

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Mosaicos reprodutivos e morfometria de estômatos em *Eriotheca gracilipes*  
(Bombacoideae-Malvaceae)

Mestranda: Annelise da Cruz Serra

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eugênio Macedo de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Clesnan Mendes Rodrigues

Uberlândia - MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Mosaicos reprodutivos e morfometria de estômatos em *Eriotheca gracilipes*  
(Bombacoideae-Malvaceae)

Annelise da Cruz Serra

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eugênio Macedo de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Clesnan Mendes Rodrigues

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

Uberlândia - MG

2018

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| S487<br>2018 | <p>Serra, Annelise da Cruz, 1992-<br/>Mosaicos reprodutivos e morfometria de estômatos em<br/><i>Eriothea gracilipes</i> (Bombacoideae-Malvaceae) [recurso<br/>eletrônico] / Annelise da Cruz Serra. - 2018.</p> <p>Orientador: Paulo Eugênio Macedo de Oliveira .<br/>Coorientador: Clesnan Mendes Rodrigues.<br/>Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,<br/>Pós-graduação em Biologia Vegetal.<br/>Modo de acesso: Internet.<br/>Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.474">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.474</a><br/>Inclui bibliografia.</p> <p>1. Botânica. I. , Paulo Eugênio Macedo de Oliveira, 1959-,<br/>(Orient.). II. Rodrigues, Clesnan Mendes, 1978-, (Coorient.). III.<br/>Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia<br/>Vegetal. IV. Título.</p> <p>CDU: 581</p> |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Mosaicos reprodutivos e morfometria de estômatos em *Eriotheca gracilipes*  
(Bombacoideae-Malvaceae)

Mestranda: Annelise da Cruz Serra

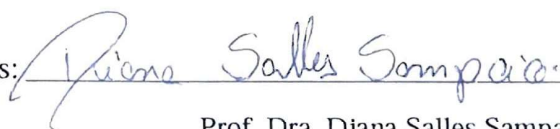
COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente (Orientador)

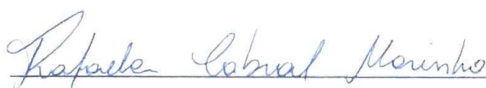


Prof. Dr. Paulo Eugênio de Oliveira

Examinadores:



Prof. Dra. Diana Salles Sampaio



Prof. Dra. Rafaela Cabral Marinho

Centro Universitário do Cerrado de Patrocínio

Dissertação aprovada em 28/02/2018

Uberlândia – MG

2018

*Aos meus pais, minha fortaleza,*

*dedico*

## Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Eugênio Oliveira, por me conceder espaço e sempre acreditar e confiar no meu trabalho, por todo o apoio, e pela experiência enriquecedora que adquiri neste período. Obrigada pelo incentivo e ensinamentos!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Clesnan Mendes Rodrigues, por ser tão acessível e sempre disponibilizar tempo para me ajudar, até mesmo nas menores questões. Obrigada por me assessorar e por também acreditar em mim.

Agradeço à Rafaela Cabral Marinho, que me acompanhou desde os primeiros passos na vida acadêmica e contribuiu imensamente para o meu aprendizado até aqui. Obrigada por toda sua generosidade, paciência e incentivo ao longo desses anos.

Aos meus colegas de mestrado: Vinicius, Mariane e Paula. Obrigada pelo companheirismo, pelas conversas e cafés durante as tardes, pelas ajudas nas mais diversas questões. Vocês fizeram com que a jornada fosse tão mais leve. Agradeço muito pela amizade!

À minha família que sempre se fez presente nos momentos mais difíceis, me apoiando e incentivando. Aos meus irmãos, obrigada por, mesmo distantes, mostrarem que posso sempre contar com vocês. Aos meus pais, obrigada por estarem sempre presentes e por sempre transmitirem a força que eu tanto preciso. Não consigo expressar o quanto sou grata por tê-los em minha vida. Amo muito vocês!

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Uberlândia pela estrutura e pelo apoio oferecido desde a graduação; aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal que fizeram parte desta formação e sempre foram fonte de inspiração e admiração – obrigada pelo incentivo e por intensificarem ainda mais essa paixão que tenho pela Botânica; À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pela concessão da bolsa para financiamento dos meus estudos (APQ-02820-15 – Evolução de Poliembrionia em Bombacoideae; *Eriotheca gracilipes* como um modelo para a filogeografia dos mosaicos reprodutivos do Cerrado) e à CAPES (O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001).

## Sumário

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| Resumo .....                              | 5  |
| Abstract .....                            | 7  |
| <b>Introdução Geral<sup>1</sup></b> ..... | 9  |
| <i>Poliploidia</i> .....                  | 9  |
| <i>Apomixia</i> .....                     | 10 |
| <i>Poliembrionia</i> .....                | 13 |
| <i>Cerrado</i> .....                      | 13 |
| <i>Objeto de estudo</i> .....             | 16 |
| <i>Objetivos Gerais</i> .....             | 17 |
| <b>CAPÍTULO 1</b> .....                   | 28 |
| <b>Resumo</b> .....                       | 29 |
| <b>Abstract</b> .....                     | 30 |
| <b>Introdução</b> .....                   | 31 |
| <b>Material e Métodos</b> .....           | 33 |
| <i>Definição de poliembrionia</i> .....   | 33 |
| <i>Medidas dos estômatos</i> .....        | 34 |
| <i>Análise Estatística</i> .....          | 35 |
| <b>Resultados</b> .....                   | 37 |
| <b>Discussão</b> .....                    | 42 |
| <b>Referências Bibliográficas</b> .....   | 50 |
| Tabelas .....                             | 58 |
| Figuras .....                             | 65 |
| <b>CAPÍTULO 2</b> .....                   | 72 |
| <b>Resumo</b> .....                       | 73 |
| <b>Abstract</b> .....                     | 74 |
| <b>Introdução</b> .....                   | 75 |
| <b>Material e Métodos</b> .....           | 76 |
| <i>Testes de hibridizações</i> .....      | 76 |
| <i>Medidas dos Estômatos</i> .....        | 78 |
| <i>Citometria de fluxo</i> .....          | 78 |
| <i>Análise Estatística</i> .....          | 79 |
| <b>Resultados</b> .....                   | 80 |
| <i>Testes de hibridizações</i> .....      | 80 |
| <i>Medidas dos estômatos</i> .....        | 80 |

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| <i>Citometria de fluxo</i> .....                        | 81 |
| <b>Discussão</b> .....                                  | 83 |
| <b>Referências Bibliográficas</b> .....                 | 87 |
| <b>Considerações finais</b> .....                       | 95 |
| <b>Normas da Revista: Acta Botanica Brasilica</b> ..... | 96 |

## Resumo

A distribuição geográfica dos padrões de embrionia encontrados em *Eriotheca* ainda é pouco compreendida. No entanto, sabe-se que a distribuição das espécies do Cerrado, bem como suas fitofisionomias e biogeografia, são resultado de flutuações paleoclimáticas e que determinaram o curso evolutivo das espécies deste bioma. *Eriotheca gracilipes* (Malvaceae – Bombacoideae), uma espécie com ampla distribuição no Cerrado, apresenta mosaicos reprodutivos e citológicos com indivíduos poliembriônicos sendo poliplóides e apomíticos, e monoembriônicos sendo diplóides e sexuados. O mapeamento amplo do padrão encontrado nessas populações poderia ajudar na compreensão de como ocorreu a dispersão desta espécie e revelar áreas de refúgio que podem ter ocorrido nos períodos de flutuações paleoclimáticas. A definição de cada padrão de embrionia encontrado em espécies que apresentam esses mosaicos reprodutivos despende muito tempo e pode ser uma ferramenta laboriosa. Por isso, no capítulo 1, verificamos a possível relação entre tamanho de estômato e padrão de embrionia, a fim de testarmos sua eficiência destes dados morfométricos na detecção de tais padrões reprodutivos e de embrionia. Para este estudo, foram coletadas 25 populações de *E. gracilipes* pelo cerrado e para medir a largura e a altura dos estômatos, obtidas a partir da técnica de decalque foliar. Seis populações foram identificadas como monoembriônicas, onze poliembriônicas e duas apresentaram baixa frequência de poliembrionia. Outras seis populações estão classificadas como sendo indefinidas. Pudemos ver que fatores geográficos (altitude, latitude e longitude) e citológicos atuam em conjunto com o padrão de embrionia na determinação do tamanho estomático e, portanto, esta relação simples e direta entre morfometria e sistema de reprodução não pôde ser estabelecida. Apesar disso, certa divisão geográfica foi mostrada a partir dos padrões de embrionia, o que nos permitiu fazer algumas inferências sobre como ocorreu a distribuição e dispersão destas populações. Populações monoembriônicas apresentaram, de forma geral, tamanhos de estômatos menores e estão associadas a maiores altitudes, além de terem se mostrado mais amplamente distribuídas. Num segundo capítulo, indivíduos de ploidias distintas de *E. gracilipes* (2x e 6x) foram cruzados para que a viabilidade fosse testada, resultando em apenas uma planta híbrida. Foram realizadas análises de citometria de fluxo de 397 plântulas de diferentes populações de *Eriotheca*, cujos cariótipos já eram conhecidos, para que pudéssemos comparar o tamanho genômico dos indivíduos a ploidia das plantas-mãe. Além disso, estômatos dessas plântulas e do indivíduo híbrido foram medidos para correlação destes dados com cada tamanho genômico. Foram analisadas altura e largura de 50 estômatos de três plântulas obtidas de cada

planta-mãe de *Eriotheca* e 80 estômatos para o indivíduo híbrido. Os resultados confirmaram que a ploidia apresentada pelas espécies de *Eriotheca* tratadas no estudo realmente influenciam no tamanho estomático dos indivíduos. Porém, o indivíduo híbrido não mostrou uma relação tão clara entre a morfometria estomática e seu nível de ploidia. Apesar disso, o estudo sobre indivíduos híbridos pode trazer esclarecimentos sobre o comportamento de populações cujo tamanho estomático não segue o padrão esperado quando consideramos esses mosaicos reprodutivos e citológicos.

Palavras-chave: Malvaceae, *Eriotheca*, morfometria estomática, ploidia, embrionia.

## Abstract

The geographical distribution of embryonic patterns found in *Eriotheca* is still poorly understood. However, it is known that the distribution of Cerrado species, as well as their phytophysiognomies and biogeography, are the result of paleoclimatic fluctuations and have determined the evolutionary course of the species of this biome. *Eriotheca gracilipes* (Malvaceae - Bombacoideae), a species with wide distribution in the Cerrado, exhibit reproductive and cytological mosaics with polyembryonic individuals being polyploid and apomictic, and monoembryonic being diploid and sexual. A wide mapping of the patterns found in these populations could help to understand how the dispersal of this species occurred and reveal areas of refuge that may have occurred during periods of paleoclimatic fluctuations. The definition of each embryonic pattern found in species that exhibit these reproductive mosaics is time consuming and can be a laborious tool. Therefore, in chapter 1, we verified the possible relationship between stomata size and embryonic pattern in order to test the efficiency of morphometric data in the detection of such reproductive patterns. For this study, it were collected 25 populations of *E. Gracilipes* throughout the Savanna Cerrado in order to measure the width and hight of the stomata, obtained by using the decal technique. Six populations were identified as monoembrionic, eleven as polyembrionic and two presented low frequency of polyembrionics. Other six populations were classified as being undefined. We could see that geographic (latitude, altitude, longitude) and cytological factors act together with the embriony pattern in the determination of stomata size and, therefore, this simple and direct relationship between morphometry and reproduction system could not be established. In spite of that, a certain geographic division was showed by the embryonic patterns, which allowed us to make some inferences about how occurred the distribution and dispersal of these populations. Monoembryonic populations presented, in general, smaller size of stomata and are associated with higher altitudes in addition to its wide distribution. In a second chapter we tested the viability of cross-pollination between different ploidies of *E. gracilipes* (2x and 6x) which resulted in only one hybrid individual. It were analyzed by flow cytometry, 397 seedlings of different populations of *Eriotheca* with caryotypes well known so we could compair the genomic size of the individuals with the mother plants. Aside that, stomata from the seedlings and from the hybrid individual were measured for comparison to each genomic size. It were analyzed 50 stomata of three seedlings obtained from each mother plant and 80 of the hybrid individual. The results confirmed that the ploidy showed by the *Eriotheca* species considered in the study does influence the stomatal size of the individuals. However, the hybrid individual did not show such a clear relationship between stomatal

morphometry and its level of ploidy. Nevertheless, the study on hybrid individuals can enlighten the behavior of populations whose stomatal size does not follow the expected pattern when considering the species reproductive and cytological mosaics.

Key words: Malvaceae, *Eriotheca*, stomatal morphometry, ploidy, embryony.

## Introdução Geral<sup>1</sup>

### *Poliploidia*

A poliploidia pode ser definida como a presença de mais de dois ou múltiplos conjuntos completos de cromossomos num organismo. (Soltis & Soltis, 2012). Em alguns casos é resultado da chamada duplicação total do genoma (Whole genome duplication – WGD). Ela pode ser causada por problemas no pareamento de cromossomos durante a meiose (Otto, 2007; van de Peer et al., 2017) e é um fenômeno encontrado muito mais comumente em plantas do que em outros organismos (Wendel, 2015). Por outro lado, sabe-se que, em plantas, a poliploidia é um evento muito frequente (Mansouri & Bagheri 2017) e que moldou a história evolutiva de grandes grupos (Alix et al., 2017): ela é capaz de levar organismos ao isolamento genético e reprodutivo e de possibilitar o surgimento de inovações valiosas para a adaptação dessas espécies (Soltis & Soltis, 2009).

Baseando-se na análise dos cromossomos e morfometria de espécies atuais, alguns autores sugeriram que cerca de 50 a 70% das Angiospermas são resultado de eventos de WGD (Goldblatt, 1980; Masterson, 1994; Coghlan et al., 2005). Entretanto, análises genômicas mais recentes demonstram que eventos de poliploidização devem ter sido anteriores ao surgimento das plantas com flores, indicando que todas as espécies de Angiospermas devem ser paleopoliploides (Bowers et al., 2003). Além disso, análises de dados filogenéticos sugerem uma relação entre extinções em massa que ocorreram entre os períodos Cretáceo e Terciário (KT) e eventos de poliploidia: a duplicação do genoma poderia ter possibilitado a sobrevivência e/ou diversificação de várias linhagens (Soltis & Burleigh, 2009).

Duplicações genômicas poderiam alterar a rota que regula a expressão da reprodução sexuada resultando na expressão da apomixia, forma de reprodução assexuada via semente (Koltunow & Grossniklaus, 2003). Por isso, a poliploidia é, geralmente, relacionada à

presença da apomixia (Carman, 1997), pois, aparentemente, a expressão desta forma de reprodução é dependente destes eventos de duplicação genômica (Hojsgaard et al., 2014). Carman (1997) propôs que a duplicação dos cromossomos, combinado a mudanças epigenéticas presentes nesses indivíduos poliplóides, teria permitido o seu pareamento correto na união dos gametas, já que diferenças de tempo de desenvolvimento dos sacos embrionários e número cromossômico diferente entre espécies, poderiam dificultar o desenvolvimento destes híbridos.

### *Apomixia*

Sabe-se que a reprodução sexual permite uma combinação infinita de genes nos quais a seleção adaptativa intervém, direcionando o curso da evolução em espécies que se estabelecem no ambiente natural, ou ainda, contribuindo para o melhoramento da qualidade de culturas agrícolas (Brukhin, 2017). No entanto, esse tipo de reprodução faz com que características resultantes da combinação de genes se percam com a segregação dos mesmos na geração dos próximos descendentes, impossibilitando, assim, a fixação de traços que poderiam ser vantajosos (Van Dijk et al., 2016). Apesar disso, espécies que se reproduzem por apomixia, tipo de reprodução descrito pela primeira vez em 1841 por Smith, são capazes de contornar essa situação. Nesta forma de reprodução assexuada, sementes viáveis são produzidas sem que ocorra a fecundação da oosfera (Koltunow & Grossniklaus, 2003; Bicknell & Koltunow, 2004), o que levará à formação de um embrião que será oriundo de tecidos maternos, ou seja, de maneira clonal (Asker & Jerling, 1992).

A ocorrência de reprodução por apomixia é bastante ampla e é relatada em vários níveis taxonômicos. Atualmente acredita-se que a apomixia ocorra em mais de 300 gêneros, distribuídos em aproximadamente 78 famílias de angiospermas (Hojsgaard et al., 2014),

dentre elas: Malvaceae (Oliveira et al., 1992, Mendes-Rodrigues et al., 2005), Melastomataceae (Saraiva et al., 1996; Goldenberg & Shepherd, 1998; Caetano et al., 2013; Mendes-Rodrigues et al., 2012) e Bignoniaceae (Sampaio, 2010). Por esse motivo, acredita-se que a apomixia tenha surgido em diferentes momentos durante a evolução dos grupos de plantas (Whitton et al., 2008), evoluindo independentemente a partir de ancestrais sexuados (van Dijk & Vijverberg, 2005). Nas Malvaceae, é mais frequente na subfamília Bombacoideae, sendo registrado para os gêneros *Pachira* e *Eriotheca* (Baker, 1960; Mendes-Rodrigues et al., 2005).

Existem dois tipos básicos de apomixia e sua classificação é feita de acordo com a origem do embrião formado (Hand & Koltunow, 2014). Na apomixia do tipo esporofítica, que também pode ser chamada de embrionia adventícia, embriões são originados a partir de células dos tegumentos do óvulo ou, mais frequentemente, de células do nucelo sem a formação de sacos embrionários (Bicknell & Koltunow, 2004; Whitton *et al.*, 2008). Este tipo de apomixia exige, ainda, que ocorra polinização para a formação do endosperma que irá nutrir o embrião em desenvolvimento (Bicknell & Koltunow, 2004; Whitton *et al.*, 2008; Hojsgaard, 2014). A embrionia adventícia é o tipo mais comum de apomixia e é encontrada principalmente em espécies tropicais e subtropicais (Naumova, 1992). Já a apomixia gametofítica é caracterizada pela formação de sacos embrionários não reduzidos que dão origem a embriões assexuados oriundos de uma oosfera diplóide ou de outras células diplóides do saco embrionário. A apomixia gametofítica pode ser dividida em dois subtipos de acordo com o tipo de célula que dará origem ao saco embrionário (Hand & Koltunow, 2014). Na diplosporia, o saco embrionário não reduzido é formado a partir de uma célula arquesporial que sofre meiose reconstitucional ou simplesmente passa por divisões mitóticas sucessivas (Caetano, 2013). Neste tipo de apomixia gametofítica o endosperma é comumente autônomo (Hand & Koltunow, 2014). Já na aposporia, células nucelares se comportam como

aposporos iniciais, passando por mitoses para formação do saco embrionário não reduzido (Bicknell & Koltunow, 2004; Whitton *et al.*, 2008; Conner & Ozias-Akins, 2017). Espécies que apresentam esse tipo de apomixia são geralmente pseudogâmicas (Bicknell & Koltunow, 2004; Whitton *et al.*, 2008; Conner & Ozias-Akins, 2017). Além disso, nesses dois tipos de apomixia, sacos embrionários reduzidos ainda são produzidos, o que pode promover a formação conjunta de embriões sexuais e apomíticos na mesma semente já que a polinização ainda é imprescindível para o desenvolvimento dos embriões haja vista que as espécies são pseudogâmicas (Carman, 1997; Mendes-Rodrigues, 2010; Hojsgaard *et al.*, 2014; Brukhin, 2017).

A apomixia evita com que ocorra depressão endogâmica entre os descendentes, já que ela acontece sem que haja fecundação da oosfera (Hörandl *et al.*, 2008). A heterozigosidade mantida e que é geralmente mais alta que a encontrada em indivíduos sexuados (Hörandl & Paun, 2007), pode ser um fator importante na habilidade dos apomíticos na colonização de novos ambientes (Hörandl *et al.*, 2008). Além disso, muitas espécies invasivas foram reportadas apomíticas como *Taraxacum officinale* (Brock, 2004), *Hypericum perforatum* (Barcaccia *et al.*, 2007) e *Miconia calvescens* (Meyer, 1998). O modo de reprodução uniparental e a independência de polinizadores foram provavelmente importantes vantagens conferidas a apomíticos que experienciaram de eventos de bottleneck ou de efeito fundador (Hörandl *et al.*, 2008; Hörandl, 2009). A combinação desses fatores permitiria que os apomíticos tenham maior distribuição que seus reativos sexuados, a chamada partenogese geográfica, onde estudos mostram que indivíduos assexuados colonizam áreas maiores nas quais houve períodos de glaciação (Bierzychudek, 1985).

### *Poliembrionia*

A poliembrionia, isto é, a ocorrência de múltiplos embriões por semente (Carman, 1997), é um evento frequentemente associado à embrionia adventícia e a aposporia visto que é muito comum que mais de uma célula esporofítica ou saco embrionário possam vir a se desenvolver partenogeneticamente (Mendes-Rodrigues, 2010; Hojsgaard et al., 2014; Brukhin, 2017). A presença de mais de um embrião por semente pode contribuir para o aumento da taxa de mortalidade das plântulas (Mendes-Rodrigues et al., 2012). A competição por nutrientes, que se inicia desde a formação desses embriões dentro da semente, levaria a uma diminuição no peso dos embriões e plântulas, o que dificultaria futuramente a sua sobrevivência no ambiente (Mendes-Rodrigues et al., 2011). Além disso, plântulas oriundas de sementes poliêmbrionicas disputariam o mesmo espaço para se estabelecerem, impossibilitando o crescimento de muitos indivíduos num mesmo local (Ladd & Cappuccino, 2005; Mendes-Rodrigues et al., 2011). Apesar disso, com o aumento da produção de embriões, crescem também as chances da planta-mãe de alcançar o sucesso reprodutivo já que pelo menos uma plântula irá se estabelecer no ambiente (Mendes-Rodrigues et al., 2011). A produção de embriões supranumerários na semente poderia, ainda, compensar uma baixa produção de frutos que possa vir a ocorrer (Mendes-Rodrigues et al., 2011).

### *Cerrado*

Com uma extensão de 23% da área total do país, cerca de 206,5 milhões de Km<sup>2</sup>, o Cerrado é segundo maior bioma brasileiro, estando atrás apenas da Amazônia (Borlaug, 2002; Aguiar et al., 2004; Klink & Machado, 2005; Ribeiro & Walter, 2008). Este bioma estende-se por 13 estados brasileiros formando uma área contínua, localizada essencialmente no Brasil Central, e também em áreas esparsas que ocorrem na região norte do país (nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima) e ao sul, no Paraná (Cole, 1986; Eiten, 1994; Ribeiro &

Walter, 2008). Apesar de ser considerado um ambiente de savana por apresentar fisionomia predominante semelhante as que caracterizam as savanas tropicais e as encontradas na África e na Austrália, o Cerrado é na verdade um complexo vegetacional que, além de savanas, abrange um grande número de ecossistemas como matas, matas de galeria e campos, que formam um gradiente herbáceo-arbóreo de espécies (Eiten, 1972, 1977; Ribeiro et al., 1981, Ribeiro & Walter, 2008).

