ser uma metodologia auxiliar na determinação da ploidia e sistema reprodutivo.

Palavras-chave: apomixia esporofítica, área dos grãos de pólen, características morfológicas, diferenciação genética, ISSR, poliembrionia, sistema reprodutivo, *Tabebuia chrysotricha*, *Tabebuia ochracea*.

ABSTRACT

Apomixis is an asexual mechanism of reproduction through seed formation with clonal embryos. The high rate of polyembryonic seeds is usually an indicative for the occurrence of sporophytic apomixis and in Bignoniaceae the expression of sporophytic apomixis seems to be related to polyploidy. *Handroanthus ochraceus* and *H. chrysotrichus* are two tree species of Bignoniaceae that are morphologically related, which usually leads to identification problems. *Handroanthus ochraceus* has self-incompatible non-apomictic and monoembryonic populations and self-fertile sporophytic apomictic and polyembryonic populations. *H. chrysotrichus* has only self-fertile, sporophytic apomictic and polyembryonic populations recognized until now. To understand the genetic and phenotypic consequences of this reproductive mosaic in these populations it were conducted molecular and morphological analysis in the present study. The aims of molecular analyzes were to verify the genetic variability of *H. ochraceus* populations, compare the genetic diversity parameters investigating the propose of a possible relationship between the reproductive systems and genetic diversity in this species and still understand the possible relationships between apomictic and non-apomictic populations. The ten primers resulted in 104 fragments and the genetic diversity parameters showed a high mean for the populations ($P = 66.35\%$, $I = 0.341$ and $He = 0.227$). In this study no clones were detected. The AMOVA analysis showed the higher variation within populations (61%), like allogamous populations. Cluster analysis and Bayesian analysis of genetic assignment determined two distinct groups, one consisting of two non-apomictic populations, Pires do Rio and Biribiri, and other gathering the apomictic populations and the non-apomictic from Uberlândia. The strong relationship between the self-incompatible population of Uberlândia and the apomictic populations indicates separate origins for non-apomictic populations of *H. ochraceus*. This relationship between self-incompatible population of Uberlândia and self-fertile populations suggest that these non-apomictic individuals may have the same genetic constitution of a possible ancestral population of self-fertile populations. The morphological analysis aimed to find differences between monoembryonic and polyembryonic populations of *H.* and morphological traits to separate the *H. chrysotrichus* and *H. ochraceus*. With this purpose non-apomictic monoembryonic populations and apomictic polyembryonic populations of *H. ochraceus* and an apomictic polyembryonic population of *H. chrysotrichus* were analyzed. Qualitative and quantitative

morphological characteristics of leaf, flower and fruit were evaluated through univariate and multivariate analyzes. The pollen grain area, the length of peduncles, the width of stigma and the number of extrafloral nectaries in the calyx showed higher values for polyembryonic populations of *H. ochraceus* so they could be an evidence of polyploidy in *H. ochraceus*, since these larger measures may be associated with the cell volume increase usually entailed by polyploidy. Several morphological characters separated *H. ochraceus* from *H. chrysotrichus*, which can support the identification of individuals and the distinction between the two species. Therefore, the morphometric analysis determined that morphological features can make a distinction between mono and polyembryonic populations of *H. ochraceus* and the association of this methodology with reproductive biology analysis can be a complement for the determination of ploidies and reproductive system in both species.

Keywords: genetic differentiation, ISSR, mating system, morphological traits, pollen grain area, polyembryony, sporophytic apomixis, *Tabebuia chrysotricha*, *Tabebuia ochracea*.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

As angiospermas apresentam uma amplitude de sistemas reprodutivos, desde a polinização cruzada e a fecundação, ao sistema de autofecundação dependente do fluxo polínico dentro da mesma planta e ainda os sistemas de reprodução assexuados, como a apomixia e a propagação vegetativa (Richards, 2003; Hörandl, 2010; Vallejo-Marín *et al.*, 2010). Os mecanismos reprodutivos são de extrema importância para a estrutura das populações, para o potencial evolutivo das mesmas (Richards, 2003), e para as diferenças genéticas encontradas na natureza (Vallejo-Marín *et al.*, 2010). Eventos como a poliploidização podem ser importantes para o estabelecimento ou a perda de determinados sistemas reprodutivos, como, por exemplo, os sistemas de autoincompatibilidade (Hörandl, 2010).

O desenvolvimento das sementes ocorre, comumente, através da reprodução sexuada na qual ocorre a dupla fecundação dentro do saco embrionário para o desenvolvimento do embrião e do endosperma (Koltunow *et al.*, 2011). Entretanto, a ocorrência de mecanismos assexuados com produção de sementes, ou apomixia, pode ser comum em determinados grupos de plantas, normalmente em alopolidíptides, formas de vegetação e condições ecológicas que promovem o estabelecimento de populações clonais (Carman, 1997; Hörandl & Paun, 2007; Koltunow *et al.*, 2011).

Estas diferenças reprodutivas são importantes para entender o processo de diferenciação e evolução das plantas e suas consequências ecológicas. Dessa forma, algumas características importantes para o entendimento dos sistemas reprodutivos e suas variações em angiospermas são apresentadas a seguir a partir de revisões sobre os temas em foco.

2. Cerrado

O Cerrado é considerado o segundo maior bioma brasileiro (Klink & Machado, 2005), restando apenas 20% de sua vegetação original (Myers *et al.*, 2000), apresenta a flora mais diversa e ameaçada quando comparado às demais savanas do mundo, sendo classificado como um dos *hot spots* para conservação mundial (Myers *et al.*, 2000; Klink & Machado, 2005). Uma das explicações para a grande diversidade observada neste bioma deve-se ao modo pelo qual as plantas se reproduzem, sendo que a existência de sistemas

controlados por genes específicos, como os sistemas de autoincompatibilidade é um dos fatores que promovem tal diversidade entre as plantas lenhosas (Oliveira & Gibbs, 2000). No entanto, há também plantas com sistemas de autocompatibilidade que podem se reproduzir assexuadamente, como através de reprodução vegetativa ou apomixia (Barbosa & Sazima, 2008; Sampaio, 2010; Mendes-Rodrigues, 2010).

Desde a década de 70, o Cerrado vem sendo rapidamente modificado e fragmentado, devido às grandes áreas de plantações e de pastagens (Ratter *et al.*, 1997; Klink & Machado, 2005). Por esta razão, estratégias de conservação precisam ser elaboradas, sendo que para isso estudos genéticos são essenciais (Lacerda *et al.*, 2001) na identificação da estrutura genética das espécies e de suas populações, auxiliando na elaboração de planos de manejo *in situ* e *ex situ*, e determinando áreas prioritárias para preservação.

3. Bignoniaceae

Bignoniaceae é uma das famílias mais diversas entre as angiospermas, representada por 82 gêneros e 827 espécies, apresenta ampla distribuição, ocorrendo inclusive no Cerrado (Gentry, 1992b; Olmstead *et al.*, 2009). O Brasil é considerado um centro de diversidade da família, pois, só neste país encontram-se cerca de 60 gêneros e 338 espécies (Gentry, 1980; Ortolani, 2007). No Brasil, há representantes desta família na Caatinga, Cerrado, Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Pantanal, apresentando espécies adaptadas a diferentes ambientes (Gentry, 1980). As plantas pertencentes à família Bignoniaceae, além de possuírem grande importância ecológica nos biomas em que estão inseridas, possuem relevante importância econômica (Gentry, 1980; 1992b).

O número cromossômico na família é considerado constante $2n=40$ (Goldblatt & Gentry, 1979; Sampaio, 2010). A ocorrência de algumas espécies com número cromossômico $2n=60$ e $2n=80$ (Goldblatt & Gentry, 1979; Piazzano, 1998; Firetti-Leggieri *et al.*, 2011), indica que eupoliploidizações ocorreram a partir do número $n=20$. Oito espécies de Bignoniaceae foram descritas como poliploides: *Dolichandra unguis-cati* (Piazzano, 1998), *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Gobatto-Rodrigues & Stort, 1992), *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos (Bittencourt & Semir, 2005), *Handroanthus ochraceus* (Sampaio, 2010) e quatro espécies de *Anemopaegma* Mart. ex Meisn (Firetti-Leggieri, 2009; Firetti-Leggieri *et al.*, 2011), além disso estas espécies apresentaram sistema reprodutivo autofértil. Dentre estas espécies, *Handroanthus*

chrysotrichus (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010) e *Anemopaegma acutifolium* (Sampaio *et al.*, *in press*) foram descritas como apomíticas esporofíticas. Estes dados sugerem que a poliploidia parece estar relacionada com a quebra do sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI), em todos os casos observados nesta família até o momento (Gibbs & Bianchi, 1993; 1999; Bittencourt, 2003; Sampaio, 2010) e também com a expressão da apomixia esporofítica (Richards, 1986; Carman, 1997; 2007; Pannell *et al.*, 2004, Sampaio, 2010).

O gênero anteriormente conhecido como *Tabebuia* é um dos mais importantes na família Bignoniaceae (Gentry, 1992b). Estudos recentes baseados em biologia molecular subdividiram este gênero em: *Handroanthus*, *Roseodendron* e *Tabebuia* (Grose & Olmstead, 2007a e b). Os ipês, espécies representativas de Bignoniaceae, apresentam importância ecológica para diversas espécies de abelhas e econômica pela produção de madeira, uma das mais duráveis entre as encontradas nas espécies neotropicais; ornamental e ainda despertam interesse pelas propriedades farmacológicas em sua casca, relacionadas a diferentes tipos de tratamentos medicinais (Gentry, 1992a). De forma geral, as espécies de ipê apresentam o número cromossômico diploide padrão para Bignoniaceae de $2n=2x=40$ (Goldblatt & Gentry, 1979; Piazzano, 1998; Sampaio, 2010).

4. Poliploidia

A poliploidia é uma característica frequente entre as angiospermas, sendo que cerca de 35 a 70% dessas plantas apresentam duplicações no número cromossômico, o que pode ocasionar efeitos fenotípicos significativos (Husband *et al.*, 2008; Soltis *et al.*, 2009; Hörandl, 2010). Os eventos de poliploidização são parte essencial da história de vida das plantas (Soltis *et al.*, 2009). Cerca de 2 a 4% dos processos de especiação entre as angiospermas e 7% entre as samambaias estão associados com a ocorrência da poliploidia, sendo um dos mecanismos mais importantes para a especiação simpátrica das plantas (Otto & Whitton, 2000). Análises genômicas recentes indicaram que um único evento de poliploidização no passado promoveu a irradiação das angiospermas (Bowers, 2003), sugerindo que 100% delas sejam paleopoliploides (Otto, 2007).

Os indivíduos poliploides são classificados como autopoliploides quando originados por autopolinização ou cruzamento entre indivíduos da mesma espécie ou como aloploploides quando surgem após cruzamentos que promovem um fluxo gênico interespecífico (hibridização) (Ramsey & Shemske, 2002; Otto, 2007; Hörandl, 2010). As

alopoliploidizações favorecem a estabilização de um sistema de autocompatibilidade devido à alta heterozigosidade encontrada nestes indivíduos, o que minimiza os efeitos da depressão endogâmica (Husband *et al.*, 2008). A alopolidiploidização também está associada à apomixia (Voigt-Zielinski *et al.*, 2012) e esta origem alopolidiploide geralmente promove uma heterozigosidade elevada quando os ancestrais têm origem divergente, sendo caracterizados por uma elevada diversidade de alelos (Hörandl & Paun, 2007).

De maneira geral, poliploides podem apresentar modificações em diversos aspectos fenotípicos com relação à morfologia, fenologia, fisiologia e até mesmo ecologia, pois a poliploidia altera o ciclo celular, o tamanho das células e o desenvolvimento do organismo (Otto & Whitton, 2000; Husband *et al.*, 2008; Beest *et al.*, 2012). A poliploidização também pode alterar o genoma de modo que a expressão de diferentes genes é rapidamente modificada, como a expressão de genes diretamente relacionados ao sistema de regulação sexual em plantas (Hörandl, 2010).

A formação de triploides a partir do cruzamento de híbridos poliploides e parentais diploides é uma barreira para a manutenção da reprodução sexuada como sistema reprodutivo, pois, geralmente, apresentam baixa fertilidade (Ramsey & Schemske, 1998; Otto & Whitton, 2000; Levin, 2002). Devido a isto, a poliploidia é considerada como um fator determinante para a quebra de sistemas de autoincompatibilidade nas plantas (Richards, 1986; Allen & Hiscock, 2008).

5. Sistemas Reprodutivos

Diversas angiospermas mantêm um sistema reprodutivo baseado na autoincompatibilidade (SI), a qual pode ser gametofítica, esporofítica ou de ação tardia. Os sistemas de autoincompatibilidade são controlados por um ou mais loci gênicos que são responsáveis por reconhecer e impedir o desenvolvimento do pólen ou do tubo polínico da própria planta ou de indivíduos proximamente aparentados que chegam ao pistilo, impedindo a autofecundação ou o desenvolvimento do ovário (Richards, 1986; Allen & Hiscock, 2008).

No sistema de autoincompatibilidade gametofítico (GSI), os grãos de pólen germinam e os tubos polínicos têm o desenvolvimento interrompido no estilete (Richards, 1986; Allen & Hiscock, 2008). Já no sistema de autoincompatibilidade esporofítico (SSI), os grãos de pólen não chegam a germinar devido à presença de substâncias que são

produzidas pela planta doadora de pólen e expressas na parede do grão de pólen, o que promove uma reação de incompatibilidade (Richards, 1986; Allen & Hiscock, 2008).

O sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI) ocorre através da germinação dos tubos polínicos que podem penetrar o óvulo e os núcleos polares, realizar a dupla fecundação e promover o desenvolvimento do zigoto e do endosperma, porém, os pistilos originados nestas autopolinizações são abortados no estágio inicial do desenvolvimento (Bittencourt, 2003; Allen & Hiscock, 2008). Apesar de este sistema ser aparentemente semelhante a um processo de depressão endogâmica devido ao aborto precoce dos pistilos autofertilizados, acredita-se na existência de um mecanismo genético que determina a rejeição do pistilo autopolinizado ou autofecundado (Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010).

A grande maioria das angiospermas apresenta indivíduos hermafroditas, o que promove a autofertilização ou autocompatibilidade, que ocorre em cerca de 40% destas plantas (Hörandl, 2010). A autofertilização pode ocorrer dentro da mesma flor (autogamia), entre flores distintas de um mesmo indivíduo (geitonogamia) ou através de polinizadores que transportam o pólen entre as flores de um mesmo indivíduo (autofertilização facilitada) (Hörandl, 2010). A autocompatibilidade tende a provocar uma perda da heterozigosidade na prole e uma possível depressão endogâmica. Entretanto, a autogamia é vantajosa quando comparada à geitonogamia e à autofertilização facilitada, pois, promovem a autofertilização independente da presença de polinizadores (Lloyd, 1992; Hörandl, 2010).

A poliploidia parece ser capaz de quebrar o sistema de autoincompatibilidade gametofítico (De Nettancourt, 1977; Hörandl, 2010), de forma que indivíduos poliploides podem se reproduzir através de gametas originados de um mesmo indivíduo, o que pode ser vantajoso, já que o cruzamento de gametas produzidos por indivíduos de diferentes ploidias pode dar origem a embriões inviáveis ou plantas estéreis (Hörandl, 2010).

6. Apomixia

A apomixia é um termo empregado para designar um tipo de reprodução assexuada por meio de sementes (Asker & Jerling, 1992; Koltunow & Grossniklaus, 2003). Esse sistema propicia uma dispersão mais eficiente de clones do que a encontrada em sistemas de propagação vegetativa, graças aos mecanismos de dispersão das sementes (Hörandl,

2011). Aparentemente, a aloploidia seria capaz de acarretar apomixia, o que não significa que todas as plantas apomíticas tenham origem aloploide (Carman, 2007).

Na apomixia o custo da meiose na formação do gameta é minimizado e a energia materna não é dispendida com a união de zigotos mal formados, já que a progênie é idêntica à mãe a qual contribui com seu genótipo como um todo e não apenas com 50%, como observado nas plantas sexuais alógamas. Além disso, plantas apomíticas fixam e disseminam genótipos extremamente adaptados, pois aqueles menos adaptados acabam sendo eliminados na seleção natural (Richards, 1997). Estas são algumas vantagens da apomixia, entretanto, a reprodução clonal por sementes também apresenta desvantagens como a incapacidade de evitar o acúmulo de mutações desvantajosas devido à ausência da recombinação e segregação gênica e a incapacidade em recombinar características vantajosas provenientes de mutações em indivíduos diferentes o que promove a evolução da espécie diante de possíveis alterações ambientais (Richards, 1997).

Normalmente, os mecanismos de apomixia evitam a meiose reducional, levam ao desenvolvimento de oosferas não fertilizadas e, em alguns casos, ao desenvolvimento independente do endosperma (Richards, 2003). Dois tipos principais de apomixia foram descritos, a apomixia gametofítica e a esporofítica (Richards, 1986; 2003; Asker & Jerling, 1992). No entanto, há uma predominância de estudos sobre a apomixia gametofítica, o que possivelmente está relacionado com a distribuição das espécies, em ambientes temperados (Paun *et al.*, 2006; Hörandl, 2010), enquanto espécies apomíticas esporofíticas são comumente encontradas em regiões tropicais e subtropicais (Asker & Jerling, 1992; Richards, 2003; Hörandl, 2011).

A apomixia gametofítica ocorre por meio da formação de embriões através de células não reduzidas do saco embrionário e, pode ser subdividida em dois tipos principais: diplosporia e aposporia, classificadas de acordo com a célula que dá origem ao saco embrionário (Asker & Jerling, 1992). Na diplosporia o saco embrionário é formado a partir da célula mãe do megásporo, em algumas espécies a origem do saco embrionário pode ocorrer sem meiose reducional, mas através de divisões mitóticas e em outras espécies ocorre a meiose reducional e uma posterior duplicação do número cromossômico, um processo denominado meiose restitucional. Neste caso os embriões são formados a partir da oosfera desse saco embrionário (Koltunow, 1993). Já na aposporia ocorre o desenvolvimento de megagametófitos não reduzidos a partir de células do nucelo (Koltunow & Grossniklaus, 2003). Desta forma, a célula mãe do megásporo pode dividir-

se normalmente dando origem a um megagametófito reduzido juntamente com um não reduzido, ou seja, um embrião assexuado de origem partenogenética desenvolve-se concomitantemente com um embrião sexuado (Koltunow & Grossniklaus, 2003).

Na apomixia esporofítica ou embrionia adventícia, os embriões são formados a partir de células somáticas do óvulo concomitantemente ao desenvolvimento normal do saco embrionário, o que geralmente promove a formação de sementes poliembriônicas (Asker & Jerling, 1992; Koltunow & Grossniklaus, 2003; Bicknell & Koltunow, 2004). Apesar de ser um mecanismo reconhecidamente assexuado, plantas com apomixia esporofítica e com aposporia, em muitos casos, não são capazes de produzir um endosperma autônomo, ou seja, possuem a necessidade da polinização e da fecundação dos núcleos polares para o desenvolvimento do endosperma (Asker & Jerling, 1992; Richards, 2003). Quando ocorre a polinização, a oosfera também pode ser fecundada dando origem a um embrião zigótico, havendo o desenvolvimento concomitante de embriões assexuados e um sexuado (Asker & Jerling, 1992; Koltunow & Grossniklaus, 2003; Richards, 2003; Hörandl, 2011). A formação de embriões sexuados promove o aumento da variabilidade genética intrapopulacional, o que em conjunto com a elevada heterozigotidade dos apomíticos de origem aloploplóide, pode favorecer a adaptação das espécies em diferentes ambientes (Hörandl & Paun, 2007).

7. Poliembryonia

A poliembryonia é tradicionalmente definida como a presença de mais de um embrião por semente (Maheshwari, 1963; Mendes-Rodrigues, 2010) e normalmente é resultado de mecanismos assexuados para a reprodução, como a apomixia (Batygina & Vinogradova, 2007; Koltunow, 1993). De acordo com Mendes-Rodrigues (2010) a poliembryonia pode ser classificada conforme a origem do embrião, sendo poliembryonia biparental, quando os embriões são formados sexualmente; uniparental, quando os embriões são clones, originados do tecido materno; ou mista, quando apresentam ambos os mecanismos.

Uma das desvantagens da poliembryonia é a competição entre os embriões, o que pode ocasionar a diminuição no peso e a consequente redução do tamanho das plântulas, o que pode dificultar o seu estabelecimento. Entretanto, a principal vantagem é a maior probabilidade de sucesso para pelo menos um embrião por semente (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012). Além disso, a formação de múltiplos embriões favorece a coexistência de

embriões sexuais e assexuais na mesma semente, ou seja, genótipos diferentes dentro de uma mesma semente ou em um mesmo indivíduo (Richards, 1986; Batygina & Vinogradova, 2007).

A poliembria é um mecanismo comum e bem distribuído entre as angiospermas, sendo observada em pelo menos 115 famílias (Carman, 1997), já foi descrita para diferentes espécies de clima temperado (Asker & Jerling, 1992; Naumova, 1992) e para espécies lenhosas encontradas em regiões de clima tropical, como Bignoniaceae (Piazzano, 1998; Salomão & Allem, 2001; Costa *et al.*, 2004; Sampaio, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012; Firetti-Leggieri *et al.*, 2013), Malvaceae (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2005) e Melastomataceae (Goldenberg & Shepherd, 1998; Mendes-Rodrigues, 2010).

A elevada taxa de sementes poliembriônicas geralmente é um indicativo da ocorrência da apomixia esporofítica (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012), embora a ocorrência de poliembria em menores frequências também possa estar associada à aposporia (apomixia gametofítica) ou a algum processo sexual (Asker & Jerling, 1992; Koltunow & Grossniklaus, 2003; Whitton *et al.*, 2008).

8. Apomixia, Poliembria e Poliploidia

A maioria das espécies apomíticas é poliploide (Carman, 1997), principalmente alopoliploide, provavelmente porque estas espécies originam-se a partir de eventos de hibridação (Carman, 2007). Geralmente, a poliploidia está diretamente relacionada com espécies que apresentam apomixia gametofítica (Hörandl, 2010, 2011). No entanto, estudos recentes também demonstraram a existência de uma correlação entre poliploidia e apomixia esporofítica (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2005; Sampaio, 2010; Firetti-Leggieri *et al.*, 2013).

A poliploidia tem um papel importante para a manutenção e estabilização da apomixia (Voigt-Zielinski *et al.*, 2012), por exemplo, minimizando as consequências das mutações deletérias (Comai, 2005). Além disso, associada à hibridação e ao acúmulo de mutações, a poliploidia pode auxiliar no aumento da diversidade alélica entre os indivíduos apomíticos (Voigt-Zielinski *et al.*, 2012). A apomixia, por sua vez, mantém a reprodução por sementes em indivíduos que seriam estéreis devido à poliploidia e hibridação (Hörandl, 2010). A poliploidização não só é importante para a regulação do sistema de pareamento meiótico e a consequente manutenção da apomixia (Carman, 1997, 2007; Majesky *et al.*, 2012), como também promove o desenvolvimento de funções e

combinações gênicas, dando maior flexibilidade ecológica e fisiológica ao poliploide (Bierzchudek, 1985; Voigt-Zielinski *et al.*, 2012).

O número de espécies poliploides, poliembrionicas e apomíticas reportadas para o Cerrado, as savanas neotropicais do Brasil Central, vem crescendo (Salomão & Allem, 2001; Sampaio, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012) e a ocorrência da poliembrionia pode indicar a presença da apomixia em algumas plantas desta região (Carman, 1997; Mendes-Rodrigues, 2010; Sampaio, 2010). Uma correlação entre taxas elevadas de sementes poliembrionicas e a ocorrência de apomixia esporofítica já foi observada para espécies de Bignoniaceae (Salomão & Allem, 2001; Costa *et al.*, 2004; Sampaio, 2010; Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012; Sampaio *et al.*, *in press*) e Malvaceae (Oliveira *et al.*, 1992; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2005) encontradas no Cerrado. Da mesma forma, a expressão da apomixia esporofítica e a consequente poliembrionia parecem estar vinculadas à ocorrência da poliploidia, um padrão observado para espécies de Bignoniaceae (Piazzano, 1998; Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010; Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*), Malvaceae-Bombacoideae (Baker, 1960; Oliveira *et al.*, 1992; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2005) e Melastomataceae-Miconieae (Goldenberg & Shepherd, 1998).

Em Bignoniaceae, nos gêneros *Anemopaegma* e *Handroanthus* uma regularidade entre apomixia, poliembrionia e poliploidia parece ocorrer (Piazzano, 1998; Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010; Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*). Para espécies de *Anemopaegma*, sementes poliembrionicas foram observadas em todos os indivíduos poliploides analisados (Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*), sendo que apenas *A. album*, uma espécie diploide, apresentou padrões de monoembrionia (Firetti-Leggieri *et al.*, 2013). Em *Handroanthus* a expressão da apomixia e da poliembrionia também parece estar vinculada à poliploidia em *H. chrysotrichus* (Piazzano, 1998; Bittencourt & Moraes, 2010) e em *H. ochraceus* (Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010). Embora diferentes estudos tenham sido realizados com ambos os gêneros, ainda não é possível estabelecer um padrão entre as espécies de Bignoniaceae, sendo que trabalhos utilizando populações inteiras ou com um número razoável de indivíduos são necessários para que esta hipótese da relação entre poliembrionia e poliploidia nesta família seja corroborada ou não.

9. Variabilidade genética e marcadores moleculares

A apomixia é um mecanismo importante para a manutenção de genótipos muito bem adaptados a determinados ambientes como florestas tropicais e savanas (Martins & Oliveira, 2003). Entretanto, estudos recentes baseados em análises com marcadores moleculares revelaram que há uma considerável diferenciação entre esses indivíduos (Paun *et al.*, 2006; Hörandl & Paun, 2007). O fato de a reprodução sexuada ser mantida nas espécies apomíticas e de estas poderem se cruzar com espécies parentais diploides são importantes fatores que levam a um acréscimo de diversidade em espécies apomíticas (Richards, 2003; Hörandl & Paun, 2007; Sampaio, 2010).

Os marcadores moleculares podem ser utilizados para pesquisas relacionadas com a diversidade genética dentro e entre populações ou entre espécies relacionadas (Souza *et al.*, 2008). Uma das classes de marcadores muito utilizada atualmente são os ISSR ou “*Inter Simple Sequence Repeat*” (Souza *et al.*, 2008) um método sensível com algumas vantagens quando comparados a outros métodos de experimentação genética (Kozyrenko *et al.*, 2011). Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) requerem informações precedentes sobre o DNA da espécie a ser analisada, o que não é necessário para a utilização dos marcadores ISSR. Os ISSR produzem fragmentos de grande reprodutibilidade em PCR (*Polimerase Chain Reaction*) quando comparados com RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Tacuatiá *et al.*, 2012). Os marcadores ISSR permitem a realização de pesquisas sobre a diversidade genética em populações de plantas, pois fornecem as informações primordiais para este tipo de estudo (Souza *et al.*, 2008; Kozyrenko *et al.*, 2011).