Essa fisionomia tão diversa do bioma Cerrado acabou refletindo também numa grande biodiversidade de espécies animais e vegetais. Aproximadamente 44% das espécies de plantas que ocorrem nessa região são endêmicas, sendo, portanto, considerada a savana tropical mais diversa do mundo (Klink & Machado, 2005). Apesar disso, os esforços aplicados a conservação do Cerrado tem sido muito menores quando comparados aos investidos na proteção da Amazônia ou da Mata Atlântica.

A fragmentação causada pela intensa atividade agrícola e a grande exploração dos produtos nativos deste bioma, intervenções antrópicas que vêm ocorrendo desde a década de 70 (Ratter et al., 1997) são os maiores responsáveis pela perda dessa diversidade. Calcula-se que mais de 70% da cobertura original do Cerrado tenha sido destruída (Felfili, 2000) e estima-se que cerca de 55% desse total tenha sido convertido em áreas de pastagem e agricultura (Machado et al., 2004). O estado de Goiás, a porção leste do estado do Mato Grosso do Sul, a o centro do Tocantins, o extremo oeste da Bahia e a região do Triângulo Mineiro no estado de Minas Gerais foram as regiões que sofreram a maior perda da vegetação natural (Lima, 2016) e, portanto, a parte norte do bioma encontra-se menos degradada (Sano et al., 2010).

Existem leis que garantem a preservação da fauna, flora, recursos hídricos e que restringem o uso do solo, porém, elas são desprezadas pela maioria dos produtores, que acabam

visando apenas o aumento de seus lucros (Ribeiro & Rodrigues, 2006). A situação se torna ainda mais agravante pois, apenas uma pequena parcela do Cerrado está legalmente protegida: estima-se que 8,3% do bioma se encontram em unidades de conservação (Ganem et al., 2013; MMA, 2015), e somente 1,4% da sua cobertura original fazem parte dessas áreas de proteção (Sano et al., 2010). Além disso, cerca de 20% das espécies endêmicas não se encontram nessas áreas protegidas e aproximadamente 137 espécies endêmicas estejam ameaçadas de extinção (Strassburg et al., 2017).

Justamente por estar entre um dos ambientes mais ameaçados e por abrigar uma biodiversidade única, o Cerrado é considerado atualmente como um dos mais importantes hotspots mundiais (Myers et al., 2000). Previsões apontam que os recursos naturais do Cerrado serão esgotados, ou estejam severamente deteriorados, até o ano de 2050 se o desmatamento mantiver o ritmo atual, 0,5% a 1,0% de perda da cobertura vegetal nativa por ano (Strassburg et al., 2017).

Estudos disponíveis mostram que mudanças climáticas do Quaternário de fato moldaram a estrutura genética e o modo como as populações de espécies estão distribuídas geograficamente (Collevatti et al., 2003; Ramos et al., 2007; Novaes et al., 2010; Souza et al., 2016). O maior conhecimento sobre a distribuição de espécies endêmicas do Cerrado é fundamental para a identificação de grandes centros de diversidade para proteção e para o desenvolvimento de estratégias de conservação dessas áreas, o que pode contribuir, conseqüentemente, como exemplos metodológicos para outros biomas Neotropicais (Werneck et al., 2012). Os estudos sobre mosaicos reprodutivos e citológicos se fazem necessários devido a importância do mapeamento de seus padrões para planejamento de estratégias de conservação, principalmente devido à intensa fragmentação que o Cerrado sofre.

### *Objeto de estudo*

Espécies antes classificadas como pertencentes às famílias Bombacaceae, Malvaceae, Tiliaceae e Sterculiaceae, todas situadas na ordem Malvales, atualmente estão reunidas em uma única família – Malvaceae – e seu monofiletismo recebe o suporte de dados moleculares e morfológicos (Duarte, 2010). Esta família compreende nove subfamílias (Alverson et al., 1999; Bayer et al., 1999), entre elas Bombacoideae e Malvoideae (antigas famílias Bombacaceae e Malvaceae) formam o clado Malvatheca, sustentado por sequências de DNA plastidial e pela morfologia de suas anteras (Baum et al., 1998; Alverson et al., 1999; Bayer et al., 1999; Duarte, 2010).

A subfamília Bombacoideae ocorre desde o México até a América do Sul e possui cerca de 18 gêneros e 187 espécies, ocupando especialmente florestas úmidas no Brasil e na Colômbia, países onde há a maior diversidade do grupo (Flora do Brasil 2020, em construção). Bombacoideae caracteriza-se ainda por ter folhas compostas que possuem de um a nove folíolos, sinapomorfia do grupo (Alverson et al., 1999), e por apresentar cromossomos pequenos e em grande número (Baum & Oginuma, 1994).

O gênero *Eriotheca* Schott & Endl, pertencente a subfamília Bombacoideae, possui cerca de 24 espécies distribuídas exclusivamente na América do Sul (Flora do Brasil 2020, em construção). No Brasil há 16 espécies do gênero e são encontradas desde o Norte do país até o estado de São Paulo (Duarte & Esteves, 2011; Duarte et al., 2011) ocupando áreas de florestas úmidas e Cerrado (Robyns, 1963; Duarte, 2010; Duarte & Esteves, 2011). O grupo apresenta indivíduos de porte arbustivo ou arbóreo que possuem folhas palmadas compostas por folíolos articulados e flores pequenas que atingem no máximo 6,5 cm com 18 a 170 estames parcialmente conados (Robyns, 1963; Duarte, 2010). *Eriotheca gracilipes* pode ser distinguida de outras espécies do gênero por apresentar nectários extraflorais na base de seus receptáculos (Oliveira et al., 1992). *Eriotheca* foi considerado originalmente por Schott &

Endlicher (1832) como parte do gênero *Bombax*, sendo reconhecido apenas mais tarde por Robyns (1963) como um grupo independente. Estudos moleculares recentes sugerem que *Eriotheca* seria um grupo monofilético, mas que forma com *Pachira* Aubl. um grupo parafilético relativo ao clado *Pachira* (Duarte et al., 2011, Carvalho-Sobrinho et al., 2016).

Estudos mostram que *E. gracilipes* possui mosaicos reprodutivos apresentando populações apomíticas ou sexuadas, (Mendes-Rodrigues et al., 2005; Mendes-Rodrigues, 2010; Marinho et al., 2014a,b). Embora em *E.gracilipes* estudos detalhem a ocorrência de autoincompatibilidade, monoembrionia e diploidia (Oliveira et al., 1992, Mendes-Rodrigues et al., 2005) amostragens recentes tem evidenciado indivíduos poliembriônicos, hexaplóides e apomíticos (Mendes-Rodrigues, 2010; Marinho et al, 2014). O padrão de distribuição desses mosaicos, como estão relacionados a mudanças paleoclimáticas e suas relações filogenéticas, ainda não são bem conhecidos.

### *Objetivos Gerais*

A proposta deste estudo foi, de modo geral, avaliar a relação de tamanho de estômatos com os padrões de embrionia e de reprodução encontrados em diferentes populações de *Eriotheca gracilipes*. O trabalho está dividido em dois capítulos cujos principais objetivos são:

1 - Associar a distribuição geográfica dos padrões de embrionia e ploidia das populações coletadas com morfometria de seus estômatos – Capítulo 1.

2 – Verificar possível relação entre tamanho estomático de plântulas de *Eriotheca* (Malvaceae – Bombacoideae) oriundas de populações com ploidias distintas e viabilidade de cruzamento entre ploidias deste gênero – Capítulo 2.

## Referências Bibliográficas

- AGUIAR, L.M.S., MACHADO, B.M., MARINHO-FILHO, J. 2004. A Diversidade Biológica do Cerrado. In Cerrado: ecologia e caracterização (L.M.S. Aguiar & A.J.A Camargo, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina, p. 17-40.
- ALIX, K., GÉRARD, P.R., SCHWARZACHER, T., HESLOP-HARRISON J.S. 2017. Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants. *An Bot.* 120: 183–194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx079>
- ALVERSON, W.S., WHITLOCKB, B.A., NYFFELER, R., BAYER, C., BAUMD, D.A. 1999. Phylogeny of the core Malvales: Evidence from *ndhF* sequence data. *American Journal of Botany* 86: 1474–1486. <https://doi.org/10.2307/2656928>
- ASKER, S.E. & JERLING, L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- BAKER, H.G. 1960. Apomixis and Polyembryony in *Pachira oleaginea* (Bombacaceae). *American Journal of Botany* Vol. 47, No. 4: 296-302. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1960.tb07128.x>
- BARCACCIA, G., BAUMLEIN, H., SHARBEL, T. 2007. Apomixis in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): an overview and glimpse towards the future 47a: 259–80.
- BAUM, D.A. & OGINUMA, K. 1994. A review of chromosome numbers in Bombacaceae with new counts for *Adansonia* Taxon 43: 11- 20. <https://doi.org/10.2307/1223456>
- BAUM, D.A., ALVERSON, W.S., NYFFELER, R. 1998. A durian by any other name: taxonomy and nomenclature of the core Malvales. *Harvard Papers in Botany* 3: 313–330.
- BAYER, C., FAY, M.F., DEBRUIJN, A.Y., SAVOLAINEN, V., MORTON, C.M., KUBIHKI, K., CHASE, M.W. 1999. Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL*

sequences. Botanical Journal of the Linnean Society 129(4): 267-303.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1999.tb00505.x>

BICKNELL, R.A. & Koltunow, A.M. 2004. Understanding apomixes: recent advances and remaining comundrums. The Plant Cell 16: 229-245. <https://doi.org/10.1105/tpc.017921>

BORLAUG, N.E. 2002. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey. Global warming and other eco-myths: 29-60. <https://doi.org/10.1079/IVP2001279>

BOWERS, J.E., CHAPMAN, B.A., RONG, J., PATERSON, A.H. 2003. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. Nature, 422: 433–438. <https://doi.org/10.1038/nature01521>

BROCK, M.T. 2004. The potential for genetic assimilation of a native dandelion species, *Taraxacum ceratophorum* (Asteraceae), by the exotic congener *T. officinale*. American Journal of Botany 91: 656–663. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.5.656>

BRUKHIN, V. 2017. Molecular and Genetic Regulation of Apomixis. Russian Journal of Genetics 53(9): 943–964. <https://doi.org/10.1134/S1022795417090046>

CAETANO, A.P.S., SIMÃO, D.G., CARMO-OLIVEIRA, R., & OLIVEIRA, P.E. 2013. Diplospory and obligate apomixis in *Miconia albicans* (Miconieae, Melastomataceae) and an embryological comparison with its sexual congener *M. chamissois*. Plant systematics and evolution, 299(7), 1253-1262. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0793-y>

CARVALHO-SOBRINHO, J.G., ALVERSON, W.S., ALCANTARA, S., QUEIROZ, L.P., MOTA, A.C., BAUM, D.A. 2016. Revisiting the phylogeny of Bombacoideae (Malvaceae): Novel relationships, morphologically cohesive clades, and a new tribal classification based on multilocus phylogenetic analyses. Molecular Phylogenetics and Evolution 101: 56-74.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.05.006>

- CARMAN, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperm may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61, 51-94. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1997.tb01778.x>
- COGHLAN, A., EICHLER, E.E., OLIVER, S.G., PATERSON, A.H., STEIN, L. 2005. Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends Genetics* 21, 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.09.009>
- CONNER, J.A., OZIAS-AKINS, P. 2017. Apomixis: Engineering the Ability to Harness Hybrid Vigor in Crop Plants. In: Schmidt A. (eds) *Plant Germline Development. Methods in Molecular Biology. Plant Germline Development*, 669: 17-34. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7286-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7286-9_2)
- COLE, M.M. 1986. *The Savannas: biogeography and geobotany*. Academic Press, London.
- 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* 12: 105–115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01701.x>
- DUARTE, M.C. 2010. Análise filogenética de *Eriotheca* Schott. & Endl. e gêneros afins (Bombacoideae, Malvaceae) e estudo taxonômico de *Eriotheca* no Brasil. Ph. D. thesis. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo.
- DUARTE, M.C. & ESTEVES, G.L. 2011. A new species of *Eriotheca* (Malvaceae, Bombacoideae) from Bahia, Brazil. *Brittonia* 63: 338– 342. <https://doi.org/10.1007/s12228-010-9174-9>
- DUARTE, M.C., ESTEVES, G.L., SALATINO, M.L.F., WALSH, K.C., BAUM, D.A. 2011. Phylogenetic Analyses of *Eriotheca* and Related Genera (Bombacoideae, Malvaceae). *Systematic Botany* 36: 690–701. <https://doi.org/10.1600/036364411X583655>

- EITEN, G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *The Botanical Review* 38: 201-341. <https://doi.org/10.1007/BF02859158>
- EITEN, G. 1977. Delimitação do conceito de Cerrado. *Arquivos do Jardim Botânico, Rio de Janeiro* 21: 125-134.
- EITEN, G. 1994. Vegetação do cerrado. *Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas*: 17-73.
- FELFILI, J.M. 2000. Perda da diversidade. UNESCO. *Vegetação no Distrito Federal: tempo e espaço*: 33-34.
- Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 30 Out. 2019.
- GANEM, R.S., DRUMMOND, J.A., FRANCO, J.L.A. 2013. Conservation policies and control of habitat fragmentation in the Brazilian Cerrado biome. *Ambiente & Sociedade* 16(3): 99-118. <https://doi.org/10.1590/S1414-753X2013000300007>
- GOLDBLATT, P. 1980. Polyploidy in angiosperms: monocotyledons. *Polyploidy* 69: 219–39. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3069-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3069-1_13)
- GOLDENBERG, R. & SHEPHERD, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in “Cerrado” vegetation. *Plant Systematics and Evolution* 211: 13-29. <https://doi.org/10.1007/BF00984909>
- HAND, M.L. & KOLTUNOW, A.M. 2014. The genetic control of apomixis: asexual seed formation. *Genetics* 197(2): 441-450. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163105>
- HOJSGAARD, D.H., KLATT, S., BAIER, R., CARMAN, J.G., HÖRANDL, E. 2014a. Taxonomy and biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. *Plant Science* 33: 1–14. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898488>

HÖRANDL, E. & PAUN, O. 2007. Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials. *Apomixis: Evolution, mechanisms and perspectives*: 169–194.

HÖRANDL, E., COSENDAL, A., TEMSCH, E.M. 2008. Understanding the geographic distributions of apomictic plants: a case for a pluralistic approach. *Plant Ecology Diversity* 1: 309–320. <https://doi.org/10.1080/17550870802351175>

HÖRANDL, E. 2009 A combinatorial theory for maintenance of sex. *Heredity* (Edinb) 103(6): 445–457. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.85>

KOLTUNOW, A.M. & GROSSNIKLAUS, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 547-574. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.110901.160842>

KLINK, C.A. & MACHADO, R.B. 2005. A conservação do cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1(1): 147-155.

LADD, D., & CAPPUCCINO, N.A. 2005. A field study of seed dispersal and seedling performance in the invasive exotic vine *Vincetoxicum rossicum*. *Canadian Journal of Botany* 83: 1181-1188. <https://doi.org/10.1139/b05-093>

LIMA, C.A. 2016. Influência de eventos históricos e recentes na filogeografia e estrutura genética de *Neothraupis fasciata* (Aves: Thraupidae), uma ave endêmica do Cerrado. Tese (Doutorado em Biologia Animal) — Universidade de Brasília, Brasília

MACHADO, R.B., RAMOS NETO, M.B., PEREIRA, P.G.P.; CALDAS, E.F., GONÇALVES, D.A., SANTOS, N.S., TABOR, K., STEININGER, M. 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.

- MANSOURI, H. & BAGHERI, M. 2017. Induction of polyploidy and its effect on *Cannabis sativa* L.. *Cannabis sativa* L. – Botany and Biotechnology: 365–383. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_17)
- MASTERSON, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264: 421–23. <https://doi.org/10.1126/science.264.5157.421>
- MARINHO, R.C; MENDES-RODRIGUES, C; BONETTI, A.M; OLIVEIRA, P.E. 2014. Pollen and stomata morphometrics and polyploidy in *Eriotheca* (Malvaceae-Bombacoideae). *Plant Biology* 16: 508–511. <https://doi.org/10.1111/plb.12135>
- MENDES-RODRIGUES, C., CARMO-OLIVEIRA, R., TALAVERA, S., ARISTA, M., ORTIZ, P.L., OLIVEIRA, P.E. 2005. Polyembryony and apomixis in *Eriothecapubescens* (Malvaceae - Bombacoideae). *Plant Biology* 7: 533-540. <https://doi.org/10.1055/s-2005-865852>
- MENDES-RODRIGUES, C. 2010. Ecologia de espécies poliembriônicas com ênfase no Bioma Cerrado. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia.
- MENDES-RODRIGUES, C., RANAL, M.A., OLIVEIRA, P.E. 2011. Does polyembryony reduce seed germination and seedling development in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae – Bombacoideae). *American Journal of Botany* 98: 1613-1622. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100022>
- MENDES-RODRIGUES, C., SAMPAIO, D.S., COSTA, M.E., CAETANO, A.P.S., RANAL, M.A., BITTENCOURT, N.S., OLIVEIRA, P.E. 2012. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). *Flora* 207: 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.10.008>

MEYER, J.Y. 1998. Observations on the reproductive biology of *Miconia calvescens* DC (Melastomataceae), an alien invasive tree on the island of Tahiti (South Pacific Ocean). *Biotropica* 30, 609–624. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.1998.tb00101.x>

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF). Cadastro nacional de unidades de conservação (CNUC). Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/cadastro-nacional-de-ucs/dados-consolidados>.

MYERS, N., MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B., KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>

NAUMOVA, T. 1992. Apomixis in Angiosperms: Nucellar and Integumentary Embryony.

NOVAES, R.M.L., LEMOS-FILHO, J.P., RIBEIRO, R.A., LOVATO, M.B. 2010. Phylogeography of *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology* 19: 985-998. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04530.x>

OLIVEIRA, P.E., GIBBS, P.E., BARBOSA, A.A., TALAVERA, S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. *Plant Systematic and Evolution* 179: 207-219. <https://doi.org/10.1007/BF00937597>

OTTO, S.P. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131, 452–462 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.022>

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* 100: 1219-1228. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm221>

RATTER, J.A., RIBEIRO, J.F., BRIDGEWATER, S. 1997. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. *Annals of Botany* 80: 223-230. <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0469>

RIBEIRO, J.F., SANO, S.M., SILVA, J.A. 1981. Chave preliminar de identificação dos tipos fisionômicos da vegetação do Cerrado. *Anais do Congresso Nacional de Botânica XXXII*: 124-133.

RIBEIRO, J.F. & WALTER, B.M.T. 2008. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. *Cerrado: ecologia e flora*: 51-212.

RIBEIRO, R.A. & RODRIGUES, F.M. 2006. Genética da conservação em espécies vegetais do Cerrado. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 5(3): 253-260.

ROBYNS, A. 1963. Essai de Monographie du genre *Bombax* L. s.l. (Bombacaceae). *Bulletin du Jardin Botanique de L'Etat* 33(1): 1–311. <https://doi.org/10.2307/3667210>

SAMPAIO, D.S. 2010. Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia.

SANO, E.E., ROSA, R., BRITO, J.L.S., FERREIRA, L.G. 2010. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment* 166: 113–124. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0988-4>

SARAIVA, L.C., CESAR, O., MONTEIRO, R. 1996. Breeding systems of shrubs and trees of a Brazilian savanna. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 39: 751-763.

SOLTIS, D.E., BURLEIGH, J.G. 2009. Surviving the K-T mass extinction: new perspectives of polyploidization in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 5455–5456.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0901994106>

SOLTIS, P.S., & SOLTIS, D.E. 2009. The role of hybridization in plant speciation. *Annual review of plant biology* 60: 561-588. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092039>

SOLTIS, P.S., & SOLTIS, D.E. 2012. Polyploidy and genome evolution. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31442-1>

SOUZA, H.A.V., COLLEVATTI, R.G., LIMA-RIBEIRO, M.S., LEMOS-FILHO, J.P., LOVATO, M.B. 2016. A large historical refugium explains spatial patterns of genetic diversity in a Neotropical savanna tree species. *Annals of Botany* 119: 239-252. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw096>

STRASSBURG, B.B., BROOKS, T., FELTRAN-BARBIERI, R., IRIBARREM, A., CROUZEILLES, R., LOYOLA, R., SOARES-FILHO, B. 2017. Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nature Ecology & Evolution* 1: 1-3. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0099>

VAN DIJK, P. & VIJVERBERG, K. 2005. The significance of apomixis in the evolution of the angiosperms: a reappraisal. *Plant Species-Level Systematics: New Perspectives on Pattern and Process*: 101–116.

VAN DIJK, P.J., RIGOLA, D., SCHAUER, S.E. 2016. Plant breeding: Surprisingly, less sex is better. *Current Biology* 26(3): 122-124. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.010>

WENDEL, J.F. 2015. The wondrous cycles of polyploidy in plants. *American journal of botany* 102(11): 1753-1756. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500320>

WERNECK, F.P., NOGUEIRA, C., COLLI, G.R., SITES, J.W., COSTA, G.C. 2012. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography* 39: 1695–170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2012.02715.x>

WHITTON, J.; SEARS, C.J; BAACK, E.J., OTTO, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 169: 169-182.

<https://doi.org/10.1086/523369>

## CAPÍTULO 1

Predição da poliembriõia utilizando a morfometria estomática de populações monoembriônicas e poliembriônicas de *Eriotheca gracilipes*.