10. Variabilidade morfológica e poliploidia

Características fenotípicas provocadas por duplicações cromossômicas vêm sendo descritas desde o século XX, sendo que o efeito mais conhecido é o “efeito giga” (Balao *et al.*, 2011), ou seja, as poliploidizações promovem o aumento do volume celular. Entretanto, sua ocorrência varia e pode ser dependente de diferentes condições ambientais, como altitude e clima (Otto & Whitton, 2000; Tate & Simpson, 2004). Em plantas, a presença da poliploidia pode modificar características fisiológicas, tais como taxas fotossintéticas e de transpiração (Otto & Whitton, 2000), e características como a tolerância ecológica (Levin, 2002). Os indivíduos poliploides, geralmente, apresentam

órgãos reprodutivos maiores que os encontrados em diploides, são normalmente maiores e mais robustos, com mais flores por inflorescência, flores e sementes maiores que as observadas em diploides (Robertson *et al.*, 2010; Balao *et al.*, 2011; te Beest *et al.*, 2012). As sementes maiores tendem a originar plântulas mais robustas e com crescimento mais rápido que as diploides, já as flores maiores podem atrair uma variedade de visitantes florais viabilizando a polinização (Beest *et al.*, 2012).

Os eventos de poliploidização podem causar alterações constantes no genoma, tanto para expansão quanto para redução, processos que têm o potencial de induzir as variações fenotípicas observadas entre diploides e poliploides (Balao *et al.*, 2011). Um melhor entendimento a respeito dessas alterações fenotípicas também permite a compreensão da biologia evolutiva de espécies que apresentam indivíduos diploides e poliploides, além disso, podem auxiliar na resolução de questões filogenéticas de espécies muito próximas (Soltis *et al.*, 2010; Balao *et al.*, 2011).

Nos primeiros estudos relacionados a plantas com diferentes ploidias foi determinada uma metodologia clássica para a identificação da ploidia através da contagem do número de cromossomos em células meristemáticas (Beest *et al.*, 2012). Novas técnicas baseadas no tamanho das células ou dos órgãos das plantas permitiram determinar métodos indiretos que permitem uma estimativa da ploidia analisada, entre os quais se encontra a medida da área e do diâmetro dos grãos de pólen, geralmente maiores nos poliploides quando comparados aos diploides da mesma espécie (Beest *et al.*, 2012).

11. *Handroanthus ochraceus* (Cham.) Mattos e *H. chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos

Handroanthus ochraceus (Cham.) Mattos e *H. chrysotrichus* (Mart. ex. DC) são duas espécies de ipê amarelo muito próximas morfologicamente (Gentry, 1992b), o que normalmente gera problemas de identificação (Silva *et al.*, 2009; Bittencourt & Moraes, 2010). *Handroanthus ochraceus* é um elemento típico do Cerrado no Brasil, onde é popularmente conhecido como ipê amarelo (Gentry, 1992b). Pode ser encontrado nas diferentes regiões deste bioma brasileiro e áreas adjacentes, porém é raramente encontrada no interior de florestas fechadas (Gentry, 1992b). Está geograficamente distribuída por toda a América Latina, desde El Salvador até o noroeste da Argentina e, geralmente, ocupa florestas de clima seco ou sazonalmente seco (Gentry, 1992b). Na América Central é representada pelas subespécies *H. ochraceus* subespécie *heterotichus* (DC) S. Grose e *H.*

ochraceus subespécie *neochrysanthus* (A. H. Gentry) S. Grose (Gentry, 1992 b). Já *H. chrysotrichus* ocorre na Mata Atlântica, na região da costa brasileira, sendo ainda encontrada na Argentina, ocorrendo em restingas e florestas abertas, topos de morros, áreas perturbadas e são também comumente cultivadas para arborização urbana (Gentry 1992b; Zapater *et al.*, 2009).

Handroanthus ochraceus é considerada uma espécie polimórfica, apresentando populações alopátricas na região neotropical, sendo que *H. ochraceus* subsp. *ochraceus* parece ser a mais comumente encontrada no Cerrado brasileiro (Gentry, 1992b; Zapater *et al.*, 2009). É uma espécie arbórea que pode chegar aos 35 metros de altura (Zapater *et al.*, 2009). A floração se estende por 30 dias entre os meses de setembro e outubro e na terceira semana de outubro frutos e folhas jovens podem ser encontrados (Zapater *et al.*, 2009), enquanto no período chuvoso apenas as folhas podem ser observadas (Gentry, 1992 b). As sementes de *H. ochraceus* já foram relatadas como monoembriônicas e poliembriônicas em diferentes populações (Salomão & Allem, 2001; Costa *et al.*, 2004; Sampaio, 2010). Na Amazônia, a casca da árvore é tradicionalmente utilizada para o tratamento contra a malária, pois apresenta componentes químicos (furanonaftoquinonas) capazes de inibir o ciclo de vida do parasita responsável por esta doença (Pérez *et al.*, 1997). As populações de *H. ochraceus* e a população de *H. chrysotrichus* analisadas no presente trabalho localizam-se nas regiões central e sudeste do Cerrado brasileiro, nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e no Distrito Federal (Figura 1).

Assim como *H. ochraceus*, *H. chrysotrichus* é uma espécie arbórea, porém, relativamente menor, entre 2 e 10 metros de altura (Gentry, 1992 b; Zapater *et al.*, 2009). A floração começa logo no início do mês de agosto, sendo que em setembro as folhas são raramente encontradas e em outubro já podem ser observados frutos concomitantes à presença de flores (Zapater *et al.*, 2009).

Ambas as espécies apresentam apomixia esporofítica (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010) que resulta em altas taxas de poliembria entre as sementes, podendo variar entre 21 e 91% (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012). A relação entre poliembria e poliploidia observada para espécies de Bignoniaceae, já foi descrita para indivíduos de *H. chrysotrichus* (Piazzano, 1998; Ortolani, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010) e *H. ochraceus* (Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010). Para *H. chrysotrichus* já foram observadas populações constituídas por indivíduos com sistema de autocompatibilidade (Bittencourt & Semir, 2005), enquanto *H. ochraceus* por sua vez,

apresenta populações constituídas por indivíduos autoincompatíveis (Gibbs & Bianchi, 1993; Barros, 2001) e populações com indivíduos autocompatíveis (Bittencourt & Moraes, 2010).

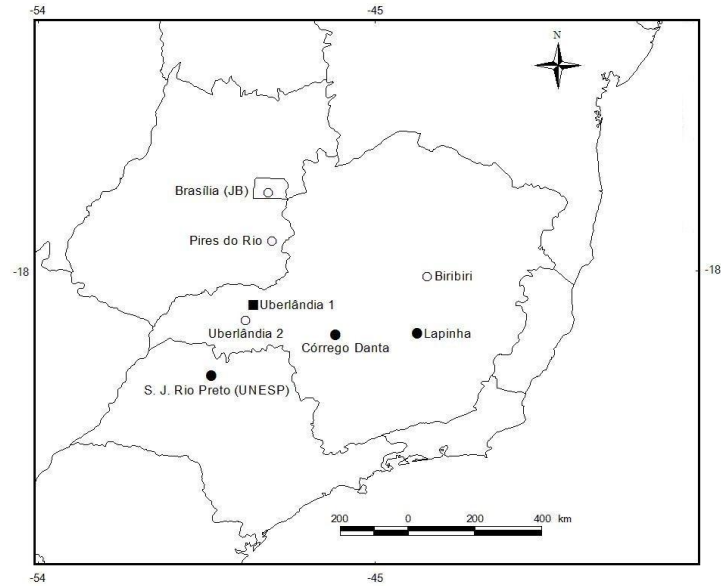


Figura 1: Mapa da distribuição das populações estudadas. Populações poliembriônicas, apomíticas e autoférteis de *Handroanthus ochraceus* ●; populações monoembriônicas, não apomíticas e sexuadas de *H. ochraceus* ○; população poliembriônica, apomítica e autofértil de *H. chrysotrichus* ■. Elaborado por Ana Luíza Freitas Oliveira através do programa ArcView GIS versão 3.2.

12. Objetivo e estrutura da dissertação

Handroanthus ochraceus apresenta populações com sistemas reprodutivos distintos o que pode determinar níveis de diversidade genética diferentes. A apomixia pode ser um meio de reter heterozigosidade preservando genótipos localmente adaptados (Durand *et al.*, 2000) enquanto a reprodução sexuada ou autoincompatibilidade através da recombinação gênica (Richards, 1997) pode gerar diferentes genótipos dentro de uma mesma população. A expressão da apomixia esporofítica geralmente está associada a elevadas taxas de sementes poliembriônicas em *H. ochraceus* (Sampaio, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012) o que, em Bignoniaceae, têm sido um indicativo da ocorrência de poliploidia (Piazzano, 1998; Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010; Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*). Um dos principais efeitos das eupoliploidizações é a alteração em diferentes aspectos fenotípicos, como o aumento do tamanho celular (Otto & Whitton, 2000; Balao *et al.*, 2011;). Assim, o presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar diferentes populações de *H. ochraceus* a partir de dados de variabilidade genética e morfológica, possibilitando o estabelecimento de padrões genotípicos e fenotípicos que auxiliem em estudos posteriores acerca da taxonomia, evolução e ecologia da espécie.

A dissertação está organizada em três partes:

Capítulo 1: os diferentes sistemas reprodutivos observados para populações de *Handroanthus ochraceus* poderiam gerar níveis diferentes de diversidade genética. Assim, este trabalho teve por objetivo determinar a variabilidade genética de populações de *H. ochraceus* e comparar os parâmetros de diversidade genética em populações apomíticas e não apomíticas, a fim de verificar uma possível interferência dos sistemas reprodutivos na diversidade genética da espécie e ainda compreender as possíveis relações entre populações apomíticas e não apomíticas. Para tanto, foram realizadas análises moleculares baseadas em marcadores ISSR de seis populações diferentes de *Handroanthus ochraceus*, sendo três autoférteis apomíticas poliembriônicas e três autoestéreis não apomíticas monoembriônicas.

Capítulo 2: a expressão da apomixia esporofítica e a poliembriãoia em populações de *H. ochraceus* pode ser um indicativo da ocorrência de poliploidia (Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010) e assim poderia determinar características morfológicas

distintas quando estas são comparadas às populações monoembriônicas o que permitiria a identificação do sistema reprodutivo utilizando metodologias mais simples. Da mesma forma, a determinação de características peculiares a *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus* poderia auxiliar na identificação de ambas as espécies. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi determinar diferenças morfológicas que podem separar populações conhecidamente apomíticas e não apomíticas de *H. ochraceus* e características que podem auxiliar na identificação e separação de indivíduos e populações de *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus*. Para isso, foram realizadas análises morfológicas de características florais, foliares e de fruto de quatro populações analisadas no Capítulo 1 e duas outras populações, sendo uma população autoestéril não apomítica monoembriônica de *H. ochraceus* e uma população autofértil apomítica poliembriônica de *H. chrysotrichus*.

Considerações finais: apresentação dos principais resultados obtidos e conclusões gerais.

13. Referências Bibliográficas

Allen, A. M. & Hiscock, S. J. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In: Franklin-Tong, V. (ed.). p. 73-102. **Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms**. Springer-Verlag, Berlin.

Asker, S. E. & Jerling, L. 1992. Apomixis in plants. Boca Raton, Florida: **CRC Press**.

Balao, F.; Herrera, J.; Talavera, S. 2011. Phenotypic consequences of polyploidy and genome size at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach. **The New Phytologist**, v. 192, n. 1, p. 256-65.

Barbosa, A. A. A. & Sazima, M. 2008. Biologia reprodutiva de plantas herbáceo-arbustivas de uma área de campo-sujo de Cerrado. In: Sano, S. M., Almeida, S. P. & Ribeiro, J. F. (ed.). p. 291-318. **Cerrado: Ecologia e Flora**, vol. 1. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, e Embrapa Cerrados, Planaltina.

Barros, M. G. 2001. Pollination ecology of *Tabebuia aurea* (Manso) Benth & Hook and T. ochracea (Cham). Standl. (Bignoniaceae) in central Brazil Cerrado vegetation. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 3, p. 255-261.

Batygina, T. B.; Vinogradova, G. Y. 2007. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 38, p. 126–151.

Beest, M. Te ; Le Roux, J. J.; Richardson, D. M.; Brysting, A. K.; Suda, J.; Kubesova, M.; Pysek, P. 2012. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1, p. 19-45.

Bicknell, R. A. & Koltunow, A. M. 2004. Understanding Apomixis : Recent Advances and Remaining Conundrums. **The Plant Cell**, v. 16, p. 228-246.

Bierzchudek, P. Patterns in plant pathogenesis. 1985. **Experientia**, v. 41, p. 1255-1264.

Bittencourt Júnior, N. S. 2003. Auto-incompatibilidade de ação tardia e outros sistemas reprodutivos em Bignoniaceae. **Tese** (Doutorado) Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Bittencourt Júnior, N. S. & Semir, J. 2005. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 493-506.

Bittencourt Júnior, 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 postpollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, n. 1-2, p. 59-76.

Bowers, J.E., Chapman, B.A., Rong, J.K. & Paterson, A.H. 2003. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. **Nature**, v. 422, p. 433–438.

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

Carman, J.G. 2007. Do duplicate genes cause apomixis? In: Hörandl, E.; Grossniklaus, U.; van Dijk, P.; Sharbel, T. (ed.), p.169–194. **Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives**. Gantner, Ruggell.

Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature reviews. Genetics**, v. 6, n. 11, p. 836-46.

Costa, M. E.; Sampaio, D. S.; Paoli, A. A. S.; Leite, S. C. A. L. 2004. Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, n. 1950, p. 395-406.

Dall'agnol, M. & Schifino-Wittman, M. T. 2005. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 11, n. 2, p. 127-133.

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

Dijk, P. J. Van. 2003. Ecological and evolutionary opportunities of apomixis: insights from *Taraxacum* and *Chondrilla*. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 358, n. 1434, p. 1113-21.

Firetti-Leggieri, F. 2009. Biosistemática das espécies do complexo *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. ex De Souza (Bignoniaceae, Bignoniaceae): aspectos anatômicos, citológicos, moleculares, morfológicos e reprodutivos. **Tese** (Doutorado em Botânica). Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Firetti-Leggieri, F.; Costa, I. R.; Forni-Martins, E. R.; Lohmann, L. G.; Semir, J. 2011. Chromosome studies in Bignoniaceae (Bignoniaceae): the first records of polyploidy in *Anemopaegma* Mart. ex Meisn. **Cytologia**, v. 76, p.185–191.

Firetti-Leggieri, F.; Lohmann, L. G.; Alcântara, S.; Costa, I. R.; Semir, J. 2013. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **Plant Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 43-53.

Gentry, A. H. 1980. Bignoniaceae - Part. I. (Crescentieae and Tourrettieae). **Flora Neotropica** Monog. 25, p. 1-130.

Gentry, A. H. 1992 a. A synopsis of Bignoniaceae ethnobotany and economic botany. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.79, p. 53-64.

Gentry, A. H. 1992 b. Bignoniaceae - Part. II. (Tribe Tecomae). New York: **Flora Neotropica**. Monograph: 25 (I), 370 p.

Gibbs, P. E. & Bianchi, M. B. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta**, v. 106, p. 64-67.

Gibbs, P. E. & Bianchi, M. B. 1999. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LST: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany**, v. 84, p. 449-457.

Gobatto-Rodrigues, A. A. & Stort, M. N. S. 1992. Biologia floral e reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.15, p. 37-41.

Goldblatt, P. & Gentry, A. H. 1979. Cytology of Bignoniaceae. **Botanical Notiser**, v. 132, p. 475-482.

Goldenberg, R. & Shepherd, G. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in “cerrado” vegetation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 21, p.113-29.

Grose, S. O. & Olmstead, R. G. 2007 a. Evolution of a charismatic neotropical clade: molecular phylogeny of *Tabebuia* s.l., Crescentieae, and allied genera (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, v. 32, p. 650-659.

Grose, S. O. & Olmstead, R. G. 2007 b. Taxonomic revision in the polyphyletic genus *Tabebuia* s.l. (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, v. 32, p. 660-670.

Hörandl, E. & Paun, O. 2007. Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials. In: Hörandl, E., Grossniklaus, U., van Dijk, P. J. & Sharbel, T. F. (eds.). p. 169-194. **Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives**. A. R. G. Gantner Verlag, Rugell, Liechtenstein.

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

Hörandl, E. 2011. Evolution and biogeography of alpine apomictic plants. **Taxon**, v. 60, n. 2, p. 390-402.

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**, v. 169, n. 1, p. 195-206.

Klink, C. A. & Machado, R. B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p. 147-155.

Koltunow, A. M.; Bicknell, R. A.; Chaudhury, A. M. 1995. Apomixis: Molecular Strategies for the Generation of Genetically Identical Seeds without Fertilization. **Plant physiology**, v. 108, n. 4, p. 1345-1352.

Koltunow, A. M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. **Annual review of plant biology**, v. 54, p. 547-574.

Koltunow, A.M.G.; Johnson, S. D.; Rodrigues, J. C. M.; Okada, T.; Hu, Y.; Tsuchiya, T.; Wilson, S.; Fletcher, P.; Ito, K.; Suzuki, G.; Mukai, Y.; Fehrer, J.; Bicknell, R.A. 2011. Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium* subgenus *Pilosella*, in which two dominant loci function to enable apomixis. **The Plant Journal**, v.66, p. 890–902.

Kozyrenko, M. M.; Gontcharova, S. B.; Gontcharov, A. A. 2011. Analysis of the genetic structure of *Rhodiola rosea* (Crassulaceae) using inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 8, p. 691-696.

Lacerda, D. R., Acedo, M. P. D.; Lemos Filho, J. P., Lovato, M. B. 2001. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular ecology**, v. 10, p. 1143-52.

Levin, D. A. 2002. **The role of chromosomal change in plant evolution**. Oxford University Press, Oxford.

Lloyd, D. G. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. **International Journal of Plant Science**, v. 153, p. 370–380.

Maheshwari, P. 1963. Recent advances in the embryology of Angiosperms. **International Society of Plant Morphologists**, University of Delhi. 467p.

Majeský, L.; Vasut, R. J.; Kitner, M.; Trávníček, B. 2012. The pattern of genetic variability in apomictic clones of *Taraxacum officinale* indicates the alternation of asexual and sexual histories of apomicts. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. 1-14.

Martins, R. L. & Oliveira, P. E. 2003. RAPD evidence for apomixis and clonal populations in *Eriotheca* (Bombacaceae). **Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 338-340.

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**, v. 7, p. 533-540.

Mendes-Rodrigues, C. 2010. Ecologia de espécies poliembriônicas com ênfase no Bioma Cerrado. **Tese** (Doutorado em Ecologia e Conservação dos Recursos Naturais) Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Mendes-Rodrigues, C.; Sampaio, D. S.; Costa, M. E.; Caetano, A. P. S.; Ranal, M. A., Bittencourt Júnior, N. S.; Oliveira, P. E. 2012. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 207, n. 4, p. 264-274.

Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

Naumova, T. M. 1992. APOMIXIS IN Angiosperms: Nucellar and integumentary embryony. 1ed. **CRC Press**, Boca Raton.

Nybom, H. & Bartish, I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 3, n. 2, p. 93-114.

Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular ecology**, v. 13, n. 5, p. 1143-1155.

Oliveira, P. E. & Gibbs, P. E. 2000. Reproductive biology of woody plants in a Cerrado community of Central Brazil. **Flora**, v. 195, p. 311-329.

Olmstead, R. G., Zjhra, M. L., Lohmann, L. G., Grose, S. O. & Eckert, A. J. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v.96, p. 1731–1743.

Ortolani, F. A. 2007. Morfo-anatomia, citogenética e palinologia em espécies de ipês (Bignoniaceae). **Tese** (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP.

Otto, S. P. & Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 401-437.

Otto, S. P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. **Cell**, v. 131, n. 3, p. 452-62.

Pannell, J. R., Obbard, D. J. & Buggs, R. J. A. 2004. Polyploidy and the sexual system: what can we learn from *Mercurialis annua*? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 82, p.547-560.

Paun, J. O.; Greilhuber, E.; Temsch, M.; Hörandl, E. 2006. Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). **Molecular ecology**, v. 15, n. 4, p. 897-910.

Pérez, H., Diaz, F. & Medina, J. D. 1997. Chemical Investigation and in vitro Antimalarial Activity of *Tabebuia ochracea* ssp. *neochrysantha*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, p. 227-231.

Piazzano, M. 1998. Números cromosômicos en Bignoniaceae de Argentina. **Kurtziana**. v. 26, p. 179-189.

Ramsey, J. & Schemske, D. W. 1998. Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 467-501.

Ramsey, J. & Schemske, D. W. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33, p. 589-639.

Ratter, J. A.; Ribeiro, J. F.; Bridgewater, S. 1997. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230.

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

Richards, A. J. 2003. Apomixis in flowering plants : an overview. **The Royal Society**, v. 358, p. 1085-1093.

Robertson, K.; Goldberg, E. E.; Igic, B. 2010. Comparative evidence for the correlated evolution of polyploidy and self-incompatibility in Solanaceae. **Evolution**, v. 65, p. 139–155.

Salomão, A. N. & Allem, A. C. 2001. Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian Cerrado and caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, n. 3, p. 369-378.

Sampaio, D. S. 2010. Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade. **Tese** (Doutorado em Ecologia e Conservação dos Recursos Naturais). Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Soltis, D. E.; Albert, V. A.; Leebens-Mack, J.; Bell, C. D.; Paterson, A. H.; Zheng, C.; Sankoff, D.; Pamphilis, C. W.; Kerr Wall, P.; Soltis, P. S. 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 336-348.

Soltis, D. E., Buggs, R. J. A., Doyle, J. J., Soltis, P. S. 2010. What we still don't know about polyploidy. **Taxon**, v. 59, p. 1387–1403.

Souza, G. A.; Carvalho, M. R. O.; Martins, E. R.; Guedes, R. N. C.; Oliveira, L. O. 2008. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 843-849.

Tacuatiá, L.O.; Souza-Chies, T. T.; Flores, A. M.; Eggers, L.; Siljak-Yakovlev, S.; Kaltchuk-Santos, E. 2012. Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 2, p. 350-364.

Tate, J. A. & Simpson, B. B. 2004. Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 2, p. 207-213.

Vallejo-Marín, M.; Dorken, M. E.; Barrett, S. C. H. 2010. The Ecological and Evolutionary Consequences of Clonality for Plant Mating. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.41, p.193–213.

Voigt-Zielinski, M.L.; Piwczyński, M.; Sharbel, T. F. 2012. Differential effects of polyploidy and diploidy on fitness of apomictic *Boechera*. **Sexual Plant Reproduction**, v. 25, n. 2, p. 97-109.

Whitton, J.; Sears, C.; Baack, E.J.; Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, v.169, p.169–182.

Wolfe, A.D. & Liston, A. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Doyle, J.J. (ed.). p. 43-86. **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing**. Boston: Kluwer.

Zapater, M. A.; Califano, L. M.; Del Castillo; E. M.; Quiroga, M. A., Lozano; E. C. 2009. Las especies nativas y exóticas de *Tabebuia* y *Handroanthus* (Tecomeae, Bignoniaceae) en Argentina. *Darwiniana*, v. 47, n. 1, p. 185-220.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome fingerprint. **Genomics**, p. 176-184.

CAPÍTULO I

Variabilidade genética em populações apomíticas e não apomíticas de
Handroanthus ochraceus (**Bignoniaceae**)

Este capítulo está em formato de artigo científico, porém, não está nos moldes de nenhuma revista específica.

RESUMO

A apomixia é um mecanismo de reprodução assexuada através da formação de sementes com embriões clonais no qual populações são teoricamente constituídas por indivíduos geneticamente semelhantes à planta-mãe. *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae) possui populações autoincompatíveis não apomíticas e outras autoférteis com apomixia esporofítica. Por apresentar diferentes sistemas reprodutivos, as populações de *H. ochraceus* podem exibir níveis de diversidade genética distintos. O presente estudo tem por objetivos determinar a variabilidade genética de populações de *H. ochraceus*, comparar parâmetros de diversidade genética em populações apomíticas e não apomíticas, com o intuito de averiguar uma possível relação entre os sistemas reprodutivos e a diversidade genética na espécie e ainda compreender as possíveis relações entre populações apomíticas e não apomíticas. Os dez *primers* ISSR utilizados resultaram em 104 bandas e os parâmetros de diversidade genética apresentaram uma média elevada para as populações ($P = 66,35\%$, $I = 0,341$ e $H_e = 0,227$). Entretanto, a diversidade genética encontrada para as populações apomíticas ($H_e = 0,205$) foi menor que a encontrada para não apomíticas ($H_e = 0,249$) e semelhante ao de espécies autocompatíveis. Não foram detectados clones no presente estudo. O cálculo da AMOVA demonstrou que a maior diversidade está dentro das populações (61%), um comportamento típico de populações alógamas que pode ser justificado pela presença de embriões sexuais que possam se estabelecer com sucesso no ambiente também em populações apomíticas, fazendo com que estas sejam caracterizadas por um sistema reprodutivo misto. A análise de agrupamento e a análise Bayesiana de atribuição genética determinaram a formação de dois grupos distintos, um constituído por duas populações não apomíticas, Pires do Rio (NA2) e Biribiri (NA3), e o outro reunindo as populações apomíticas e a não apomítica de Uberlândia (NA1). A forte relação entre a população autoincompatível de Uberlândia e as apomíticas indica origens distintas para as populações não apomíticas de *H. ochraceus* e uma origem comum para as três populações apomíticas analisadas. Esta relação entre a população autoincompatível de Uberlândia e as populações autoférteis permite supor que os indivíduos não apomíticos dessa população apresentem a mesma constituição genética de uma possível população ancestral das populações autoférteis.

Palavras-chave: apomixia esporofítica, diferenciação genética, *Handroanthus ochraceus*, ISSR, sistema reprodutivo.

ABSTRACT

Apomixis is an asexual mechanism of reproduction through seed formation with clonal embryos whereupon the populations are genetically uniform, in theory. *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae) has self-incompatible non-apomictic populations and also self-fertile populations with sporophytic apomixis. Since it has different reproductive systems, *H. ochraceus* populations may exhibit different levels of genetic diversity. The present study aims to verify the genetic variability of *H. ochraceus* populations, compare the genetic diversity parameters in apomictic and non-apomictic populations, with the investigating propose of a possible relationship between the reproductive systems and genetic diversity in this species and still understand the possible relationships between apomictic and non-apomictic populations. The ten primers resulted in 104 fragments and the genetic diversity parameters showed a high mean for the populations ($P = 66.35\%$, $I = 0.341$ and $H_e = 0.227$). However, the genetic diversity found for apomictic populations ($H_e = 0.205$) was lower than that found for non-apomictic ($H_e = 0.249$) and similar to self-compatible species. In this study no clones were detected. The AMOVA analysis showed that the greatest diversity occurs within populations (61%), a typical behavior of allogamous populations which can be explained by the presence of sexual embryos in apomictic populations that can be successfully established in the environment, which characterizes a mixed mating system. Cluster analysis and Bayesian analysis of genetic assignment determined two distinct groups, one consisting of two non-apomictic populations, Pires do Rio (NA2) and Biribiri (NO3), and other gathering the apomictic populations and the non-apomictic from Uberlândia (NA1). The strong relationship between the self-incompatible population of Uberlândia and the apomictic populations indicates separate origins for non-apomictic populations of *H. ochraceus* and a common origin for the three apomictic populations analyzed. This relationship between self-incompatible population of Uberlândia and self-fertile populations suggest that these non-apomictic individuals may have the same genetic constitution of a possible ancestral population of self-fertile populations.

Keywords: genetic differentiation, *Handroanthus ochraceus*, ISSR, mating system sporophytic apomixis.