Annelise da Cruz Serra<sup>1\*</sup>, Clesnan Mendes Rodrigues<sup>2</sup>, Rafaela Cabral Marinho<sup>3</sup>, Paulo Eugênio Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

\*Autora para correspondência:

e-mail: ac.serrabio@gmail.com

## Resumo

A poliembrionia, presença de mais de um embrião por semente, é comum entre espécies de Cerrado. *Eriotheca gracilipes*, uma espécie arbórea amplamente distribuída pelo bioma, apresenta padrões de embrionia distintos entre suas populações e que estão relacionados a diferentes modos de reprodução e ploidia. Períodos de instabilidades climáticas que ocorreram no Quaternário (2,48Ma) parecem ter influenciado a distribuição desses padrões de reprodução em termos fitogeográficos. Mas estudar a distribuição destes padrões reprodutivos e citológicos é difícil e custoso, de maneira que proxies morfológicos que ajudassem a entender tal distribuição seriam importantes. No presente estudo, avaliamos a relação entre o padrão de embrionia encontrado nas populações de *E. gracilipes* e a morfometria estomática. Foram analisadas 25 populações de *E. gracilipes* coletadas por toda extensão do bioma. As lâminas de estômatos foram preparadas utilizando-se a técnica de decalque foliar. Foram feitas lâminas usando a parte abaxial das folhas e foram medidas altura e largura dos estômatos. Os padrões de embrionia apresentados pelas populações foram estabelecidos em estudo anterior por dissecação de sementes. Seis populações do estudo apresentam monoembrionia, onze poliembrionia e duas baixa frequência de poliembrionia. Seis populações foram tratadas como indefinidas haja vista que seu padrão de embrionia não pôde ser identificado anteriormente. Foi possível notar que outros fatores (altitude, latitude e longitude) além do padrão de embrionia influenciam o tamanho estomático. Os padrões de embrionia mostraram certa divisão geográfica, permitindo inferências de como a distribuição e dispersão destas populações pode ter ocorrido. O padrão poliembriônico e provavelmente apomítico se mostrou mais amplamente distribuído evidenciando a habilidade de dispersão e colonização que essa característica pode conferir aos indivíduos e que muitas vezes está associada a presença de apomixia.

Palavras-chave: *Eriotheca*, poliembrionia, apomixia, morfometria estomática, mosaicos de reprodução.

## Abstract

Polyembryony, the presence of more than one embryo per seed, is common among Cerrado species. *Eriotheca gracilipes*, an arboreal species widely distributed throughout the biome, presents distinct embryonic patterns among its population and are related to different modes of reproduction and ploidy. Periods of climatic instability that occurred in the Quaternary (2.48Ma) seem to have influenced the distribution of these reproduction patterns in phytogeographic terms. However, studying the distribution of these reproductive and cytological patterns is difficult and costly, so morphological proxies that help understand such distribution would be important. In the present study, we evaluated the relationship between the embryonic pattern found in populations of *E. gracilipes* and stomatal morphometry. Twenty-five populations of *E. gracilipes* collected for most of the extension of the biome were analyzed. The stomatal slides were prepared using the foliar decal technique. Slides were made using the abaxial part of the leaves and height and width of the stomata were measured. The embryonic patterns presented by the populations were established by seed dissection in a previous study. Six populations of the study present were monoembryonic, 11 polyembryonic and two low frequencies of polyembryony. Six populations were treated as indefinite since their embryonic pattern could not be identified previously. It was possible to note that other factors (altitude, latitude and longitude) apart from the embryonic pattern can influence the stomatal size. Embryonic patterns showed a certain geographical division, allowing inferences on how the distribution and dispersion of these populations may have occurred. The polyembryonic and probably apomictic pattern has shown to be more widely distributed, evidencing the dispersion and colonization ability that this characteristic can confer to individuals and that is often associated with the presence of apomixis.

Key words: *Eriotheca*, polyembryony, apomixis, stomatal morphometry, mosaics of reproduction.

## 1    **Introdução**

2            A grande maioria das espécies vegetais do Cerrado são sexuadas, sendo o sistema de  
3    autoincompatibilidade, o modo de reprodução mais frequente (Oliveira & Gibbs, 2000).  
4    Apesar disso, estudos referentes a biologia reprodutiva de plantas nativas deste bioma tem  
5    mostrando que a apomixia, formação de embriões viáveis sem que haja fecundação da  
6    oosfera, (Bicknell & Koltunow, 2004; Koltunow & Grossniklaus, 2003) também apresenta  
7    ampla distribuição nesta região.

8            Acredita-se que a apomixia possa ocorrer em função de uma desregulação do  
9    desenvolvimento sexual, o que ocasionaria a eliminação de etapas desde processo (Nogler,  
10   1971). Isso poderia ser resultado de eventos antigos de hibridação entre espécies relacionadas  
11   ou de ecótipos distintos já que os indivíduos apresentariam assincronia na expressão de genes  
12   envolvidos na formação do saco embrionário e do endosperma (Koltunow, 1993; Carman,  
13   1997; Koltunow & Grossniklaus, 2003). A duplicação de genes poderia ser capaz de corrigir  
14   isso, permitindo o pareamento dos cromossomos e a manutenção desta deregulação. Por este  
15   motivo, a apomixia é frequentemente relacionada a poliploidia, evento reconhecido como um  
16   dos mais importantes na história evolutiva das angiospermas (Soltis & Soltis, 2000) com  
17   registros fósseis indicando que ao menos 70% são de origem poliplóide (Masterson, 1994).

18           Também é recorrente a associação entre a apomixia e poliembrionia (Carman, 1997)  
19   especialmente, a embrionia adventícia, onde embriões são formados a partir de células do  
20   nucelo ou dos tegumentos. Neste tipo de apomixia, a formação de embriões sexuais também  
21   pode ocorrer em paralelo a formação de embriões clonais, uma vez que o endosperma não se  
22   desenvolve de forma autônoma, fazendo com que a polinização ainda seja necessária  
23   (Hojsgaard et al., 2014). A combinação entre apomixia, poliembrionia e poliploidia poderia  
24   ter conferido características mais vantajosas a esses indivíduos já que permitem uma maior

1 garantia reprodutiva dessas e podem conferir uma maior adaptação destas espécies a  
2 ambientes diferentes dos ocupados pelos diplóides (Otto & Whitton, 2000).

3 *Eriotheca* (Malvaceae – Bombacoideae) é um gênero de árvores tropicais cuja maioria  
4 das espécies ocorre no Brasil. Estudos sobre espécies do gênero *Eriotheca* indicam a presença  
5 de mosaicos citológicos e de reprodução, com indivíduos hexaplóides ( $2n = 6x = 276$ ) sendo  
6 poliploides e assexuados, enquanto diplóides e tetraplóides ( $2n = 2x = 92$ ;  $2n = 4x = 184$ ) são  
7 monoembriônicos e sexuados (Oliveira et al., 1992; Mendes-Rodrigues et al., 2005; Mendes-  
8 Rodrigues, 2010). *Eriotheca gracilipes* (K. Schum.) A. Robyns é uma espécie particularmente  
9 comum no Cerrado, ocorrendo por toda sua extensão. A espécie floresce de maio até setembro  
10 e sua frutificação ocorre de setembro a outubro. Os indivíduos desta espécie podem atingir  
11 até 12m de altura. Ainda não foram registradas populações tetraplóides para esta espécie.

12 Espécies que apresentam mosaicos reprodutivos e de ploidia podem ser resultado de  
13 variação ecológica e biogeografia do ambiente que se encontram. Portanto, estudos  
14 envolvendo variação citotípica encontrada nessas espécies poderiam contribuir para um  
15 melhor entendimento sobre a distribuição destes mosaicos, e consequentemente, auxiliar no  
16 conhecimento da história evolutiva destas espécies. Mas tendo em vista a ampla distribuição  
17 dessas espécies, estudos dessa natureza envolveriam grande quantidade de amostras. Isto  
18 tornaria a contagem de cromossomos e as análises de citometria de fluxo, métodos usuais para  
19 detectar diferenças citogenéticas (e.g. Balao et al., 2009, 2011; Escudero et al., 2018),  
20 custosos e pouco viáveis. Além disso, espécies do gênero *Eriotheca* possuem cromossomos  
21 pequenos e em grande número (Mendes-Rodrigues, 2010), o que dificultaria ainda mais a  
22 utilização dessas técnicas.

23 Assim, ferramentas de baixo custo e que permitam uma rápida estimativa da ploidia de  
24 diferentes populações se fazem necessárias. As diferenças de ploidia muito comumente  
25 afetam o tamanho celular, o chamado efeito “gigas” (Balao et al., 2011). Algumas estruturas

como pólen e estômatos são particularmente afetados pelas mudanças de ploidia e estudos anteriores com espécies de *Eriotheca* indicaram que a morfometria poderia ser utilizada como indicador de diferenças citogenéticas (Marinho et al., 2014a). A morfometria de estômatos seria uma técnica eficiente para inferência da ploidia de populações de *Eriotheca*, permitindo a caracterização da distribuição citotípica ou de tipos de sistemas reprodutivos destas espécies (Marinho et al., 2014a) e tendo a vantagem de poder ser avaliada em folhas mesmo fora da época reprodutiva. Portanto, neste capítulo, associamos a os diferentes padrões de embrionia e ploidia, anteriormente inferidos (Mendes-Rodrigues, 2010), encontrados em 25 populações de *E. gracilipes*, para predizer e mapear

## Material e Métodos

Para o estudo, foram coletados folhas adultas totalmente expandidas e, quando possível, frutos de *E. gracilipes* nos estados de Minas Gerais (populações: MG1, MG2, MG3, MG4, MG5), Goiás (populações: GO1, GO2, GO3, GO4, GO5, GO6, GO7, GO8, GO9), Mato Grosso (populações: MT1, MT2, MT3), Mato Grosso do Sul (populações: MS1), Tocantins (populações: TO1, TO2, TO3, TO4), e Bahia (populações: BA1, BA2, BA3), totalizando 25 populações (Fig. 2). As coordenadas geográficas e a altitude de cada população foram definidas por GPS. Detalhes das populações podem ser observados na tabela 1.

## Definição de poliembrionia

Quando possível foram coletadas sementes maduras nos indivíduos das populações estudadas. Foram avaliados de um a cinco indivíduos por população, sendo avaliados de 10 a 50 sementes por indivíduo. O número de indivíduos e de sementes por indivíduo oscilou em função da disponibilidade de frutos para cada coleta. As sementes foram germinadas em água destilada e dissecadas para contagem do número de embriões por semente e para definir os

padrões de embrionia (Mendes-Rodrigues et al., 2005) Uma semente foi considerada como poliembriônica se apresentava mais de um embrião. Um indivíduo foi considerado monoembriônico (padrão monoembriônico) se possuía todas as sementes exclusivamente monoembriônicas e um indivíduo foi considerado poliembriônico (padrão poliembriônico) se pelo menos uma semente foi poliembriônica. Foi calculado a média de embriões por semente e a frequência de sementes poliembriônicas para cada uma das populações onde se coletou sementes. Seis populações foram identificadas como monoembriônicas, (GO3, MG1, MG2, MG3, MG4 e MT2) e onze como poliembriônicas (GO1, GO2, GO5, GO6, GO7, GO8, GO9, TO2 e TO3, MT1 e MT3). Duas populações apresentaram baixa frequência de sementes poliembriônicas (menos de 10%) e foram classificadas como o grupo “Baixa Poliembriõnia” (populações BA2 e GO4). Seis populações não puderam ter seu padrão de embrionia definidos (populações: TO1, TO4, MG5, BA1, BA3 e MS1).

#### *Medidas dos estômatos*

Para obtenção das medidas dos estômatos, foram utilizadas folhas secas de no mínimo dois indivíduos e no máximo de dez indivíduos para cada população. As folhas foram submersas em água por um tempo de cerca de dois minutos para reidratação, e posterior preparação das lâminas. Foi utilizado cola instantânea Super Bonder Loctite para obtenção dos moldes dos estômatos, que foram feitos através de impressões da face abaxial das folhas sobre as lâminas (Chin, 1995; Fig. 1E,F). As lâminas confeccionadas foram, então, observadas e fotografadas com o auxílio do microscópio Olympus BX51 e da câmera digital DP70, para posterior análise da altura e largura dos estômatos (Fig. 1E,F). As medidas foram realizadas com o auxílio do programa ImageJ (Aramoff et al., 2004), e foram medidos pelo menos 50 estômatos por indivíduo.

## 1 *Análise Estatística*

2 Os dados de altura e largura dos estômatos não apresentaram normalidade (testado  
3 com teste de Kolmogorov-Smirnov Lilliefors), enquanto os dados obtidos com média das  
4 medidas por indivíduo mostraram normalidade. Para comparação entre as populações,  
5 independentemente de outros fatores, foi realizada uma ANOVA seguida de comparações  
6 múltiplas pelo teste de Scott-Knott, nesse caso independentemente dos indivíduos amostrados.

7 A decomposição da variância do comprimento e da largura entre os padrões foi  
8 realizada com uma ANOVA aninhada (Nested ANOVA) baseada na metodologia proposta  
9 por Neter et al. (1985), para quantificar os componentes de variância relacionados ao efeito do  
10 padrão de embrionia ( $\sigma^2_P$ ), e demais fatores aninhados dentro do padrão de embrionia ( $\sigma^2_{F/P}$ ),  
11 e o componente do resíduo ( $\sigma^2_R$ ). A análise foi realizada com os dados individuais dos  
12 estômatos e para a média de cada indivíduo, separadamente. Mas como as tendências foram  
13 semelhantes, foram apresentadas aqui apenas as análises das médias das medidas por  
14 indivíduo. Foram adotados quatro modelos na decomposição da variância (tabela 2). O  
15 primeiro considerando os três padrões de embrionia (monoembrionia, poliembrionia e baixa  
16 poliembrionia), no segundo monoembrionia e poliembrionia (populações poliembriônicas e  
17 com baixa frequência de poliembrionia agrupados) e no terceiro monoembrionia e  
18 poliembrionia para a região Sul (populações com latitudes abaixo de Brasília). Nos três  
19 modelos citados acima foi considerado padrão de embrionia, população aninhada dentro de  
20 padrão e resíduos. No quarto modelo foi considerado o fator região (norte e sul), os padrões  
21 de embrionia aninhados em região, população aninhada em padrão e resíduos.

22 Para testar a relação linear entre as variáveis geográficas (altitude, longitude e latitude)  
23 com os dados de estômatos foi realizada correlação linear de Pearson (tabela 3) e a  
24 significância das estimativas testada com teste  $t$  de Student. Assim como nas análises de

1 Nested ANOVA, a correlação linear foi feita tanto para a média dos indivíduos como para as  
2 médias das populações, porém foram utilizados apenas os dados de médias de indivíduos.

3 Para comparação entre os três padrões (monoembriônico, poliembriônico e baixa  
4 poliembrionia) foi realizada uma ANOVA aninhada (Nested ANOVA) com causas de  
5 variação padrão de embrionia e população aninhada dentro de padrão de embrionia (tabela 4).  
6 Quando detectadas diferenças entre os padrões, foi realizado o teste de Tukey par-a-par.  
7 Como a análise anterior indicou que os padrões poliembriônico e baixa poliembrionia tem o  
8 mesmo comportamento, a análise foi repetida agrupando-se estes dois grupos e o Nested  
9 ANOVA foi repetido.

10 Como foi observado pelos testes de correlação linear de Pearson que as variáveis  
11 geográficas afetaram as medidas dos estômatos, foi realizada uma Análise de Covariância  
12 (ANCOVA) com as causas de variação padrão de embrionia (monoembriônico e  
13 poliembriônico) e as covariáveis (altitude, latitude e longitude) (Tabela 5).

14 Para estimar um modelo de predição de poliembrionia, os dados de altitude, latitude,  
15 longitude, largura e altura médias dos estômatos de cada um dos indivíduos foram ajustados a  
16 modelos de regressão logística multivariada. Para o modelo foram considerados somente os  
17 indivíduos monoembriônicos e poliembriônicos ( $n = 26$  indivíduos monoembriônicos,  $n = 73$   
18 indivíduos poliembriônicos), sendo que os indivíduos com baixa poliembrionia (abaixo de  
19 10%) foram excluídos da construção do modelo. Foi considerado o modelo mais  
20 parcimonioso, pelo método backward com seleção de variáveis baseada na probabilidade  
21 inferior a 5% do teste de Wald. A partir do modelo reduzido foi calculada a probabilidade de  
22 cada um dos indivíduos amostrados das 25 populações ser poliembriônico e calculada a  
23 probabilidade média de cada população estudada, sendo estas comparadas entre-si pelo teste  
24 de Scott-Knott (Tabela 1, Fig. 6).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS 20.0, no pacote SAEG ou no ambiente R (R Development Core 2017). Foi adotada significância de 5% para todas as análises.

## Resultados

As médias da largura e altura dos estômatos para as populações monoembriônicas e poliembrionicas foram calculadas e mostraram que há uma clara diferença entre os dois padrões. Os estômatos foram significativamente maiores para as populações com padrão poliembrionico do que para aquelas com padrão monoembriônico (Fig. 3). Apesar destas diferenças, houve uma variação e sobreposição muito grande na morfometria dos estômatos das plantas com diferentes padrões de embrionia. As duas populações que apresentam uma baixa frequência de poliembrionia (BA2 e GO4) foram incluídas juntamente com as populações poliembrionicas. As populações que não tinham padrão de embrionia definido não entraram nessa análise. É possível entender as razões de tal sobreposição quando se observa a variação nos dados morfométricos por população (Fig. 4). Esta variação foi mais complexa do que o previsto e parece ser influenciada por outros fatores. Dessa maneira foram tentadas várias estratégias de decomposição da variância para entender que fatores poderiam estar influenciando tal variação.

No primeiro modelo de decomposição da variância, observamos que para a altura e para a largura do estômato o fator padrão de embrionia explicou muito pouco da variância (0,00 e 0,98%, respectivamente), evidenciando que este fator não é determinante para o tamanho estomático como esperado. Já o fator população dentro de padrão explicou foi o mais explicativo dentre os fatores definidos para este modelo para ambas as medidas, o que mostra que a variação do tamanho estomático das populações estudadas. Os valores dos

1    resíduos indicam que fatores não considerados nas análises ainda estão atuando sobre a  
2    variação do tamanho dos estômatos.

3           No segundo modelo, considerando dois padrões de embrionia, o fator padrão foi mais  
4    significativo quando comparado ao primeiro (15,37% para altura e 14,24% para largura). Isso  
5    indicaria que populações com baixa frequência de poliembriõnia estariam se comportando  
6    como as populações poliembriônicas. Porém, assim como no primeiro modelo, o padrão de  
7    embrionia também não explica a maior parte da variação. Já o fator população dentro de  
8    padrão, assim como no primeiro modelo, foi o que melhor explicou a variação do tamanho  
9    estomático com 63,13% e 56,27% para a média de altura e largura, respectivamente.

10          Considerando os dois padrões de embrionia (monoembriõnia e poliembriõnia)  
11    encontrados na região Sul, o terceiro modelo mostrou que o padrão de embrionia praticamente  
12    não influencia na altura e da largura dos estômatos, o que indicaria que grande parte da  
13    variância se encontra em populações localizadas no Norte. O fator população dentro de  
14    padrão mostrou 68,70% e 51,87% para as respectivas medidas e foi novamente o que mais  
15    explicou a variância do tamanho estomático.

16          Já no quarto modelo, adicionamos o fator região, que mostrou os maiores valores para  
17    esta análise, representando 49,64% e 38,18% da variância para a média altura e largura dos  
18    estômatos, respectivamente, confirmando essa divisão entre as populações em Norte e Sul. O  
19    padrão de embrionia dentro de região explicou 12,75% para altura e 25,32% para largura dos  
20    estômatos. No entanto, fatores aleatórios ainda estão atuando consideravelmente nesta análise  
21    (37,61% e 36,5% para altura e largura respectivamente).

22          Os dados de correlação linear mostram a relação direta entre duas variáveis. Pode-se  
23    notar que a coeficiente de variação da altura (CV Altura) dos estômatos está sendo  
24    influenciado diretamente pelas variáveis geográficas, estando relacionada de maneira positiva  
25    com a altitude (0,214), enquanto que esta relação se mostra inversa para a latitude (-0,434) e a

longitude (-0,160), sendo a longitude o fator mais fraco dentre as variáveis. Isso quer dizer que as variáveis geográficas em questão são responsáveis diferença encontrada nas médias de altura estomática. Também é importante destacar a estreita relação entre porcentagem de poliembrião (PSP) e as variáveis latitude e altitude. Os dados mostram que quanto maior a porcentagem de poliembrião, menor será a altitude (-0,625). No entanto, esta relação é direta para a variável latitude (0,279). Além disso, a altura estomática se mostrou correlacionada de forma positiva com a PSP (0,285).

Na decomposição da variação da segunda ANOVA Aninhada (nested ANOVA), considerando os fatores padrão de embrião e população dentro de padrão de embrião para dois ou três padrões (monoembrião, poliembrião e baixa poliembrião ou monoembrião e poliembrião), percebemos que a média do tamanho dos estômatos é sempre maior para as populações poliembriônicas ( $36,22 \pm 0,37$  e  $36,49 \pm 0,39$  para altura considerando dois e três padrões, respectivamente). No entanto, nota-se pelo coeficiente de variação (CV) que essas medidas diferem mais entre populações monoembriônicas ( $8,51 \pm 0,22$  e  $10,93 \pm 0,35$  para altura e largura, respectivamente). O padrão de embrião de mostra significativo apenas quando consideramos o CV das medidas ( $F = 11,50$ ;  $p = 0,001$  para altura e  $F = 3,81$ ;  $p = 0,045$  para largura). Já o fator população dentro de padrão de embrião explica a variação do tamanho de estômato tanto para as médias ( $F = 20,36$ ;  $p = <0,001$  para altura e  $F = 13,48$ ;  $p = <0,001$  para largura) quanto para o CV dos indivíduos ( $F = 2,91$ ;  $p = 0,001$  e  $F = 4,64$ ;  $p = <0,001$  para altura e largura, respectivamente). A análise par a par demonstrou que há um comportamento semelhante na média dos estômatos de populações poliembriônicas e de baixa poliembrião.

Na Análise de Covariância - ANCOVA foram consideradas as covariáveis geográficas para correlação entre as médias de altura, largura, e o coeficiente de variação dos estômatos para os dois padrões de embrião. Populações monoembriônicas mostraram, na análise de

média de estômatos, valores menores que os apresentados pelas populações poliembriônicas ( $32,09 \pm 1,06$  e  $35,22 \pm 0,49$  para altura dos estômatos e  $17,34 \pm 0,44$  e  $19,12 \pm 0,21$  para a largura dos estômatos), confirmando a diferença de tamanho entre os dois padrões de embrionia. No entanto, o coeficiente de variação evidencia que há maior variabilidade entre as médias dos indivíduos de populações monoembriônicas do que nas populações poliembriônicas, tanto para altura ( $CV = 8,46 \pm 0,27$  e  $6,49 \pm 0,13$ ) quanto para largura ( $CV = 10,62 \pm 0,49$  e  $8,88 \pm 0,23$ ). O padrão de embrionia mostrou influência direta sendo significativo tanto na média do tamanho dos estômatos quanto no seu coeficiente de variação para ambas as medidas ( $F = 6,27$ ;  $p = 0,0014$  para altura e  $F = 11,28$ ;  $p = 0,001$  para largura dos estômatos). Porém, quando consideramos somente a altura dos estômatos, apenas a covariável altitude parece não exercer influência significativa ( $F = 2,43$ ;  $p = 0,122$ ), enquanto que para a largura, a única covariável geográfica que se mostrou não significativa foi a longitude ( $F = 2,51$ ;  $p = 0,116$ ). Considerando o coeficiente de variação (CV), pode-se notar que nenhuma covariável geográfica parece influir diretamente no seu valor, sendo significativo apenas o padrão de embrionia ( $F = 37,01$ ;  $p = 0,001$  e  $F = 8,98$ ;  $p = 0,003$  para altura e largura do estômato, respectivamente).