1. Introdução

A apomixia é um sistema de reprodução assexuada que ocorre através de sementes no qual são gerados indivíduos geneticamente semelhantes à planta-mãe (Asker & Jerling, 1992; Koltunow & Grossniklaus, 2003; Bicknell & Koltunow, 2004; Paun *et al.*, 2006; Voigt-Zielinsk *et al.*, 2012). Populações apomíticas são consideradas geneticamente uniformes, uma consequência da reprodução clonal por sementes (Daurélio *et al.*, 2004), enquanto populações autoincompatíveis são reconhecidas por um nível elevado de diversidade genética (Kevin *et al.*, 2004). Entretanto, estudos recentes baseados em análises com marcadores moleculares revelaram que há uma considerável diversidade genética em populações assexuadas naturais (Paun *et al.*, 2006; Hörandl & Paun, 2007). Análises de populações apomíticas utilizando microsatélites revelaram genótipos únicos para cada indivíduo apomítico (Paun *et al.*, 2006). A variabilidade genética observada em apomíticos é normalmente atribuída a fatores como a elevada heterozigosidade derivada da alopoliploidização, a coexistência de apomixia e reprodução sexuada e a ocorrência de mutações (Richards, 2003; Van Dijk, 2003; Paun *et al.*, 2006; Hörandl & Paun, 2007).

Existem dois mecanismos principais de apomixia, a gametofítica e a esporofítica, e apesar de ser a menos estudada, a apomixia esporofítica é a mais difundida entre as angiospermas (Asker & Jerling, 1992; Carman, 1997). Na apomixia esporofítica ou embrionia adventícia, os embriões são formados a partir de células somáticas do óvulo (Asker & Jerling, 1992; Bicknell & Koltunow, 2004), sendo um mecanismo comumente observado em espécies arbóreas de regiões tropicais (Richards, 2003; Hörandl, 2011). Apesar de ser um sistema reprodutivo reconhecidamente assexuado, a maioria das plantas apomíticas esporofíticas não consegue produzir um endosperma de maneira autônoma, havendo a necessidade da polinização e da fecundação dos núcleos polares para a sua formação, que será responsável pela nutrição dos embriões (Asker & Jerling, 1992; Richards, 2003). Quando ocorre a penetração do tubo polínico no saco embrionário, a oosfera também pode ser fecundada dando origem a um embrião zigótico. Desta forma, embriões assexuados e sexuados podem se desenvolver concomitantemente em uma mesma semente ou em um mesmo fruto (Asker & Jerling, 1992; Koltunow & Grossniklaus, 2003; Richards, 2003; Hörandl, 2011).

A poliploidização tem um papel importante para a manutenção e estabilização da apomixia (Voigt-Zielinski *et al.*, 2012), estando mais relacionada com espécies que

apresentam apomixia gametofítica (Carman, 1997; Whitton *et al.*, 2008). Entretanto, em estudos recentes, a poliploidia foi apontada como um fator relacionado com a expressão da apomixia esporofítica em espécies neotropicais das famílias Bignoniaceae (Bittencourt & Moraes, 2010; Firetti-Leggieri *et al.*, 2011; Sampaio *et al.*, *in press*) e Malvaceae (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2005). A apomixia esporofítica está vinculada a taxas elevadas de poliembrionia e nos gêneros *Anemopaegma* e *Handroanthus* de Bignoniaceae uma regularidade parece ocorrer entre poliembrionia e poliploidia (Piazzano, 1998; Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010; Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*).

As Bignoniaceae possuem um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI) (Gibbs & Bianchi, 1993; 1999; Bittencourt, 2003; Bittencourt & Semir, 2005). *Handroanthus ochraceus* é uma espécie de Bignoniaceae que apresenta populações constituídas por indivíduos descritos como autoestéreis (LSI), monoembriônicos e não apomíticos (Gibbs & Bianchi, 1993; Barros, 2001; Guerra & Natera, 2007; Sampaio, 2010) e populações com indivíduos autoférteis, poliembrionicos e apomíticos esporofíticos (Salomão & Allem, 2001; Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012).

Por exibirem mecanismos reprodutivos distintos, as populações de *H. ochraceus* podem apresentar diferentes níveis de diversidade genética. Nas populações autoincompatíveis, a reprodução sexuada pode gerar a variabilidade por meio da recombinação, segregação e fusão sexual e pode ainda promover a migração gênica pela troca e pela incorporação de genes (Richards, 1997). A apomixia, por sua vez, pode ser um meio de reter heterozigosidade pela combinação da reprodução vegetativa e dispersão de sementes, preservando assim genótipos localmente adaptados (Durand *et al.*, 2000). Dessa forma, populações autoestéreis e autoférteis apresentariam diferentes alelos para um mesmo gene o que poderia ocasionar níveis de variabilidade genética distintos para cada população. Assim, o presente trabalho teve por objetivo determinar a variabilidade genética de populações de *H. ochraceus* e comparar os parâmetros de diversidade genética em populações apomíticas e não apomíticas, a fim de verificar uma possível interferência dos sistemas reprodutivos na diversidade genética da espécie e ainda compreender as possíveis relações entre populações apomíticas e não apomíticas.

2. Material e Métodos

2.1 Espécie estudada e Áreas de Estudo

Handroanthus ochraceus é um elemento típico do Cerrado no Brasil, onde é popularmente conhecido como ipê amarelo, podendo ser encontrado nas diferentes fisionomias deste bioma brasileiro e áreas adjacentes, sendo dificilmente observado no interior de florestas fechadas (Gentry, 1992). Está geograficamente distribuído em toda a América Latina, e na América Central é representado pelas subespécies *H. ochraceus* subsp. *heterotrichus* (DC) S. Grose, *H. ochraceus* subsp. *neochrysanthus* (A. H. Gentry) S. Grose (Gentry, 1992). *Handroanthus ochraceus* subsp. *ochraceus* parece ser a mais comumente encontrada no Cerrado brasileiro (Gentry, 1992; Zapater *et al.*, 2009). É uma espécie arbórea, podendo variar de 4 a 35 metros de altura, com flores amarelas e o pico de floração ocorrendo nos meses de agosto a setembro, sendo que os frutos maduros podem ser encontrados a partir de setembro (Gentry, 1992; Zapater *et al.*, 2009). As sementes de *H. ochraceus* foram relatadas como monoembriônicas ou poliembriônicas em diferentes populações (Salomão & Allem, 2001; Costa *et al.*, 2004; Sampaio, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012), indicando a ocorrência de sexualidade e apomixia.

As seis populações de *H. ochraceus* utilizadas para a realização das análises já foram descritas quanto ao sistema reprodutivo e embrionia, entretanto nem todos os indivíduos foram avaliados quanto à ploidia devido à inviabilidade das sementes para germinação (Tabela 1) (Sampaio, 2010). As populações de Uberlândia (MG) (Figura 1A), Biribiri (MG) e Pires do Rio (GO) foram descritas como não apomíticas e monoembriônicas, sendo que a porcentagem de sementes com múltiplos embriões nestas populações foi igual à zero (Sampaio, 2010). Para a população de Uberlândia, seis indivíduos foram avaliados para a poliembriõnia, entretanto apenas um foi analisado quanto à ploidia e descrito como diploide ($2n=40$); para a população de Biribiri apenas um indivíduo foi avaliado e descrito como diploide ($2n=40$); na população de Pires do Rio os oito indivíduos analisados foram identificados como diploides ($2n=40$) (Tabela 1) (Sampaio, 2010). Com relação às populações apomíticas na população de Córrego Danta (MG), entre os seis indivíduos analisados, um apresentou apenas 2% de sementes poliembriônicas e foi descrito como diploide ($2n=40$) (Tabela 1), outro apresentou 25% de sementes poliembriônicas e os demais indivíduos mais de 50%, sendo esta uma população mista com indivíduos mono e poliembriônicos (Sampaio, 2010). Na população de Lagoa

Santa (MG), três indivíduos apresentaram 52 a 70% de sementes poliembriônicas, sendo também identificada a ocorrência de apomixia esporofítica, destes três, um foi avaliado quanto à ploidia e descrito como poliploide ($2n=80$) (Tabela 1) (Sampaio, 2010). Já na população de São José do Rio Preto (SP) (Figura 1B), os indivíduos analisados apresentaram uma variação entre 62 e 94% de sementes poliembriônicas sendo esta uma população reconhecidamente apomítica e poliembriônica (Bittencourt & Moraes, 2010). Para os cinco indivíduos avaliados nesta população, um foi analisado quanto à ploidia e descrito como poliploide ($2n=80$, Tabela 1) (Sampaio, 2010).

Devido a um número reduzido de indivíduos analisados com relação à ploidia, não é possível afirmar que as populações são constituídas apenas por indivíduos diploides ou poliploides. Porém, permite inferir que as populações consideradas poliembriônicas sejam formadas por um número razoável de indivíduos poliploides já que nos gêneros *Anemopaegma* (Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*) e *Handroanthus* (Piazzano, 1998; Bittencourt, 2003; Ortolani, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010) a poliembrião está relacionada com a ocorrência da poliploidia.

As coletas foram realizadas nos anos de 2010, 2011 e 2012 nos estados brasileiros de Goiás, Minas Gerais e São Paulo (Tabela 1, Figura 2). Foram coletadas amostras de folhas, preferencialmente jovens, de 20 indivíduos em cada população. Para a população de Córrego Danta (A1) foram coletadas amostras de 19 indivíduos e para a de Lagoa Santa (A2), de 18 indivíduos. Assim que coletadas, as folhas foram individualizadas, identificadas e secas em sílica gel.

Tabela 1: Município e coordenadas geográficas do local de coleta; número de espécime em Herbário; porcentagem de sementes poliembriônicas e número de indivíduos avaliados por Sampaio (2010); caracterização quanto à ocorrência de poliembria e apomixia, código adotado para cada população, número de indivíduos amostrados; ploidia registrada para a população e número de indivíduos avaliados por Sampaio (2010).

Município	Localização Geográfica	Material testemunho	% de sementes poliembriônicas (n)	Ocorrência de poliembria (Código da população, n)	Ploidia (n)
Uberlândia – MG (Sucupira*)	19°18'34,09"S 48°26'48,10"O	HUFU-52585	0% (n=5)	Monoembriônica, Não apomítica (NA1, n=20)	2n=2x= 40 (n=1)
Pires do Rio – GO (BR 050 – Km 153)	17°11'37,26"S 47°45'02,83"O	HUFU-55507	0% (n=8)	Monoembriônica Não apomítica (NA2, n=20)	2n=2x=40 (n=8)
Biribiri - MG PEB*	18°07'53,59"S 43°36'55,51"O	-	0% (n=1)	Monoembriônica Não apomítica (NA3, n=20)	2n=2x=40 (n=1)
Córrego Danta - MG (BR 262 - Km 570)	19°41'12,40"S 46°02'19,60"O	HUFU-52593	2 – 66% (n=6)	Poliembriônica Apomítica (A1, n=19)	-
Lagoa Santa – MG (Serra do Cipó - Lapinha)	19°33'34,26"S 43°56'21,05"O	BHCB-68100	52 – 70% (n=3)	Poliembriônica Apomítica (A2, n=18)	2n=4x=80 (n=1)
São José do Rio Preto (Campus UNESP*)	20°47'10,46"S 49°21'31,84"O	SJRP-29235	62 – 94% (n=5)	Poliembriônica Apomítica (A3, n=20)	2n=4x=80 (n=1)

* Sucupira: região fora do perímetro urbano da cidade de Uberlândia - MG; PEB: Parque Estadual do Biribiri; UNESP: Campus do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista.

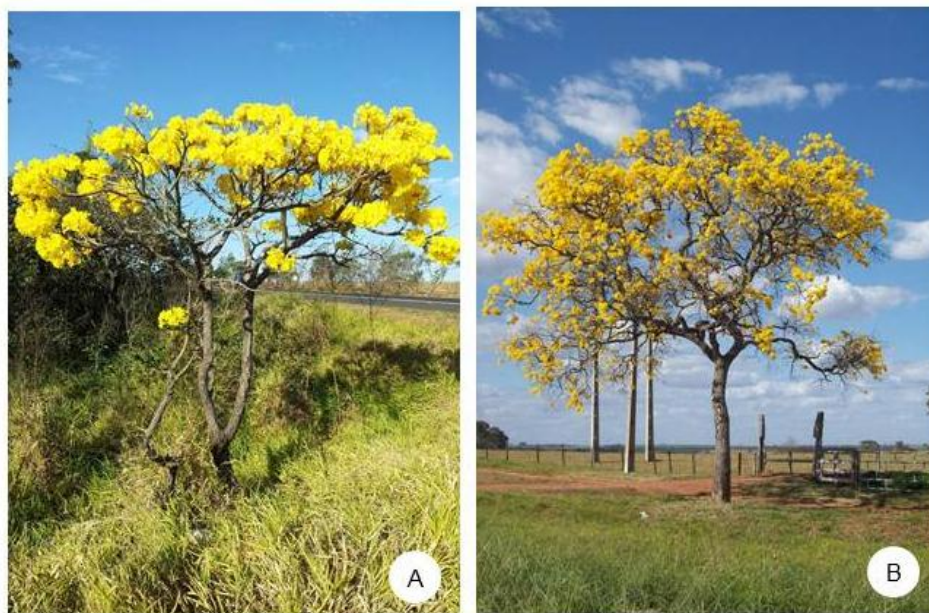


Figura 1: Indivíduos em flor de *Handroanthus ochraceus*. A. Indivíduo não apomítico sexuado, Uberlândia – MG. B. Indivíduo apomítico, São José do Rio Preto – SP.

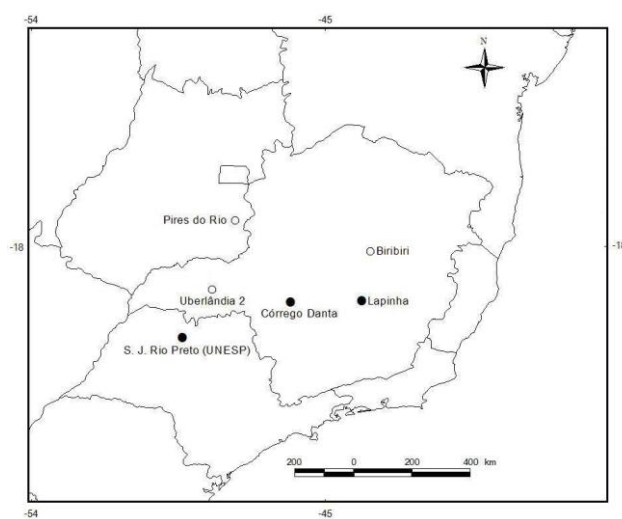


Figura 2: Mapa da distribuição das populações estudadas. Populações apomíticas ● e populações sexuais ○ de *H. ochraceus*. Mapas elaborados por Ana Luíza Freitas Oliveira através do programa ArcView GIS versão 3.2

2.2 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit de extração DNeasy® Plant mini (Qiagen), seguindo recomendações do fabricante. Uma amostra de 20 mg de tecido de folha seca foi macerada e pulverizada com o auxílio de nitrogênio líquido. O DNA foi ressuspenso e armazenado no tampão de eluição fornecido pelo kit e preservado em *freezer* a -20°C. Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), o DNA foi diluído numa proporção de 1 µL de DNA para 49 µL de água ultrapura (1:50) Mili-Q (Millipore). Foram testados dezoito *primers* de marcadores dominantes ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para a análise e os dez que apresentaram bandas claras e reprodutíveis nas amplificações foram selecionados para as análises (Tabela 2).

Cada reação de PCR foi realizada com um volume final de 19µL, contendo uma mistura para a reação (Mix PCR) com 13,16 µL de água Mili-Q autoclavada; 2,0 µL de Tampão 10X de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50mM KCl, Phoneutria); 0,54 µL de MgCl₂ (1,5 mM, Phoneutria); 1,5 µL de dNTP (0,21mM dATP, dCTP, dGTP e dTTP, Ludwig); 0,6 µL de *primer* (0,32 mM, Phoneutria); 0,2 µL de Taq polimerase (1 Unidade, Phoneutria) e 1 µL de DNA (1:50). Para cada reação de PCR foi incluído um controle negativo, sem DNA molde, para avaliar possíveis contaminações provenientes dos próprios reagentes. As amplificações por PCR foram conduzidas em termociclador automático (Thermo Scientific – Arktik Thermal Cycler de 96 poços e Applied Biosystems – PCR System 9700), seguindo o programa de ciclos: denaturação inicial de 94°C por 4 minutos; seguido por 37 ciclos de 1 minuto a 94°C; 2 minutos nas temperaturas de 46°, 47,5° ou 50°C de acordo com o *primer* utilizado (Tabela 2); 2 minutos a 72°C; extensão final por 7 minutos a 72° e 5 a 10 minutos para a redução da temperatura a 4°C.

Os produtos da amplificação passaram por eletroforese em gel de agarose (Ultra Pure™ Agarose, Invitrogen) a 1,5%, utilizando tampão de corrida TBE (1M Tris, 0,02M EDTA, 0,89M de Ácido Bórico) com pH 8,0, a uma voltagem constante de 80 V por 3 horas. Para acompanhar a corrida eletroforética e estimar o tamanho das bandas, foram aplicados 2µL de marcador molecular com 100 pares de base (Ludwig). Foi adicionado Brometo de Etídio (0,5 mg/mL) para a visualização das bandas sob luz Ultravioleta (UV) em Transiluminador Image Quant 150 (GE Healthcare) conectado a computador onde as imagens obtidas foram armazenadas para posterior análise. Com o intuito de obter melhores resultados para as análises, ou seja, bandas claras e facilmente identificadas,

reações de PCR em triplicata foram realizadas para cada *primer* em cada população de *H. ochraceus*, para a avaliação da reprodutibilidade do método ISSR para a espécie.

Tabela 2: *Primers* ISSR utilizados para a amplificação do DNA de *Handroanthus ochraceus*, temperatura de anelamento, número de bandas e porcentagem de bandas polimórficas (P%) por primer.

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i>	Temperatura de anelamento (°C)	Número de bandas (P%)
Becky	(CA) ₇ YC	50 °C	13 (87,5)
Dat	(GA) ₇ RG	46 °C	7 (89,0)
Goofy	(GT) ₇ YG	50 °C	10 (100,0)
Jonh	(AG) ₇ YC	47,5 °C	10 (100,0)
Manny	(CAC) ₄ RC	50 °C	11 (78,0)
Omar	(GAG) ₄ RC	47,5 °C	9 (100,0)
UBC 840	(GA) ₈ YT	50 °C	11 (87,5)
UBC 880	(GGAGA) ₃	50 °C	11 (83,5)
UBC 898	(CA) ₆ RY	50 °C	12 (83,5)
UBC 899	(CA) ₆ RG	50 °C	10 (100,0)
Total			104 (91,6)

*Y= C ou T; R= A ou G.

2.3 Análise de Dados

As bandas amplificadas na PCR foram analisadas visualmente e anotadas de acordo com o peso molecular correspondente ao marcador (Lousada *et al.*, 2011). Bandas que apresentaram baixa resolução foram excluídas da análise. A presença e a ausência de bandas visualizadas nos géis de agarose, foi registrada para os indivíduos das seis populações no programa Transformer 3 (Cajuapé-Castells & Baccarani-Rosas, 2005) que cria uma matriz binária, onde a presença de banda corresponde a 1 e a ausência, a 0.

Os parâmetros de diversidade genética foram calculados com auxílio do programa GenAlEx 6.41 (Peakall & Smouse, 2010). Foram obtidos: porcentagem de polimorfismo (P), índice de diversidade fenotípica de Shannon (I) e heterozigosidade média esperada (H_e). O índice de Shannon foi estimado a partir de $I = -\sum p_i \ln p_i / n$, onde p_i é a frequência da banda e n representa o número de marcadores utilizados. Já a heterozigosidade esperada foi baseada em $H_e = 1 - \sum p_i^2$. Também foi realizada uma análise denominada *Multilocus Matches* (GenAlEx 6.41) para cada população com o objetivo de avaliar a presença de pares indivíduos com todos loci iguais e pares de indivíduos que diferem em diferentes números de loci. Para verificar a distribuição das frequências do número de loci diferentes por par de indivíduos foi elaborado um gráfico de barras utilizando a Fórmula de Sturges A/K.

A distância genética não enviesada de Nei (1978) foi calculada para todas as populações utilizando o programa GenAlEx 6.41 e foi utilizada para a elaboração de um dendrograma com o auxílio do programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) utilizando *neighborjoining* como algoritmo de agrupamento. Para obter os valores de bootstrap que sustentam os ramos de ligação observados no dendrograma, dois programas foram utilizados (Lousada *et al.*, 2011, 2013): AFLP-SURV (Vekemans *et al.*, 2002) e PHYLIP 3.69 (Felsenstein, 2006), baseados na matriz binária de 0 e 1. O algoritmo Bayesiano (Nei & Li, 1979) do AFLP-SURV foi utilizado para gerar 1000 matrizes de dissimilaridade as quais foram utilizadas para construir 1000 dendrogramas utilizando o algoritmo *neighborjoining* implementado no pacote NEIGHBOR do programa PHYLIP 3.69. O pacote CONSENSE (PHYLIP 3.69) foi utilizado para computar os dados e apresentar os bootstraps. Apenas bootstraps com valor superior a 50% foram considerados na análise dos resultados.

A distância genética (GD) obtida a partir da matriz binária, calculada com o programa GenAlEx 6.41, foi utilizada para a realização da Análise de Coordenadas Principais (PCO). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada a partir da matriz binária de 0 e 1 com o intuito de analisar a diversidade entre as populações e dentro das mesmas. Foram realizadas três AMOVA, com 999 permutações cada (Peakall & Smouse, 2010), uma para avaliar a variância dentro e entre as populações estudadas; outra foi calculada com a identificação dos dois grupos de populações, apomíticas e não apomíticas; e a terceira foi realizada para os grupos formados na análise de agrupamento, um grupo constituído pelas populações NA1, A1, A2 e A3 e o outro por NA2 e NA3, com o intuito de verificar a diferenciação entre estes grupos.

Para inferir o número de clusters genéticos (K) nas populações de *Handroanthus ochraceus* amostradas foi realizada uma análise Bayesiana de atribuição utilizando o programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2010). O cálculo do número de clusters genéticos (K) foi realizado de $K=1$ a $K=7$ com 15 corridas independentes para cada K . Cada corrida conteve 1.000.000 interações da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com um *burn-in* inicial de 100.000 iterações, com *admixture model* com alelos correlacionados entre as populações. Para inferir o número de clusters ou populações presumidas, foi calculada a média de cada valor de probabilidade K , o “log da probabilidade” [$\ln P(D)$], através de todas as corridas, como sugerido por Pritchard *et al.* (2010) e também o delta estatístico de K (ΔK) (Evanno *et al.*, 2005).

3. Resultados

Os dez *primers* utilizados resultaram em 104 bandas no total, sendo que cada *primer* amplificou de 7 a 13 bandas que variaram de 300 a 2000 pares de base estimados, aproximadamente, de acordo com o marcador molecular. A porcentagem média de bandas polimórficas para o conjunto de populações de *Handroanthus ochraceus* foi de 91,6% (Tabela 2).

O nível de polimorfismo (P) das populações variou entre 52,88% e 78,85%, apresentando uma média de 66,35% (Tabela 3). Já os parâmetros índice de Shannon (I) e heterozigosidade esperada (H_e) apresentaram média de 0,341 e 0,227, respectivamente (Tabela 3). A população NA1 apresentou a maior diversidade genética, a população A3 a menor diversidade (Tabela 3). De maneira geral, as populações não apomíticas apresentaram maiores valores para H_e e I e as apomíticas os menores valores (Tabela 3).

Entretanto, a população A2 apresentou valores de diversidade genética comparáveis às não apomíticas e a população NA3 valores menores que as demais não apomíticas (Tabela 3).

Na análise de *Multilocus Matches* realizada para as populações, a população A1 (Córrego Danta) apresentou os indivíduos 14 e 16 semelhantes, no entanto 10 bandas foram distintas. O mesmo ocorreu na população A2 (Lagoa Santa) onde os indivíduos 11 e 15 foram semelhantes, exceto por 14 bandas. Para a população A3 (São José do Rio Preto) os indivíduos 8 e 9 foram semelhantes, exceto para 14 bandas. Os indivíduos mais semelhantes das populações não apomíticas diferiram em 13 bandas para NA2 e NA3 e em 17 bandas para NA1, números semelhantes aos encontrados para as populações apomíticas.

No gráfico de barras com a distribuição das frequências do número de locos diferentes por par de indivíduos baseado na análise *Multilocus Matches* (Figura 3) foi possível observar que as populações não apomíticas e apomíticas apresentaram diferenciação genética entre os indivíduos analisados os quais se diferiram entre 13 e 43 loci nas não apomíticas e 10 e 37 loci nas apomíticas. Nas populações NA2 e NA3 (Figura 3A) uma frequência maior de indivíduos se diferenciou entre 25 e 31 loci onde foram observadas as maiores colunas para estas populações e cerca de 60% dos pares de indivíduos destas populações se diferiram entre 13 e 28 loci. Já a população NA1 apresentou uma distribuição mais homogênea para a frequência relativa de pares de indivíduos por número de loci, sendo que não foi observada uma discrepância de tamanho de coluna semelhante às encontradas para NA2 e NA3. Para as populações apomíticas (Figura 3B) verificou-se que os pares de indivíduos se diferenciaram entre 10 e 37 loci, o que determina a não ocorrência de clones. Na população A1 71% dos pares de indivíduos se diferenciaram entre 10 e 22 loci, sendo que entre os loci 16 e 22 foram observadas as maiores colunas para esta população. Para a população A2 cerca de 60% dos indivíduos se diferiram entre 14 e 25 loci e assim como observado para A1, entre as classes de loci $\geq 16 \leq 19$ e $\geq 19 \leq 22$ foram observadas as maiores colunas para a população. Já a população A3 apresentou uma aparente distribuição normal para a frequência relativa de pares de indivíduos nas diferentes classes de loci, entretanto, há uma coluna muito maior na classe $\geq 22 \leq 25$, determinando que cerca de 32% dos pares de indivíduos nesta população se diferiram entre 22 e 25 loci.

O dendrograma agrupou as populações em dois grupos principais: um grupo bem sustentado (86% de bootstrap) formado pelas populações NA1, A1, A2 e A3, refletindo proximidade genética entre as populações e outro com menos de 50% de bootstrap,

formado por NA2 e NA3 (Figura 4). O primeiro grupo ainda apresentou o subgrupo NA1, A1 e A3 (59% de bootstrap). A população A3 agrupada a NA1, A1 e A2 apresentou maior comprimento do ramo quando comparada às demais populações, o que pode estar relacionado a um maior grau de diferenciação dos indivíduos que constituem esta população, o que foi observado no gráfico de barras baseado na análise *Multilocus Matches* (Figura 3B). Este fato também foi confirmado quando um dendrograma baseado nos mesmos dados foi elaborado utilizando o algoritmo UPGMA (dados não apresentados), no qual a população A3 foi ligada externamente ao grupo NA1, A1 e A2.