Os dados de morfometria dos estômatos e coordenadas geográficas de *E. gracilipes* foram utilizados como preditores da ocorrência do evento poliembrionia, em dois modelos de regressão logística multivariada. No primeiro modelo foram incluídos todos os preditores. No segundo modelo, foram selecionados as variáveis preditoras pelo método backward baseado na probabilidade do teste de Wald a 5%. A partir do modelo reduzido foi calculada a probabilidade de cada indivíduo ser poliembriônico utilizando-se as variáveis altura e altitude, que indicaram ser as mais significativas ( $p$ ) e a partir disso foi calculada a probabilidade média de cada população estudada, e as médias foram comparadas entre-si pelo teste de Scott-Knott (Tabela 1). Os resultados mostram que a altura dos estômatos tem uma relação direta

1 com a poliembrionia, enquanto que com a altitude esta relação é inversa (*bi*). O valor OR  
2 (Odds ratio ou taxa de probabilidade) indica que para cada incremento de altura dos estômatos  
3 é possível prever um incremento de 1,29-1,22 % na probabilidades das populações serem  
4 poliembrionicas. Ao mesmo tempo, para cada metro de aumento na altitude da população,  
5 haveria uma redução de cerca de um por cento na probabilidade da população ser  
6 monoembriônica (Tabela 6).

7 O modelo completo foi capaz de predizer corretamente 92,9% dos indivíduos (95,9%  
8 dos poliembrionicos e 84,6% dos monoembriônicos) com  $R^2$  de Nagelkerke de 80,7%. O  
9 modelo reduzido foi capaz de predizer corretamente 96% dos indivíduos (100% dos  
10 poliembrioncios e 84,6% dos monoembriônicos) com  $R^2$  de Nagelkerke de 70,4%.

11 Quando se compara as probabilidades do modelo calculadas para populações  
12 indefinidas e de baixa ploidia, é possível claramente indicar que algumas delas devem ser  
13 poliembrionicas, com probabilidades de inclusão no padrão poliembrionico acima de 70%,  
14 enquanto outras devem ser monoembriônicas, com probabilidades de inclusão no padrão  
15 poliemrbiônico mais baixas que 50% (Fig. 6). É interessante notar que o modelo coloca as  
16 populações que apresentam baixa poliembrionia próximas as populações poliembrionicas e no  
17 caso de indivíduos de MT2 e MT3, populações simpátricas que apresentam monoembrionia e  
18 poliembrionia respectivamente, o modelo traz a predição de que ambas seriam  
19 poliembrionicas.

## 1    **Discussão**

2            Os dados morfométricos dos estames de *Eriotheca gracilipes* mostraram uma variação  
3    mais complexa do que o previsto. Apesar dos estômatos de plantas com padrão  
4    poliembriônicos serem significativamente maiores do que aqueles das plantas com padrão  
5    monoembriônicos, houve uma variação e sobreposição entre os grupos indicando que outros  
6    fatores influenciam no tamanho dos estômatos. Análises estatísticas de decomposição da  
7    variância e de correlação linear mostram que variáveis geográficas influenciariam o tamanho  
8    estomático além do padrão de embrionia. Modelos de predição de poliembrionia incluindo  
9    estas variáveis geográficas e ecológicas indicaram que a altura dos estômatos e a altitude de  
10   ocorrência da população podem ser utilizadas como preditores do padrão de embrionia. Uma  
11   discussão detalhada destas tendências é apresentada abaixo.

12           As análises de ANOVA aninhada (Nested ANOVA) mostraram que para os três  
13   primeiros modelos o fator população influi muito mais do que o padrão de embrionia na  
14   variância do tamanho dos estômatos. Apesar das análises mostrarem que populações  
15   monoembriônicas possuem estômatos menores que as poliembriônicas, ocorreu uma ampla  
16   sobreposição entre os grupos devido a grande variação encontrada entre populações. Diante  
17   disso, não podemos utilizar diretamente a morfometria de estômatos como método de  
18   identificação de citótipos ou padrões de embrionia, como sugerido por Marinho et al. (2014a).  
19   As análises indicam que outros fatores devem estar afetando tal variação. Variações no  
20   tamanho e comportamento estomático são comuns e associadas ao ambiente onde a planta se  
21   desenvolve (Melo et al., 2004), à constituição genética da espécie (Alves et al., 2001), e  
22   frequentemente aos diferentes estresses aos quais as plantas são submetidas (Castro et al.,  
23   2005).

24           Associando dados de distribuição geográfica nos modelos foi possível notar uma  
25   divisão geográfica entre os padrões de embrionia encontrados. Populações ao Norte da cidade

1 de Brasília são predominantemente poliembriônicas, enquanto que as ao Sul desta região são  
2 monoembriônicas. A exceção ocorre apenas para a população MT2 que é monoembriônica e  
3 se encontra na região Norte. A mesma divisão parece ocorrer para os dados morfométricos  
4 dos estômatos: populações do Norte possuem, de modo geral, estômatos maiores do que as  
5 populações do Sul. Apesar de apresentar monoembrionia, o tamanho do estômato da  
6 população MT2 acompanha o de populações poliembriônicas, seguindo o tamanho geral das  
7 populações do Norte, o que evidenciaria a influencia regional morfometria estomática.

8 Tendo em vista essa divisão, foi desenvolvido um terceiro modelo de análise aninhado  
9 (Nested ANOVA), onde foi incluído o fator região. As análises deste modelo foram feitas  
10 considerando três padrões de embrionia (monoembrionia, poliembrionia e baixa-  
11 poliembrionia). Ao adicionar a variável região, pudemos notar que esta é capaz de explicar  
12 melhor a variação dos dados apresentados pelas populações, se tornando o fator que  
13 influencia mais fortemente no tamanho dos estômatos. No entanto, fatores aleatórios ainda  
14 são marcantes para ambas as medidas, mostrando que outras variáveis não consideradas ainda  
15 atuam sobre a variabilidade apresentada pelos dados. Por este motivo, outros fatores externos  
16 como altitude, latitude e longitude foram adicionados as análises que puderam confirmar que  
17 tais fatores estão relacionados de alguma forma a variação das medidas de estômatos.

18 Por ser uma variável que abrange muitos fatores, a altitude pode afetar características  
19 estomáticas por uma combinação de elementos que podem mudar com a elevação (Beerling &  
20 Kelly, 1996). Altitudes maiores estão diretamente relacionadas a diminuição da pressão  
21 atmosférica, maior umidade relativa do ar, maior incidência de luz solar, além de maior  
22 precipitação de chuvas (Jones, 1992, Baskin & Baskin, 1998; Korner et al., 1986). Essa  
23 combinação de fatores provocaria um aumento no coeficiente de difusão de vapor de água ,  
24 levando a uma maior condutância estomática (Gale, 2004), ou seja, maior abertura dos  
25 estômatos para maior eficiência no uso da água. Com o aumento da altitude, a área foliar

diminui, enquanto a condutância, conteúdo de nitrogênio nas folhas, frequência estomática e espessura foliar aumentam (Korner et al., 1986). Os resultados das análises mostraram que a altitude parece estar mais correlacionada a variação da média da largura dos estômatos e aos coeficientes de variação de altura e largura. Estudos sugerem que altitudes maiores estão relacionadas ao aumento do tamanho de células do mesófilo (Korner et al., 1986) e até mesmo ao dos estômatos (Kao & Chang, 2001; Yang et al., 2014). Porém, as tendências observadas no presente trabalho foram de uma redução do tamanho estomático com a altitude.

Populações monoembriônicas de *E. gracilipes* mostraram possuir uma maior variação do tamanho do estômato do que populações poliembriônicas. Essa maior variação pode ter ocorrido por serem populações que parecem ocupar áreas de maiores altitudes que populações poliembriônicas. Além deste fator, a largura do estômato pode ser a medida mais variável pela absorção de água na reidratação das folhas na preparação das lâminas, o que afetaria diretamente o tamanho da abertura estomática (Kerbaudy, 2004).

A latitude também representa um gradiente ambiental complexo que inclui mudanças na temperatura, radiação solar, e condições do solo (Li et al., 1998). Os resultados mostraram que esta variável está diretamente relacionada ao tamanho da altura e da largura dos estômatos. Estudos mostram que o aumento da temperatura e da incidência solar estão relacionados a um menor tamanho estomático nas plantas (Boeger & Wisniewski, 2003; Nascimento et al., 2015), provavelmente uma adaptação para a compensação para perda de água, haja vista que estômatos menores podem controlar mais rapidamente a sua abertura. (Nascimento et al., 2015). No entanto, nosso estudo demonstra que os maiores tamanhos de estômato se encontram na região norte, o que evidencia e corrobora a ideia de que as variáveis geográficas estão atuando em conjunto.

1           A longitude mostrou estar correlacionada a altura dos estômatos. No entanto, ao  
2   contrário das outras variáveis geográficas, a longitude parece estar mais relacionada à forma  
3   como os padrões de embrionia estão distribuídos do que a mudanças climáticas resultantes do  
4   de seu gradiente, haja vista que divisão leste-oeste (com poliembriônicos predominantemente a  
5   oeste e monoembriônicos a leste) não está diretamente associada a diferenças climáticas.  
6   Diferenças longitudinais têm sido observadas entre populações de espécies de Cerrado e  
7   podem ser associadas a bacias hidrográficas ou outras variáveis ecológicas (e.g. Novaes et al.,  
8   2013), que não foram propriamente investigadas em nossos modelos.

9           A pressuposição inicial do presente estudo era que os dados morfométricos estariam  
10   associados aos padrões de embrionia, que por sua vez são indicadores do sistema de  
11   reprodução e ploidia em *Eriotheca gracilipes*. Apesar de mais complexos que o previsto  
12   inicialmente, as análises mostraram que populações poliembriônicas estão associadas a  
13   estômatos maiores e a altitudes menores na região, além de serem influenciadas por outros  
14   fatores covariantes como a latitude e longitude. Em todo o mundo, mudanças climáticas  
15   afetaram a distribuição das espécies, moldando a sua história evolutiva (Novaes et al., 2010).  
16   Estudos palinológicos demonstram que a distribuição e composição da vegetação, inclusive  
17   nos Neotrópicos, foram profundamente influenciadas pelas flutuações climáticas que  
18   ocorreram entre os períodos Terciário e Pleistoceno (Collevatti et al, 2012a; Ribeiro et al.,  
19   2016). Além disso, estudos baseando-se na estrutura genética e modelagem de distribuição e  
20   padrões de riqueza de espécies nesta região mostram que áreas de estabilidade climática  
21   durante estes períodos glaciais desempenharam um papel importante como refúgio (Carnaval  
22   et al., 2009, 2014; Keppel et al., 2012, Werneck et al., 2011, 2012). Portanto, espera-se que  
23   áreas de estabilidade durante o Quaternário reflitam a presença de espécies com alta  
24   diversidade genética e forte estrutura filogeográfica entre os refúgios em oposição a áreas de  
25   instabilidade onde as espécies teriam de expandido desde o ultimo máximo glacial - LGM

(Hewitt, 2004; Buzatti et al. 2017). Como populações poliembriônicas e apomíticas de *Eriotheca* são putativamente derivadas e possivelmente resultado de pertenogênese geográfica (Horandl, 2006, 2009; Marinho et al., 2014) a presença de populações monoembriônicas ao Sul poderia ser um indício de que centros de diversidade genética e de estabilidade climática durante o LGM ocorreram nesses locais.

O Cerrado é caracterizado por uma formação geológica antiga chamada de chapadas (entre 500 e 1700 metros de altura) formadas do período Terciário ao Quaternário, separadas por vales mais recentes (entre 100 e 500 metros). Acredita-se que chapadas e locais de maior altitude no Cerrado formaram um refúgio de espécies durante o Pleistoceno (Ab'Sáber, 1983), enquanto locais de menor altitude e vales eram muito mais secos que hoje e passaram a ter espécies muito mais adaptadas a esse clima. Portanto, registros fósseis mostram uma expansão do Cerrado durante os períodos interglaciais do Quaternário (Colevatti et al., 2012a). Essa retração e expansão de populações é capaz de levar a mudanças genéticas já que apenas alguns genótipos podem sobreviver e expandir a cada novo ciclo (Davis & Shaw, 2001). A apomixia, juntamente com a poliembria, poderia ter favorecido o estabelecimento e colonização de novas regiões durante os períodos interglaciais (Marinho, 2017), o que poderia explicar a maior distribuição de populações poliembriônicas e possivelmente apomíticas em altitudes mais baixas enquanto as monoembriônicas e sexuadas ocorreriam mais comumente em áreas mais altas de chapadas (Mendes-Rodrigues et al., Em preparação) que corresponderam a refúgios durante o pleistoceno (Werneck et al., 2012). O mesmo padrão de distribuição parece ocorrer para *Adansonia kilim* (Pettigrew et al., 2013), espécie também pertencente a subfamília Bombacoideae, que apresenta indivíduos diplóides ocorrendo em áreas mais restritas e de maior altitude que os poliplóides.

Ademais, as populações poliembriônicas de *E. gracilipes* mostraram uma distribuição mais abrangente em relação a monoembriônicas. Espécies assexuadas possuem distribuição

1 mais ampla que espécies próximas sexuadas (Bierzychudek, 1985; Horandl, 2006; Horandl et  
2 al., 2008), provavelmente por terem capacidade de formar populações uniparentais (Carman,  
3 1997). Além disso, genótipos mais generalistas, provavelmente resultantes de eventos de  
4 aloploidia ou hibridização, podem estar relacionados a habilidade de colonização de  
5 diferentes ambientes que essas espécies apresentam (Horandl, 2006, 2009). Portanto, a  
6 presença de populações poliembriônicas ao Norte poderia indicar a capacidade de colonização  
7 desses indivíduos a ambientes mais secos e frios durante o LGM. É interessante que apesar de  
8 corroborar a associação entre indivíduos monoembriônicos e maiores altitudes, os dados  
9 obtidos para *Eriotheca pubescens* indicaram uma tendência latitudinal inversa, com  
10 populações monoembriônicas e possíveis refúgios durante o LGM localizados mais ao norte  
11 (Marinho, 2017).

12 Os dados morfométricos e análises da distribuição das populações permitiram também  
13 fazer inferências sobre as populações para as quais tínhamos dados ambíguos ou lacunas de  
14 observação. Com a inferência do padrão de embrionia das populações, foi verificado que duas  
15 populações, GO4 e BA2, apresentavam sementes poliembriônicas em uma frequência menor  
16 que o restante das populações (1,07 para a primeira e 9,8 para a segunda). Análises de  
17 regressão logística mostraram que ambas populações possuem índices de predição de  
18 poliembrionia comparáveis aos de populações que apresentaram altas taxas de poliembrionia  
19 (médias de 69,6% e 75,5%, respectivamente), indicando que poderiam ser consideradas  
20 verdadeiramente poliembriônicas. Entretanto, GO4 e BA2 apresentaram tamanhos de  
21 estômatos discrepantes, sendo que a primeira possui estômatos menores, se encaixando na  
22 média de tamanho de populações monoembriônicas, enquanto a segunda apresentou  
23 estômatos maiores, se comportando como as populações poliembriônicas. É interessante notar  
24 que os locais de ocorrência destas populações corroboram a tendência das populações com  
25 estômatos maiores estarem localizados mais ao Norte e populações com tamanho estomático

menor, mais ao Sul. Ao mesmo tempo em que estes dados mostram a capacidade preditiva dos modelos utilizados, estas inferências devem ser tratadas com cautela ao se relacionar seu padrão de embrionia ao modo de sistema reprodutivo, haja vista que a poliembrionia pode ter origem sexuada ou ser apenas reflexo de anomalias eventuais (Mendes-Rodrigues, 2010).

Análises de predição também permitiram inferir a embrionia das populações cujo padrão não foi havia sido identificado diretamente através de sementes (TO1, TO4, BA1, BA3, MG5 e MS1). As populações TO1, TO4, BA1 e MG5 mostraram previsões quanto ao padrão de embrionia condizentes com as regiões em que se encontram. Além disso, duas destas populações preditas como monoembriônicas (BA1 e MG5) se encontram em maiores altitudes (BA1 = 1322 m e MG5 = 825 m), e na região Leste, o que confirmaria a tendência observada para as outras populações classificadas como monoembriônicas que estão ocupando áreas de maior altitude (de 717m a 1322m) e estão predominantemente ocupando esta região. A única exceção para isso seria a população MT2, monoembriônica que ocorre a uma altitude de 336m.

Neste trabalho, encontramos indivíduos monoembriônicos e poliembriônicos ocorrendo na mesma localidade e que foram separados em duas populações, MT2 e MT3, respectivamente. Estas coletas foram realizadas em Nova Xavantina sem que tivesse havido um mapeamento preciso da ocorrência de cada indivíduo, de maneira que não sabemos se ocorriam exatamente no mesmo local ou se estavam segregados. De qualquer forma, nenhum estudo anterior envolvendo padrão de embrionia de *Eriotheca* havia descrito populações mistas num mesmo local. Buzzatti e colaboradores (2017) em estudo envolvendo análises genéticas e modelagem paleoclimáticas, encontraram evidência de que existiu, além de uma grande área de refúgio na parte central do Cerrado, refúgios menores em áreas de transição entre Cerrado e Amazonia e em áreas mais ao leste e sudoeste do bioma. A ocorrência de populações mistas e de uma distribuição complexa de populações monoembriônicas de uma

1 maneira geral, poderia indicar que múltiplos refúgios por todo bioma teriam sido formados ao  
2 longo de muitos ciclos climáticos, resultando em um ambiente heterogenio (Keppel et al.,  
3 2012, Turchetto-Zolet, 2013; Bueno et al., 2016). Estudos futuros sobre a filogeografia de  
4 espécies com ampla distribuição no Cerrado, incluindo essas áreas de transição, poderão  
5 auxiliar no melhor entendimento de como os eventos de glaciação do Pleitosceno moldaram a  
6 dinâmica deste bioma e afetaram a distribuição de suas espécies (Buzzatti et al., 2017).

7 Além do resultado de ciclos climáticos no pleistoceno, a ocorrência de populações  
8 simpátricas com padrões de embrionia distintos poderia ser resultado de hibridações entre  
9 indivíduos poliembriônicos. Alguns estudos envolvendo os mecanismos de segregação de  
10 poliembrionia e monoembrionia indicam que a poliembrionia é determinada por um unico  
11 locus dominante (Parlevliet & Cameron, 1959; Iwamasa et al., 1967; Nishiura et al., 1983;  
12 Nakato et al., 2008), o que permitiria a formação de indivíduos monoembriônicos a partir do  
13 cruzamento entre poliembriônicos heterozigotos. Ademais, observamos que é possível o  
14 cruzamento entre indivíduos de *E. gracilipes* com ploidias diferentes, apesar de não terem  
15 sido encontrados híbridos naturais (Capítulo 2). Isso permitiria a ocorrência de indivíduos  
16 tetraplóides, como observado para *E. pubescens* (Mendes-Rodrigues, 2010). e que poderia  
17 aumentar a variação morfométrica e até mesmo a diversidade de padrões reprodutivos em  
18 populações simpátricas de *E. gracilipes*. Todos os fatores indicados acima podem justificar o  
19 tamanho de estômato da população MT2, monoembriônica, semelhante ao de populações  
20 poliembriônicas. No entanto, estudos citológicos para confirmação da ploidia desta população  
21 se fazem necessários. Além disso, uma maior amostragem poderia revelar a ocorrência de  
22 outras populações mistas de *E. gracilipes*, o que traria entendimento sobre o seu  
23 comportamento.

## Referências Bibliográficas

- ALVES, E.S., GIUSTI, P.M., DOMINGOS, M. 2001. Anatomic studies on *Trandescantia* hibrid clone 4430 leaves: changes caused by urban air pollution. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 561-566. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042001000500012>
- ABRAMOFF, M.D., MAGALHAES, P.J., RAM, S.J. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36–42.
- AB'SABER, A.N. 1983. O domínio dos cerrados: Introdução ao conhecimento. *Revista do Servidor Público* 111: 41–55.
- BASKIN, C.C. & BASKIN, J.M. 1998. Seeds – ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511525445.004>
- BEERLING, D.J. & KELLY, C.K. 1996. Evolutionary comparative analyses of the relationship between leaf structure and function. *New Phytol* 134: 35–51. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb01144.x>
- BICKNELL, R.A. & KOLTUNOW, A.M. 2004. Understanding apomixes: recent advances and remaining comundrums. *The Plant Cell* 16: 229-245. <https://doi.org/10.1105/tpc.017921>
- BALAO, F., CASIMIRO-SORIGUER, R., TALAVERA, M., HERRERA, J., TALAVERA, S. 2009. Distribution and diversity of cytotypes in *Dianthus broteri* as evidenced by genome size variations. *Annals of Botany* 104(5): 965-973. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp182>
- BALAO, F., HERRERA, J., TALAVERA, S. 2011. Phenotypic consequences of polyploidy and genome size at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach. *New Phytol* 192: 256–265. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03787.x>
- BIERZYCHUDEK, P. 1985. Patterns in plant parthenogenesis. *Experientia* 41:, 1255–1263. <https://doi.org/10.1007/BF01952068>

- BOEGER, M.R.T. & WISNIEWSKI, C. 2003. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 26(1): 61-72. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042003000100007>
- BUENO, M.L., PENNINGTON, R.T., DEXTER, K.G., KAMINO, L.H.Y., PONTARA, V., NEVES, D.M., OLIVEIRA-FILHO, A. T. 2016. Effects of Quaternary climatic fluctuations on the distribution of Neotropical savanna tree species. *Ecography* 39: 001–012.
- BUZATTI, R.S.O., LEMOS-FILHO, J.P., BUENO, M. L., LOVATO, M.B. 2017. Multiple Pleistocene refugia in the Brazilian cerrado: evidence from phylogeography and climatic nichemodelling of two *Qualea* species (Vochysiaceae), *Botanical Journal of the Linnean Society* 185(3): 307–320. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box062>
- CARMAN, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperm may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 51-94. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1997.tb01778.x>
- CARNAVAL, A.C., HICKERSON, M.J., HADDAD, C.F.B., RODRIGUES, M.T. & MORITZ, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785–789. <https://doi.org/10.1126/science.1166955>
- CASTRO, E.M., PINTO, J.E.B.P., MELO, H.C., SOARES, A.M., ALVARENGA, A.A., LIMA, E.C. 2005. Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de guaco submetidas a diferentes fotoperíodos. *Horticultura Brasileira* 23: 846-850. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362005000300031>
- COLLEVATTI, R.G., LIMA-RIBEIRO, M.S., SOUZA-NETO, A.C., FRANCO, A.A., TERRIBILE, L.C. 2012a. Recovering the demographical history of a Brazilian Cerrado tree

species *Caryocar brasiliense*: coupling ecological niche modeling and coalescent analyses. *Natureza e Conservação* 10: 169–176. <https://doi.org/10.4322/natcon.2012.024>

CHIN, J., WAN, Y., SMITH, J., CROXDALE, J. 1995. Linear aggregations of stomata and epidermal cells in *Tradescantia* leaves: evidence for their group patterning as a function of the cell cycle. *Developmental Biology* 168: 39–46. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1059>

DAVIS, M.B., SHAW, R.G. 2001. Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. *Science* 292: 673–79. <https://doi.org/10.1126/science.292.5517.673>

ESCUDERO, M., BALAO, F., MARTÍN-BRAVO, S., VALENTE, L., & VALCÁRCEL, V. 2018. Is the diversification of Mediterranean Basin plant lineages coupled to karyotypic changes. *Plant Biology* 1: 166–175 <https://doi.org/10.1111/plb.12563>

GALE, J. 2004. Plants and altitude—revisited. *Annals of Botany* 94: 199–200. <https://doi.org/10.1093/aob/mch143>

HEWITT, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic changes in the Quaternary. *Phil. Transactions of the Royal Society of London* 359: 183–195. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1388>

HOJSGAARD, D.H., KLATT S., BAIER R., CARMAN J.G., HÖRANDL E. 2014a. Taxonomy and biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. *Critical Reviews in Plant Science* 33: 1–14. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898488>

HÖRANDL, E. 2006. The complex causality of geographical parthenogenesis. *New Phytologist* 171(3): 525–538. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01769.x>

HÖRANDL E., COSENDAL A., TEMSCH E.M. 2008. Understanding the geographic

distributions of apomictic plants: a case for a pluralistic approach. *Plant Ecology Diversity* 1: 309–320. <https://doi.org/10.1080/17550870802351175>

HÖRANDL, E. 2009. Geographical parthenogenesis: opportunities for asexuality. In *Lost sex* (pp. 161–186). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2770-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2770-2_8)

IWAMASA, M., UENO, I., NISHIURA, M. 1967. Inheritance of nucellar embryony in *Citrus*. *Bull. Hort. Res. Sta. Japan*, serB 7: 1–10.

JONES, H.G. 1992. *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge University Press: 428–428.

KAO, W. & CHANG, K. 2001. Altitudinal trends in photosynthetic rate and leaf characteristics of *Miscanthus* populations from central Taiwan. *Australian Journal of Botany* 49: 509–514. <https://doi.org/10.1071/BT00028>

KEPPEL, G., VAN NIEL, K.P., WARDELL-JOHNSON, G.W., YATES, C.J., BYRNE, M., MUCINA, L., SCHUT, A.G.T., HOPPER, S.D., FRANKLIN, S.E. 2012. Refugia: identifying and understanding safe havens for biodiversity under climate change. *Global Ecology and Biogeography* 21: 393–404. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00686.x>

KERBAUY, G.B. 2004. *Fisiologia Vegetal*.

KOLTUNOW, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryo formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5: 1425–1437. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1425>

KOLTUNOW, A.M. & GROSSNIKLAUS, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 547–574. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.110901.160842>

KÖRNER, C., BANNISTER, P., MARK, A.F. 1986. Altitudinal variation in stomatal conductance, nitrogen content and leaf anatomy in different plant life forms in New Zealand.

Oecologia 69: 577–588. <https://doi.org/10.1007/BF00410366>

LI B., SUZUKI J.I., HARA T. 1998. Latitudinal variation in plant size and relative growth rate in *Arabidopsis thaliana*. Oecologia 115: 293–301. <https://doi.org/10.1007/s004420050519>

MARINHO, R.C.; MENDES-RODRIGUES, C.; BONETTI, A.M.; OLIVEIRA, P.E. 2014. Pollen and stomata morphometrics and polyploidy in *Eriotheca* (Malvaceae-Bombacoideae). Plant Biology 16: 508–511. <https://doi.org/10.1111/plb.12135>

MARINHO, R.C. 2017. Poliploidia e variações reprodutivas em Bombacoideae (Malvaceae): distribuição geográfica, filogeografia e tamanho de genôma. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

MASTERSON, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. Science 264: 421–24. <https://doi.org/10.1126/science.264.5157.421>

MELO, H.C., CASTRO, E.M., FERRER, J.L.R., ALVES, J.D., FRIES, D.D., MELO, L.A., MAGALHÃES, P.C. 2004. Influência da aplicação de cálcio e alagamento do solo sobre características anatômicas das folhas de milho (*Zea mays* L.) “Saracura” BRS-4154. Revista Brasileira de Milho e Sorgo 3: 333-342. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v3n3p333-342>

MENDES-RODRIGUES, C., CARMO-OLIVEIRA, R., TALAVERA, S., ARISTA M., ORTIZ, P.L., OLIVEIRA, P.E. 2005. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae - Bombacoideae). Plant Biology 7: 533-540. <https://doi.org/10.1055/s-2005-865852>

MENDES-RODRIGUES, C. 2010. Ecologia de espécies poliembriônicas com ênfase no Bioma Cerrado. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia.

NAKANO, M., SHIMIZU, T., KUNIGA, T., NESUMI, H., OMURA, M.. 2008. Mapping and haplotyping of the flanking region of the polyembryony locus in *Citrus unshiu* Marcow.

- Japanese Society for Horticultural Science 77: 109–114. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.77.109>
- NASCIMENTO, A.M.P., PAIVA, P.D.O., NERY, F.C., SOUZA, R.R., MANFREDINI, G.M., ALMEIDA, E.F.A. 2015. Influência do espaçamento de plantio e luminosidade no desenvolvimento de bastão-do-imperador. *Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 10(2): 230-236. <https://doi.org/10.5039/agraria.v10i2a5103>
- NISHIURA, M., SHICHIJO, T., UENO, I., IWAMASA, M., KIHARA, T., YAMADA Y., YOSHIDA, T., IWASAKI, T. 1983. New *Citrus* cultivar ‘Kiyomi’ tangor. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. B* 10: 1–9.
- NOGLER, G.A. 1971. Genetik der Aposporie bei *Ranunculus auricomus* s.l. W. Koch. I. Embryologie. *Berichte der Schweizer Botanischen Gesellschaft* 81: 139-79.
- NOVAES, R.M.L., LEMOS-FILHO, J.P., RIBEIRO, R.A., LOVATO, M.B. 2010. Phylogeography of *Plathymeria reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology* 19: 985-998. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04530.x>
- NOVAES, R.M.L., RIBEIRO, R.A., LEMOS-FILHO, J.P., LOVATO, M.B. 2013. Concordance between phylogeographical and biogeographical patterns in the Brazilian Cerrado: diversification of the endemic tree *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae). *PloS one* 8(12): e82198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082198>
- OLIVEIRA, P.E., GIBBS, P.E., BARBOSA, A.A., TALAVERA, S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. *Plant Systematic and Evolution* 179: 207-219. <https://doi.org/10.1007/BF00937597>

- OLIVEIRA, P.E. & GIBBS, P.E. 2000. Reproductive biology of woody plants in a Cerrado community of Central Brazil. *Flora* 195: 311-329. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)30990-8](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)30990-8)
- OTTO, S.P. & WHITTON, J. 2000. Polyploidy incidence and evolution. *Annual Review Genetics* 34: 401–437. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.401>
- PARLEVLIET, J.E. & CAMERON, J.W. 1959. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in *Citrus*. *Proceedings of the American Society for Horticulture Science* 74: 252–260.
- PETTIGREW, J.D., BELL, K.L., BHAGWANDIN, A., GRINAN, E., JILLANI, N., MEYER, J., WABUYELE, E., VICKERS, C.E. 2012. Morphology, ploidy and molecular phylogenetics reveal a new diploid species from Africa in the baobab genus *Adansonia* (Malvaceae: Bombacoideae). *Taxon* 61: 1240-1250. <https://doi.org/10.1002/tax.616006>
- RIBEIRO, P.C., SOUZA, M.L., MULLER, L.A., ELLIS, V.A., HEUERTZ, M., LEMOS-FILHO, J.P., LOVATO, M.B. 2016b. Climatic drivers of leaf traits and genetic divergence in the tree *Annona crassiflora*: a broad spatial survey in the Brazilian savannas. *Global Change Biology* 22: 3789–3803. <https://doi.org/10.1111/gcb.13312>
- SOLTIS, P.S. & SOLTIS, D.E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(13): 7051-7057. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.7051>
- TURCHETTO-ZOLET, A.C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. – *Molecular Ecology* 22: 1193–1213. <https://doi.org/10.1111/mec.12164>
- WERNECK, F.P., NOGUEIRA, C., COLLI, G.R., SITES, J.W., COSTA, G.C., 2012. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of

South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography* 39: 1695-1706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2012.02715.x>

YANG, X., YANG, Y., JI, C., FENG, T., SHI, Y., LIN, L., MA, J., HE, J.S. 2014. Large-scale patterns of stomatal traits in Tibetan and Mongolian grassland species, *Basic and Applied Ecology* 15: 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2014.01.003>

## Tabelas

Tabela 1 –Código das 25 populações de *Eriotheca gracilipes*, suas respectivas localidades, altitude, padrão de embrionia, porcentagem de sementes poliembriônicas (PSP), número de sementes amostradas (NSA), número de indivíduos amostrados (NIA), médias de altura e largura e estômática e intervalo de confiança (IC), quantidade de estômatos medidos (N) probabilidade de poliembionia (P Poli).

| Código | Latitude  | Longitude | Altitude | Padrão | PSP ± IC (%)  | NSA (NIA) | Média ± IC (largura) | N   | Média ± IC (altura) | N   | P Poli |
|--------|-----------|-----------|----------|--------|---------------|-----------|----------------------|-----|---------------------|-----|--------|
| TO1    | S10.48162 | W48.21089 | 228      | IND    |               |           | 19.01 ± 0.15         | 507 | 34.5 ± 0.3          | 507 | 99.8   |
| TO4    | S11.38063 | W43.57104 | 404      | IND    |               |           | 18.72 ± 0.16         | 466 | 35.28 ± 0.24        | 466 | 98.8   |
| BA1    | S11.47233 | W46.26069 | 640      | IND    |               |           | 21.44 ± 0.2          | 500 | 40.9 ± 0.3          | 500 | 91.6   |
| BA3    | S14.03417 | W46.16094 | 825      | IND    |               |           | 20.44 ± 0.19         | 252 | 38.09 ± 0.31        | 252 | 37.5   |
| MG5    | S18.1417  | W43.3639  | 1322     | IND    |               |           | 17.49 ± 0.22         | 332 | 40.21 ± 0.34        | 332 | 0.14   |
| MS1    | S20.4434  | W54.6478  | 612      | IND    |               |           | 19.28 ± 0.37         | 153 | 32.01 ± 0.71        | 153 | 71.3   |
| MT2    | S14.42250 | W52.21029 | 336      | M      | 0             | 249 (2)   | 19.88 ± 0.43         | 99  | 38.24 ± 0.64        | 99  | 99.7   |
| GO3    | S17.49025 | W51.09518 | 865      | M      | 0             | 35 (2)    | 17.14 ± 0.28         | 214 | 29.76 ± 0.49        | 214 | 7      |
| MG2    | S19.1834  | W48.26481 | 717      | M      | 0             | 695 (16)  | 18.37 ± 0.28         | 353 | 33.32 ± 0.33        | 353 | 48.5   |
| MG1    | S18.33179 | W48.18508 | 945      | M      | 0             | 102 (2)   | 17.29 ± 0.25         | 250 | 30.18 ± 0.45        | 250 | 2.7    |
| MG3    | S19.23256 | W47.20086 | 1060     | M      | 0             | 189 (3)   | 15.93 ± 0.26         | 200 | 28.94 ± 0.49        | 200 | 0.46   |
| MG4    | S21.01307 | W47.13261 | 796      | M      | 0             | 263 (2)   | 15.7 ± 0.28          | 212 | 27.61 ± 0.38        | 212 | 9.9    |
| GO4    | S18.22435 | W52.01212 | 552      | BP     | 1.07 ± 1.47   | 187 (8)   | 16.03 ± 0.14         | 530 | 27.07 ± 0.2         | 530 | 69.6   |
| GO7    | S18.19582 | W49.26494 | 536      | P      | 100           | 4 (1)     | 17.1 ± 0.24          | 265 | 31.19 ± 0.45        | 265 | 85     |
| GO8    | S18.16340 | W49.37504 | 519      | P      | 88.99 ± 3.39  | 327 (5)   | 18.32 ± 0.23         | 266 | 33.47 ± 0.34        | 266 | 92.7   |
| GO5    | S18.58540 | W51.29411 | 450      | P      | 70.97 ± 11.30 | 62 (1)    | 18.23 ± 0.25         | 472 | 32.15 ± 0.49        | 472 | 94.3   |
| GO6    | S18.53546 | W49.56308 | 476      | P      | 91.96 ± 5.03  | 112 (1)   | 16.46 ± 0.19         | 537 | 28.18 ± 0.36        | 537 | 86.8   |
| MT1    | S13.04597 | W52.42166 | 358      | P      | 100           | 1 (1)     | 19.25 ± 0.19         | 263 | 34.79 ± 0.33        | 263 | 99.3   |
| GO2    | S15.39092 | W49.21105 | 664      | P      | 79.31 ± 14.74 | 29 (3)    | 20.78 ± 0.22         | 268 | 39.84 ± 0.39        | 268 | 86.8   |
| GO1    | S13.23327 | W49.07012 | 386      | P      | 88.20 ± 3.35  | 327 (5)   | 20.58 ± 0.27         | 257 | 41.79 ± 0.45        | 257 | 99.7   |
| TO3    | S12.09572 | W49.09435 | 271      | P      | 77.67 ± 5.69  | 206 (3)   | 20.41 ± 0.3          | 258 | 42.41 ± 0.34        | 258 | 99.4   |
| TO2    | S11.05084 | W48.55090 | 244      | P      | 93.69 ± 4.52  | 111 (1)   | 19.05 ± 0.16         | 511 | 36.68 ± 0.36        | 511 | 99.8   |
| BA2    | S12.23060 | W45.52088 | 752      | BP     | 9.8 ± 8.16    | 51 (2)    | 23.34 ± 0.23         | 512 | 41.9 ± 0.35         | 512 | 75.5   |
| MT3    | S14.42250 | W52.21029 | 336      | P      | 89.29 ± 4.28  | 168 (4)   | 19.32 ± 0.28         | 200 | 36.8 ± 0.45         | 200 | 99.6   |
| GO9    | S17.45322 | W48.38251 | 748      | P      | 95.26 ± 0.94  | 1964 (7)  | 20.75 ± 0.25         | 495 | 41.26 ± 0.31        | 495 | 74.6   |

Tabela 2. Partição da variância (%) baseada em ANOVA Aninhada (Nested ANOVA) aplicada a dados de estômatos de *Eriotheca gracilipes*, em função de diferentes hierarquias.

| Medida  | Causa de Variação  | 3 grupos | Monoembriônico x<br>Poliembriônico | Monoembriônico<br>x<br>Poliembriônico<br>na Região Sul |
|---------|--------------------|----------|------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|         |                    | Média    | Média                              | Média                                                  |
| Altura  | Padrão             | 0,00     | 15,37                              | 0,00                                                   |
|         | População (Padrão) | 76,21    | 63,13                              | 68,70                                                  |
|         | Resíduo            | 23,79    | 21,50                              | 31,30                                                  |
| Largura | Padrão             | 0,98     | 14,24                              | 0,00                                                   |
|         | População (Padrão) | 66,72    | 56,27                              | 51,87                                                  |
|         | Resíduo            | 32,30    | 29,49                              | 48,13                                                  |
| Altura  | Região             | 49,64    |                                    |                                                        |
|         | Padrão (Região)    | 12,75    |                                    |                                                        |
|         | População (Padrão) |          |                                    |                                                        |
|         | Resíduo            | 37,61    |                                    |                                                        |
| Largura | Região             | 38,18    |                                    |                                                        |
|         | Padrão (Região)    | 25,32    |                                    |                                                        |
|         | População (Padrão) |          |                                    |                                                        |
|         | Resíduo            | 36,50    |                                    |                                                        |

Tabela 3. Correlação de Pearson entre as medidas de estômatos, as variáveis geográficas e dados de poliembrião de indivíduos de *Eriotheca gracilipes*. Os dados são correlações baseadas nas médias de indivíduo.

| Medidas       | Medidas |         |          |         |         |          |         |          |
|---------------|---------|---------|----------|---------|---------|----------|---------|----------|
|               | 1       | 2       | 3        | 4       | 5       | 6        | 7       | 8        |
| 1. Altura     | 1       | 0.858** | -0.402** | -0.037  | 0.052   | 0.515**  | 0.445** | 0.285**  |
| 2. Largura    |         | 1       | -0.392** | -0.167* | -0.076  | 0.523**  | 0.277** | 0.147    |
| 3. CV altura  |         |         | 1        | 0.584** | 0.214** | -0.434** | -0.160* | -0.298** |
| 4. CV largura |         |         |          | 1       | 0.307** | -0.410** | 0.022   | -0.152   |
| 5. Altitude   |         |         |          |         | 1       | -0.502** | 0.550** | -0.625** |
| 6. Latitude   |         |         |          |         |         | 1        | 0.241** | 0.279**  |
| 7. Longitude  |         |         |          |         |         |          | 1       | -0.227*  |
| 8. PSP        |         |         |          |         |         |          |         | 1        |

Legenda: \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , CV: coeficiente de variação, PSP: porcentagem de sementes poliembriônicas.

Tabela 4. ANOVA Aninhada (Nested ANOVA) para comparação entre os padrões de embrionia em *Eriothea gracilipes*

| Medida     |                     |                       | Três grupos    | Dois Grupos    |
|------------|---------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Altura     | Monoembrionica      | Média ± EP            | 31,33 ± 0,63 b | 31,33 ± 0,72 a |
|            | Poliembrionica      | Média ± EP            | 36,22 ± 0,37 a | 36,49 ± 0,39 a |
|            | Baixa Poliembrionia | Média ± EP            | 34,50 ± 0,67 a |                |
|            | Padrão              | <i>F</i> ( <i>p</i> ) | 0,98 (0,394)   | 3,86 (0,067)   |
|            | População (Padrão)  | <i>F</i> ( <i>p</i> ) | 20,36 (<0,001) | 15,21 (<0,001) |
| Largura    | Monoembriônica      | Média ± EP            | 17,38 ± 0,31 b | 17,38 ± 0,37 a |
|            | Poliembriônica      | Média ± EP            | 19,10 ± 0,18 a | 19,34 ± 0,20 a |
|            | Baixa Poliembrionia | Média ± EP            | 19,70 ± 0,33 a |                |
|            | Padrão              | <i>F</i> ( <i>p</i> ) | 1,03 (0,379)   | 3,76 (0,069)   |
|            | População (Padrão)  | <i>F</i> ( <i>p</i> ) | 13,48 (<0,001) | 8,58 (<0,001)  |
| CV Altura  | Monoembriônica      | Média ± EP            | 8,51 ± 0,22 a  | 8,51 ± 0,22 a  |
|            | Poliembriônica      | Média ± EP            | 6,63 ± 0,13 b  | 6,55 ± 0,11 b  |
|            | Baixa Poliembrionia | Média ± EP            | 6,08 ± 0,23 b  |                |
|            | Padrão              | <i>F</i> ( <i>p</i> ) | 11,50 (0,001)  | 27,19 (<0,001) |
|            | População (Padrão)  | <i>F</i> ( <i>p</i> ) | 2,91 (0,001)   | 2,96 (<0,001)  |
| CV Largura | Monoembriônica      | Média ± EP            | 10,93 ± 0,35 a | 10,94 ± 0,35 a |
|            | Poliembriônica      | Média ± EP            | 8,98 ± 0,21 b  | 8,80 ± 0,18 b  |
|            | Baixa Poliembrionia | Média ± EP            | 7,84 ± 0,38 c  |                |
|            | Padrão              | <i>F</i> ( <i>p</i> ) | 3,81 (0,045)   | 7,92 (0,011)   |
|            | População (Padrão)  | <i>F</i> ( <i>p</i> ) | 4,64 (<0,001)  | 4,80 (<0,001)  |

Legenda: CV: coeficiente de variação, EP: erro padrão, *F*: estatística *F* do Nested ANOVA, *p*: probabilidade.

Médias com letras distintas, dentro de cada comparação, são diferentes baseadas no teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Tabela 5. Análise de Covariância – ANCOVA para comparação entre os padrões de embrionia em *Eriothea gracilipes*, adotando-se as covariáveis altitude, latitude e longitude.

| Medida  | Causa de variação | Estatística    | Estômato           | CV                 |
|---------|-------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Altura  | Monoembriônica    | Media $\pm$ EP | 32,09 $\pm$ 1,06 b | 8,46 $\pm$ 0,27 a  |
|         | Poliembriônica    | Media $\pm$ EP | 35,22 $\pm$ 0,49 a | 6,49 $\pm$ 0,13 b  |
|         | Padrão            | $F(p)$         | 6,27 (0,014)       | 37,01 (<0,001)     |
|         | Altitude          | $F(p)$         | 2,43 (0,122)       | 0,02 (0,899)       |
|         | Longitude         | $F(p)$         | 4,74 (0,032)       | 1,38 (0,243)       |
|         | Latitude          | $F(p)$         | 39,12 (<0,001)     | 1,96 (0,164)       |
| Largura | Monoembriônica    | Media $\pm$ EP | 17,34 $\pm$ 0,44 b | 10,62 $\pm$ 0,49 a |
|         | Poliembriônica    | Media $\pm$ EP | 19,12 $\pm$ 0,21 a | 8,88 $\pm$ 0,23 b  |
|         | Padrão            | $F(p)$         | 11,28 (0,001)      | 8,98 (0,003)       |
|         | Altitude          | $F(p)$         | 9,66 (0,002)       | 0,05 (0,818)       |
|         | Longitude         | $F(p)$         | 2,51 (0,116)       | 0,15 (0,703)       |
|         | Latitude          | $F(p)$         | 42,95 (<0,001)     | 3,68 (0,057)       |

Legenda: CV: coeficiente de variação, EP: erro padrão,  $F$ : estatística  $F$  da ANCOVA,  $p$ : probabilidade

Tabela 6. Modelo de regressão logística multivariada para a predição de ocorrência de poliembrião, baseado no modelo completo ou reduzido de dados de estômatos e geográficos de *Eriothea gracilipes* (n = 26 indivíduos monoembriônicos, n = 73 indivíduos poliembriônicos).

| Modelo   | Preditor  | <i>bi</i> | <i>EP</i> | Wald  | <i>p</i> | <i>OR (IC95%)</i>     |
|----------|-----------|-----------|-----------|-------|----------|-----------------------|
| Completo | Altura    | 0,255     | 0,31      | 0,68  | 0,408    | 1,29 (0,71-2,36)      |
|          | Largura   | -0,348    | 0,64      | 0,29  | 0,589    | 0,71 (0,2-2,50)       |
|          | CV Altura | -1,458    | 0,59      | 6,13  | 0,013    | 0,23 (0,07-0,74)      |
|          | CVLargura | 0,114     | 0,27      | 0,17  | 0,677    | 1,12 (0,66-1,92)      |
|          | Altitude  | -0,016    | 0,01      | 5,96  | 0,015    | 0,98 (0,97-1,00)      |
|          | Latitude  | 0,213     | 0,53      | 0,16  | 0,689    | 1,24 (0,44-3,51)      |
|          | Longitude | 0,814     | 0,75      | 1,17  | 0,280    | 2,26 (0,52-9,88)      |
|          | Constante | 62,578    | 48,30     | 1,68  | 0,195    | 1,5*10 <sup>-27</sup> |
| Reduzido | Altura    | 0,202     | 0,07      | 7,35  | 0,007    | 1,22 (1,06-1,42)      |
|          | Altitude  | -0,013    | 0,003     | 17,29 | <0,001   | 0,99 (0,98-0,99)      |
|          | Constante | 2,655     | 2,34      | 1,29  | 0,257    | 14,23                 |

Legenda: *bi*: i-ésima estimativa do parâmetro, *EP*: erro padrão, *p*: probabilidade baseada no teste de Wald, *OR*: Odds-Ratio, *IC95%*: intervalo de confiança do *OR* a 95%.