Na Análise de Coordenadas Principais (PCO), os três primeiros eixos corresponderam a 71,33% da variância observada, sendo que o eixo 1 explica 33,81% dessa variância separando duas populações das demais, no caso as não apomíticas NA2 e NA3. O eixo 2 explica 19,35% da variância, separando a população A3 das populações NA1, A1 e A2, entretanto pode ser observado um contínuo de indivíduos da A3 com indivíduos da A1 (Figura 5A). Já o eixo 3 explica 18,17% da variância separando a população A2 das demais apomíticas (Figura 5B), ou seja, NA1, A1 e A3 permanecem juntas, o que refletiu o resultado observado no dendrograma (Figura 3) onde A2 aparece ligada externamente ao grupo NA1, A1 e A3.

Tabela 3: Parâmetros de diversidade genética das seis populações de *Handroanthus ochraceus* baseados em 104 bandas obtidas a partir dos marcadores ISSR. As populações não apomíticas são NA1, NA2 e NA3, e as apomíticas são A1, A2 e A3.

População	<i>P</i> (%)	<i>I</i>	<i>H_e</i>
Não apomíticas			
NA1	78,85	0,447±0,267	0,306 ± 0,193
NA2	74,04	0,355 ± 0,267	0,234 ± 0,190
NA3	66,35	0,318 ± 0,268	0,208 ± 0,187
Média	73,08	0,373 ± 0,066	0,249 ± 0,051
Apomíticas			
A1	53,85	0,316 ± 0,307	0,217 ± 0,215
A2	72,12	0,342 ± 0,250	0,221 ± 0,174
A3	52,88	0,267 ± 0,280	0,177 ± 0,194
Média	59,62	0,308 ± 0,038	0,205 ± 0,024
Média espécie	66,35	0,341 ± 0,060	0,227 ± 0,043

P é a porcentagem de bandas polimórficas; *I* representa o Índice de diversidade de Shannon; *H_e* a heterozigosidade esperada; ± desvio padrão.

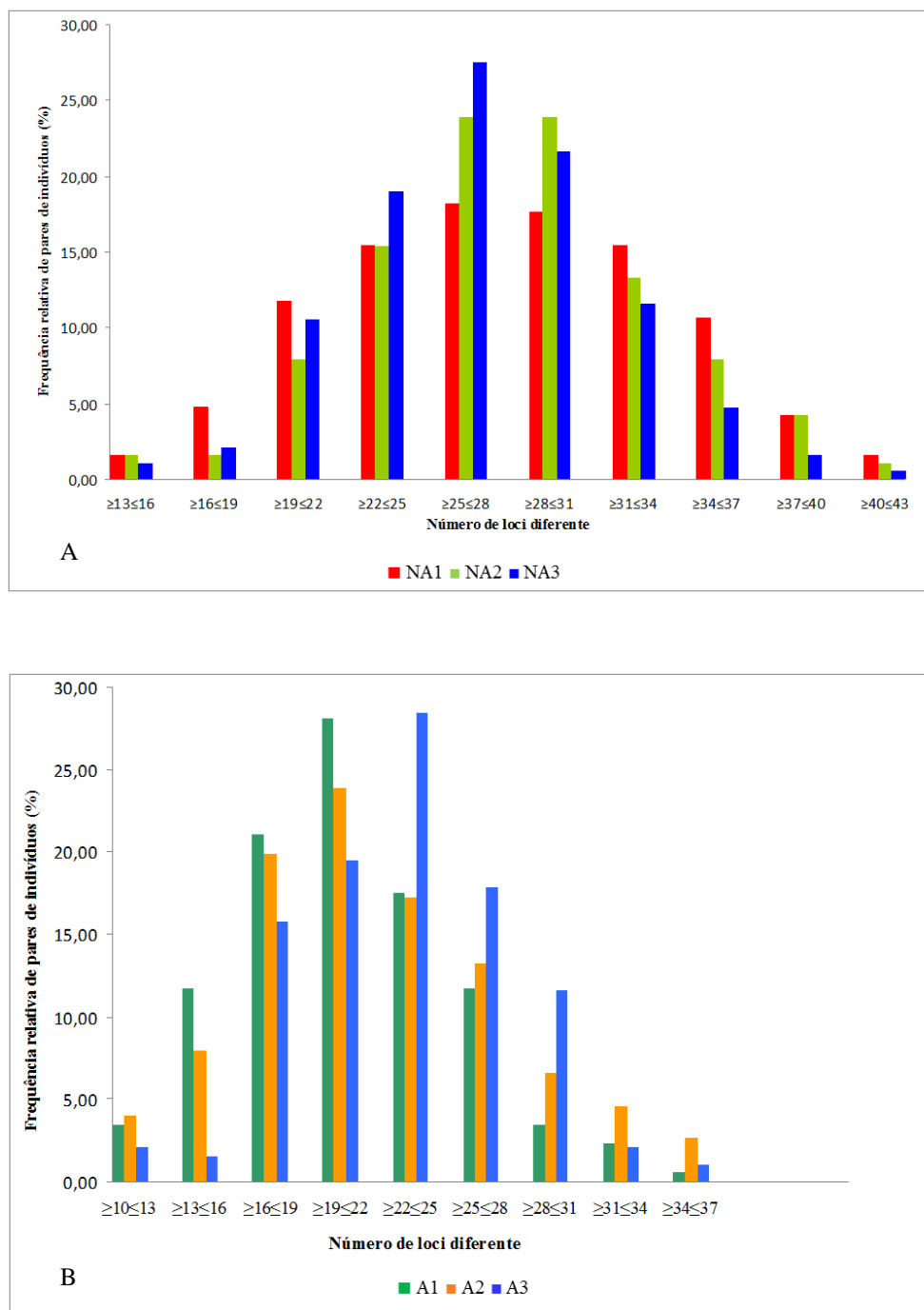


Figura 3: Gráfico de barras com a distribuição das frequências do número de lócus diferentes por par de indivíduos baseado nos resultados da análise *Multilocus Matches* (GenAlEx 6.41), elaborado a partir da Fórmula de Sturges A/K. A. Distribuição das frequências nas populações não apomíticas (NA1, NA2, NA3). B. Distribuição das frequências nas populações apomíticas (A1, A2, A3).

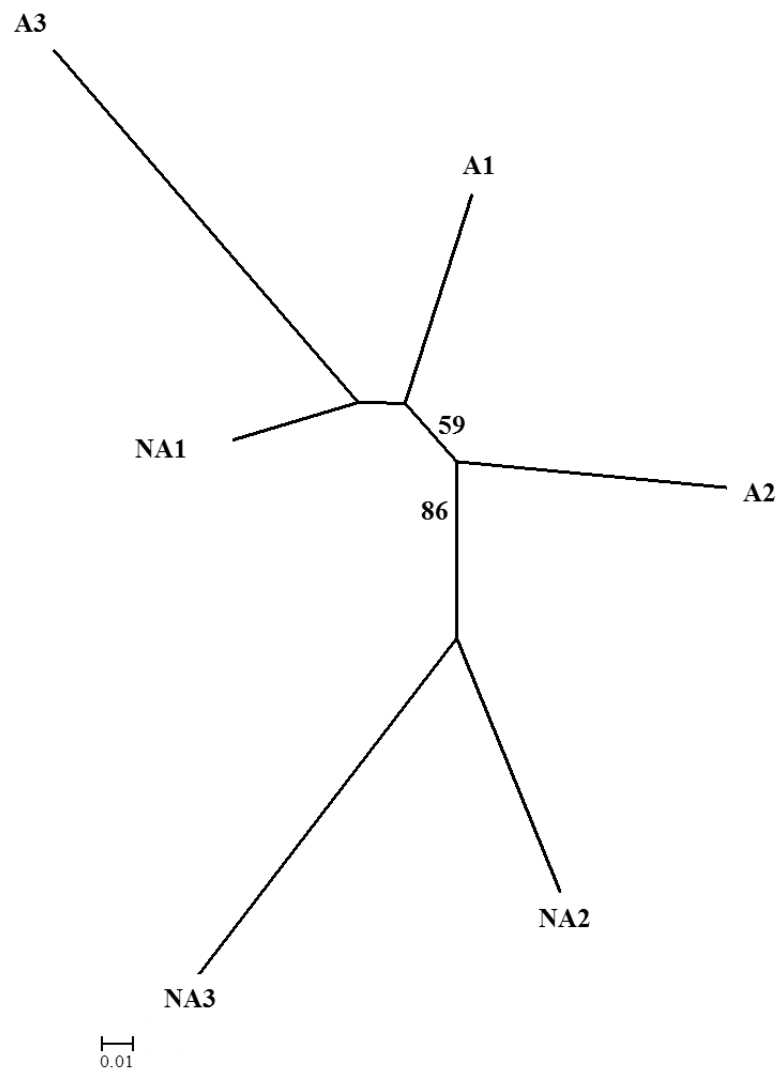


Figura 4: Dendrograma neighbor-joining, elaborado a partir da matriz de distância genética não enviesada de NEi (Nei, 1978) com base em 104 loci ISSR, apresentando a relação entre as seis populações de *Handroanthus ochraceus*. As porcentagens significativas de bootstrap (mais de 50%) estão nos respectivos ramos. O nome das populações encontra-se na Tabela 1.

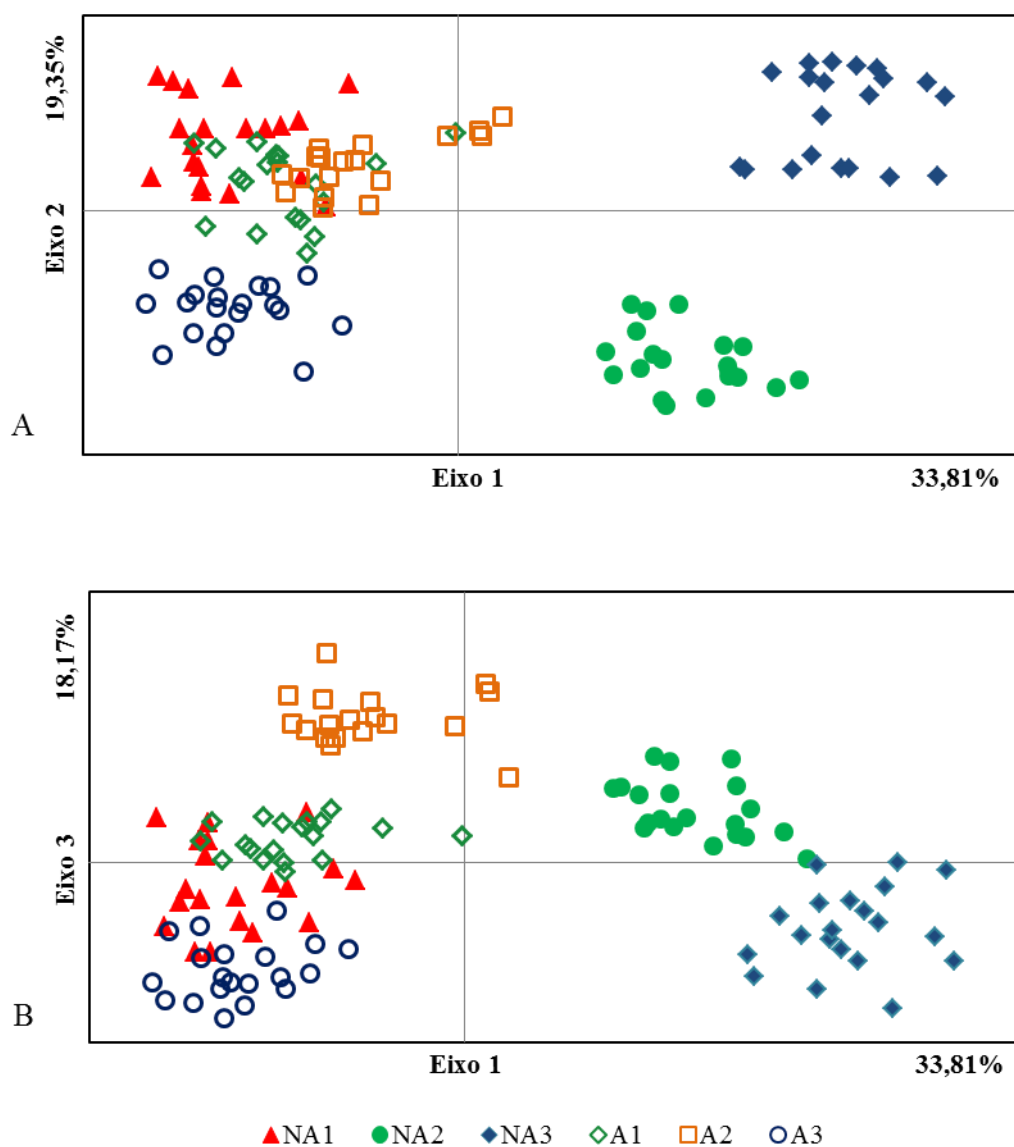


Figura 5: Representação dos pontos nos três primeiros eixos da análise de coordenadas principais (PCO) obtidos a partir da matriz de distância genética baseada em 104 bandas polimórficas de ISSR dos 117 indivíduos de *Handroanthus ochraceus*. Os símbolos fechados correspondem às populações não apomíticas e os símbolos abertos às populações apomíticas. A. Eixos 1 e 2. B. Eixos 1 e 3.

Na AMOVA com todas as populações como um único grupo, a maior parte da variação foi encontrada dentro das populações, com uma porcentagem de 61% (entre populações, $\Phi_{ST}=0,39$) (Tabela 4). Na AMOVA com as populações separadas em grupos apomíticos e não apomíticos (Tabela 4), a variação encontrada entre eles foi de apenas 1% (61%, $\Phi_{ST}=0,38$). Já na AMOVA com as populações separadas de acordo com os grupos formados na análise de agrupamento, NA1, A1, A2, A3 e NA1, NA2 (Figura 4), a variação entre eles foi de 12% (58%, $\Phi_{ST}=0,30$) determinado uma maior diferenciação entre estes grupos.

O gráfico de $\text{LnP}(K)$ (Figura 6A) da análise Bayesiana de atribuição genética apresentou maior probabilidade para o valor de $K=2$, ocorrendo estabilização no incremento na média de $\text{LnP}(K)$, o que também foi observado no resultado para ΔK (Figura 6B). No gráfico de representação dos grupos os dois agrupamentos genéticos foram indicados, sendo as populações NA2 e NA3 constituindo um grupo, e o outro grupo reunindo as populações NA1, A1, A2 e A3 (Figura 6C), resultados congruentes com os encontrados nas análises de agrupamento e de ordenação (Figuras 4 e 5). Considerando o valor de $K=3$ (dados não apresentados) foi observado que a população NA1 continua agrupada às populações apomíticas, ou seja, entre as 15 corridas para este valor de K , a população que se separa das demais constituintes do grupo não foi NA1, mas sim a população A3, deste modo NA1 está fortemente agrupada às apomíticas.

Tabela 4: Análise de Variância Molecular (AMOVA) para níveis diferentes de hierarquia genética baseada em 104 bandas polimórficas de ISSR dos 117 indivíduos de *Handroanthus ochraceus*.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	% de variação total	Valor de P
<i>Handroanthus ochraceus</i>					
Entre populações	5	875,138	8,322	39,00	<0,001
Dentro das populações	11	1420,766	12,800	61,00	<0,001
Dois grupos: apomíticas e não apomíticas					
Entre grupos	1	183,914	0,199	1,00	<0,046
Entre populações	4	688,760	8,168	38,00	<0,001
Dentro das populações	111	1441,104	12,983	61,00	<0,001
Dois grupos: NA1, A1, A2, A3 e NA1, NA2					
Entre grupos	1	290,046	290,046	12,00	<0,001
Entre populações	4	582,777	145,694	30,00	<0,001
Dentro das populações	111	1440,954	12,982	58,00	<0,001

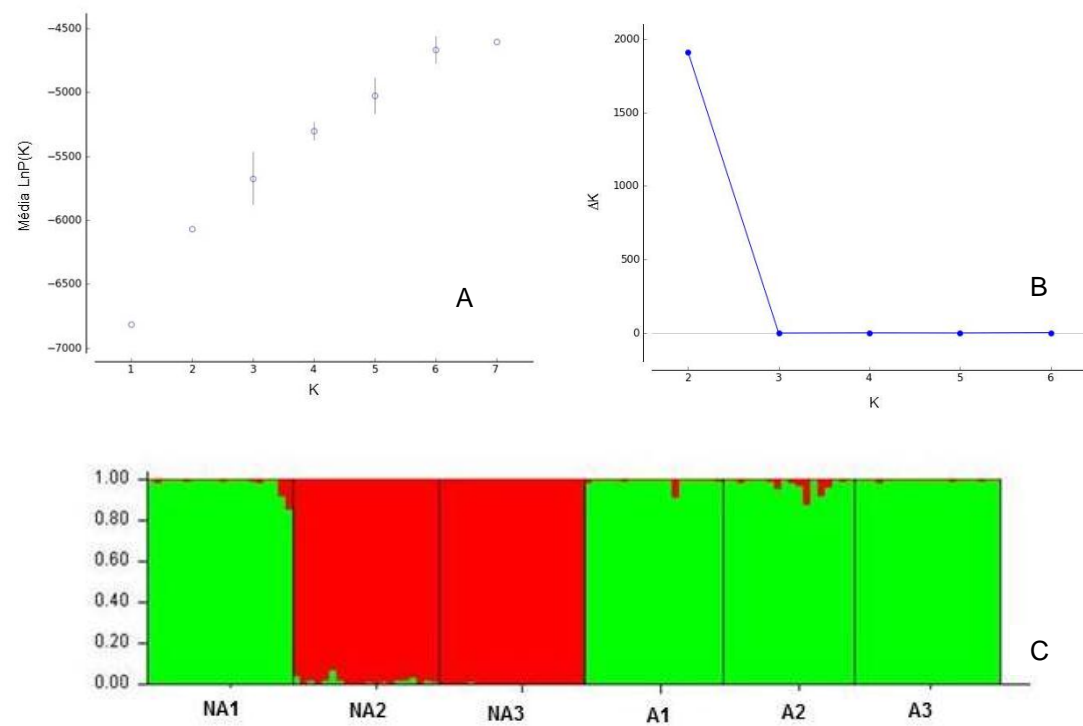


Figura 6: Análise bayesiana de atribuição genética de 117 indivíduos das seis populações de *Handroanthus ochraceus* baseada em 104 loci de ISSR. A. Gráfico de $\ln P(D)$ para 15 corridas independentes. Os valores apresentados são média \pm desvio padrão. B. Gráfico do ΔK . C. Representação gráfica dos grupos genéticos ($K=2$), onde as populações são separadas por barras verticais.

4. Discussão

Apesar das populações apomíticas de *Handroanthus ochraceus* apresentarem taxas elevadas de sementes poliembriônicas (Sampaio, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012) não foram encontrados clones entre os indivíduos analisados o que foi indicado por uma elevada diferenciação genética dentro das populações. De forma geral, as populações apomíticas apresentaram um nível de polimorfismo muito próximo ao encontrado para as não apomíticas. Além disso, foi obtida uma maior diversidade genética dentro das populações, independentemente de serem ou não apomíticas, o oposto do que é descrito para populações apomíticas e autoférteis (Paun *et al.*, 2006; Hörandl & Paun, 2007; Majeský *et al.*, 2012) e indicando a ocorrência de reprodução sexuada com fecundação cruzada. Ainda foi possível observar uma forte relação entre a população não apomítica de Uberlândia (MG) e as populações apomíticas determinando que esta população possivelmente apresente uma origem distinta das demais não apomíticas.

Assim como os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), os RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) são marcadores moleculares dominantes. Dessa forma, os resultados obtidos por esses diferentes tipos de *primers* são passíveis de comparação (Nybom & Bartish, 2000; Nybom, 2004; Lousada *et al.*, 2011). A porcentagem média de bandas polimórficas encontrada para populações não apomíticas ($P=73,08\%$) foi semelhante ao encontrado com marcadores RAPD para a espécie de Bignoniaceae autoincompatível *Jacaranda decurrens* ($P=69,2\%$; Bertoni *et al.*, 2010), enquanto que o valor encontrado para as populações apomíticas ($P=59,62\%$) foi semelhante ao encontrado para a espécie tida como autocompatível *Incarvillea younghusbandii* ($P=55,7\%$) com marcadores AFLP (Zhu *et al.*, 2009), o que pode ser resultado de algum sucesso no estabelecimento dos clones nas populações apomíticas.

Uma comparação qualitativa entre estudos anteriores com *Handroanthus ochraceus* utilizando microssatélites e os resultados do presente estudo com marcadores ISSR também pode ser estabelecida com cautela (Lousada *et al.*, 2013). Em uma análise com populações de *H. ochraceus* utilizando sete *loci* microssatélites, Moreira *et al.* (2009) encontraram valores de diversidade genética menores ($H_e = 0,439$) quando comparados a diversidade encontrada por Nybom (2004) em uma revisão de 106 estudos com microssatélites ($H_e = 0,61$). Já as populações analisadas no presente estudo apresentaram

valores de diversidade genética ($H_e = 0,227$) semelhantes ao encontrado para marcadores ISSR em uma revisão de 307 estudos com marcadores dominantes ($H_e = 0,22$) (Nybom, 2004). Deste modo, é possível considerar que os marcadores ISSR utilizados no presente estudo representam uma metodologia importante para pesquisas sobre diversidade genética em *H. ochraceus*.

Tendo em vista a elevada taxa de sementes poliembriônicas e elevado número de embriões adventícios por semente (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010, Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012), é curioso que não tenham sido encontrados clones entre os indivíduos analisados nas populações apomíticas de *Handroanthus ochraceus*. Entretanto, embora clones não tenham sido amostrados, isso não quer dizer que eles não existam. O grande número de sementes por fruto e a sua dispersão pelo vento, além do grande número de indivíduos por população pode ter dificultado a amostragem desses indivíduos. Além disso, os clones podem ter maiores dificuldades em se estabelecer e atingir a maturidade, já que embriões apresentando anomalias morfológicas ou em estágios imaturos nas sementes poliembriônicas de *Handroanthus* parecem ser clones (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012).

A população apomítica de Lagoa Santa (A2) representa uma exceção, pois apresentou um polimorfismo equiparável às não apomíticas, o que pode estar relacionado à sua localização. Em regiões onde são encontradas populações autoincompatíveis e apomíticas, a diversidade das apomíticas parece ser maior (Daurélio *et al.*, 2004; Hörandl & Paun, 2007), o que foi observado para esta população ($H_e = 0,221$) localizada na Serra do Cipó, onde já foram registradas populações autoestéreis não apomíticas (Sampaio, 2010). Já a população não apomítica NA3 com os menores valores de polimorfismo gênico, foi a única que apresentou poucos indivíduos de grande porte e a maioria dos seus indivíduos de pequeno porte, os quais podem ser juvenis ou resultado de rebrote na área do Parque Estadual do Biribiri. Os menores valores dos parâmetros de diversidade genética nesta população indicam que a maioria dos indivíduos de *H. ochraceus* encontrados na área possam ser juvenis, estando H_e (0,208) mais próximo aos valores encontrados para populações em estágio sucessional inicial ou médio H_e (0,166 - 0,195), do que ao encontrado para o estágio tardio H_e (0,287) (Nybom & Bartish, 2000).

Handroanthus ochraceus apresentou valores de H_e (0,227) e Φ_{ST} (0,39) condizentes ao sistema reprodutivo misto e à forma de vida perene. Plantas que apresentam o sistema reprodutivo predominantemente alógamo ou misto apresentam H_e entre 0,219 e 0,260 e

Φ_{ST} entre 0,27 e 0,28, quando avaliadas com marcadores RAPD (Nybom & Bartish, 2000). Resultados semelhantes ao encontrado para a Bignoniaceae autoincompatível *Jacaranda decurrens* $\Phi_{ST} = 0,303$ com o mesmo marcador (Bertoni *et al.*, 2010), mas diferente do encontrado para a espécie de distribuição restrita e possivelmente autocompatível *Incarvillea younghusbandii*, com marcadores AFLP, $H_e = 0,063$ e $\Phi_{ST} = 0,614$ (Zhu *et al.*, 2009). Os valores encontrados para *H. ochraceus* ainda condizem com a forma de vida perene ($\Phi_{ST} = 0,25 - 0,39$), diferindo fortemente dos valores encontrados para plantas anuais ($\Phi_{ST} = 0,70$) com marcadores RAPD (Nybom & Bartish, 2000).

A maior variação encontrada dentro das populações (61%, $\Phi_{ST} = 0,39$) corresponde ao encontrado em populações tipicamente alógamas (Richards, 1986), o que só pode ser explicado pela manutenção da reprodução sexuada nas populações apomíticas esporofíticas (Richards, 2003; Costa *et al.*, 2004; Sampaio *et al.*, *in press*), incluindo a ocorrência de fecundação cruzada. O fato de as espécies de *Handroanthus* possuírem a dispersão das sementes pelo vento também é um fator importante para que haja uma maior variação dentro das populações, embora Nybom & Bartish (2000) não tenham encontrado diferenças significativas entre os diferentes modos de dispersão das sementes.

Estudos de cruzamentos intercitótipos (Sampaio, 2010) e de histologia dos eventos pós-polinização apontam para a formação e sobrevivência do embrião zigótico em espécies apomíticas de Bignoniaceae (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, *in press*), podendo justificar a elevada diversidade genética nessas populações ($H_e = 0,227$). O estudo da estrutura populacional de outra Bignoniaceae apomítica autofértil (Firetti-Leggieri *et al.*, 2011; 2013; Sampaio *et al.*, *in press*), *Anemopaegma arvense*, apresentou dados muito semelhantes aos de *H. ochraceus* com marcadores RAPD, com $\Phi_{ST} = 0,283$, mas com a porcentagem de bandas polimórficas inferior à encontrada para as populações apomíticas no presente estudo, com $P=41,4\%$ na população de Bauru (Batistini *et al.*, 2009), onde a poliembrionia e a poliploidia já foram confirmadas (Sampaio *et al.*, *in press*). Numa espécie correlata, *A. acutifolium*, o tubo pró-embriônico cresce antes de os embriões adventícios serem iniciados, fazendo com que o embrião zigótico seja maior e mais vigoroso na semente madura (Sampaio *et al.*, *in press*), fator que diminuiria a chance do estabelecimento dos embriões clonais e justificaria a maior variação encontrada dentro das populações. Por outro lado, em *Eriotheca pubescens* (Malvaceae), os embriões clonais parecem se desenvolver e chegar à maturidade com maior facilidade, pois crescem mais rápido (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2005; 2012), o que pode explicar a grande porcentagem

de possíveis clones encontrada na análise de uma população apomítica analisada por marcadores RAPD (Martins & Oliveira, 2003).

Para as populações das espécies apomíticas *H. ochraceus* (presente estudo) e *A. arvense* (Batistini *et al.*, 2009) foi obtida uma maior diversidade genética dentro das populações, contrastando com resultados obtidos para outras apomíticas (Hörandl & Paun, 2007; Majesky *et al.*, 2012) e para *Ranunculus carpaticola* com apomixia gametofítica (Paun *et al.*, 2006). Esse resultado deve ser consequência do sistema reprodutivo misto adotado pelas populações apomíticas esporofíticas daquelas espécies. As Bignoniaceae são primariamente autoincompatíveis (Gibbs & Bianchi, 1993; 1999; Bittencourt, 2003; Bittencourt & Semir, 2005), mas no caso das populações apomíticas podem ser formados embriões clonais, embriões oriundos de fecundação cruzada, bem como oriundos de autofecundação (Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013). Isso proporciona uma grande flexibilidade para a reprodução via sementes nestas populações e, embora elas continuem dependentes de polinizações, os polinizadores não precisam ser tão especializados, tendo sido registrado até mesmo o desenvolvimento de frutos através de autopolinizações espontâneas em *A. acutifolium* (Sampaio *et al.*, 2013).

As populações de *Handroanthus ochraceus* analisadas no presente estudo foram organizadas em dois grupos distintos na análise de agrupamento e na análise Bayesiana de atribuição genética. As três populações não apomíticas foram separadas em grupos distintos, de modo que as populações de Pires do Rio - GO (NA2) e Biribiri - MG (NA3) constituíram um grupo enquanto a população não apomítica de Uberlândia - MG (NA1) foi fortemente agrupada às populações apomíticas. A variação observada entre estes dois grupos na AMOVA (12%) permite inferir uma forte diferenciação entre as populações que os constituem, de modo que a formação destes grupos está possivelmente associada a origens distintas.

Na análise de ordenação as populações apomíticas foram ordenadas em um contínuo, diferente das populações não apomíticas, distantes entre si. Deste modo, é possível que os indivíduos autoférteis apomíticos que constituem as populações de Córrego Danta - MG (A1), Lagoa Santa - MG (A2) e São José do Rio Preto - SP (A3) apresentem uma origem única, porém distinta da linhagem não apomítica em *H. ochraceus*. Com relação às não apomíticas, a forte ligação observada entre a população de Uberlândia - MG (NA1) e as apomíticas e a separação desta com as demais populações autoestéreis (NA2 e

NA3), permite supor que as populações não apomíticas de *H. ochraceus* analisadas no presente estudo não tiveram uma única origem.

A proximidade entre a população de Uberlândia (NA1) e as apomíticas indica que os indivíduos que a constituem possam apresentar a mesma constituição genética dos indivíduos de uma possível população ancestral dos apomíticos. Acredita-se que a origem desses apomíticos esteja relacionada à aloploidia (Sampaio *et al.*, *in press*), baseado no registro de espécimes intermediários que indicam a ocorrência de hibridação (Gentry, 1992; Firetti-Leggieri *et al.*, 2011, 2013), muito comum durante os períodos de glaciação. No último evento de glaciação (12.000 a 18.000 anos), as temperaturas muito baixas e os fortes congelamentos criaram um clima muito severo para a sobrevivência de espécies do Cerrado no sudeste e na região central do Brasil (Collevatti *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2009), deste modo, as paisagens savânicas foram dominadas por pastagens subtropicais e incêndios frequentes (Collevatti *et al.*, 2003). Por esta razão ocorreram migrações de comunidades vegetais do Cerrado para regiões mais amenas ou para locais restritos onde as condições climáticas eram mais favoráveis, os refúgios (Collevatti *et al.*, 2003). No Holoceno (7.000 anos), as condições climáticas começaram a se reestabelecer, com o aumento da temperatura e da umidade, permitindo o retorno das populações ao seu local de origem (Collevatti *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2007, 2008). Este padrão sequencial de alterações climáticas pode ter determinado o contato de linhagens distintas viabilizando o fluxo gênico e a hibridação entre espécies filogeneticamente próximas (Collevatti *et al.*, 2003), e teria sido o gatilho para a ocorrência da poliploidização e subsequente expressão da apomixia. Porém, somente estudos de filogeografia, que utilizam análises histórico-climáticas para compreender a atual distribuição geográfica e a genealogia das espécies (Collevatti *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2007) podem corroborar com a hipótese aqui apresentada.

Os resultados encontrados para as populações de *Handroanthus ochraceus* demonstraram que as populações apomíticas nem sempre são geneticamente uniformes, pois, no caso das populações analisadas não foram encontrados clones. A maior variação encontrada dentro das populações, tanto para apomíticas quanto não apomíticas, parece estar relacionada à manutenção da reprodução sexuada entre os indivíduos autoférteis (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio, 2010; Sampaio *et al.*, *in press*). O sistema reprodutivo de autoincompatibilidade nas populações não apomíticas ou misto nas apomíticas (Nybom, 2004) também parece ser um fator determinante para esta maior

diversidade dentro das populações. A separação das populações não apomíticas em grupos distintos permite inferir que os indivíduos que as constituem apresentem diferentes constituições genéticas indicando origens distintas para estas populações não apomíticas de *H. ochraceus*. A forte ligação entre a população não apomítica de Uberlândia e as populações apomíticas aponta para uma possível população ancestral das apomíticas de *H. ochraceus*, constituída por indivíduos geneticamente semelhantes àqueles que constituem a população de Uberlândia. Deste modo, pesquisas relacionadas à origem das diferentes populações de *H. ochraceus* ainda são necessárias para que a hipótese aqui apresentada possa ser ou não corroborada.

5. Referências Bibliográficas

Allem, A. C. 2004. Optimization theory in plant evolution: an overview of long term evolutionary prospects in the angiosperms. **The Botanical Review**, v. 69, p. 225-251.

Asker, S. E. & Jerling, L. 1992. **Apomixis in plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Barbosa, A. A. A. & Sazima, M. 2008. Biologia reprodutiva de plantas herbáceo-arbustivas de uma área de campo-sujo de Cerrado. In: Sano, S. M., Almeida, S. P. & Ribeiro, J. F. (ed.). p. 291-318. **Cerrado: Ecologia e Flora**, vol. 1. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, e Embrapa Cerrados, Planaltina.

Barros, M. G. 2001. Pollination ecology of *Tabebuia aurea* (Manso) Benth & Hook and T. ochracea (Cham). Standl. (Bignoniaceae) in central Brazil Cerrado vegetation. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 3, p. 255-261.

Batistini, A. P.; Telles, M. P. C.; Bertoni, B. W.; Coppede, J. da S.; Môro, F. V.; França, S. De C.; Pereira, A. M. S. 2009. Genetic diversity of natural populations of *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae) in the Cerrado of São Paulo State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 52-63.

Bertoni, B. W.; Telles, M. P. C.; Malosso, M. G.; Torres, S. C. Z.; Pereira, J. O.; Lourenço, M. V.; França, S. C.; Pereira, A. M. S. Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. determined using RAPD and AFLP markers. **Genetics and molecular biology**, v. 33, n. 3, p. 532-538, 2010.

Bicknell, R. A. & Koltunow, A. M. 2004. Understanding Apomixis : Recent Advances and Remaining Conundrums. **The Plant Cell**, v. 16, p. 228-246.

Bittencourt Júnior, N. S. 2003. Auto-incompatibilidade de ação tardia e outros sistemas reprodutivos em Bignoniaceae. **Tese** (Doutorado) Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Bittencourt Júnior, N. S. & Semir, J. 2005. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 493-506.

Bittencourt Júnior, 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 postpollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, n. 1-2, p. 59-76.

Cajuapé-Castells, C. & Baccarani-Rosas, M. 2005. **Transformer-3**. Las Palmas de Gran Canaria, Espanha.

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

Collevatti, R. G.; Grattapaglia, D.; Hay, J. D. 2003. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular ecology**, v. 12, n. 1, p. 105-15.

Costa, M. E.; Sampaio, D. S.; Paoli, A. A. S.; Leite, S. C. A. L. 2004. Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, n. 1950, p. 395-406.

Daurélio, L. D.; Espinoza, F.; Quarín, C. L.; Pessino, S. C. 2004. Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. **Plant Systematics and Evolution**, v. 244, n. 3-4, p. 189-199.

Dijk, P. J. Van. 2003. Ecological and evolutionary opportunities of apomixis: insights from *Taraxacum* and *Chondrilla*. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 358, n. 1434, p. 1113-21.

Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p. 2611–2620.

Felsenstein, J. 2006. **PHYLIP**: phylogeny inference package, version 3.66. Universidade de Washington, Seattle.

Firetti-Leggieri, F.; Costa, I. R.; Forni-Martins, E. R.; Lohmann, L. G.; Semir, J. 2011. Chromosome studies in Bignonieae (Bignoniaceae): the first records of polyploidy in *Anemopaegma* Mart. ex Meisn. **Cytologia**, v. 76, p.185–191.

Firetti-Leggieri, F.; Lohmann, L. G.; Alcântara, S.; Costa, I. R.; Semir, J. 2013. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **Plant Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 43-53.

Gentry, A. H. 1992. Bignoniaceae - Part. II. (Tribe Tecomae). New York: **Flora Neotropica**. Monograph: 25 (I), 370 p.

Gibbs, P. E. & Bianchi, M. B. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta**, v. 106, p. 64-7.

Gibbs, P. E. & Bianchi, M. B. 1999. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LST: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany**, v. 84, p. 449-457.

Guerra, N. A. & Natera, R. M. 2007. Chromosome numbers tree *Tabebuia* species (Bignoniaceae). **Nordic Journal of Botany**, v. 25, p. 359-360.

Hörandl, E. & Paun, O. 2007. Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials. In: Hörandl, E., Grossniklaus, U., van Dijk, P. J. & Sharbel, T. F. (eds.). p. 169-194. **Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives**. A. R. G. Gantner Verlag, Rugell, Liechtenstein.

Hörandl, E. 2011. Evolution and biogeography of alpine apomictic plants. **Taxon**, v. 60, n. 2, p. 390-402.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2002. **Área territorial oficial. Resolução da Presidência do IBGE de n° 5**. Página visitada em 18 de maio de 2013.

Kevin, K. S.; Lee, S. L., Koh, C. L. 2004. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 3, p. 657-669.

Koltunow, A. M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. **Annual review of plant biology**, v. 54, p. 547-574.

Lousada, J. M.; Borba, E. L.; Ribeiro, K. T.; Ribeiro, L. C.; Lovato, M. B. 2011. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. **Genetica**, v. 139, n. 4, p. 431-40.

Lousada, J. M.; Bernadete, M.; Borba, E. L. 2013. High genetic divergence and low variability in disjunct populations of endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in the two edaphic environments of Brazilian campos rupestres. **Brazilian Journal of Botany**.

Majeský, L.; Vasut, R. J.; Kitner, M.; Trávníček, B. 2012. The pattern of genetic variability in apomictic clones of *Taraxacum officinale* indicates the alternation of asexual and sexual histories of apomicts. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. 1-14.

Martins, R. L. & Oliveira, P. E. 2003. RAPD evidence for apomixis and clonal populations in *Eriotheca* (Bombacaceae). **Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 338-340.

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**, v. 7, p. 533-540.

Mendes-Rodrigues, C.; Sampaio, D. S.; Costa, M. E.; Caetano, A. P. S.; Ranal, M. A., Bittencourt Júnior, N. S.; Oliveira, P. E. 2012. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 207, n. 4, p. 264-274.

Moreira, P. A.; Fernandes, G. W.; Collevatti, R. G. 2009. Fragmentations and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. **Forest Ecology and Management**, v. 258, p. 2690-2695.

Nascimento, M. A. L. 1991. Geomorfologia do estado de Goiás. **Boletim Goiano de Geografia**, v. 12, n. 1, p. 1-22.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590.

Nei, M. & Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 10, p. 5269-5273.

Nybom, H. & Bartish, I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 3, n. 2, p. 93-114.

Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular ecology**, v. 13, n. 5, p. 1143-1155.

Paun, J. O.; Greilhuber, E.; Temsch, M.; Hörandl, E. 2006. Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). **Molecular ecology**, v. 15, n. 4, p. 897-910.

Peakall, Rod; Smouse, P. 2011. **GenAlEx 6.41**. The Australian National University, Caberra, Australia.

Pritchard, J. K.; Wen, X.; Falush, D. 2010. **Documentation for structure software : Version 2.3.4**. Oxford, Inglaterra.

Qu, R., Li, X., Luo, Y., Dong, M., Xu, H., Chen, X. & Dafni, A. 2007. Wind-dragged corolla enhances self-pollination: a new mechanism of delayed self-pollination. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1155–1164.

Ramos, A. C. S.; Lemos-Filho, J. P.; Ribeiro, R. A.; Santos, F. R.; Lovato, M. B. 2007. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. **Annals of Botany**, v. 100, n. 6, p. 1219-1228.

Ramos, A. C. S.; Lemos-Filho, J. P. De; Lovato, M. B. 2009. Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the Vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. **The Journal of Heredity**, v. 100, n. 2, p. 206-216.

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

Richards, A. J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 358, n. 1434, p. 1085-1093.

Saadi, A. 1995. A geomorfologia da Serra do Espinhaço em Minas Gerais e de suas margens. **Geonomos**, v. 3, n. 1, p. 41-63.

Salomão, A. N. & Allem, A. C. 2001. Polyembryony in angiosperm trees of the Brazilian cerrado and caatinga vegetation. **Acta Botânica Brasilica**, v. 15, p. 369-378.

Sampaio, D. S. 2010. Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade. **Tese** (Doutorado em Ecologia e Conservação dos Recursos Naturais). Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Sampaio, D. S.; Moço, M. C. C.; Mariath, J. E. A. 2013. Floral ontogeny of *Aeschynomene falcata* and *A. sensitive* (Leguminosae: Papilionoideae) supports molecular phylogenetic data. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, p. 499 – 513.

Sampaio, D. S.; Bittencourt Júnior, N. S.; Oliveira, P. E. M. In Press. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from Central Brazil. **Botanical Journal of Linnean Society**.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, N.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739.

Vekemans, X.; Beauwens, T.; Lemaire, M.; Roldan-Ruiz, I. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 139–151.

Whitton, J.; Sears, C.; Baack, E.J.; Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, v.169, p.169–182.

Voigt-Zielinski, M.L.; Piwczyński, M.; Sharbel, T. F. 2012. Differential effects of polyploidy and diploidy on fitness of apomictic *Boechera*. **Sexual Plant Reproduction**, v. 25, n. 2, p. 97-109.

Zapater, M. A.; Califano, L. M.; Del Castillo; E. M.; Quiroga, M. A., Lozano; E. C. 2009. Las especies nativas y exóticas de *Tabebuia* y *Handroanthus* (Tecomeae, Bignoniaceae) en Argentina. **Darwiniana**, v. 47, n. 1, p. 185-220.

Zhu, Y.; Geng, Y.; Tersing, T.; Liu, N.; Wang, Q.; Zhong, Y. 2009. High genetic differentiation and low genetic diversity in *Incarvillea younghusbandii*, an endemic plant of Qinghai-Tibetan Plateau, revealed by AFLP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 5, p. 589-596.

CAPÍTULO II

**Análises morfológicas auxiliam na separação de diferentes populações de
Handroanthus ochraceus e *H. chrysotrichus* (Bignoniaceae)**

Este capítulo está em formato de artigo científico, porém, não está nos moldes de nenhuma revista específica.

RESUMO

A poliploidia é uma característica frequente entre as angiospermas e pode ocasionar efeitos fenotípicos significativos, sendo que um dos mais conhecidos é o aumento do volume das células, o “efeito giga”. Em Bignoniaceae, a expressão da apomixia esporofítica está associada com a ocorrência de poliembrionia e esta, por sua vez, está vinculada à poliploidia em espécies dos gêneros *Anemopaegma* e *Handroanthus*. *Handroanthus ochraceus* e *H. chrysotrichus* apresentam taxas elevadas de sementes poliembriônicas, assim ambas poderiam apresentar populações constituídas por indivíduos poliploides. Entretanto, poucos estudos relacionando poliembrionia e poliploidia foram realizados dentro de uma mesma população, o que ainda não permite o estabelecimento de um padrão entre as Bignoniaceae. *Handroanthus ochraceus* e *H. chrysotrichus* são espécies arbóreas morfológicamente semelhantes o que normalmente ocasiona problemas de identificação. Com o objetivo de buscar distinções morfológicas entre populações mono e poliembriônicas de *H. ochraceus* e determinar características morfológicas que auxiliam na separação de *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus*, foram analisadas populações reconhecidamente monoembriônicas não apomíticas e poliembriônicas apomíticas de *H. ochraceus* e uma população poliembriônica apomítica de *H. chrysotrichus*. Características qualitativas e quantitativas de folha, flor e fruto foram avaliados a partir de análises estatísticas univariadas e multivariadas. Área do grão de pólen, comprimento do pedicelo, largura do estigma e número de nectários extraflorais no cálice apresentaram maiores valores para populações poliembriônicas de *H. ochraceus* quando comparadas às monoembriônicas. Estas características são uma possível evidencia da relação entre poliembrionia e poliploidia em *H. ochraceus*, já que estas maiores medidas podem estar associadas ao aumento do volume celular geralmente acarretado pela poliploidia. Diferentes características morfológicas separaram as populações de *H. ochraceus* da população de *H. chrysotrichus*, as quais podem auxiliar na identificação de indivíduos e na distinção das espécies. Assim as análises morfométricas determinaram que características morfológicas podem auxiliar na separação de populações mono e poliembriônicas de *H. ochraceus*, e em conjunto com análises de biologia reprodutiva podem ser uma metodologia auxiliar na determinação da ploidia e sistema reprodutivo.

Palavras-chave: área dos grãos de pólen, características morfológicas, poliembrionia, *Tabebuia chrysotricha*, *Tabebuia ochracea*.

ABSTRACT

Polyploidy is a frequent feature among angiosperms that can cause significant phenotypic effects, a well-known effect of polyploidy in plants is cell enlargement, the ‘gigas’ effect. In Bignoniaceae, sporophytic apomixis is associated with the occurrence of polyembryony this, in turn, is linked to polyploidy in *Anemopaegma* and *Handroanthus* species. *Handroanthus ochraceus* and *H. chrysotrichus* have high rates of polyembryonic seeds, so the both species could have populations consisted by polyploid individuals. However, a lack of studies linking polyembryony and polyploidy were performed within the same population which does not allow the establishment of a pattern among Bignoniaceae species. *Handroanthus ochraceus* and *H. chrysotrichus* are two morphologically close species of yellow trumpet tree which usually causes identification problems. In order to seek for morphological differences between mono and polyembryonic populations of *H. ochraceus* and morphological traits to separate the *H. chrysotrichus* and *H. ochraceus*, populations of *H. ochraceus* known as monoembryonic not apomictic and as polyembryonic apomictic and a polyembryonic apomictic population of *H. chrysotrichus* were analyzed. Qualitative and quantitative morphological characteristics of leaf, flower and fruit were evaluated through univariate and multivariate analyzes. The pollen grain area, the length of peduncles, the width of stigma and the number of extrafloral nectaries in the calyx showed higher values for polyembryonic populations of *H. ochraceus* when they were compared to monoembryonic. These features are an evidence of a possible relationship between polyembryony and polyploidy in *H. ochraceus*, since these larger measures may be associated with the cell volume increase usually entailed by polyploidy. Several morphological characters separated *H. ochraceus* from *H. chrysotrichus*, which can support the identification of individuals and the distinction between the two species. Therefore, the morphometric analysis determined that morphological features can make a distinction between mono and polyembryonic populations of *H. ochraceus* and the association of this methodology with reproductive biology analysis can be a complement for the determination of ploidies and reproductive system in both species.

Key words: morphological traits, pollen grain area, polyembryony, *Tabebuia chrysotricha*, *Tabebuia ochracea*.

1. Introdução

A poliploidia pode causar modificações em diversos aspectos fenotípicos das plantas com relação à morfologia e fisiologia, pois altera o ciclo celular, o tamanho das células e o desenvolvimento do organismo (Stebbins, 1971; Husband *et al.*, 2008). Um dos efeitos mais conhecidos da eupoliploidização nas plantas é o aumento do volume das células, o “efeito giga” (Otto & Whitton, 2000; Balao *et al.*, 2011). Dessa forma, características fenotípicas podem ser consideradas um bom método para avaliar populações que apresentam indivíduos poliploides, diploides ou ambos, e são determinantes no reconhecimento de espécies, subespécies e variedades morfológicas. O diâmetro e o tamanho dos grãos de pólen são um dos métodos mais utilizados para estudos de ploidia (Mishra, 1997; Otto & Whitton, 2000; Zlesak, 2009). No entanto, alguns autores relatam que essa característica não está estritamente relacionada com a ploidia das plantas, mas envolve fatores distintos como condições ambientais (Tate & Simpson, 2004).

O número cromossômico entre as espécies de Bignoniaceae é relativamente constante, com cerca de 72% delas apresentando $2n=40$ cromossomos, considerado o número diploide para as espécies da família (Goldblatt & Gentry 1979; Sampaio, 2010). Existem relatos de espécies eupoliploides em Bignoniaceae (Piazzano, 1998; Sampaio, 2010; Firetti-Leggiere *et al.*, 2011; Sampaio *et al.*, *in press*), as quais apresentam frequentemente alterações em seus sistemas reprodutivos, com relatos de autofertilidade e apomixia, numa família predominantemente autoincompatível (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Semir, 2005; Bittencourt & Moraes; 2010, Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012; Sampaio *et al.*, 2013).

Em Bignoniaceae, a elevada frequência de poliembrionia, ou seja, a presença de mais de um embrião por semente, geralmente é um indicativo da ocorrência da apomixia esporofítica (Piazzano, 1998; Bittencourt, 2003; Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio, 2010; Firetti-Leggiere *et al.*, 2011; 2013; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012; Sampaio *et al.*, *in press*) e assim como relatado para Malvaceae-Bombacoideae (Oliveira *et al.*, 1992; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2005) e Melastomataceae (Goldenberg & Shepherd, 1998), a expressão da apomixia esporofítica está vinculada à poliploidia. Estudos recentes com o gênero *Anemopaegma* (Firetti-Leggiere *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*) revelaram que a poliembrionia pode ser observada em todas as espécies poliploides analisadas, uma relação que já foi descrita para outras Bignoniaceae, como *Handroanthus*

chrysotrichus (Piazzano, 1998; Ortolani, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010) e *H. ochraceus* (Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010).

Handroanthus ochraceus e *H. chrysotrichus* apresentam elevadas taxas de sementes poliembriônicas, sendo descritos mais de 80% de sementes com múltiplos embriões (Piazzano, 1998; Salomão & Allem, 2001; Costa *et al.*, 2004; Sampaio, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012), revelando que ambas podem apresentar populações constituídas por indivíduos poliploides. No entanto, a ausência de estudos que relacionam a poliploidia e a poliembria utilizando um número considerável de indivíduos dentro de uma mesma população não permite afirmar que populações destas espécies sejam compostas apenas por indivíduos diploides ou poliploides. *Handroanthus ochraceus* e *H. chrysotrichus* são espécies morfológicamente semelhantes sendo que a ocorrência de híbridos naturais entre elas já foi sugerida devido à observação de indivíduos com características intermediárias (Gentry 1992). A semelhança entre estas espécies ainda provoca problemas de identificação (Silva *et al.*, 2009; Bittencourt & Moraes, 2010) que podem comprometer desde estudos taxonômicos a análises moleculares.

A expressão da apomixia esporofítica e a consequente poliembria em populações de *H. ochraceus* pode ser um indicativo da ocorrência de poliploidia (Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010) e assim pode determinar características morfológicas distintas quando comparadas às populações monoembriônicas. A observação de características determinantes para cada grupo permitiria a identificação do sistema reprodutivo utilizando metodologias mais simples. Da mesma forma, a determinação de características peculiares a *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus* poderia facilitar a identificação de ambas as espécies e viabilizar futuras pesquisas. Assim, o presente trabalho teve por objetivo determinar diferenças morfológicas que podem separar populações conhecidamente apomíticas e não apomíticas de *H. ochraceus* e características que podem auxiliar na identificação e separação de indivíduos e populações de *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus*.

2. Material e Métodos

2.1 Espécies estudadas e Áreas de Estudo

Handroanthus ochraceus está distribuída em quase todo o território brasileiro, sendo um elemento típico do Cerrado, amplamente distribuída neste bioma e podendo

estender-se por áreas adjacentes, porém é raramente encontrada no interior de florestas fechadas (Gentry, 1992). Está representada na América Central pelas subespécies *Handroanthus ochraceus* subespécie *heterotichus* (DC) S. Grose e *Handroanthus ochraceus* subespécie *neochrysanthus* (A. H. Gentry) S. Grose (Gentry, 1992). Já *Handroanthus chrysotrichus* ocorre na Mata Atlântica, do estado de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, sendo ainda encontrada na Argentina (Gentry 1992). Ocorre em restingas e florestas abertas, topos de morros, áreas perturbadas e são também comumente encontradas em áreas urbanas, como indivíduos cultivados (Gentry 1992).

Para a realização das análises morfométricas foram selecionadas populações de *Handroanthus ochraceus* apomíticas e não apomíticas e uma população de *H. chrysotrichus* previamente conhecidas. As coletas foram realizadas nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e no Distrito Federal, Brasil (Tabela 1, Figura 1).

Sampaio (2010) descreveu as populações analisadas quanto à embrionia das sementes, no entanto, nem todos os indivíduos foram avaliados quanto à ploidia devido à inviabilidade das sementes para a germinação. Para a população de Uberlândia (MG) seis indivíduos foram descritos como monoembriônicas, dentre os quais um foi avaliado como diploide ($2n=40$). Na população de Pires do Rio (GO) oito indivíduos da população foram descritos como monoembriônicos e diploides ($2n=40$) (Sampaio, 2010). Para estas duas populações foi obtida uma porcentagem de sementes com múltiplos embriões nestas populações igual à zero (Tabela 1) (Sampaio, 2010). A população do Jardim Botânico de Brasília (DF) apresentou um indivíduo com uma taxa de 3,9% de poliembrionia sendo considerada monoembriônica (Tabela 1) (Sampaio, 2010), no entanto esta população já foi descrita anteriormente como autoincompatível monoembriônica e diploide ($2n=40$) (Gibbs & Bianchi, 1993). Já na população de São José do Rio Preto (SP) cinco indivíduos foram analisados e apresentaram uma variação de 62 a 94% de sementes poliembriônicas, sendo uma população reconhecidamente apomítica e poliembriônica (Bittencourt & Moraes, 2010). Entre os cinco indivíduos avaliados para a população de São José do Ri Preto apenas foi avaliado quanto à ploidia e descrito como poliploide ($2n=80$) (Tabela 1) (Sampaio, 2010). Na população de Córrego Danta (MG), entre seis indivíduos analisados, um apresentou apenas 2% de sementes poliembriônicas, outro apresentou 25% de sementes poliembriônicas e os demais indivíduos mais de 50%, sendo esta uma população mista com indivíduos mono e poliembriônicos (Sampaio, 2010). Com relação a *H. chrysotrichus* foi observado um nível elevado de poliembrionia (86,21%) para os diferentes indivíduos

avaliados e também a ocorrência de poliploidia ($2n=80$), sendo assim a população foi considerada poliembriônica (Tabela 1) (Sampaio, 2010).

Devido a um número reduzido de indivíduos analisados quanto à ploidia, não é possível afirmar que as populações sejam constituídas apenas por indivíduos diploides ou poliploides. Entretanto, é possível inferir que as populações consideradas poliembriônicas sejam formadas por um número considerável de indivíduos poliploides já que nos gêneros *Anemopaegma* (Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*) e *Handroanthus* (Piazzano, 1998; Bittencourt, 2003; Ortolani, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010) a poliembria está associada com a ocorrência da poliploidia.

As coletas foram realizadas em diferentes períodos do ano de 2012 de acordo com a floração (agosto) e frutificação (setembro a outubro) das populações analisadas. Foram coletadas amostras de folhas, flores e frutos, em dez indivíduos de cada população. Para cada indivíduo foram coletadas pelo menos duas amostras de cada órgão. A população do Jardim Botânico de Brasília (OM3) não frutificou no ano da coleta, por isso não foi possível realizar as análises previstas para frutos nesta população. A população do município de Córrego Danta (OP2), passou por um evento de fogo entre os períodos de floração (agosto) e frutificação (setembro), não ocorrendo frutificação no ano de 2012, não sendo possível realizar as análises morfológicas de fruto, além disso, não foi possível coletar folhas em três indivíduos dessa população.