## Figuras

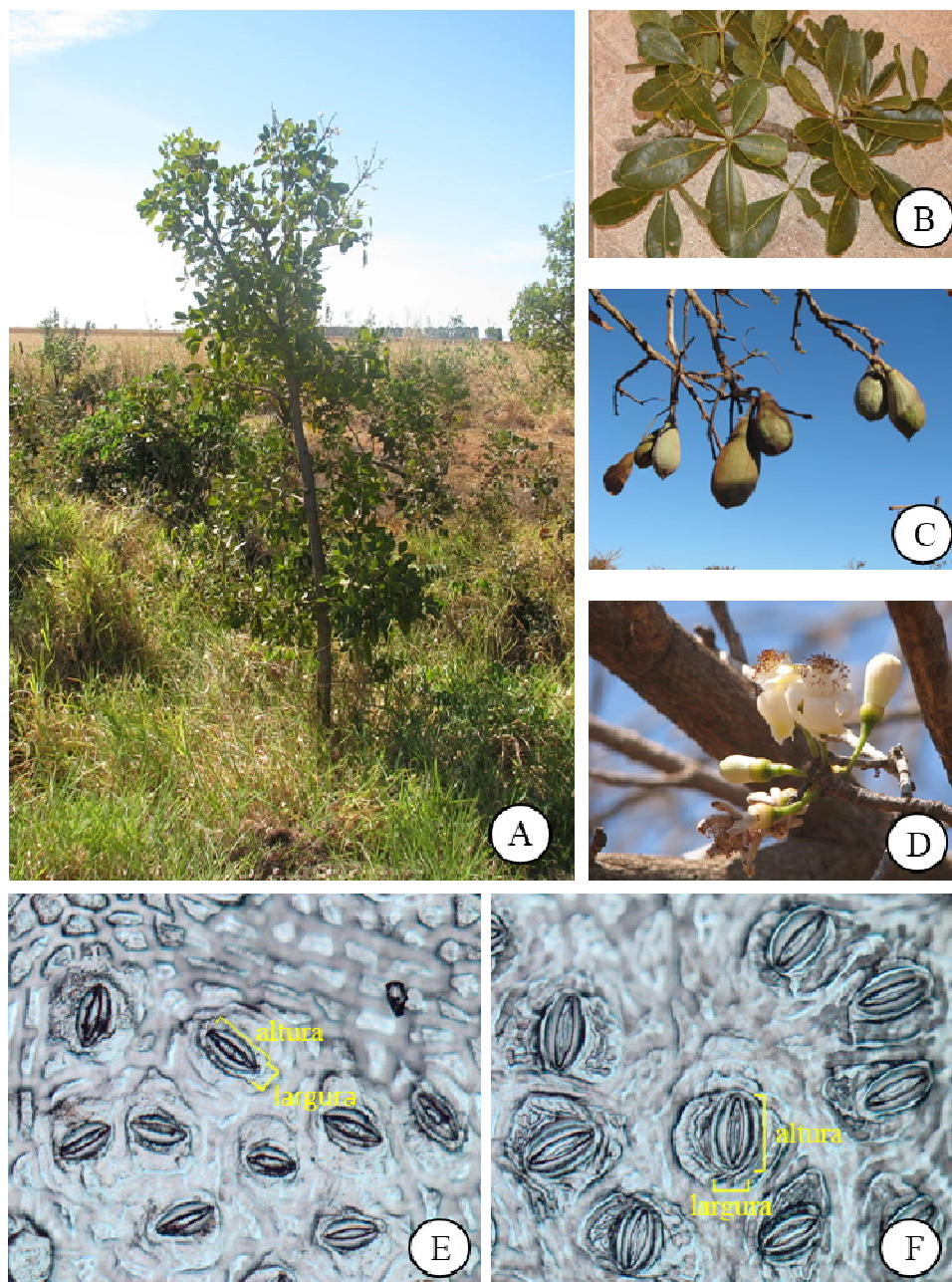


Figura 1. A - *Eriotheca gracilipes*, B - folhas, C - frutos e D - folhas. E e F - Comparação entre lâminas de impressão foliar para mensuração de estômatos. Figura E representa uma população monoembriônica (MG1) e Figura F uma população poliembriônica (GO9). Colchetes amarelos indicam a forma como os estômatos foram medidos.

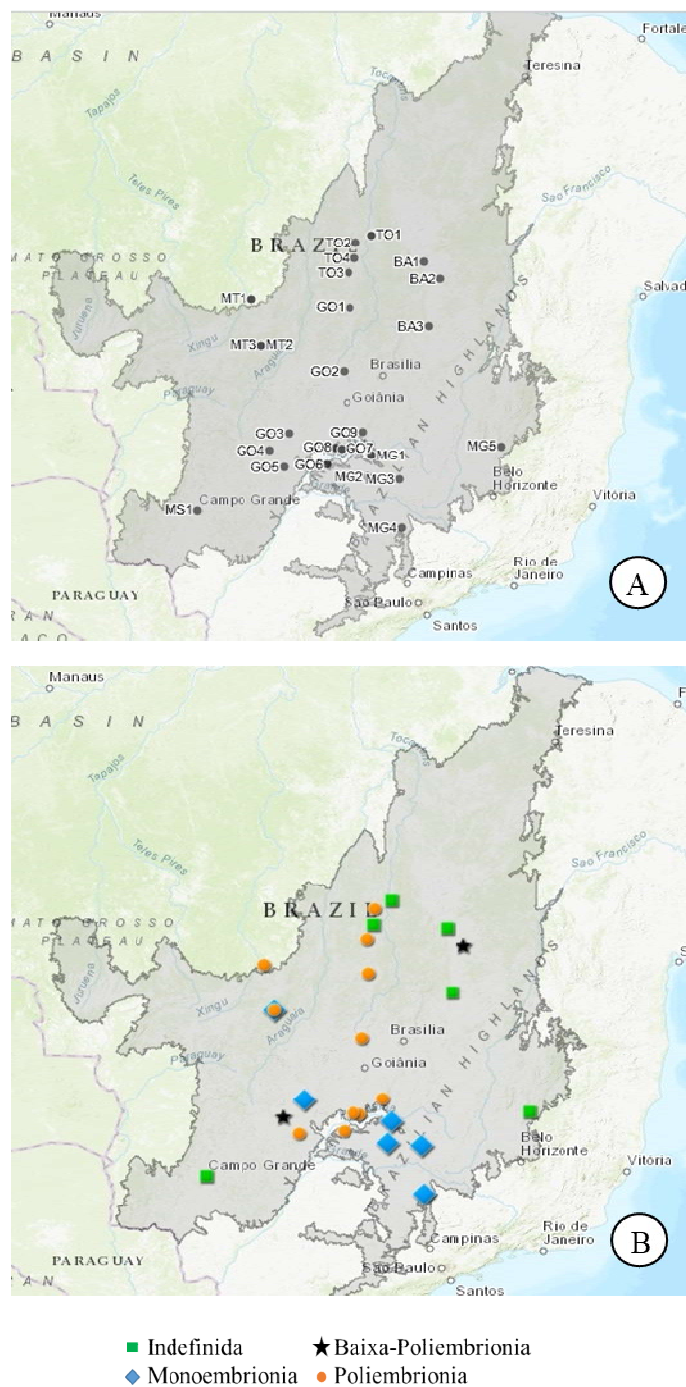


Figura 2. Mapa de distribuição das 25 populações de *E. gracilipes*. Figura A representa o código das populações amostradas para morfometria estomática e B o padrão de embrião encontrado para cada uma delas.

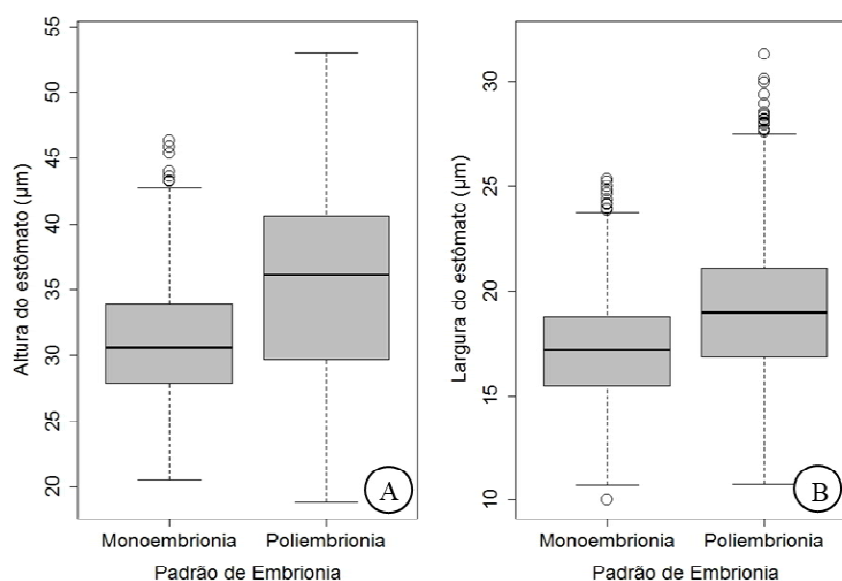


Figura 3. Boxplots para medidas de estômatos para 19 populações com padrão de embryonia conhecidos de *E. gracilipes*. Figura A e B indicam a altura e largura média de populações monoembriônicas e poliembriônicas, respectivamente. Populações cuja embryonia não foi identificadas não foram incluídas. Populações com baixa poliembryonia foram consideradas poliembriônicas nesta análise.

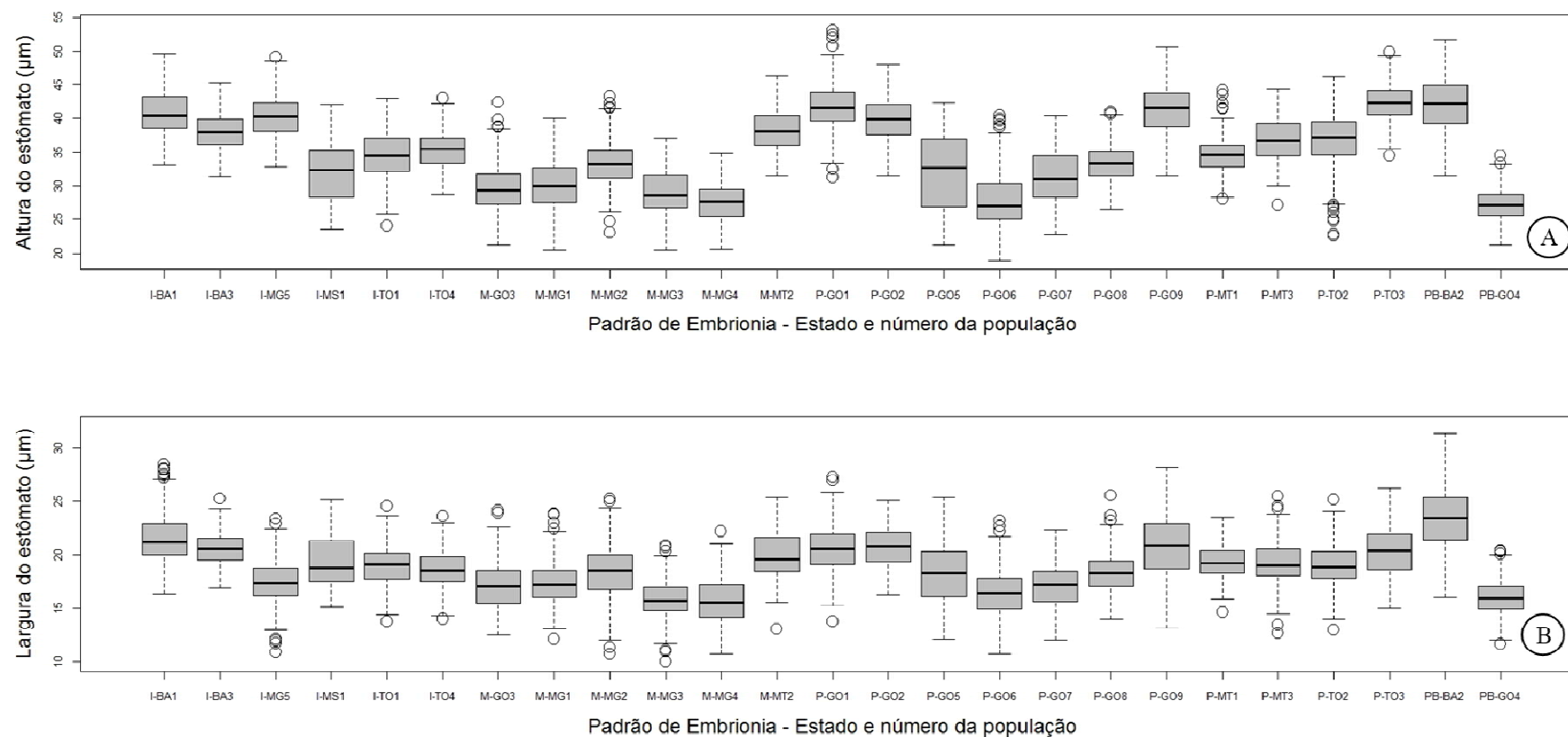


Figura 4. Boxplots para medidas de estômatos para as 25 populações de *E. gracilipes*. Figura A mostra a altura e a figura B mostra a largura média.

Embrionia: I = Indefinida, M = Monoembriônica, P = Poliembriônica.

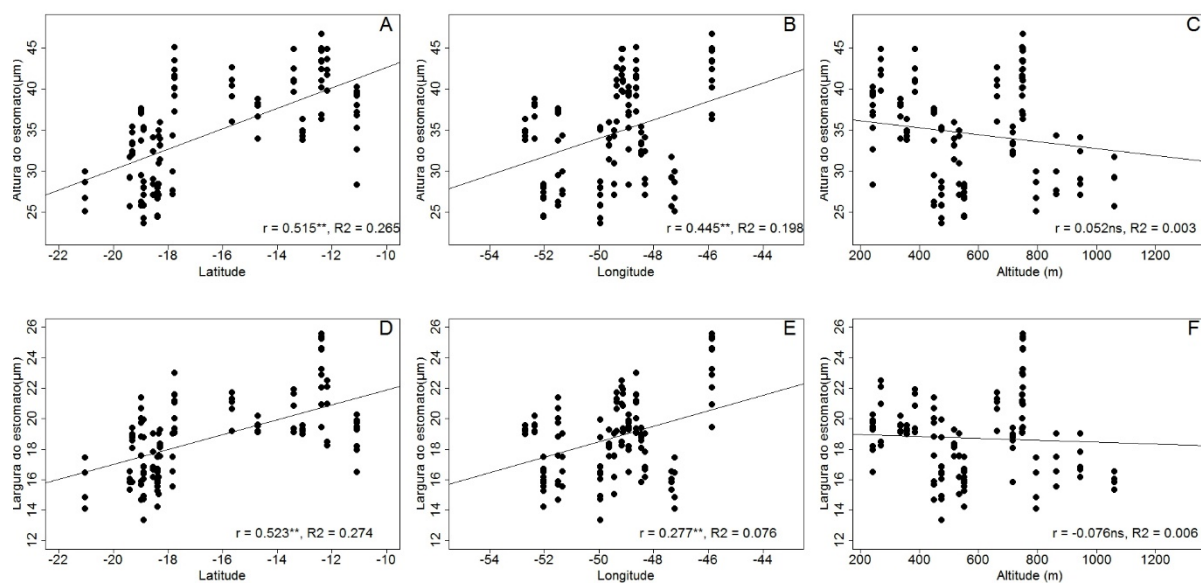


Figura 5. Relação linear entre medidas de estômato e as variáveis geográficas de indivíduos de *Eriotheca gracilipes* (Malvaceae).

A: latitude x altura, B: longitude x altura, C: altitude x altura, D: latitude x largura, E: longitude x largura, F: altitude x largura.

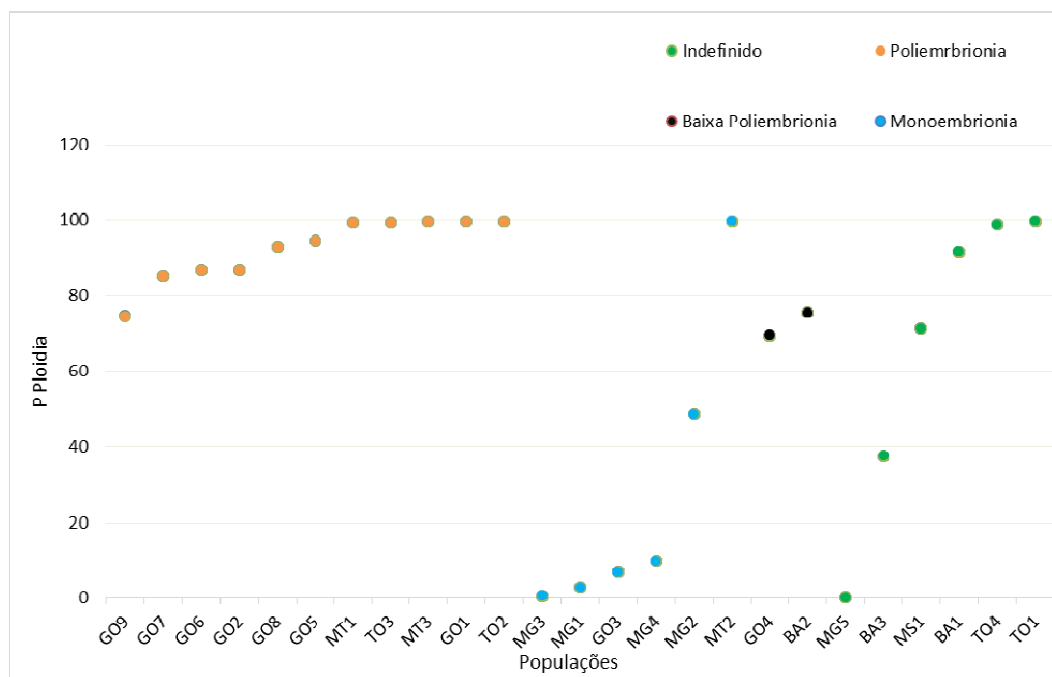


Figura 6. Gráfico representando os resultados de regressão logística multivariada. P Poli indica predição da ocorrência do evento poliembrionia.

## CAPÍTULO 2

Caracterização morfométrica de híbridos interploidia em *Eriotheca gracilipes* (Bombacoidae – Malvaceae).

Annelise da Cruz Serra<sup>1\*</sup>, Clesnan Mendes-Rodrigues<sup>2</sup>, Rafaela Cabral Marinho<sup>3</sup>, Francisco Balao<sup>4</sup>, Paulo Eugênio Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>4</sup> Universidade de Sevilha, Sevilha, Espanha.

\*Autora para correspondência:

email: ac.serrabio@gmail.com

## Resumo

A existência de diferentes citótipos em uma mesma espécie pode estar associada à presença de determinados tipos de reprodução e geralmente podem explicar o isolamento genético e ecológico entre essas populações. No entanto, híbridos resultantes de cruzamentos interploidias poderiam contribuir para um melhor entendimento de como estas populações podem ter se originado, além de interações que possam estar ocorrendo entre elas. Tendo isso em vista, a morfometria estomática foi realizada para comparação entre plântulas de diferentes populações de *Eriotheca* (com citótipos já definidos) e um indivíduo híbrido resultante do cruzamento entre citótipos distintos de *E. gracilipes*. Ademais, a citometria de fluxo para as progênes foi utilizada para verificação da ocorrência de híbridos naturais nas populações coletadas. Dos cruzamentos realizados entre *E. gracilipes* (2x) e *E. gracilipes* (6x), obteve-se apenas um fruto com poucas sementes e uma única planta híbrida. As análises de citometria de fluxo envolveram o total de 397 plântulas. Lâminas feitas com a técnica de decalque foliar foram preparadas para a morfometria dos estômatos. Foram analisadas altura e largura de 50 estômatos de três plântulas obtidas de cada planta-mãe de *Eriotheca* e 80 estômatos para o indivíduo híbrido. As análises de morfometria estomática para as progênes mostraram clara diferença de tamanho entre cada citótipo. No entanto, os resultados obtidos para o indivíduo híbrido indicaram que a média de sua altura estomática é compatível ao padrão hexaplóide da espécie enquanto que a largura dos estômatos corresponde aproximadamente à largura do padrão tetraplóide. Outros fatores além da ploidia, podem estar contribuindo com a variação da morfometria estomática encontrada. As análises de morfometria de fluxo para as progênes mostraram que o tamanho genômico das plântulas correspondia ao das plantas-mãe, não indicando, portanto, ocorrência de híbridos naturais nas populações.

Palavras-chave: híbrido, cruzamento interploidia, *Eriotheca*, plântulas, morfometria estomática.

## Abstract

The existence of different cytotypes in the same species may be associated with the presence of certain types of reproduction and may generally explain the genetic and ecological isolation between these populations. However, hybrids resulting from interploid crosses could contribute to a better understanding of how these populations may have originated, in addition to interactions that may be occurring between them. Considering this, stomata morphometrics was made in order to compare seedlings from different populations of *Eriotheca* (with cytotypes previously defined) and one hybrid individual resulted from the cross between distinct cytotypes of *E. gracilipes*. Moreover, flow cytometry for the seedlings was used to verify the occurrence of natural hybrids in the populations collected. From the crosses between *E. gracilipes* diploid (2x) and *E. gracilipes* hexaploid (6x), it was obtained only one fruit with few seeds and only one hybrid plant. The analyzes of flow cytometry involved the total of 397 seedlings. Slides made with the leave decal technique were prepared for the stomata morphometrics. Height and width were analyzed for 50 stomata of three seedlings obtained from each mother plant of *Eriotheca* and 80 stomata for the hybrid individual. The analyzes of stomata morphometrics for the progenies showed a clear size difference between each cytotype. However, the results obtained for the hybrid individual demonstrate that the average stomata height is compatible with the haploid pattern of the species while the stomata width nearly corresponds to the tetraploid pattern showed by *E. pubescens*. Other factors in addition to ploid could be contributing with the variation in stomata morphometrics data found. The flow morphometric analyzes for the progenies showed that the genomic size of seedlings matched the size presented by mother plants, thus not indicating the occurrence of natural hybrids within the populations.

Keywords: hybrid, interploidy crossing, *Eriotheca*, seedlings, stomatal morphometry.

## 1    **Introdução**

2            Hibridação entre espécies ou entre indivíduos de populações distintas é um processo  
3    natural e acredita-se que acontece em pelo menos 25% das plantas terrestres (Chen, 2010).  
4    Uma de suas consequências é o maior vigor que esses indivíduos podem apresentar em  
5    relação a seus progenitores (Birchler et al., 2003).

6            A ocorrência de populações de espécies próximas, ou até mesmo de uma mesma  
7    espécie com diferentes citótipos, geralmente é considerada uma barreira para a troca de genes  
8    (Hanneman & Peloquin, 1968) e comumente está associada à separação geográfica ou  
9    ecológica entre estes citótipos com ploidias ou estrutura genética diferente (Balao et al.,  
10   2009). Grupos que apresentam populações com diferentes ploidias podem auxiliar no  
11   entendimento dos processos de poliploidização e de como influenciaram no surgimento e  
12   estabelecimento dessas espécies (e. g Balao et al., 2009). Além disso, essas espécies nos dão  
13   a chance de desenvolver estudos envolvendo interações entre citótipos *in situ* (Kolář et al.,  
14   2017), o que possibilitaria o conhecimento sobre o desenvolvimento e desempenho de  
15   indivíduos híbridos, ou até mesmo a origem dos poliplóides. Pesquisas envolvendo número  
16   cromossômico de espécies estimam que cerca de 16% de todas as plantas apresenta variação  
17   de citótipos (Rice et al., 2015).

18            Ainda que a ploidia exata das espécies possa ser determinada apenas por contagem de  
19   cromossomos, este método pode ser inviável ou muito laborioso para confirmação de  
20   citótipos de alguns grupos, como em *Eriotheca*, que possui cromossomos numerosos e  
21   diminutos (Baum & Oginuma 1940, Oliveira et al. 1992, Marinho et al. 2014a,b). A  
22   morfometria de estômatos parece ser uma boa alternativa na caracterização dessas populações  
23   e já foi testada e se mostrou eficiente para distinção entre as ploidias do gênero *Eriotheca*  
24   (Marinho et al., 2014a,b). Outro método que tem sido amplamente utilizado em screenings de

ploidia para um grande número de populações e indivíduos é a citometria de fluxo, pela facilidade de execução e precisão na definição de tamanhos de genoma (Jung et al., 1993).

Neste capítulo, usamos métodos morfométricos para comparar o tamanho de estômatos de diferentes citótipos encontrados no gênero *Eriotheca* com aquele de um indivíduo resultante de cruzamento bem sucedido entre ploidias distintas de *Eriotheca gracilipes*. Dessa forma, objetivamos estabelecer uma relação entre a ploidia de plântulas (cujo cariótipo das plantas-mãe fora previamente verificado) e o tamanho dos estômatos, além de inferir sobre a ploidia do indivíduo híbrido a partir destes dados. Ademais, utilizamos dados envolvendo citometria de fluxo para confirmar a se a ploidia das plântulas oriundas das populações coletadas seria compatível com a o cariótipo estabelecido para cada uma delas, possibilitando, assim, a averiguação de híbridos natirais.

## Material e Métodos

Para o estudo, foram utilizadas três espécies do gênero *Eriotheca*, para representação de cada ploidia e, conseqüentemente, padrão de embrionia e sistema reprodutivo. Foram analisados indivíduos diploides e hexaplóides de *E. gracilipes*, indivíduos tetraplóides e hexaplóides de *E. pubescens* (Marinho et al., 2014a) e, para comparação, indivíduos diplóides da espécie *E. estevesia* (Marinho, 2017). As populações estudadas foram descritas em detalhe por Marinho et al. (2014a).

## Testes de hibridizações

Foi testada a viabilidade do processo de hibridação entre citótipos de duas ploidias diferentes de *E. gracilipes*. Para isso, foram realizadas polinizações manuais em 19 flores, previamente emasculadas e ensacadas, abertas de primeiro dia de um indivíduo diplóide localizado no Bairro Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. As polinizações foram

1 feitas com pólen de três indivíduos hexaplóides de *E. gracilipes* coletados em Caldas Novas,  
2 Goiás, Brasil. A ploidia dos indivíduos e populações utilizadas já havia sido definida por  
3 estudos anteriores (Marinho et al., 2014a). Para controle da quantidade de frutos produzidos  
4 por polinização natural, foram marcadas 35 flores abertas de primeiro dia na mesma planta.  
5 As polinizações manuais entre as ploidias foram feitas em julho de 2013 e a quantificação  
6 dos frutos produzidos ocorreu 30 dias após o tratamento. Foi produzido um único fruto, com  
7 cinco sementes (uma delas normal, e outras quatro com embriões reduzidos e malformados).  
8 As sementes foram semeadas e a única plântula formada da semente normal, foi coletada e  
9 seca em sílica gel cerca de 45 dias após a semeadura.

10 Foi testada ainda a viabilidade de hibridação entre indivíduos de *E. pubescens*  
11 tetraplóide ocorrentes em Cristalina (Goiás) e *E. gracilipes* diplóide oriundas de Uberlândia,  
12 Minas Gerais. Foram realizados tratamentos de polinizações controladas em 35 flores  
13 previamente emasculadas e ensacadas de cinco indivíduos diplóides de *E. gracilipes*. As  
14 polinizações foram feitas em flores abertas de primeiro dia com pólen proveniente de três  
15 indivíduos tetraplóides de *E. pubescens*. Para o controle, foram marcadas 51 flores abertas de  
16 primeiro dia para mensuração da frutificação por polinização natural. Os cruzamentos entre  
17 as duas espécies foram realizados julho de 2009 e a quantidade produzida de frutos também  
18 foi verificada após 30 dias.

19 Não foram realizados cruzamentos utilizando plantas hexaplóides como receptoras de  
20 pólen por serem apomíticas e poliembriônicas e produzirem muitos embriões reduzidos que  
21 não germinam (Mendes-Rodrigues et al., 2005), o que poderia dificultar a identificação das  
22 progênes de cruzamento. Além disso, os cruzamentos são dificultados pela separação  
23 geográfica das ploidias. Todas as ploidias das populações foram anteriormente determinadas  
24 (Marinho et al., 2014a,b). Populações mistas eram desconhecidas até a execução do estudo.

## 1 *Medidas dos Estômatos*

2 Folhas secas de três plântulas originadas de sementes de uma planta mãe de cada  
3 ploidia (*E. gracilipes*  $2n=92$  e  $2n=276$ , uma de *E. estevesiae*  $2n=92$ , e duas de *E. pubescens*  
4  $2n=184$  e  $2n=276$ ) e do indivíduo híbrido resultante do cruzamento entre as duas ploidias de  
5 *E. gracilipes* foram submersas em água por um tempo máximo de dois minutos para  
6 hidratação e posterior preparação das lâminas. Foi utilizado cola instantânea de cianoacrilato  
7 (Super Bonder Loctite) para obtenção dos moldes dos estômatos (Chin et al., 1995), que  
8 foram feitos através de impressões foliares sobre as lâminas (Fig.1). As lâminas  
9 confeccionadas foram, então, observadas e fotografadas com o auxílio do microscópio  
10 Olympus BX51 e da câmera digital DP70, para posterior análise da altura e largura dos  
11 estômatos. Com o auxílio do programa ImageJ (disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>),  
12 foram medidos cerca de 30 estômatos por indivíduo, com exceção do híbrido, que teve 80  
13 estômatos avaliados.

## 15 *Citometria de fluxo*

16 Foram coletados, aleatoriamente, sementes de frutos de polinização natural de  
17 indivíduos nas populações de *E. gracilipes* e *E. pubescens*, cujas ploidias foram previamente  
18 descritas em Marinho et al. (2014a,b). As sementes coletadas foram semeadas e cultivadas  
19 em estufa. Suspensões de DNA nuclear de 397 plântulas foram mensuradas por citometria de  
20 fluxo usando protocolo adaptado de Dolezel et al. (1989). As plântulas foram obtidas e  
21 analisadas separadamente para cada planta-mãe de uma população de cada padrão. Para *E.*  
22 *gracilipes*, foram utilizadas 65 sementes de cinco plantas-mãe de uma população  
23 poliembriônica coletada em Caldas Novas, Goiás e 51 sementes de cinco plantas-mãe de  
24 uma população monoembriônica entre os municípios de Uberlândia e Araguari, Minas  
25 Gerais. Foram obtidos de 3 a 27 e de 1 a 10 plântulas para cada planta mãe para cada

população, respectivamente. Já para *E. pubescens*, foram coletadas 151 sementes de 21 plantas-mãe de uma população monoembriônica e 130 sementes de cinco plantas-mãe de uma população poliembriônica, ambas localizadas em Cristalina, Goiás. Para a população monoembriônica, foram obtidos de 3 a 11 plântulas por planta mãe, enquanto na população poliembriônica o resultado foi de 21 a 33 plântulas por planta mãe. Foi utilizada somente uma repetição por plântula, a partir material fresco de folhas coletadas de plântulas de um a dois meses após a emergência.

### *Análise Estatística*

Os dados de altura e largura apresentaram normalidade (testado com teste de Kolmogorov-Smirnov Lilliefors), mas mostraram variâncias heterocedásticas (testada com teste de Levene). Por isso, para comparação entre os padrões, foi utilizado Modelos Lineares Generalizados (GLM) adotando distribuição Gaussiana e função de ligação identidade e, para comparações múltiplas foi utilizado o teste das diferenças mínimas significativas (LSD). A diferença na produção de frutos entre testes de hibridação e polinização natural foi testada com o teste G.

A decomposição da variância da altura e da largura dos estômatos entre os diferentes citótipos foi testada com ANOVA Aninhada (Nested ANOVA) baseado na metodologia proposta por Neter et al. (1985), para quantificar os componentes da variância relacionados ao efeito do citótipo ( $\sigma^2_c$ ), plântulas aninhadas dentro do citótipo ( $\sigma^2_{p/c}$ ) e o componente do resíduo ( $\sigma^2_r$ ).

A partir de uma nova modelagem por regressão logística binária, reconstruímos o modelo de predição mais parcimonioso utilizado no capítulo 1 (método backward com seleção de variáveis baseada na probabilidade inferior a 5% do teste de Wald) somente com

os dados de altura do indivíduo híbrido, tendo em vista que, juntamente com a altitude, foi a variável mais significativa na construção do modelo.

## Resultados

### *Testes de hibridações*

Em *E. gracilipes*, foi produzido somente um fruto (5,26%, 1/19) para o cruzamento entre as duas ploidias, enquanto que para a polinização natural também foi obtido somente um fruto (2,86%, 1/35), sem diferenças significativas na produção de frutos entre os dois tratamentos ( $G = 0,14$ ;  $p = 0,6994$ ). O fruto resultante do cruzamento entre as duas ploidias continha cinco sementes, das quais somente uma era bem formada e germinou, formando apenas uma plântula normal. As demais sementes apresentaram embriões rudimentares e com preenchimento da semente anormal, o que impossibilitou sua germinação.

Os indivíduos diplóides de *E. gracilipes* polinizadas com pólen de indivíduos tetraplóides de *E. pubescens* não produziram frutos (0%, 0/35), enquanto que para a polinização natural foram obtidos 10 frutos (19,6%, 10/51). A produção de flores e frutos no ano em que foram feitos os cruzamentos entre estas espécies (2009), foi bastante reduzida.

### *Medidas dos estômatos*

Na decomposição da variância para comparação entre os tamanhos de estômato das diferentes ploidias, observamos que tanto para a altura quanto para a largura do estômato o fator citótipo foi o mais explicativo dentre todos os fatores, representando 61,74% da variância para a primeira medida e 31,35% da variância para a segunda, mostrando a importância do tamanho genômico na determinação do tamanho estomático. Já o fator plântulas dentro de citótipo representou 22,94% da variância para a altura e 30,26% para a largura, mostrando o quanto da variação é determinada pelo indivíduo. Os fatores aleatórios

representaram 15,32% da variância da altura estomática, enquanto que para a largura esse valor foi de 38,59%, indicando que fatores não considerados nas análises podem estar atuando fortemente na determinação do tamanho dos estômatos. Como o objetivo foi comparar o híbrido com o padrão de cada ploidia, o fator plântula não foi considerado nesta análise.

Para comparação entre os tamanhos de altura e largura de estômatos entre as ploidias apresentadas pelas espécies e o indivíduo híbrido, foram feitas análises GLM (Generalized Linear Models). Para a altura, houve diferença entre os padrões ( $X^2 = 937,06$ ;  $g.l. = 5$ ;  $p < 0,001$ ), sendo que as comparações par a par, realizadas com teste de Tukey, mostraram diferenças não significativas somente entre o híbrido e o padrão hexaplóide de *E. gracilipes*. A largura também mostrou diferença entre os padrões ( $X^2 = 289,52$ ;  $g.l. = 5$ ;  $p < 0,001$ ). As comparações par a par para essa medida mostraram diferenças não significativas apenas entre o híbrido e o padrão tetraplóide de *E. pubescens*. As espécies hexaplóides apresentaram os maiores valores, tanto para altura, quanto para a largura. Já a espécie diplóide *E. estevesia*, apresentou os menores valores para ambas as medidas (Fig. 3). Houve pouca variabilidade entre as plântulas, sendo que o híbrido não se sobrepôs a nenhuma outra plântula amostrada (Fig.4).

### *Citometria de fluxo*

O screening da citometria de fluxo (Fig. 2) feito para verificação da ploidia das plântulas oriundas de sementes de diferentes ploidias de *E. gracilipes* e *E. pubescens* mostrou uma clara distinção do tamanho do genoma entre as ploidias. Plântulas oriundas de *E. gracilipes* diplóide mostraram o menor tamanho de genoma (média = 3,66, desvio padrão = 0,09; mínimo = 3,45; máximo = 4,02), enquanto as provindas de *E. gracilipes* hexaplóide, apresentaram os maiores tamanhos (média = 10,36; desvio padrão = 0,58; mínimo = 9,16;

máximo = 11,84). Indivíduos originados de *E. pubescens* tetraplóide mostraram tamanho intermediário entre as duas ploidias (media = 6,92; desvio padrão = 0,11; mínimo = 6,53; máximo = 7,16), mas menores que as plantas hexaplóides de *E. pubescens* (média = 10,20, desvio padrão = 0,24; mínimo = 9,62; máximo = 10,82). Houve sobreposição apenas entre plântulas provenientes das populações hexaplóides de *E. gracilipes* e *E. pubescens*, indicando o tamanho semelhante do genoma dessas duas espécies. As plântulas evidenciaram um tamanho de genoma compatível com o de suas plantas-mãe, ou seja, todas apresentaram a mesma ploidia de suas progenitoras.

### *Regressão Logística*

O modelo de regressão logística para predição da poliembrião no indivíduo híbrido mostrou os seguintes resultados: parâmetros constante (6,251), altura do estômato (0,176) e coeficiente de variação do estômato (-1,465). A partir desse modelo, concluímos que a probabilidade do híbrido ser poliembriônico é de 0,9662 (96,62%).

## 1 Discussão

2        Testamos a viabilidade de hibridação entre espécies de diferentes ploidias e entre  
3        citótipos de uma mesma espécie com ploidias diferentes. Estes cruzamentos resultaram num  
4        sucesso muito baixo de formação de frutos e sementes, mesmo quando realizados entre  
5        citótipos de uma mesma espécie. Tais resultados corroboram a ideia de que diferenças de  
6        ploidia representam barreiras reprodutivas importantes (Schatlow et al., 2014). Este  
7        insucesso é comumente resultado da má formação do endosperma, causada por um  
8        desbalanço cromossômico na união dos gametas (Lafon-Placette & Kohler, 2016). Somente o  
9        cruzamento entre ploidias de *E. gracilipes* teve resultado, mas mesmo assim resultou em uma  
10      única plântula, o que dificulta generalizações.

11      Os resultados das análises de citometria de fluxo tão pouco mostraram evidências de  
12      hibridação ou modificações nos níveis de tamanho de genoma nas progênies das populações  
13      estudadas, o que leva a ideia de uma ploidia constante nessas progênies. Foram feitas análises  
14      de citometria de uma grande quantidade de amostras (397 plântulas), sendo o método uma  
15      ferramenta mais rápida e precisa que a contagem de cromossomos (Loureiro, 2007). Em  
16      nenhum caso o tamanho do genoma das plântulas deixou de corresponder ao citótipo  
17      previamente conhecido das plantas-mãe. Portanto, as análises não indicaram a existência de  
18      populações com ploidias mistas ou que esteja ocorrendo fluxo gênico entre populações de  
19      citótipos distintos já que nenhuma plântula de origem híbrida foi detectada pela quantificação  
20      do DNA. Os resultados da citometria de fluxo seriam mais um indício de que as populações  
21      estudadas estão isoladas, geográfica ou ecologicamente, umas das outras, pelo menos no que  
22      diz respeito à ploidia. No entanto, análises envolvendo uma amostragem maior de  
23      populações poderão trazer melhores indícios quanto à ocorrência de indivíduos de diferentes  
24      citótipos numa mesma população, principalmente em áreas limítrofes da distribuição dos  
25      citótipos. Como visto no Capítulo 1, a presença de indivíduos com padrões de embrionia

distintos (o que também pode indicar citótipos distintos) ocorrendo em simpatria já foi observada pelo menos para uma área de ocorrência de *E. gracilipes*. Eventualmente, outros níveis de ploidia, como a tetraplóide encontrada em *E. pubescens* (Marinho et al., 2014), podem vir a ser encontradas naturalmente para *E. gracilipes*.

Como visto, os resultados obtidos a partir das análises ANOVA Aninhada (nested ANOVA) mostraram diferenças morfométricas entre as ploidias, distinguindo cada uma delas. Os dados corroboram com o cariótipo apresentado pelas plantas-mãe dos indivíduos analisados e com o tamanho do genoma inferido pela citometria de fluxo. Populações diplóides apresentaram as menores médias de tamanho estomático, enquanto as hexaplóides, as maiores médias. Em conformidade com o resultado, o citótipo das espécies se mostrou o fator mais importante na variação das medidas dos estômatos, sustentando a idéia de que a poliploidização tem influencia direta no tamanho celular de *E. gracilipes* (Grant, 1954; Suzuki et al., 1982).

Portanto, este estudo indicou que a morfometria de estômatos pode ser usada como um método simples e rápido para estimativas de diferentes ploidias para o gênero *Eriotheca*, assim como mostrado por Marinho e colaboradores (2014a), mesmo o estudo tendo utilizado indivíduos jovens para as análises. Por conseguinte, podemos afirmar a aplicabilidade das técnicas apresentadas para plântulas oriundas do cultivo de frutos coletados. Apesar de percebermos que esta variação celular também ocorre no indivíduo híbrido, não podemos confirmar se o citótipo do indivíduo híbrido pode corresponder ao padrão tetraplóide esperado. Apesar de sua largura média de estômatos refletir o valor encontrado para o padrão tetraplóide de *E. pubescens*, houve também igualdade significativa entre média da altura dos estômatos desse indivíduo e aquela obtida para o padrão hexaplóide de *E. gracilipes*. A análise de regressão logística também indicou o indivíduo híbrido como sendo poliembriônico.

Entretanto, como visto no Capítulo 1, estudos utilizando a morfometria estomática para inferência de características reprodutivas ou de citótipos de populações, devem levar em conta fatores ambientais, já que mostraram atuar em conjunto com os padrões de embrionia da espécie. Estudos envolvendo morfometria de pólen para inferência da ploidia poderiam ser mais indicados neste caso, haja vista que esta é uma estrutura haplóide e não sofreria a ação de genes aditivos, como provavelmente acontece no caso dos estômatos (Chen, 2007). Análises envolvendo densidade estomática das folhas podem ser um melhor parâmetro para detecção rápida da ploidia de indivíduos híbridos, já que este não é tão influenciado por fatores externos (como temperatura e disponibilidade de água) quanto o tamanho do estômato (Beck et al., 2002). Motonobu et al. (1997) demonstrou que o número de estômatos em folhas de crisântemo foi diretamente proporcional ao aumento dos cromossomos, mas o tamanho dos estômatos não variou entre as plantas de diferentes níveis de ploidia. No entanto, outros estudos que também mostram essa relação inversa entre frequência estomática e aumento da ploidia, comprovaram que o aumento celular também acompanha o tamanho do genoma (Beck et al., 2002; Ohri 1998; Hetherington e Woodward 2003). Além disso, estudos com híbridos do gênero *Citrus* (Costa et al., 2004) e de *Musa* (Vandenhout et al., 1995) também mostraram a relação positiva entre o tamanho estomático e nível de ploidia, além de observarem que uma quantidade maior de estômatos por área foliar nos parentais diplóides quando comparados com indivíduos híbridos.

Estudos adicionais envolvendo maior amostragem de indivíduos resultantes de cruzamentos interploidias serão necessários para confirmar definitivamente a relação entre a ploidia desses híbridos e o tamanho dos estômatos. Apesar disso, é evidente a eficácia da técnica de morfometria estomática quando tratamos de populações com tamanho genômico já conhecido, como confirmado através da citometria de fluxo. Sendo assim, os resultados

- 1 indicam que tal relação pode ser usada para evidenciar populações heterogêneas e ocorrência
- 2 de hibridações naturais.