Tabela 1: Populações de *Handroanthus ochraceus* e *H. chrysotrichus* avaliadas no presente estudo. Espécie (código adotado para a população no decorrer do trabalho); embrionia, porcentagem de sementes poliembriônicas para cada população e número de indivíduos avaliados por Sampaio (2010); ploidia e número de indivíduos avaliados por Sampaio (2010); município, estado e localidade onde estão as populações analisadas; coordenadas geográficas do local de coleta; número do material testemunho depositado em Herbário.

Espécie (Código da população)	Embrionia (% de sementes poliembriônicas, n)	Ploidia (n)	Município	Localização Geográfica	Material testemunho
<i>H. ochraceus</i> (OM1)	Monoembriônica (0%, n=5)	2n=2x=40 (n=1)	Uberlândia – MG (Sucupira*)	19°18'34,09"S 48°26'48,10"O	HUFU-52585
<i>H. ochraceus</i> (OM2)	Monoembriônica (0%, n=8)	2n=2x=40 (n=8)	Pires do Rio – GO (BR 050 – Km 153)	17°11'37,26"S 47°45'02,83"O	HUFU-55507
<i>H. ochraceus</i> (OM3)	Monoembriônica (3,9%, n=1)	2n=2x=40 (n=1)	Brasília – DF (JBB*)	15°53'40,83"S 47°51'09,49"O	HUFU-48837
<i>H. ochraceus</i> (OP1)	Poliembriônica (62-94%, n=5)	2n=4x=80 (n=1)	São José do Rio Preto – SP (Campus UNESP*)	20°47'10,46"S 49°21'31,84"O	SJRP-29235
<i>H. ochraceus</i> (OP2)	Poliembriônica (2-66%, n=6)	-	Córrego Danta – MG (BR 262 - Km 570)	19°41'12,40"S 46°02'19,60"O	HUFU-52593
<i>H. chrysotrichus</i> (CP)	Poliembriônica (86%)	2n=4x=80	Uberlândia – MG (Campus UFU*)	18°53'10,29"S 48°14'16,59"O	HUFU-52589

*Sucupira: região fora do perímetro urbano da cidade de Uberlândia; JBB: Jardim Botânico de Brasília; UNESP: Campus do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual de São Paulo - Campus São José do Rio Preto; UFU: Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia.

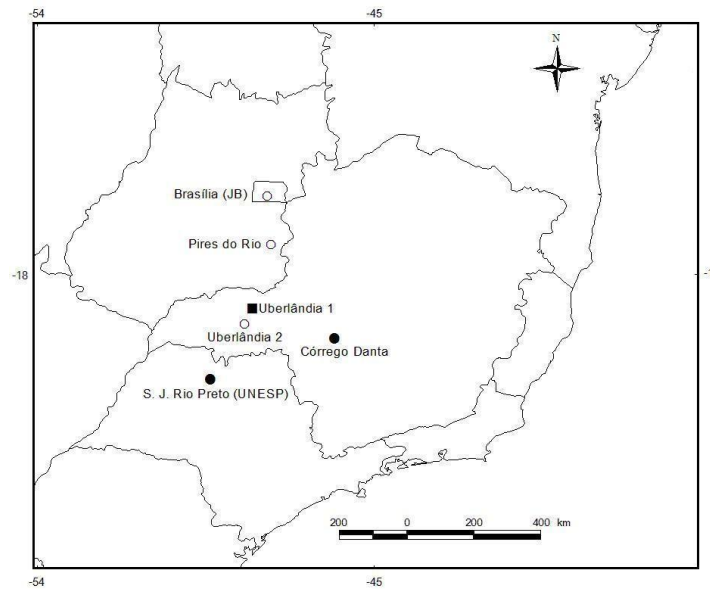


Figura 1: Mapa de distribuição das populações estudadas. Populações apomíticas poliembrionicas de *Handroanthus* ●; populações não apomíticas monoembrionicas de *H. ochraceus* ○; população apomítica poliembrionica de *H. chrysotrichus* ■. Mapas elaborados por Ana Luíza Freitas Oliveira com auxílio do programa ArcView GIS versão 3.2.

2.2 Características avaliadas

Folhas, flores e frutos de cada população foram herborizados para as posteriores análises morfométricas. Botões florais e flores também foram conservados em etanol 70% para as análises de algumas características. Foram analisadas 12 características morfológicas foliares, 19 florais e nove dos frutos (Tabela 2).

A determinação de características qualitativas para todas as estruturas foram baseadas em Radford (1986) e Gentry (1992). Para a mensuração de estruturas macroscópicas foi utilizado um paquímetro digital (Digimess), com precisão de 0,01mm. Para análise da ocorrência de nectários e tricomas foi utilizado o estereomicroscópio Stemi SU6 (ZEISS). Para quantificação dos tipos de tricomas, bem como para as análises de estimativa de viabilidade polínica foi utilizado microscópio óptico DIAGTECH XSJ-900 T. O microscópio óptico BX51 (Olympus) com uma câmera digital Olympus DP70 acoplada foi utilizado para realização de fotomicrografias de tricomas e grãos de pólen.

Todas as características referentes aos folíolos foram analisadas no folíolo mediano, ou no maior folíolo quando a folha apresentou apenas quatro folíolos (Figura 2A). Para estabelecer a relação entre comprimento e largura do folíolo, o comprimento foi medido desde a base até o ápice da lâmina foliar, enquanto a largura foi medida na região de maior largura da lâmina (Figura 2A). A mensuração do comprimento da flor foi tomada desde a base do cálice até a porção mais distal da corola, enquanto a largura foi tomada na região de maior largura da corola (Figura 2G). O comprimento do pistilo foi medido desde a base do ovário até a porção mais distal do estigma com os lobos fechados (Figuras 2I, K, L). O comprimento do estame foi medido em um dos estames maiores de cada flor, desde seu ponto de inserção na corola até a porção mais distal da antera (Figuras 2I, J). Durante a coleta foi realizada uma contagem do número de frutos em cada indivíduo para avaliação do número de frutos por planta (NFP). As medidas de comprimento (CFR) e diâmetro do fruto (DFR) foram realizadas com o auxílio de uma fita, posteriormente medida com o paquímetro, já que os frutos são cilíndricos e não são perfeitamente longilíneos, apresentando curvaturas em seu comprimento (Figura 2M). Para verificar se os tricomas eram caducos, realizou-se um toque sutil na superfície da estrutura; se os tricomas saíssem ao toque eram considerados caducos.

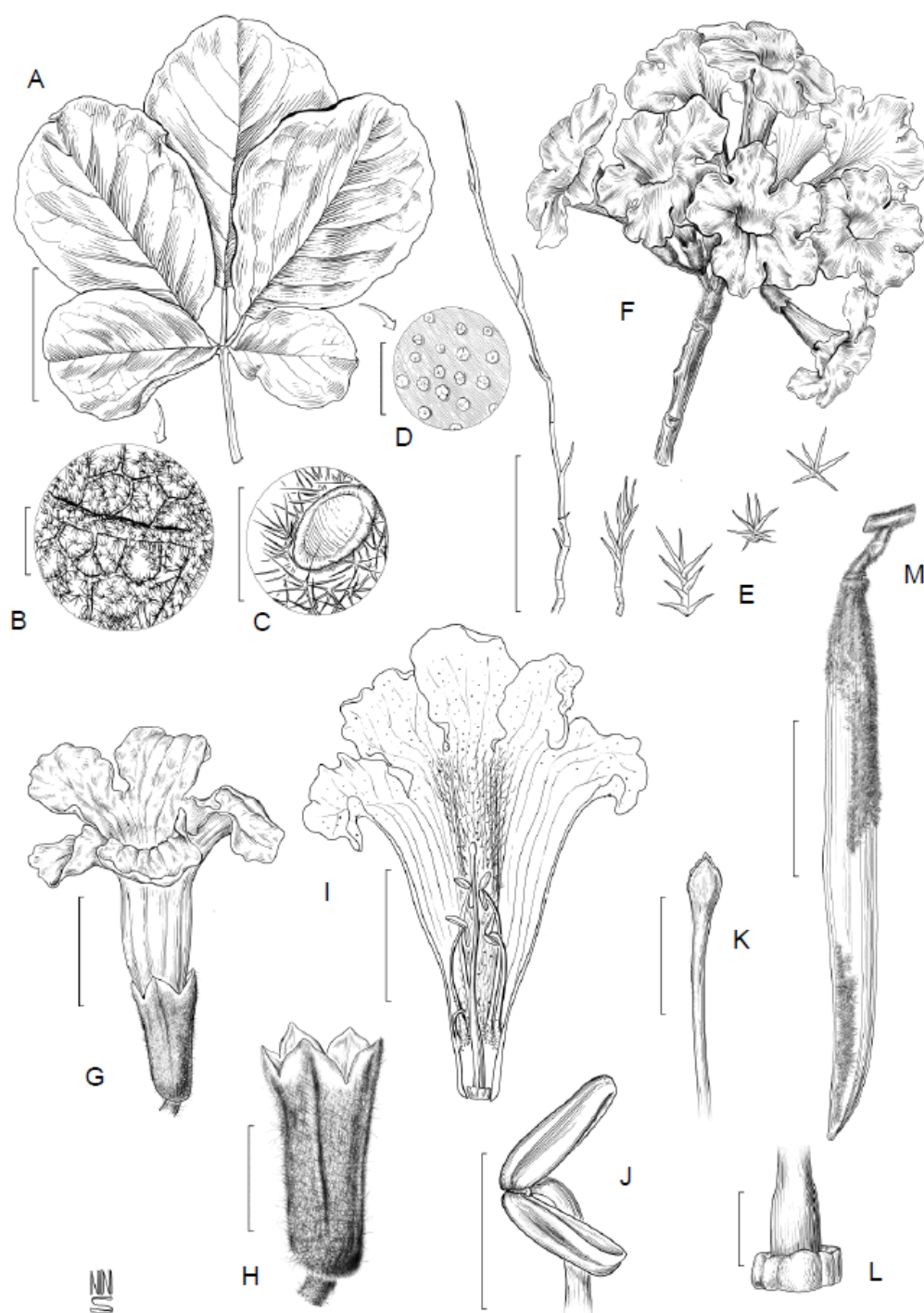


Figura 2: Detalhes da folha, flor e fruto de *Handroanthus ochraceus* coletados em Uberlândia, MG, Brasil. A. Folha digitada; B. Tricomas estrelados na face abaxial da folha; C. Nectário extrafloral; D. Tricomas lepidotos na face adaxial da folha; E. Detalhe de um tricoma barbado (à esquerda), dois tricomas dendroides (ao centro) e dois tricomas estrelados (à direita); F. Inflorescência; G. Flor; H. Cálice; I. Seção longitudinal da corola; J. Antera; K. Região estigmática do pistilo; L. Ovário e disco nectarífero; M. Fruto com tricomas caducos. A, M: barra=5cm; B, E: barra=1mm; C, D: barra=0,5mm; G, I: barra=2cm; H: barra=1cm; J, L: barra=3mm; K: barra=5mm. Ilustração: Natanael Nascimento dos Santos.

As análises da estimativa de viabilidade polínica foram realizadas para avaliar se a viabilidade em populações apomíticas seria reduzida em comparação com as populações não apomíticas. Essa estimativa foi realizada através da coloração com Carmim Acético, sendo que, os grãos de pólen considerados inviáveis foram aqueles com tamanho reduzido ou com ausência de corabilidade, a qual corresponde à ausência de citoplasma (Dafni *et al.*, 2005). Para isso, foram utilizados dois botões florais em pré-antese por indivíduo, os quais haviam sido armazenados em etanol 70%. Foi montada uma lâmina com o conteúdo de uma antera de cada botão floral proveniente de um mesmo indivíduo. Os grãos de pólen foram retirados das anteras sobre lâminas com uma gota de glicerol 50%, sendo acrescentada, posteriormente, uma gota de Carmim Acético (Dafni *et al.*, 2005). O conteúdo foi homogeneizado e em seguida coberto com uma lamínula. Foram analisados 300 grãos de pólen por lâmina/indivíduo. As lâminas confeccionadas para avaliação da corabilidade com Carmim acético foram fotografadas para a posterior análise da área dos grãos de pólen considerados viáveis. Para a mensuração das áreas dos grãos de pólen as imagens foram analisadas através do programa ImageJ 1.45 m (2011), sendo mensurados 30 grãos por indivíduo.

Com o objetivo de verificar o comprimento dos tricomas barbados e a relação entre o número de tricomas barbados e dendroides/estrelados (Figura 2E) foram montadas lâminas com tricomas extraídos de cálices e frutos, sendo uma lâmina por estrutura (cálice ou fruto) e duas estruturas por planta, acrescentando-se uma gota de glicerol 50%. Foram contados 100 tricomas por lâmina, o que permitiu determinar a porcentagem dos diferentes tipos de tricomas presentes nos indivíduos analisados. Diferentes campos das lâminas confeccionadas foram fotografados e as imagens obtidas foram utilizadas para averiguar o comprimento dos tricomas barbados. O comprimento dos tricomas barbados foi avaliado através do programa ImageJ 1.45 m (2011), com mensuração de 30 tricomas por lâmina. A coloração dos tricomas foi avaliada sob estereomicroscópio para cada uma das estruturas (folha, cálice e fruto), mas foi apresentada apenas uma vez na Tabela 2 por não apresentar variações entre as estruturas e indivíduos de uma mesma população.

2.3 Análises Estatísticas

Para os dados quantitativos foram realizadas análises univariadas a fim de comparar as diferentes populações. Para dados com distribuição normal, foi realizada ANOVA de um fator e o teste de Tukey para comparações *a posteriori*. Para dados que não

apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste de Kruskal Wallis e o teste de Dunn para comparações *a posteriori*. Todas as análises foram realizadas através do programa Systat (SPSS, 2004).

As variáveis florais e foliares foram avaliadas e padronizadas em milímetros, já com relação aos frutos as medidas foram padronizadas em centímetros devido ao tamanho destes órgãos. Foi realizado um agrupamento para os caracteres quantitativos referentes às folhas e flores (CPC, NF, CPCL, RCLF, NNF, CPD, CF, MLF, CCL, CLC, NNC, PTEC, CTTC, CPST, CEG, LEG, CEM, CTE, LTE, AGP), e outro referente a características dos frutos (NFP, CFR, DFR, CTTF, PTEF). Estas análises foram realizadas separadamente devido aos diferentes padrões de medida utilizados, além disso, as características peculiares aos frutos de cada espécie são importantes para a sua identificação. Para tal, o coeficiente que mais se adequou ao objetivo deste trabalho foi o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis, que utiliza apenas dados quantitativos contíguos (Bray & Curtis, 1957) e o método de agrupamento UPGMA no programa Fitopac 2 (Shepherd, 2007).

Também foi realizado um agrupamento que reuniu os caracteres quantitativos e qualitativos obtidos para folhas e flores (CPC, NF, CPCL, RCLF, FOF, TAF, TMF, NNF, TTAD, TTAB, TCF, CPD, CF, MLF, CCL, CLC, NNC, TTC, PTEC, TCC, CTTC, CPST, CEG, LEG, CEM, CTE, LTE, AGP, CORT), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Gower, por tornar possível a análise conjunta de dados quantitativos e qualitativos (Gower, 1971). Os dados qualitativos foram transformados em dados de presença e ausência (0 e 1) (Gower, 1971; Rocha *et al.*, 2010). Também foi utilizado o método de agrupamento UPGMA no programa Fitopac 2.

Para confirmar a existência dos grupos formados nas análises de agrupamento, foi realizada, com o auxílio do programa PC-ORD (McCune & Mefford, 2011), uma análise Multi-Response Permutation Procedure (MRPP). Esta análise consiste na realização do teste T e na aplicação da estatística A. O teste T descreve a separação entre os grupos; quanto mais negativo o valor de T mais forte a separação dos grupos e, a estatística A descreve a homogeneidade dentro do grupo, comparado com uma expectativa aleatória (Duffy *et al.*, 2009).

Para as Análises de Componentes Principais (PCA), baseada na matriz de correlação, foram utilizados apenas os caracteres quantitativos em três grupos de variáveis distintos, um grupo com os caracteres florais, outro com os foliares e florais, e o último

apenas com caracteres de fruto, utilizando o programa PC-ORD (2011). Com o intuito de avaliar se existiam características correlacionadas, foi realizado um teste de Correlação de Pearson, com probabilidade $p < 0,05$ (Systat, 2004). O caractere comprimento da flor (CF) foi correlacionado à maior largura da flor (correlação de 72%), comprimento do pistilo (correlação de 68%), e comprimento do estame maior (correlação de 61%), de forma que apenas a primeira característica (CF) foi utilizada para as ordenações. Quando os primeiros gráficos de ordenação foram avaliados, verificou-se que alguns vetores de menor peso para a composição dos eixos ficaram sobrepostos a vetores de maior peso. Desta forma, para uma melhor apresentação e interpretação dos dados, as variáveis que apresentaram os menores vetores foram retiradas da ordenação.

3. Resultados

As características qualitativas (Tabela 2) não variaram em uma mesma população e foram semelhantes entre as populações OM1, OM2, OP1 e OP2 de *Handroanthus ochraceus* e entre a população OM3 de *Handroanthus ochraceus* e a CP de *Handroanthus chrysotrichus*.

Uma das características qualitativas que determinou a distinção entre OM3 e CP e as demais populações de *H. ochraceus* foi a cor dos tricomas, sendo amarela nas populações OM1, OM2, OP1 e OP2, e com uma tonalidade mais escura, amarronzada, em *H. chrysotrichus* (CP) e em OM3. A ausência de tricomas estrelados nos frutos da população *H. chrysotrichus* é uma característica que a distingue das populações de *H. ochraceus* (OM1, OM2, OP1). O formato dos folíolos e a caducidade dos tricomas também foram características importantes na similaridade entre OM3 e CP, sendo que estas populações apresentaram folíolos elípticos de ápice acuminado e margem denteada e tricomas que não se soltavam facilmente com o toque, enquanto que as demais populações apresentaram folhas obovadas, de ápice obtuso e margem sinuosa e os tricomas caducos, saindo facilmente ao toque (Tabela 2). As características de número de folíolos (NF), comprimento do estigma (CEG) e viabilidade polínica (VPOL) não apresentaram diferenças estatísticas entre as populações analisadas (Tabela 2).

Tabela 2: Características quantitativas e qualitativas de flor, folha e fruto de três populações monoembriônicas e duas poliembriônicas de *Handroanthus ochraceus* e de uma população poliembriônica de *H. chrysotrichus*. São apresentados os valores das análises univariadas (ANOVA e Kruskal-Wallis), bem como a média e o desvio-padrão das características quantitativas. As populações monoembriônicas são representadas pelos códigos OM1 (Uberlândia), OM2 (Pires do Rio) e OM3 (Brasília), já as poliembriônicas pelos códigos OP1 (São José do Rio Preto) e OP2 (Córrego Danta), enquanto a população de *H. chysotrichus* é representada por CP (Uberlândia). Todas as medidas em milímetros, exceto os valores referentes às características dos frutos (em centímetros) e às porcentagens de tricomas e viabilidade polínica. Para todos os caracteres foram utilizados 10 indivíduos, exceto na população OP2, onde as análises foliares foram realizadas apenas em 7 indivíduos.

Característica (Sigla)	Valores das análises estatísticas	Populações					
		OM1	OM2	OM3	OP1	OP2	CP
<i>Folha</i>							
Comprimento do pecíolo (CPC)	F ₅₋₅₄ = 3,81*	67,4 ± 1,6 ^{ab}	51,9 ± 2,6 ^{cb}	77,5 ± 1,5 ^{ab}	78,6 ± 2,0 ^a	83,0 ± 2,3 ^a	56,7 ± 1,5 ^{ab}
Número de folíolos (NF)	H = 6,84	4,2 ± 0,9	4,8 ± 0,6	4,8 ± 0,6	4,2 ± 0,9	4,42 ± 0,5	4,6 ± 0,7
<i>Folíolo mediano</i>							
Compr. do peciólulo (CPCL)	F ₅₋₅₄ = 5,09*	29,8 ± 0,7 ^{bc}	40,4 ± 1,5 ^{ab}	33,4 ± 0,9 ^{bc}	31,2 ± 0,8 ^{bc}	38,3 ± 0,8 ^{ab}	21,2 ± 0,9 ^{cd}
Relação comprimento / largura (RCLF)	F ₅₋₅₄ = 5,32*	13,6 ± 0,1 ^{bc}	13,2 ± 1,6 ^{cd}	15,8 ± 0,2 ^{abc}	16,2 ± 0,3 ^{abc}	16,9 ± 0,4 ^{ab}	17,9 ± 0,2 ^a
Formato (FOF)	-	Obovado	Obovado	Eliptico	Obovado	Obovado	Eliptico
Tipo de Ápice (TAF)	-	Obtuso	Obtuso	Acuminado	Obtuso	Obtuso	Acuminado
Tipo de margem (TMF)	-	Sinuosa	Sinuosa	Denteada	Sinuosa	Sinuosa	Denteada
Número de nectários extraflorais em ambas as faces (NNF)	H = 39,39*	6,50 ± 3,3 ^c	25,7 ± 8,9 ^{ab}	14,8 ± 3,2 ^b	15,1 ± 7,1 ^{bc}	12,2 ± 3,0 ^{bc}	60, ± 20,1 ^a
Tipo de tricomas (TTAB)	-	Estrelados e barbados	Estrelados e barbados	Dendroides e barbados	Estrelados e barbados	Estrelados e barbados	Dendroides e barbados
Tricomas caducos - f. abax. (TCF)	-	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não
<i>Flor</i>							
Compr. do pedicelo (CPD)	H = 22,54*	64,4 ± 1,0 ^{bc}	83,3 ± 2,3 ^b	49,2 ± 0,6 ^c	87,4 ± 1,4 ^a	84,5 ± 1,4 ^b	65,7 ± 1,1 ^{bc}
Compr. da flor (CF)	F ₅₋₅₄ = 5,46*	70,0 ± 7,3 ^{ab}	77,7 ± 12,1 ^a	79,7 ± 8,2 ^a	69,5 ± 6,2 ^{ab}	62,4 ± 8,4 ^b	76,8 ± 5,5 ^a
Maior largura da flor (MLF)	F ₅₋₅₄ = 2,74*	46,7 ± 9,3 ^{ab}	54,3 ± 13,8 ^a	52,6 ± 7,1 ^{ab}	47,5 ± 6,0 ^{ab}	38,1 ± 6,0 ^{cb}	50,1 ± 7,2 ^{bc}
Compr. do cálice (CCL)	F ₅₋₅₄ = 6,73*	18,1 ± 2,1 ^{ab}	18,1 ± 3,4 ^{ab}	18,6 ± 2,4 ^{ab}	14,6 ± 2,5 ^c	16,4 ± 2,8 ^{bc}	22,2 ± 1,5 ^a
Compr. do lobo do cálice (CLC)	F ₅₋₅₄ = 9,89*	5,1 ± 1,1 ^{ab}	4,5 ± 0,9 ^{bc}	6,6 ± 1,1 ^a	3,4 ± 1,6 ^c	4,1 ± 1,4 ^{bc}	4,9 ± 1,0 ^{abc}
Número de nectários no cálice (NNC)	F ₅₋₅₄ = 16,52*	3,0 ± 1,2 ^c	2,6 ± 0,9 ^c	5,5 ± 1,7 ^{bc}	8,1 ± 2,1 ^a	7,6 ± 3,8 ^{ab}	7,5 ± 4,3 ^b
Porcentagem de tricomas estrelados no cálice (PTEC)	F ₅₋₅₄ = 15,56*	76,0 ± 8,8 ^a	57,2 ± 7,9 ^{abc}	48,2 ± 8,9 ^c	69,0 ± 8,5 ^{ab}	61,4 ± 10,1 ^b	45,9 ± 11,4 ^c

Tricomas caducos no cálice (TCC)	-	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não
Compr. dos tricomas barbados no cálice (CTBC)	H = 27,39*	13,4 ± 1,3 ^c	15,0 ± 1,1 ^{abc}	17,4 ± 1,2 ^a	13,7 ± 1,1 ^c	14,7 ± 2,1 ^b	16,8 ± 1,1 ^{ab}
Compr. do pistilo (CPST)	F ₅₋₅₄ = 10,10*	33,6 ± 3,8 ^{cd}	38,9 ± 5,5 ^{ab}	36,2 ± 1,9 ^{abcd}	32,7 ± 2,4 ^{de}	29,7 ± 6,1 ^e	38,0 ± 2,9 ^{abc}
Compr. do estigma (CEG)	F ₅₋₅₄ = 0,69	2,7 ± 0,6	2,8 ± 0,8	2,9 ± 0,7	2,5 ± 0,9	3,1 ± 0,8	3,1 ± 0,5
Largura do estigma (LEG)	F ₅₋₅₄ = 13,72*	2,1 ± 0,6 ^c	2,0 ± 0,3 ^c	2,4 ± 0,3 ^{bc}	2,6 ± 0,5 ^a	2,7 ± 0,6 ^a	2,5 ± 0,4 ^b
Compr. do estame maior (CEM)	F ₅₋₅₄ = 5,81*	18,2 ± 2,3 ^{bc}	20,5 ± 3,8 ^{bc}	21,1 ± 2,1 ^{ab}	17,0 ± 3,7 ^{abc}	13,3 ± 1,0 ^c	23,0 ± 1,9 ^{ab}
Compr. da teca (CTE)	F ₅₋₅₄ = 2,50*	2,9 ± 0,3 ^b	3,0 ± 0,4 ^{ab}	3,8 ± 0,4 ^{ab}	3,2 ± 0,8 ^{ab}	3,7 ± 1,7 ^{ab}	3,8 ± 0,3 ^{ab}
Largura da teca (LTE)	F ₅₋₅₄ = 9,376*	1,3 ± 0,3 ^c	1,5 ± 0,3 ^c	1,6 ± 0,3 ^{ab}	1,5 ± 0,37 ^c	1,7 ± 0,3 ^{ac}	1,5 ± 0,1 ^b
Área do grão de pólen (AGP)	F ₅₋₅₄ = 34,08*	228,1 ± 63,2 ^c	257,4 ± 38,6 ^b	306,1 ± 49,0 ^{ab}	678,2 ± 75,3 ^a	396,7 ± 12,6 ^a	275,8 ± 14,1 ^{ab}
Viabilidade Polínica (VPOL)	F ₅₋₅₄ = 4,84	97,6 ± 1,1	97,1 ± 1,6	96,1 ± 0,9	97,5 ± 0,7	96,2 ± 1,0	95,9 ± 0,8

Fruto

Número de frutos por planta (NFP)	F ₃₋₃₆ = 15,41*	22,9 ± 3,5 ^b	23,2 ± 5,1 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	46,7 ± 23,5 ^a	-	10,3 ± 2,5 ^{bc}
Compr. do fruto (CFR)	F ₃₋₃₆ = 6,87*	20,3 ± 3,5 ^b	21,2 ± 4,7 ^{ab}	-	17,2 ± 3,7 ^b	-	25,9 ± 5,3 ^a
Diâmetro do fruto (DFR)	F ₃₋₃₆ = 10,43*	5,2 ± 0,7 ^b	6,6 ± 1,2 ^a	-	4,9 ± 0,7 ^b	-	4,9 ± 0,5 ^b
Presença de nectários (PNFR)	-	Presentes	Presentes		Presentes		Presentes
Tipo de tricomas (TTF)		Estrelados, dendroides e barbados	Estrelados, dendroides e barbados	-	Estrelados, dendroides ^e barbados	-	Barbados e dendroides
Porcentagem de tricomas estrelados (PTEF)	F ₃₋₃₆ = 47,26*	35,6 ± 6,8 ^c	61,6 ± 8,3 ^a	-	45,6 ± 9,5 ^b	-	19,0 ± 8,0 ^d
Tricomas caducos (TCFR)	-	Sim	Sim	-	Sim	-	Não
Compr. dos tricomas barbados (CTBF)	F ₃₋₃₆ = 50,04*	10,2 ± 2,3 ^c	14,1 ± 1,6 ^b	-	14,8 ± 1,3 ^b	-	19,9 ± 1,8 ^a

Coloração dos tricomas para folhas, flores e frutos

Cor dos tricomas (CORT)	-	Amarelo	Amarelo	Marrom	Amarelo	Amarelo	Marrom
-------------------------	---	---------	---------	--------	---------	---------	--------

*Valores significativos com $p < 0,05$ de probabilidade. Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes de acordo com os testes de Tukey (testes paramétricos) ou Dunn (testes não paramétricos) com $p < 0,05$ de probabilidade.

O dendrograma de distância baseado nas características quantitativas florais e foliares, apresentou seis grupos estatisticamente distintos (MRPP $T=-11,213$; $A=0,216$; $P<0,001$) (Figura 3). O agrupamento mais externo em relação aos demais foi constituído apenas por indivíduos das populações poliembriônicas, com os 10 indivíduos da população OP1 e três da OP2 (Figura 3). Em seguida formaram-se dois grupos, que somam nove indivíduos da população de *Handroanthus chrysotrichus*, e um da OM3 (Figura 3). Os demais indivíduos formam um grande grupo, o qual é constituído predominantemente por indivíduos monoembriônicos de *H. ochraceus*, salvo por quatro indivíduos da OP2 e por um de *H. chrysotrichus* (Figura 3). Dentro desse grupo, formou-se um agrupamento com cinco indivíduos da população OM1 e um da OM2, e outro maior, onde predominam indivíduos das populações OM2 e OM3 (nove indivíduos) e OM1 está representada por cinco indivíduos.

No dendrograma de distância obtido a partir dos caracteres quantitativos e qualitativos florais e foliares foram formados quatro grupos distintos (MRPP $T=-15,600$; $A=0,359$; $P<0,001$) (Figura 4). Um dos grupos foi constituído por todos os indivíduos da população de *H. chrysotrichus* e da população OM3. Os outros três grupos foram formados pelas demais populações de *H. ochraceus*. Um grupo de populações poliembriônicas, sendo sete indivíduos da OP1 e dois da OP2 (Figura 4). Outro reúne quatro indivíduos da OM1, quatro da OP2, três da OP1 e um da OM2 (Figura 4). E no último, quase todos os indivíduos são das populações OM1 e OM2, exceto por um indivíduo da OP2 (Figura 4). Este dendrograma evidencia que *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus* são espécies distintas, devido à distância observada entre o grupo constituído por CP e OM3 com relação às demais populações.

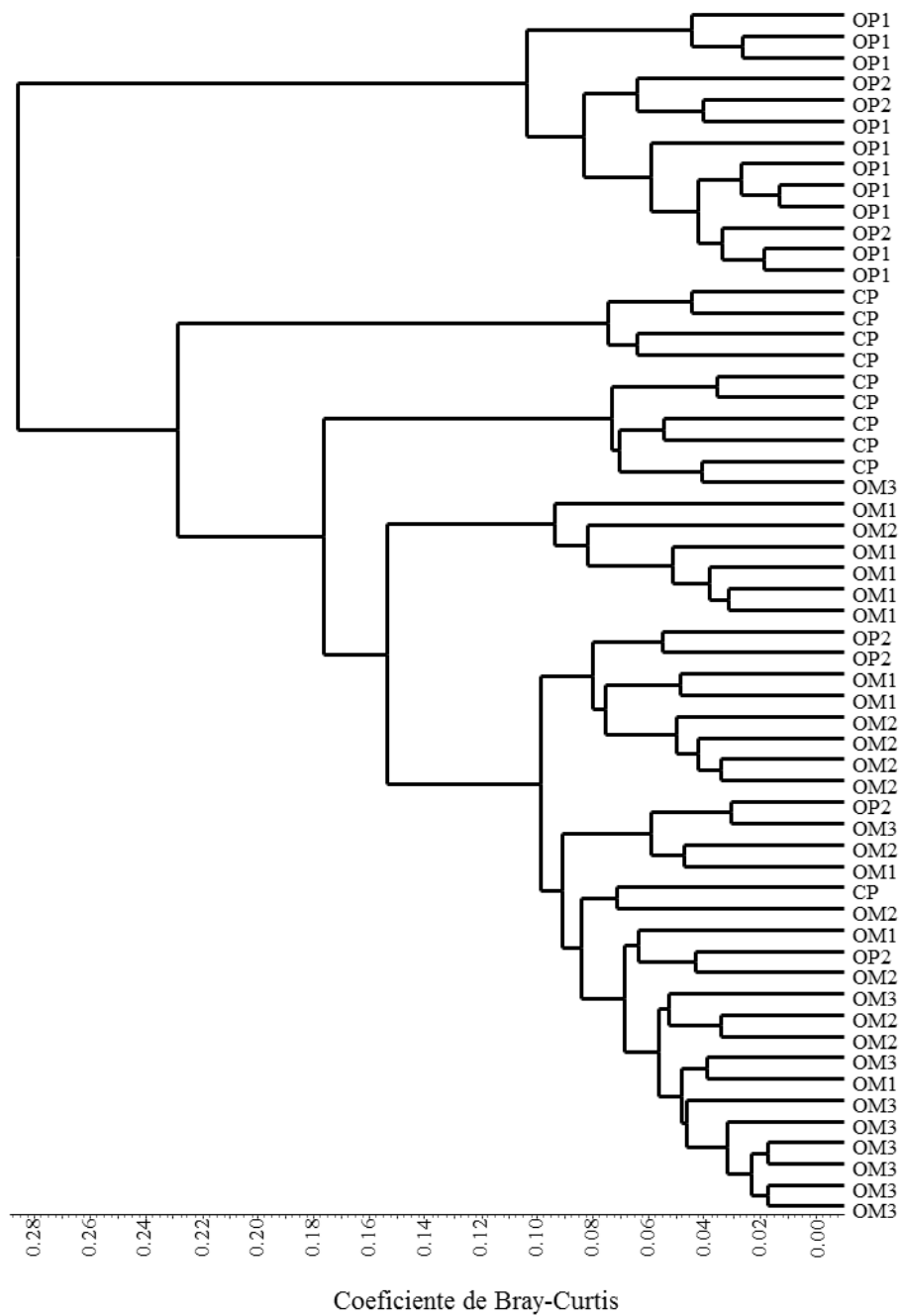


Figura 3: Dendrograma de distância de cinco populações de *Handroanthus ochraceus* e uma população de *H. chrysotrichus* baseado nas características morfológicas quantitativas florais e foliares utilizando o coeficiente de Bray-Curtis através do método de ligação UPGMA.

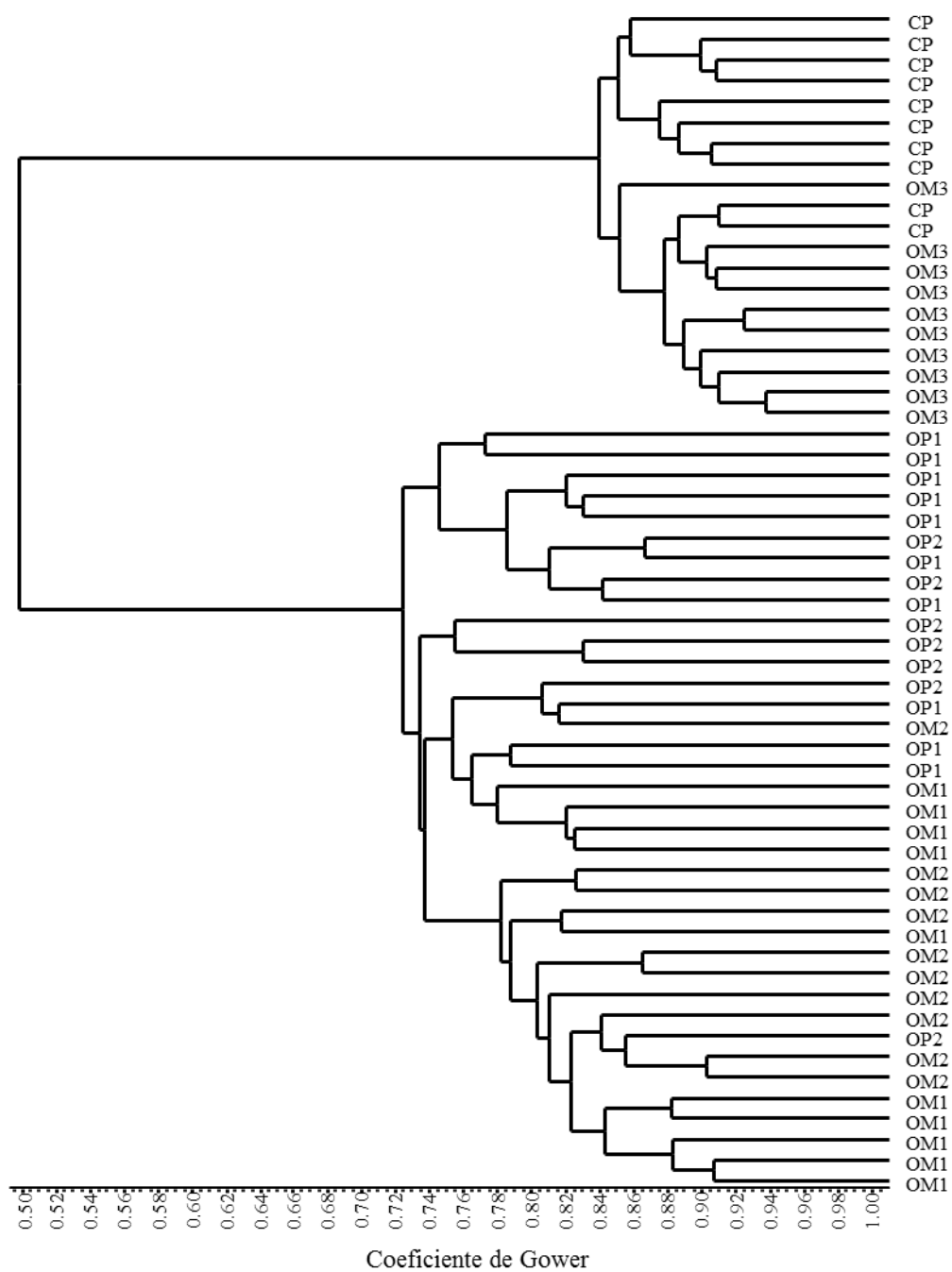


Figura 4: Dendrograma de distância de cinco populações de *Handroanthus ochraceus* e uma população de *H. chrysotrichus* baseado nas características morfológicas qualitativas e quantitativas florais e foliares utilizando o coeficiente de Gower através do método de ligação UPGMA.

O dendrograma de distância obtido a partir das características quantitativas de fruto apresentou a formação de cinco grupos distintos (MRPP $T=-11,682$; $A=0,327$; $P<0,001$) (Figura 5). Um grupo mais isolado, constituído apenas pelos indivíduos de *H. chrysotrichus* (CP); um grupo menor com quatro indivíduos de OP1; outro grupo com todos os indivíduos da população OM1 e um indivíduo de OP1; um grupo com mais três indivíduos de OP1 em meio às populações monoembriônicas; e por último, um grupo com indivíduos de OM2 e os dois indivíduos restantes de OP1 (Figura 5). Portanto, as características do fruto separam as duas espécies de *Handroanthus* em grupos distintos e distinguem as populações mono e poliembriônicas de *H. ochraceus*.

Nas Análises de Componentes Principais (PCA), foram obtidos os valores da porcentagem de variância nos oito primeiros eixos formados, no entanto, os eixos 1 e 2, nas três PCA realizadas, acumularam juntos mais de 50% da variância, por isso foram utilizados para explicar quais as características podem separar as populações mono e poliembriônicas de *H. ochraceus* e quais podem ser importantes na identificação das duas espécies analisadas.

Na PCA realizada para características quantitativas florais, o eixo 1 acumulou 31,79% da variância e o eixo 2, 20,64% da variância, de forma que estes dois componentes principais explicam juntos 52,43% da variância (Figura 6A). O eixo 1 separa a população OM3 e *H. chrysotrichus* (CP) das demais populações de *H. ochraceus*. Enquanto o eixo 2 separa as duas populações monoembriônicas não apomíticas de *H. ochraceus* (OM1 e OM2) das poliembriônicas apomíticas (OP1 e OP2) (Figura 6A). Existe uma sobreposição de alguns indivíduos de OP2 com a população OM1 e uma aproximação de indivíduos da OM2 com CP e OM3.

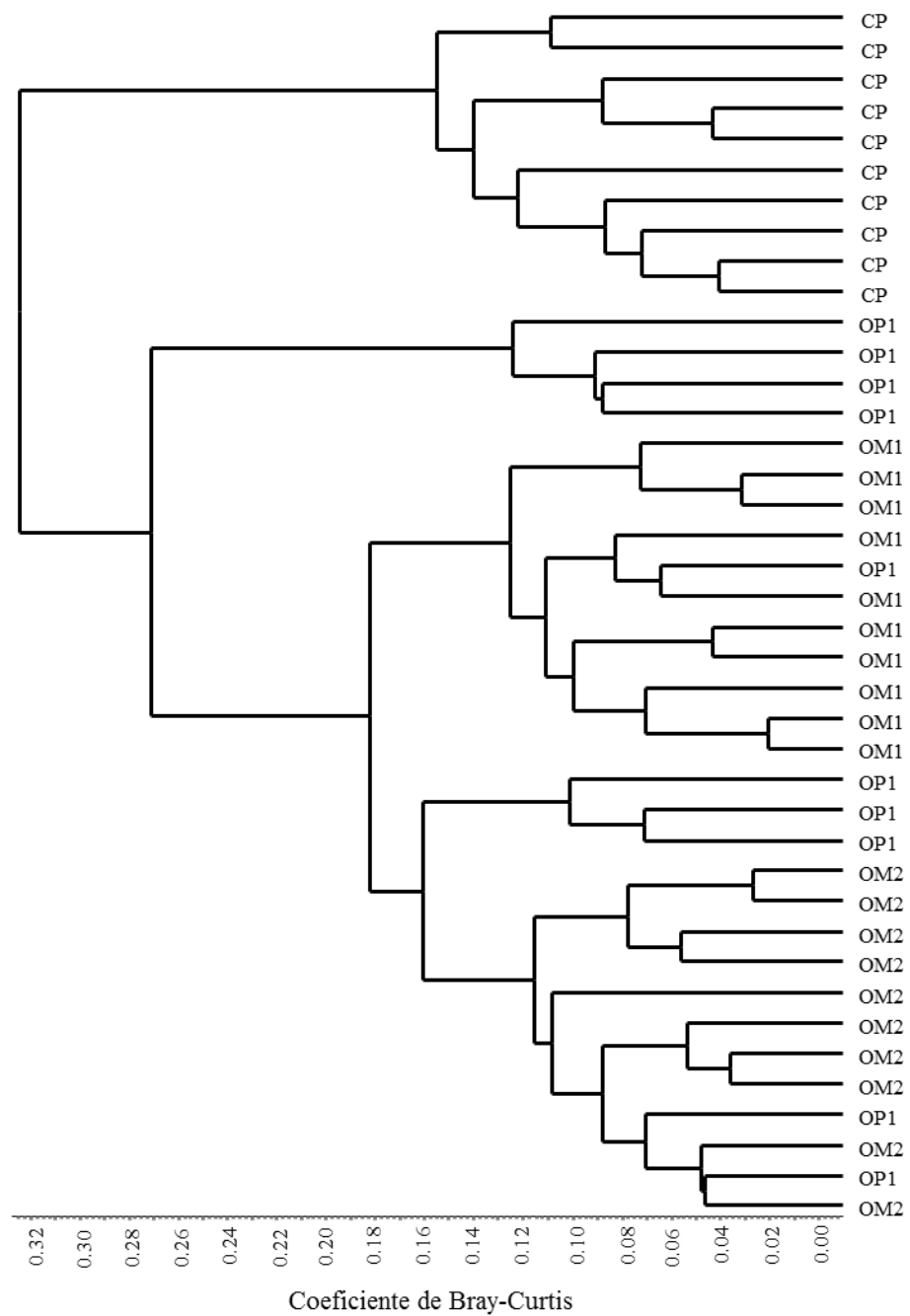


Figura 5: Dendrograma de distância das diferentes populações de *Handroanthus ochraceus*, Uberlândia (OM1), Pires do Rio (OM2) e São José do Rio Preto (OP1) e *H. chrysotrichus* (CP) baseado nas características morfológicas quantitativas de frutos utilizando o coeficiente de Bray-Curtis através do método de ligação UPGMA.

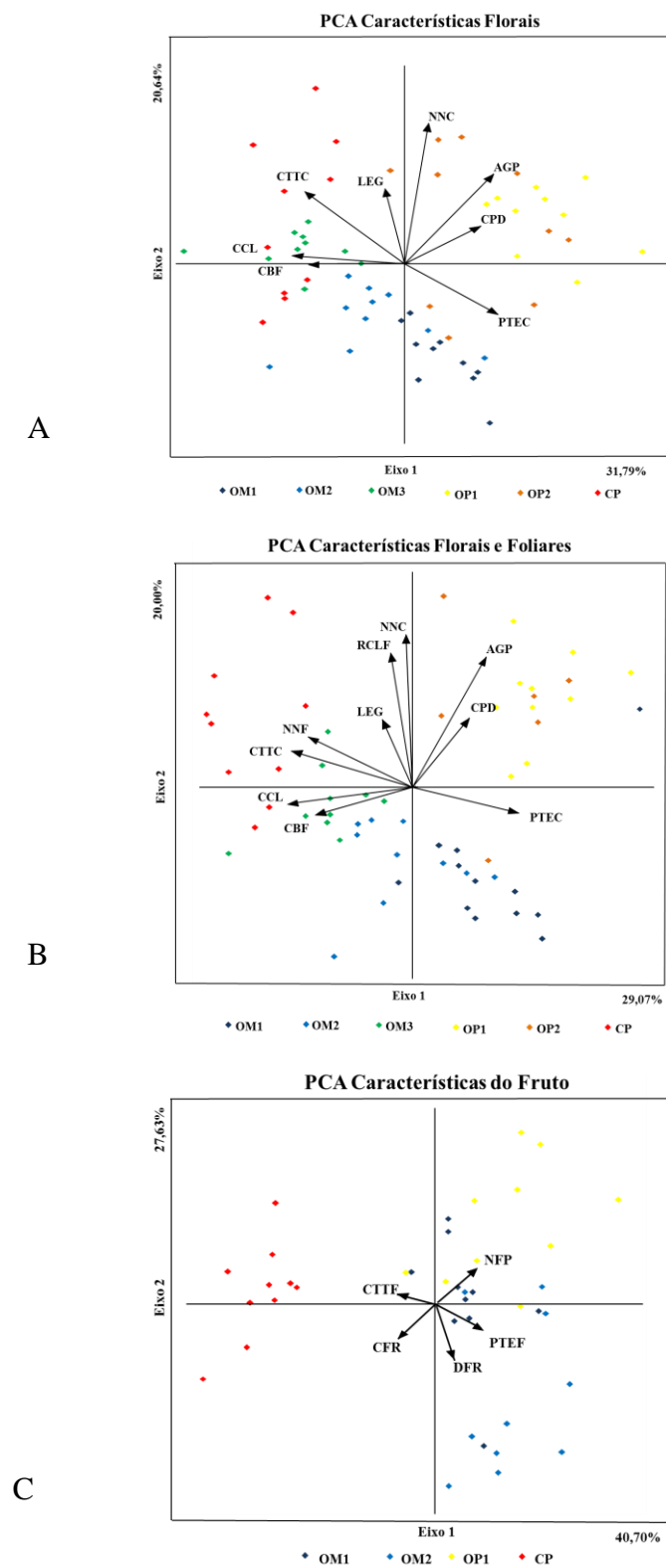


Figura 6: Análises de componentes principais (PCA) para características morfológicas quantitativas das populações de *Handroanthus ochraceus* e *H. chrysotrichus*. A. PCA para características quantitativas florais. B. PCA para características quantitativas de florais e foliares. C. PCA para características quantitativas de fruto.

Os caracteres LEG e NNC foram importantes para a separação das populações monoembriônicas em relação às poliembriônicas de *H. ochraceus* (Figura 6A). As populações OP1 e OP2 apresentaram os maiores valores para ambas as características, e OM1 e OM2 os menores, ficando CP e OM3 com valores intermediários (Tabela 2). O caractere área do grão de pólen (AGP) foi importante para a composição dos eixos 1 e 2. Com relação ao eixo 1 a característica é determinante para a separação das populações OP1 e OP2 da população CP (*H. chrysotrichus*) e OM3 de *H. ochraceus*, de forma que, as poliembriônicas apresentaram os maiores valores para área do grão de pólen e CP e OM3 valores intermediários (Tabela 2). Para o eixo 2, a característica é importante na separação das populações de *Handroanthus ochraceus*, sendo que OP1 e OP2 apresentaram os maiores valores e OM1 e OM2 os menores valores para esta característica (Tabela 2).

As características CPD, CF, CCL, PTEC e CTBC foram importantes para a composição do eixo 1. A característica CPD foi importante na separação das populações OP1 e OP2 de *Handroanthus ochraceus* das populações CP e OM3, sendo que OP1 apresentou o maior valor para esta característica e CP e OM3 valores intermediários. O comprimento da flor (CF), o comprimento do cálice (CCL) e o comprimento dos tricomas barbados no cálice (CTBC) foram maiores para as populações CP e OM3 e menores para as demais populações de *Handroanthus ochraceus*, enquanto para a característica PTEC as populações OM1, OP1 e OP2 apresentaram os maiores valores, já CP e OM3 apresentaram os menores valores (Tabela 2).

Na PCA realizada para características quantitativas florais e foliares, o eixo 1 acumulou 29,07% e o eixo 2 20,00% da variância, sendo assim os dois componentes principais acumularam juntos aproximadamente 50,00% da variância total (Figura 6B). O eixo 1 separa a população CP das demais populações e OM3 fica mais próxima das demais populações monoembriônicas de *H. ochraceus*. O eixo 2 separa as populações OM1, OM2 e OM3 das populações OP1 e OP2 de *H. ochraceus*, bem como quase todos os indivíduos de *H. chrysotrichus* (Figura 6B). O acréscimo dos dois caracteres foliares (RCLF e NNF) fez com que os indivíduos de *H. chrysotrichus* se distanciassem mais dos indivíduos de OM3, podendo ordená-los sem que haja sobreposição. As populações monoembriônicas de *H. ochraceus* ficaram mais próximas umas das outras de forma mais concisa, exceto por 3 indivíduos de OM3 que ainda permaneceram mais próximos de CP. Nesta PCA, a separação entre as populações mono e poliembriônicas de *H. ochraceus* foi mais nítida,

pois a sobreposição de OP2 com as populações OM1, OM2 e OM3 foi reduzida a um indivíduo.

As características florais mantiveram sua importância na ordenação já observada na PCA anterior (Figura 6A). A área do grão de pólen (AGP), o número de nectários no cálice (NNC) e a largura do estigma (LEG) contribuíram para a formação do eixo 2, ou seja, na separação das populações de *H. ochraceus* (Figura 6B). As características CPD, CF, CCL, PTEC e CTBC também mantiveram sua importância na constituição do eixo 1, determinante para a separação das populações de *H. ochraceus*, principalmente as populações OP1 e OP2, da população de *H. chrysotrichus*.

As características de folha inseridas na PCA foram importantes para composição dos dois eixos (Figura 6B). O caractere RCLF foi determinante para a composição do eixo 2. As populações poliembriônicas apresentaram os maiores valores de RCLF, independente da espécie, e as monoembriônicas os menores valores, embora a análise univariada tenha gerado sobreposições entre estes grupos, não conseguindo separá-los completamente, detectando diferenças apenas entre CP, com o maior valor, e as populações OM1 e OM2, com os menores valores. O número de nectários extraflorais em ambas as faces foliares (NNF) foi determinante para a formação do eixo 1. A população CP apresentou maiores valores para NNF, o que provavelmente a distanciou mais das demais populações, diferente do que foi observado na PCA elaborada apenas com características florais (Figuras 6A, B).

Na PCA realizada para caracteres quantitativos de frutos, o eixo 1 acumulou 40,70% da variância e o eixo 2 27,63% da variância, de forma que estes dois componentes principais explicam juntos aproximadamente 68% da variância (Figura 6C). A análise dos frutos permitiu separar com clareza as duas espécies, embora OM3, que apresentou sobreposição com CP na PCA elaborada com características florais, não tenha sido avaliada para este parâmetro.

As características número de frutos por planta (NFP), comprimento do fruto (CFR), porcentagem de tricomas dendroides e estrelados no fruto (PTEF) e comprimento dos tricomas barbados no fruto (CTBF) foram importantes para a composição do eixo 1, dessa forma contribuíram para a separação das populações de *H. ochraceus* da população de *H. chrysotrichus*. As populações OM1, OM2 e OP1 apresentaram os maiores valores para porcentagem de tricomas estrelados e dendroides, PTEF, e *H. chrysotrichus* os menores valores o que contribuiu para a separação das espécies. Já para o caractere comprimento de

tricomas barbados, CTBF, *H. chrysotrichus* apresentou os maiores valores e as populações de *H. ochraceus* os menores (Tabela 2). Já o diâmetro do fruto (DFR) contribuiu de maneira importante para a composição do eixo 2, sendo importante para a separação das populações mono e poliembriônicas de *H. ochraceus*. A população OM2 foi a que apresentou o maior valor para o diâmetro do fruto (DFR), enquanto OM1 e OP1 apresentaram resultados estatisticamente semelhantes, justificando a não separação entre essas populações.

4. Discussão

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo demonstra que características morfológicas podem separar populações monoembriônicas e populações poliembriônicas de *Handroanthus ochraceus*, assim como podem determinar a identificação de indivíduos de *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus*. Apesar da ploidia de todos os indivíduos das populações analisadas não ser conhecida (Sampaio, 2010), a relação observada entre poliembria e poliploidia em Bignoniaceae nos gêneros *Anemopaegma* (Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*) e *Handroanthus* (Piazzano, 1998; Salomão & Allem, 2001; Bittencourt, 2003; Ortolani, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010) é corroborada por características morfológicas que apresentaram maiores valores entre os indivíduos das populações poliembriônicas quando comparadas às monoembriônicas em *H. ochraceus*, o que pode ser um indicativo do “efeito giga” reportado para plantas poliploides (Otto & Whitton, 2000; Balao *et al.*, 2011).

A viabilidade polínica (VPOL) é uma característica importante, pois, frequentemente é capaz de distinguir populações sexuadas de populações apomíticas, devido à capacidade das espécies apomíticas obrigatórias se reproduzirem sem a ocorrência de polinização (Asker & Jerling, 1992; Caetano *et al.*, 2013). No entanto, a maioria das espécies apomíticas necessitam da fecundação para o desenvolvimento do endosperma, especialmente as espécies apomíticas esporofíticas (Whitton *et al.*, 2008), de forma que uma reduzida viabilidade polínica poderia prejudicar a formação de sementes. Esse parece ser o motivo pelo qual todas as populações analisadas tenham apresentado mais de 90% de viabilidade polínica, o que é confirmado por trabalhos de biologia reprodutiva que comprovam a necessidade de polinização para o desenvolvimento de frutos nas espécies apomíticas de Bignoniaceae (Bittencourt & Semir, 2005; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013; *in press*). A elevada viabilidade polínica e a

possibilidade da produção de embriões sexuais (Sampaio *et al.*, *in press*) é um dos importantes fatores para a manutenção da variabilidade genética em populações apomíticas (Capítulo I), podendo ser responsável também pela transmissão da apomixia a populações primariamente sexuadas (Whitton *et al.*, 2008).

A expressão da apomixia esporofítica em espécies de Bignoniaceae está associada com a ocorrência da poliembria, o que já foi observado para espécies de *Anemopaegma* (Firetti-Leggieri *et al.*, 2011; 2013; Sampaio *et al.*, *in press*) e *Handroanthus* (Piazzano, 1998; Bittencourt, 2003; Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010). A regularidade observada entre poliembria e poliploidia em *Anemopaegma* (Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*) também foi considerada em indivíduos de *H. chrysotrichus* (Piazzano, 1998; Ortolani, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010) e *H. ochraceus* (Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes) delimitando um possível padrão em espécies dos dois gêneros de Bignoniaceae. O fato das populações poliembriônicas de *H. ochraceus* (OP1 e OP2) analisadas no presente estudo terem apresentado medidas e valores maiores para área do grão de pólen, largura do estigma, comprimento do pedicelo e número de nectários no cálice podem corroborar com a hipótese de que estas populações poliembriônicas sejam realmente constituídas por indivíduos poliploides. O “efeito giga” geralmente ocasionado pela ocorrência da poliploidia em plantas determina o aumento do tamanho celular (Otto & Whitton, 2000; Balao *et al.*, 2011), o que foi observado nas populações OP1 e OP2 quando estas são comparadas às monoembriônicas.

O tamanho do grão de pólen, aqui avaliado como a área (AGP), pode ser considerado uma maneira eficiente de avaliar a ploidia de diferentes espécies e populações, pois, normalmente é maior em poliploides (Mishray, 1997; Zlesak, 2009; Beest *et al.*, 2012). As populações poliembriônicas de *Handroanthus ochraceus* (OP1 e OP2) apresentaram um tamanho maior para esta característica quando comparadas às monoembriônicas (OM1 e OM2) o que pode estar relacionado à possível poliploidia dos indivíduos avaliados que constituem estas populações com elevadas taxas poliembriônicas (Sampaio, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012). Esse efeito do aumento no tamanho celular também pode ter afetado a largura do estigma e o comprimento do pedicelo, maiores em OP1 e OP2. Também foi observado um maior número de nectários no cálice dos indivíduos destas populações de *H. ochraceus*, característica que pode ter um efeito ecológico importante, pois os nectários extraflorais são estruturas capazes de proteger a

planta contra a herbivoria (Shultz & McGlynn, 2000; Cogni *et al.*, 2003), que neste caso está diretamente relacionada à proteção dos órgãos reprodutivos.

Embora os indivíduos da população de *H. chrysotrichus* também tenham apresentado taxas elevadas de poliembrião (Sampaio, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012) sugerindo a possível ocorrência de poliploidia, para as características área do grão de pólen, largura do estigma, comprimento do pedicelo e número de nectários no cálice esta população apresentou valores intermediários quando comparados às populações mono e poliembriônicas de *H. ochraceus*. Já para as características comprimento da flor, comprimento do cálice, comprimento dos tricomas barbados do cálice e comprimento do pistilo, os indivíduos de *H. chrysotrichus* apresentaram médias maiores, bem como a maior quantidade de tricomas barbados do cálice e do fruto e o maior número de nectários extraflorais nas folhas. Estas diferenças observadas entre *H. chrysotrichus* e *H. ochraceus* determinam que realmente são espécies diferentes. Ainda que sejam consideradas morfológicamente semelhantes (Gentry, 1992), o que ocasiona dificuldades em sua identificação (Gentry, 1992; Silva *et al.*, 2009; Bittencourt & Moraes, 2010), nossos dados demonstram que as duas espécies podem ser separadas através de análises morfométricas que distinguem principalmente tamanho e quantidade para determinadas características.

As sobreposições de indivíduos da população monoembriônica OM3 com a população de *H. chrysotrichus* foram determinadas pela correspondência entre as duas populações para todas as características qualitativas e quase todas as quantitativas. Algumas características distintivas para as duas espécies, tais como tricomas amarelodourados com uma maior porcentagem de tricomas estrelados e dendroides em *Handroanthus ochraceus* (Gentry, 1992), e tricomas amarronzados com maior porcentagem e comprimento dos tricomas barbados em *H. chrysotrichus* (Gentry, 1992; Zapater *et al.*, 2009), poderiam levar à identificação de OM3 como uma população de *H. chrysotrichus*. Entretanto, OM3 está bem inserida no grupo de populações monoembriônicas de *H. ochraceus* no dendrograma de distância com características quantitativas florais e foliares, e parece estar em um contínuo com OM1 e OM2 nas PCAs realizadas para as mesmas características, mas se encontra na extremidade desse contínuo devido à proximidade com *H. chrysotrichus*. Desta forma, acreditamos que os indivíduos de OM3 sejam morfológicamente intermediários entre as duas espécies, como em outros casos já descritos na literatura (Gentry, 1992). Como esta população já foi descrita como autoincompatível não apomítica monoembriônica e diploide (Gibbs & Bianchi, 1993) é

possível que o possível parental de *H. chrysotrichus*, no caso de ter ocorrido hibridação envolvendo *H. ochraceus* como um dos progenitores, também fosse diploide e sexuado.

De maneira geral, as análises morfométricas realizadas no presente estudo determinaram que os indivíduos das populações de *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus* avaliados apresentam medidas maiores que aquelas observadas em descrições na literatura (Gentry, 1992; Zapater *et al.*, 2009). Características florais como comprimento do pedicelo, comprimento da flor e maior largura da flor foram muito maiores, assim como o comprimento dos tricomas barbados do cálice e do fruto que apresentaram medidas extremamente maiores que as descritas por Gentry (1992). As diferenças observadas entre os parâmetros analisados podem estar relacionadas a diversos fatores, como condições ambientais, alterações genéticas e amplitude dos dados avaliados. O clima característico do Cerrado pode justificar a diferença em relação às plantas analisadas na Argentina (Zapater *et al.*, 2009). Já com relação à descrição realizada por Gentry (1992), este avaliou amostras de diferentes origens, desta forma, diferentes variáveis podem interferir nas diferenças encontradas. O desconhecimento da ploidia e da ocorrência de apomixia e poliembria nos indivíduos analisados anteriormente (Gentry, 1992; Zapater *et al.*, 2009) também podem esclarecer as diferenças verificadas na comparação com as populações analisadas no presente estudo.

Nossos dados determinaram que características morfológicas como a área dos grãos de pólen, comprimento do pedicelo, largura do estigma e número de nectários no cálice podem separar populações mono e poliembriônicas de *Handroanthus ochraceus*. Embora sejam poucas características, elas podem influenciar na biologia reprodutiva das espécies e promover um incremento na diversidade. As diferenças de medidas e valores encontrados para a população de *H. chrysotrichus* quando esta é comparada às populações de *H. ochraceus* sugerem que indivíduos de ambas as espécies podem ser separados através de análises morfométricas que determinam sua identificação. Deste modo, apesar da semelhança, *H. chrysotrichus* e *H. ochraceus* são espécies distintas e possivelmente apresentam origens diferentes para as respectivas linhagens apomíticas e poliembriônicas. Também é possível inferir que a ploidia de populações pode ser sugerida através de análises morfométricas com características determinantes como a área dos grãos de pólen, comprimento do pedicelo, largura do estigma e número de nectários no cálice significativamente maiores nos indivíduos poliembriônicos apomíticos de *H. ochraceus* sugerindo que estas sejam constituídas por um número razoável de indivíduos poliploides.

Entretanto, estudos relacionando apomixia esporofítica, poliembrionia e poliploidia ainda precisam ser realizados utilizando indivíduos da mesma população com uma maior amplitude de dados, o que permitirá a corroboração ou a refutação deste padrão entre poliembrionia e poliploidia em espécies de Bignoniaceae.

5. Referências Bibliográficas

Asker, S. E. & Jerling, L. 1992. **Apomixis in plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Balao, F.; Herrera, J.; Talavera, S. 2011. Phenotypic consequences of polyploidy and genome size at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach. **The New Phytologist**, v. 192, n. 1, p. 256-65.

Barros, M. G. 2001. Pollination ecology of *Tabebuia aurea* (Manso) Benth & Hook and T. ochracea (Cham). Standl. (Bignoniaceae) in central Brazil Cerrado vegetation. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 3, p. 255-261.

Beest, M. Te ; Le Roux, J. J.; Richardson, D. M.; Brysting, A. K.; Suda, J.; Kubesova, M.; Pysek, P. 2012. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1, p. 19-45.

Bittencourt Júnior, N. S. & Semir, J. 2005. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 493-506.

Bittencourt Júnior, 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 postpollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, n. 1-2, p. 59-76.

Bray, J. R. & Curtis, J. T. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 4, p. 325-349.

Butterfass, T. 1987. Cell Volume Ratios of Natural and of Induced Tetraploid and Diploid Flowering Plants. **Cytologia**, v. 52, p. 309-316.

Caetano, A. P. S; Teixeira, S. P.; Forni-Martins, E. R.; Carmello-Guerreiro, S. M. 2013. Pollen insights into apomictic and sexual *Miconia* (Miconieae, Melastomataceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 174, p. 760 – 768.

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

Carman, J.G. 2007. Do duplicate genes cause apomixis? In: Hörandl, E.; Grossniklaus, U.; van Dijk, P.; Sharbel, T. (ed.), p.169–194. **Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives**. Gantner, Ruggell.

Cogni, R.; Freitas, A. V. L.; Oliveira, P. S. 2003. Interhabitat differences in ant activity on plant foliage: ants at extrafloral nectaries of *Hibiscus pernambucensis* in sandy and mangrove forests. **The Netherlands Entomology Society**, v. 107, p. 125 – 131.

Costa, M. E.; Sampaio, D. S.; Paoli, A. A. S.; Leite, S. C. A. L. 2004. Poliembrião e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, n. 1950, p. 395-406.

Crepet, W. L. & Niklas, K. J. 2009. Darwin's second "abominable mystery": why are there so many angiosperm species? **American Journal of Botany**, v. 96, p. 366–381.

Dafni, A.; Kevan, P. G.; Husband, B. C. 2005. Practical pollination ecology. **Enviroquest**: Cambridge.

Duffy, K. J.; Scopece, G.; Cozzolino, S.; Fay, M. F.; Smith, M. J.; Stout, J.C. 2009. Ecology and genetic diversity of the dense-flowered orchid, *Neotinea maculata*, at the centre and edge of its range. *Annals of botany*, v. 104, n. 3, p. 507-516.

Firetti-Leggieri, F.; Costa, I. R.; Forni-Martins, E. R.; Lohmann, L. G.; Semir, J. 2011. Chromosome studies in Bignoniaceae (Bignoniaceae): the first records of polyploidy in *Anemopaegma* Mart. ex Meisn. **Cytologia** 76:185–191.

Firetti-Leggieri, F.; Lohmann, L. G.; Alcântara, S.; Costa, I. R.; Semir, J. 2013. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **Plant Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 43-53.

Gentry, A. H. 1992. Bignoniaceae - Part. II. (Tribe Tecomae). New York: **Flora Neotropica**. Monograph: 25 (I), 370 p.

Gibbs, P. E. & Bianchi, M. B. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta**, v. 106, p. 64-67.

Goldblatt, P. & Gentry, A. H. 1979. Cytology of Bignoniaceae. **Botanical Notiser**, v. 132, p. 475-482.

Gower, J. C. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v. 27, n. 4, p. 857-871.

Guerra, N. A. & Natera, R. M. 2007. Chromosome numbers tree *Tabebuia* species (Bignoniaceae). **Nordic Journal of Botany**, v. 25, p. 359-360.

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

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**, v. 169, n. 1, p. 195-206.

Mccune, B. & Mefford, M. J. 2011. **PC-ORD: Multivariate Analysis of Ecological Data**. Version 6.0. MjM Software, Gleneden Beach: Oregon, U.S.A.

Mendes-Rodrigues, C.; Sampaio, D. S.; Costa, M. E.; Caetano, A. P. S.; Ranal, M. A., Bittencourt Júnior, N. S.; Oliveira, P. E. 2012. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 207, n. 4, p. 264-274.

Mishra, M. K. 1997. Stomatal Characteristics at Different Ploidy Levels in *Coffea L.* **Annals of Botany**, v. 80, p. 689-692.

Otto, S. P. & Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 401-437.

Piazzano, M. 1998. Números cromosômicos en Bignoniaceae de Argentina. **Kurtziana**. v. 26, p. 179-189.

Radford, A. E. 1986. Fundamentals of plant systematics. New York: **Harper & Row, Publishers**, 498 p.

Ramsey, J. & Schemske, D. W. 1998. Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 467-501.

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

Rocha, M. C.; Gonçalves, L. S. A.; Rodrigues, R.; Silva, P. R. A.; Carmo, M. G. F.; Abboud, A. C. S. 2010. Uso do algoritmo de Gower na determinação da divergência genética entre acessos de tomateiro do grupo cereja. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 423-431.

Salomão, A. N. & Allem, A. C. 2001. Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian Cerrado and caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, n. 3, p. 369-378.

Sampaio, D. S. 2010. Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade. **Tese** (Doutorado em Ecologia e

Conservação dos Recursos Naturais). Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Sampaio, D. S.; Moço, M. C. C.; Mariath, J. E. A. 2013. Floral ontogeny of *Aeschynomene falcata* and *A. sensitive* (Leguminosae: Papilionoideae) supports molecular phylogenetic data. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, p. 499 – 513.

Sampaio, D. S.; Bittencourt Júnior, N. S.; Oliveira, P. E. M. In Press. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from Central Brazil. **Botanical Journal of Linnean Society**.

Schultz, T.R. & McGlynn, T.P. 2000. The interactions of ants with other organisms. In: Agosti, D.; Majer, J.D.; Alonso, L.E.; Schultz T. R. (ed.), p. 35 – 44. **Ants: Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity**. Smithsonian Institution Press, Washington, London.

Shepherd, G. J. 2007. **FITOPAC 2: Manual do usuário**. Departamento de Botânica. UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil. 78 p.

Silva, A. M. L.; Costa, M. F. B.; Leite, V. G.; Rezende, A. A.; Teixeira, S. P. 2009. Anatomia foliar com implicações taxonômicas em espécies de ipês. **Hoehnea**, v. 36, p. 329-338.

Soltis, D. E.; Albert, V. A.; Leebens-Mack, J.; Bell, C. D.; Paterson, A. H.; Zheng, C.; Sankoff, D.; Pamphilis, C. W.; Kerr Wall, P.; Soltis, P. S. 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 336-348.

SPSS. 2004. **Systat version 11.0. SPSS Inc.**, San Francisco, Califórnia.

Stebbins, G. L. 1971. **Chromosomal Evolution in Higher Plants**. J. W. Arrowsmith Ltd., Bristol.

Tate, J. A. & Simpson, B. B. 2004. Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 2, p. 207-213.

Whitton, J.; Sears, C.; Baack, E.J.; Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, v.169, p.169–182.

Zapater, M. A.; Califano, L. M.; Del Castillo; E. M.; Quiroga, M. A., Lozano; E. C. 2009. Las especies nativas y exóticas de *Tabebuia* y *Handroanthus* (Tecomeae, Bignoniaceae) en Argentina. *Darwiniana*, v. 47, n. 1, p. 185-220.

Zlesak, D. C. 2009. Pollen Diameter and guard cell length as predictors of ploidy in diverse rose cultivars, species and breeding lines. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 53-70.

Considerações finais

Os resultados das análises moleculares revelaram que as populações autoférteis apomíticas de *Handroanthus ochraceus* analisadas não são geneticamente uniformes como seriam supostamente (Asker & Jerling, 1992; Koltunow & Grossniklaus, 2003; Bicknell & Koltunow, 2004; Paun *et al.*, 2006; Voigt-Zielinsk *et al.*, 2012). Entretanto, o fato de não terem sido encontrados clones entre os indivíduos apomíticos não nos permite afirmar que estes realmente estejam ausentes. As populações analisadas não são constituídas apenas pelos indivíduos amostrados, de modo que, um possível aumento do número amostral talvez pudesse permitir a detecção destes indivíduos geneticamente semelhantes. Outro fator que pode ter interferido neste resultado é um possível fluxo gênico com indivíduos sexuados que podem em alguns casos coexistir com apomíticos em uma mesma população (Daurélio *et al.*, 2004). Mas para que isto seja verificado são necessárias novas avaliações sobre o sistema reprodutivo de um número razoável de indivíduos em cada população.

O conhecimento dos tipos de mecanismos reprodutivos nas populações de *H. ochraceus* foi importante para a compreensão dos resultados sobre a variação dentro e entre as populações analisadas quando foram feitas comparações com revisões anteriores que demonstraram a relação entre os sistemas reprodutivos e a diversidade genética encontrada em populações (Nybom & Bartish, 2000; Nybom, 2004). Do mesmo modo, este conhecimento permitiu avaliar a confiabilidade de nossos resultados através de comparações interespecíficas com estudos semelhantes em Bignoniaceae (Batistini *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009; Bertoni *et al.*, 2010; Firetti-Leggieri *et al.*, 2011, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*) e em outras espécies do Cerrado como *Eriotheca pubescens* (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2005). Assim, um mapeamento de populações de *H. ochraceus* e a determinação dos respectivos sistemas reprodutivos poderiam auxiliar no entendimento sobre a distribuição geográfica dos diferentes sistemas e a possibilidade de fluxos gênicos entre indivíduos de diferentes populações o que auxiliaria na compreensão dos níveis distintos de diversidade genética encontrados para a espécie.

Marcadores moleculares dominantes vêm sendo substituídos por microssatélites em trabalhos semelhantes ao presente estudo devido a sua melhor reprodutibilidade, simplicidade, rapidez da técnica, maior poder de resolução e altos níveis de polimorfismo (Oliveira, 2006). Entretanto, para os objetivos propostos no presente trabalho baseados na hipótese de que populações apomíticas e não apomíticas de *H. ochraceus* apresentariam

níveis de variabilidade distintos, os marcadores ISSR utilizados trouxeram resultados positivos. Embora não fosse esperado encontrar um nível de diversidade genética para apomíticos ($H_e = 0,205$) próximo ao obtido para não apomíticos ($H_e = 0,249$) e uma maior diferenciação dentro das populações (61%, $\Phi = 0,39$) ao contrário do que já foi relatado para populações autoférteis (Paun *et al.*, 2006; Hörandl & Paun, 2007), os resultados para ISSR ($H_e = 0,227$) foram semelhantes aos descritos em revisão sobre marcadores dominantes ($H_e = 0,22$) (Nybom, 2004). Enquanto que em análises utilizando microsatélites para populações de *H. ochraceus* ($H_e = 0,48$; Moreira *et al.*, 2009) apresentaram resultados inferiores aos apresentados para uma revisão com este tipo de marcadores ($H_e = 0,61$) (Nybom, 2004). De modo que, os ISSR responderam as hipóteses previamente estabelecidas permitindo comparações e relações entre populações de *H. ochraceus*.

Com relação às análises morfológicas também é possível concluir que os métodos utilizados conseguiram responder às questões propostas para este estudo. As populações monoembriônicas e poliembriônicas de *H. ochraceus* podem ser distinguidas por características morfológicas que apresentaram medidas distintas para os indivíduos que constituem estas populações. Área do grão de pólen, largura do estigma, comprimento do pedicelo e número de nectários no cálice auxiliaram nesta separação proposta determinando maiores medidas para as populações poliembriônicas podendo assim ser consideradas para estudos posteriores com outras populações. Da mesma, forma, foi possível determinar características que podem separar morfológicamente *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus* apesar de sua semelhança (Gentry, 1992). Características como comprimento da flor, do cálice, do pistilo e dos tricomas barbados tanto no cálice quanto no fruto e o número de nectários extraflorais nas folhas apresentaram medidas significativamente maiores em indivíduos de *H. chrysotrichus*, sendo assim podem ser determinantes para estudos em que haja a necessidade de distinção entre as duas espécies.

Neste estudo foram avaliadas diferentes características morfológicas para que realmente fosse realizado um levantamento de características determinantes para as separações propostas e que pudessem corroborar nossas hipóteses, entretanto nem todas foram determinantes. As características qualitativas, por exemplo, podem ser importantes na identificação das espécies, porém, por serem subjetivas, não devem ser utilizadas como prioridade, mas sim como um complemento às avaliações morfométricas. Os tipos de tricomas encontrados nas duas espécies, a maneira como estão distribuídos em cada órgão

e a quantidade de cada tipo são importantes para a separação de *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus* (Gentry, 1992), mas a sua classificação deve ser feita com cautela devido às semelhanças entre eles. A viabilidade polínica é muito utilizada para distinguir populações sexuadas e apomíticas (Asker & Jerling, 1992; Caetano *et al.*, 2013), entretanto, espécies apomíticas esporofíticas, como *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus*, necessitam da fecundação para o desenvolvimento do endosperma (Whitton, 2008), então se apresentassem uma viabilidade reduzida poderia ocasionar problemas na formação das sementes. Sendo assim, todas as populações avaliadas apresentaram altos índices de viabilidade polínica, dessa forma, esta não foi, neste caso, uma característica relevante para as propostas do presente estudo, entretanto, associada aos dados moleculares auxilia a compreender os resultados encontrados para a diversidade genética em populações apomíticas.

Outro fato que deve ser ressaltado é a necessidade de realização da contagem de cromossomos de todos os indivíduos analisados o que permitirá determinar corretamente a ploidia de cada um. Sabe-se que taxas elevadas de sementes poliembriônicas estão associadas à ocorrência de poliploidia em *H. ochraceus* e *H. chrysotrichus* (Piazzano, 1998; Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010). No entanto, a confirmação da ploidia dos indivíduos que constituem as populações avaliadas no presente estudo, além de auxiliar na melhor compreensão dos resultados, poderá também fortalecer esta hipótese proposta para espécies de Bignoniaceae na qual a expressão da apomixia esporofítica está fortemente relacionada à poliploidia (Piazzano, 1998; Bittencourt, 2003; Bittencourt & Moraes, 2010; Firetti-Leggieri *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, *in press*).

As relações estabelecidas entre as populações analisadas, tanto com relação às análises moleculares quanto às análises morfométricas sugerem que existam origens distintas dentro da espécie *Handroanthus ochraceus*. No entanto, não são conclusões fechadas, mas que ainda precisam e devem ser avaliadas como hipóteses que sugerem novos estudos.

Referências bibliográficas

Asker, S. E. & Jerling, L. 1992. **Apomixis in plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Batistini, A. P.; Telles, M. P. C.; Bertoni, B. W.; Coppede, J. da S.; Môro, F. V.; França, S. De C.; Pereira, A. M. S. 2009. Genetic diversity of natural populations of *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae) in the Cerrado of São Paulo State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 52-63.

Bertoni, B. W.; Telles, M. P. C.; Malosso, M. G.; Torres, S. C. Z.; Pereira, J. O.; Lourenço, M. V.; França, S. C.; Pereira, A. M. S. Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. determined using RAPD and AFLP markers. **Genetics and molecular biology**, v. 33, n. 3, p. 532-538, 2010.

Bicknell, R. A. & Koltunow, A. M. 2004. Understanding Apomixis : Recent Advances and Remaining Conundrums. **The Plant Cell**, v. 16, p. 228-246.

Bittencourt Júnior, N. S. 2003. Auto-incompatibilidade de ação tardia e outros sistemas reprodutivos em Bignoniaceae. **Tese** (Doutorado) Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Bittencourt Júnior, 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 postpollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, n. 1-2, p. 59-76.

Caetano, A. P. S.; Teixeira, S. P.; Forni-Martins, E. R.; Carmello-Guerreiro, S. M. 2013. Pollen insights into apomictic and sexual *Miconia* (Miconieae, Melastomataceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 174, p. 760 – 768.

Daurélio, L. D.; Espinoza, F.; Quarin, C. L.; Pessino, S. C. 2004. Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. **Plant Systematics and Evolution**, v. 244, n. 3-4, p. 189-199.

Firetti-Leggieri, F.; Costa, I. R.; Forni-Martins, E. R.; Lohmann, L. G.; Semir, J. 2011. Chromosome studies in Bignonieae (Bignoniaceae): the first records of polyploidy in *Anemopaegma* Mart. ex Meisn. **Cytologia**, v. 76, p.185–191.

Firetti-Leggieri, F.; Lohmann, L. G.; Alcântara, S.; Costa, I. R.; Semir, J. 2013. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignonieae, Bignoniaceae). **Plant Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 43-53.

Gentry, A. H. 1992. Bignoniaceae - Part. II. (Tribe Tecomae). New York: **Flora Neotropica**. Monograph: 25 (I), 370 p.

Hörandl, E. & Paun, O. 2007. Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials. In: Hörandl, E., Grossniklaus, U., van Dijk, P. J. & Sharbel, T. F. (eds.). p. 169-194. **Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives**. A. R. G. Gantner Verlag, Rugell, Liechtenstein.

Koltunow, A. M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. **Annual review of plant biology**, v. 54, p. 547-574.

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**, v. 7, p. 533-540

Moreira, P. A.; Fernandes, G. W.; Collevatti, R. G. 2009. Fragmentations and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. **Forest Ecology and Management**, v. 258, p. 2690-2695.

Nybom, H. & Bartish, I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 3, n. 2, p. 93-114.

Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular ecology**, v. 13, n. 5, p. 1143-1155.

Oliveira, E. J. 2006. Desenvolvimento e uso de marcadores microsatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. F. *flavicarpa* Deg.). **Tese** (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil.

Paun, J. O.; Greilhuber, E.; Temsch, M.; Hörandl, E. 2006. Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). **Molecular ecology**, v. 15, n. 4, p. 897-910.

Piazzano, M. 1998. Números cromosômicos en Bignoniaceae de Argentina. **Kurtziana**. v. 26, p. 179-189.

Sampaio, D. S.; Bittencourt Júnior, N. S.; Oliveira, P. E. M. In Press. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) forma Central Brazil. **Botanical Journal of Linnean Society**.

Whitton, J.; Sears, C.; Baack, E.J.; Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, v.169, p.169–182.

Voigt-Zielinski, M.L.; Piwczyński, M.; Sharbel, T. F. 2012. Differential effects of polyploidy and diploidy on fitness of apomictic *Boechera*. **Sexual Plant Reproduction**, v. 25, n. 2, p. 97-109.

Zhu, Y.; Geng, Y.; Tersing, T.; Liu, N.; Wang, Q.; Zhong, Y. 2009. High genetic differentiation and low genetic diversity in *Incarvillea younghusbandii*, an endemic plant of Qinghai-Tibetan Plateau, revealed by AFLP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 5, p. 589-596.