## Referências Bibliográficas

- BALAO, F., CASIMIRO-SORIGUER, R., TALAVERA, M., HERRERA, J., TALAVERA, S. 2009. Distribution and diversity of cytotypes in *Dianthus broteri* as evidenced by genome size variations. *Annals of Botany* 104: 965–973. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp182>
- BAUM, D.A. & OGINUMA K. 1994. A review of chromosome numbers in Bombacaceae with new counts for *Adansonia*. *Taxon* 43: 11 - 20. <https://doi.org/10.2307/1223456>
- BIRCHLER, J.A., AUGER, D.L., RIDDLE, N.C. 2003. In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell* 15: 2236–2239. <https://doi.org/10.1105/tpc.151030>
- CHEN, Z.J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Reviews in Plant Biology* 58: 377. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103835>
- CHEN, Z.J. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science* 15: 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.003>
- CHIN, J., WAN, Y., SMITH, J., CROXDALE, J. 1995. Linear aggregations of stomata and epidermal cells in *Tradescantia* leaves: evidence for their group patterning as a function of the cell cycle. *Developmental Biology* 168: 39–46. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1059>
- COSTA, M.A.P.D, DE ALMEIDA, W.A.B, MOURAO, F.D.A. 2004. Stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplast fusion. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39: 297–300. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000300015>
- DOLEZEL, J., BINAROVA, P., LUCRETTI, S. 1989. Analysis of nuclear-DNA content in plant-cells by flow-cytometry. *Biologia Plantarum* 31: 113–120. <https://doi.org/10.1007/BF02907241>
- GRANT, W.F. 1954. A cytological study of *Celosia argentea*, *C. argentea* var. *cristata*, and their hybrids. *Botanical Gazette*. 115: 323–336. <https://doi.org/10.1086/335831>

- HANNEMAN, R.E.JR. & PELOQUIN, S.J. 1968: Ploidy levels of progeny from diploid-tetraploid crosses in potato. *American Potato Journal* 45: 255–26. <https://doi.org/10.1007/BF02849919>
- HETHERINGTON, A.M. & WOODWARD, F.I. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424: 901–908. <https://doi.org/10.1038/nature01843>
- JUNG, T., SCHAUER U., HEUSSER C., NEUMAN C., RIEGER C. 1993. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 159: 197–207. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90158-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90158-4)
- KOLÁŘ, F., ČERTNER, M., SUDA, J., SCHÖNSWETTER, P., HUSBAND, B.C. 2017. Mixed-ploidy species: progress and opportunities in polyploid research. *Trends in Plant Science* 22: 1041–1055. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.011>
- LAFON-PLACETTE, C. & KOHLER, C. 2016. Endosperm-based postzygotic hybridization barriers: developmental mechanisms and evolutionary drivers. *Molecular Ecology* 25: 2620–2629. <https://doi.org/10.1111/mec.13552>
- LOUREIRO, J., RODRIGUEZ, E., DOLEZEL, J., SANTOS, C. 2007A. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of Botany* 100: 875–888. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm152>
- MARINHO, R.C., MENDES-RODRIGUES, C., BONETTI, A.M., OLIVEIRA, P.E. 2014A. Pollen and stomata morphometrics and polyploidy in *Eriotheca* (Malvaceae-Bombacoideae). *Plant Biology* 16: 508–511. <https://doi.org/10.1111/plb.12135>
- MARINHO R.C, MENDES-RODRIGUES C., BALAO F., ORTIZ P.L., YAMAGISHI-COSTA J., BONETTI A.M., OLIVEIRA P.E. 2014b Do chromosome numbers reflect phylogeny? New counts for Bombacoideae and a review of Malvaceae s.l. *American Journal of Botany* 101: 1456–1465. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400248>

MARINHO, R.C. 2017. Poliploidia e variações reprodutivas em Bombacoideae (Malvaceae): distribuição geográfica, filogeografia e tamanho de genôma. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

MENDES-RODRIGUES, C., CARMO-OLIVEIRA, R., TALAVERA, S., ARISTA, M., ORTIZ, P.L., OLIVEIRA, P.E. 2005. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae - Bombacoideae). *Plant Biology* 7: 533-540. <https://doi.org/10.1055/s-2005-865852>

MOTONOBU, E., KIM, J.S., INADA, I. 1997. Production and characteristics of chromosome doubled plants of small flowered garden *Chrysanthemum*, *Dendranthema* × *grandiflorum* Ramat. Kitam. cv. YS by colchicine treatment of cultured shoot tips. *Journal Japan Society Horticulturae Science* 65: 528-833. <https://doi.org/10.2503/jjshs.65.825>

NETER, J., WASSERMAN, W., KUTNER, M.H. 1985. Applied linear statistical models: regression, analysis of variance and experimental designs. Richard D. Irwin, Illinois.

OLIVEIRA, P.E., GIBBS, P.E., BARBOSA, A.A., TALAVERA, S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. *Plant Systematic and Evolution* 179: 207-219. <https://doi.org/10.1007/BF00937597>

OHRI, D. 1998. Genome size and plant systematics. *Annals of Botany* 82: 75–83. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0765>

RICE, A., GLICK, L., ABADI, S., EINHORN, M., KOPELMAN, N.M., SALMANMINKOV, A., MAYZEL, J., CHAY, O., MAYROSE, I. 2015. The Chromosome Counts Database (CCDB) — a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytology* 206: 19–26. <https://doi.org/10.1111/nph.13191>

SCHATLOWSKI, N., WOLFF, P., SANTOS-GONZALEZ, J., SCHOFT, V., SIRETSKIY, A., SCOTT, R., TAMARU, H., KOHLER, C. 2014. Hypomethylated pollen bypasses the

interploidy hybridization barrier in Arabidopsis. Plant Cell 26: 3556-3568.

<https://doi.org/10.1105/tpc.114.130120>

SUZUKI, T., S. NISHIBAYASHI, T. KUROIWA, T. KANBE, AND K. TANAKA. 1982.

Variance of ploidy in *Candida albicans*. Journal of Bacteriology 152: 893-896.

VANDENHOUT, H., ORTIZ, R., VUYLSTEKE, D., SWENNEN, R., BAI, K.V.

1995. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana

hybrids. Euphytica 83: 117–122. <https://doi.org/10.1007/BF01678038>

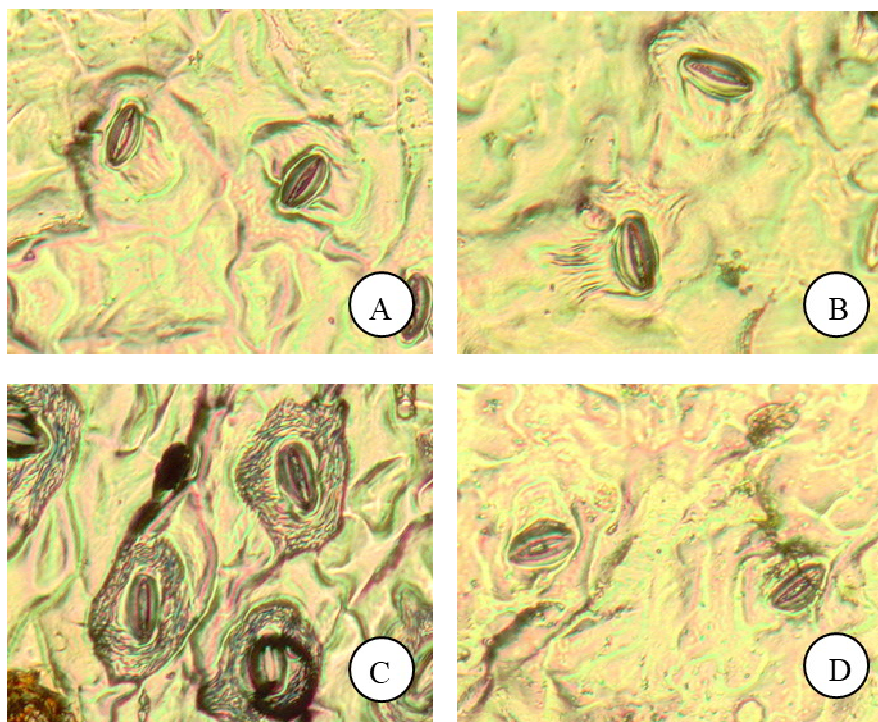


Figura 1 – Lâmina de impressões foliares obtidas de plântulas de *Eriotheca* spp. Comparação entre *E. gracilipes* diplóide (A), *E. gracilipes* hexaplóide (B), *E. pubescens* tetraplóide (C) e indivíduo híbrido (D).

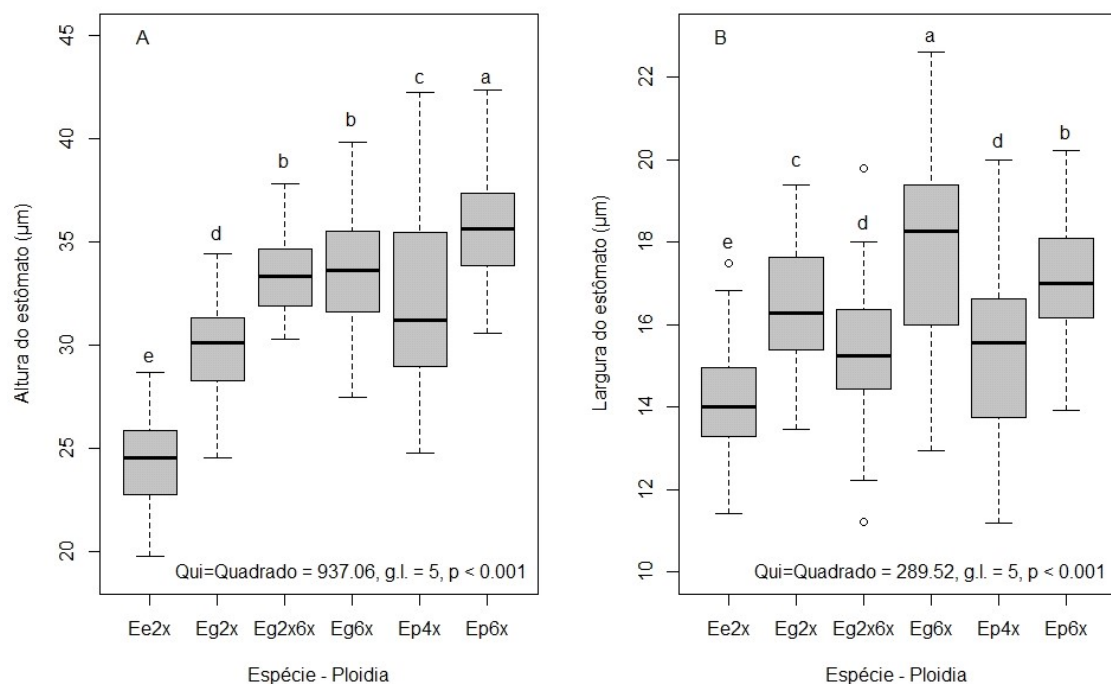


Figura 2. Comparação entre a alturas e largura dos estômatos de espécies de *Eriotheca* com diferentes citótipos (Bombacoideae – Malvaceae). Ee: *Eriotheca estevesiae*, Eg: *Eriotheca gracilipes*, Ep: *Eriotheca pubescens*. Os números que seguem as espécies representam a ploidia, ou o cruzamento entre as ploidias no caso de Eg2x6x.

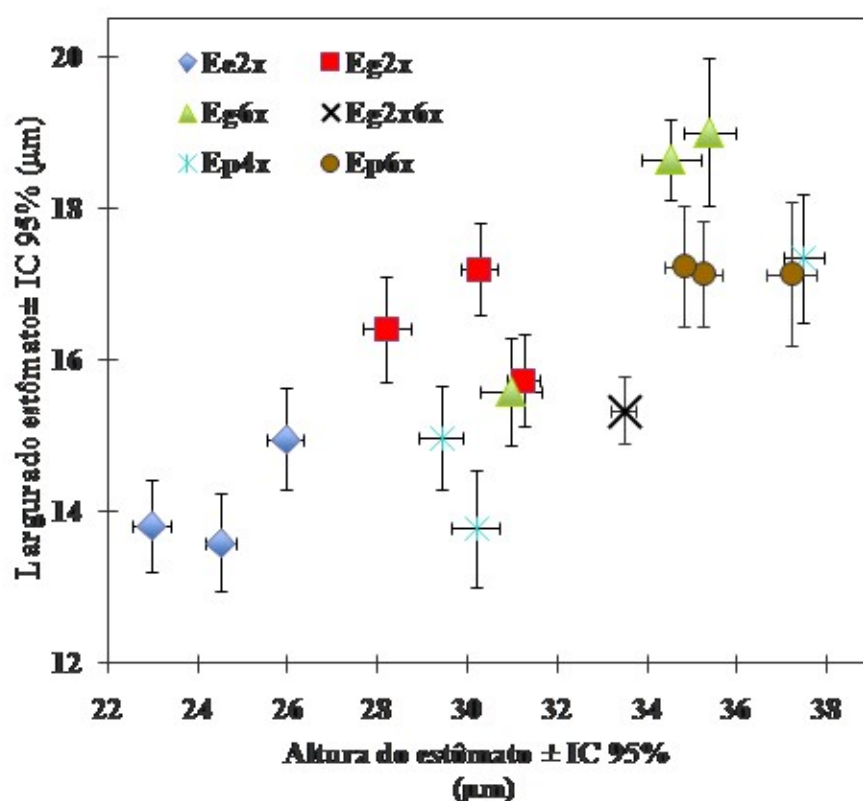


Figura 3. Comparação da altura e largura dos estômatos entre plântulas das espécies de espécies de *Eriotheca* com diferentes citótipos (Bombacoideae – Malvaceae). Ee: *Eriotheca estevesiae*, Eg: *Eriotheca gracilipes*, Ep: *Eriotheca pubescens*. Os números que seguem as espécies representam a ploidia, ou o cruzamento entre as ploidias no caso de Eg2x6x.

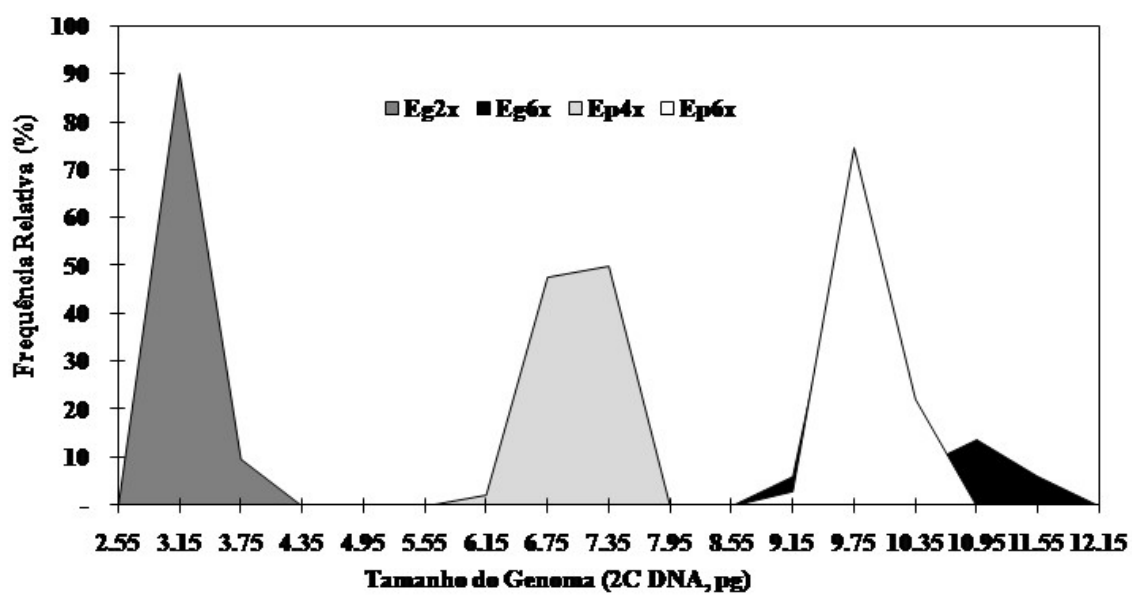


Figura4. Screening para tamanho de genoma em plântulas de *Eriotheca gracilipes* (Eg) oriundas de plantas mãe com ploidia diplóide (Eg2x) e hexaplóide (Eg6x); ou *Eriotheca pubescens* (Ep) oriundas de plantas mãe com com ploidia tetraplóide (Ep4x), e hexaplóide (Ep6x).

## Considerações finais

O estudo teve como objetivo geral relacionar a morfometria estomática aos padrões de embrionia encontrados em diferentes populações de *Eriotheca gracilipes*. Além disso, foi testada a viabilidade do método para inferência de ploidia em um indivíduo híbrido resultante do cruzamento entre ploidias distintas da espécie. No entanto, o estudo mostrou que não é possível detectar e caracterizar mosaicos reprodutivos e citológicos apresentados por *E. gracilipes* por meio da morfometria estomática, tendo em vista que outros fatores externos influenciam o tamanho dos estômatos. Variáveis geográficas se mostraram importantes na determinação da medida estomática e devem ser considerados em estudos futuros envolvendo esta ferramenta. Além disso, a variação encontrada entre populações com o mesmo padrão de embrionia pode ser em decorrência de hibridações naturais que poderiam acontecer na espécie, como visto no capítulo 2. Apesar disso, apenas uma localidade mostrou indivíduos simpátricos com embrionias distintas. Uma maior amostragem poderia revelar a ocorrência de outras populações mistas.

Ademais, o estudo pôde verificar certa divisão geográfica entre os padrões embriônicos, além de mostrar que locais de maior altitude abrigam, majoritariamente, espécies que apresentam monoembrionia. Esses resultados poderiam mostrar indícios de como a espécie se dispersou pelo bioma. O mapeamento mais amplo das populações de *E. gracilipes* e estudos futuros incluindo a filogeografia da espécie, poderão elucidar e confirmar hipóteses sobre o padrão de distribuição destes mosaicos. Além disso, estes estudos deverão auxiliar na implantação de estratégias de conservação de *E. gracilipes*, haja vista que seu padrão de distribuição pode apontar centros de diversidade genética e locais de refúgio de espécies.

## Normas da Revista: Acta Botanica Brasilica

All manuscripts must follow these guidelines: the text should be in Times New Roman font, size 12, double-spaced throughout and with 25 mm margins; the paper size should be set to A4 (210 x 297 mm). All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. For text files .doc, .docx and .rtf are the only acceptable formats. Files in Adobe® PDF format (.pdf files) will not be accepted. When appropriate, the article file should include a list of figure legends and table heads at the end. This article file should not include any illustrations or tables, all of which should be submitted in separate files. Do not include field code either.

The **first page** should state the type of article (Original Article, Review, Viewpoint, Method, Short communication or MDD) and provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Each name should be followed by the Orcid number an identifying superscript number (1, 2, 3 etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. Only one corresponding author should be indicated with an asterisk and should always be the submitting author. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the superscript number where appropriate. The address must be synthetic and in English with institution, postal code, city, state and country. Do not translate laboratory, department and university. Titles and positions should not be mentioned. This information is followed by the e-mail address of the corresponding author.

The **second page** should contain a structured **Abstract** not exceeding 200 words in a single paragraph without references. The Abstract should outline the essential content of the manuscript, especially the results and discussion, highlighting the relevance of main findings.

The Abstract should be followed by between five and ten **Key words**. Note that essential words in the title should be repeated in the key words.

Original articles should be divided into sections presented in the following order:

**Title page**

**Abstract**

**Introduction**

**Materials and methods**

**Results****Discussion****Acknowledgements****References****Tables and Figure legends****Supplementary Data (if applicable)**

**Material and methods and Results** should be clear and concise. The Discussion section should avoid extensive repetition of the results and must finish with some conclusions. This section can be combined with results (Results and discussion), however, we recommend authors consult the Editorial Board for a previous evaluation.

**Plant names** must be written out in full in the abstract and again in the main text for every organism at first mention but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus (e.g. *Hymenaea stigonocarpa* e *H. stilbocarpa*). The authority (e.g., L., Mill., Benth.) is required only in Material and Methods section. Use The International Plant Names Index ([www.ipni.org](http://www.ipni.org)) for correct plants names. Cultivars or varieties should be added to the scientific name (e.g. *Solanum lycopersicum* 'Jumbo'). Authors must include in Material and Methods a reference to voucher specimen(s) and voucher number(s) of the plants or other material examined.

**Abbreviations** must be avoided except for usual cases (see recent issues) and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Non-conventional abbreviations should be spelled out at first mention.

**Units of Measurement.** Acta bot. bras. adopts the Système International d'Unités (SI). For volume, use the cubic metre (e.g.  $1 \times 10^{-5} \text{ m}^3$ ) or the litre (e.g. 5  $\mu\text{L}$ , 5 mL, 5 L). For concentrations, use  $\mu\text{M}$ ,  $\mu\text{mol L}^{-1}$  or  $\text{mg L}^{-1}$ . For size and distance use meters (cm, mm,  $\mu\text{m}$ , etc) and be consistent in the manuscript.

**Numbers** up to nine should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals unless they are starting sentences.

**Citations** in the text should take the form of Silva (2012) or Ribeiro & Furr (1975) or (Mayer & Wu 1987a; b; Gonzalez 2014; Sirano 2014) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by et al. (e.g. Simmons et al. 2014). If two different authors have the same last name, and the article have the same year of publication, give their initials (e.g. JS Santos 2003). Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and last name of the person concerned (e.g., RA Santos unpubl. res.).

**References** should be arranged alphabetically based on the surname of the author(s). Where the same author(s) has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Letters 'a', 'b', 'c', etc., should be added to the date of papers with the same citation in the text. Please provide DOI of 'in press' papers whenever possible.

For papers with six authors or fewer, please give the names of all the authors. For papers with seven authors or more, please give the names of the first three authors only, followed by et al.

Please follow the styles:

#### *Books*

Smith GM. 1938. Cryptogamic botany. Vol. II Bryophytes and Pteridophytes. 2nd. edn. New York, McGraw-Hill Book Company.

#### *Chapters in books*

Schupp EW, Feener DH. 1991. Phylogeny, lifeform, and habitat dependence of ant-defended plants in a Panamanian forest. In: Huxley CR, Cutler DC. (eds.) Ant-plant interactions. Oxford, Oxford University Press. p. 175-197.

#### *Research papers*

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

#### *Papers in press (ahead of print)*

Alves JJ, Sampaio MTY. 2015. Structure and evolution of flowers. *Acta Botanica Brasilica* (in press). doi: 10.1590/0102-33062015abb3339

*Online-only journals*

Wolkovich EM, Cleland EE. 2014. Phenological niches and the future of invaded ecosystems with climate change. *AoB Plants* 6: plu013 doi:10.1093/aobpla/plu013

*Thesis (citation should be avoided)*

Souza D. 2014. Plant growth regulators. PhD or MSc Thesis, University of Brazil, Brazil.

*Websites and other sources (citation should be avoided)*

Anonymous. 2011. Title of booklet, leaflet, report, etc. City, Publisher or other source, Country.

References to websites should be structured as: author(s) name author(s) initial(s). year. Full title of article. Full URL. 21 Oct. 2014 (Date of last successful access).

**Acknowledgements** should be preferably in fewer than 80 words. Be concise: “we thank...” is preferable to “The present authors would like to express their thanks to...”. Funding information should be included in this section.

The following example should be followed:

We acknowledge the Center of Microscopy (UFMG) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy. We also thank J.S. Santos for assistance with the statistical analyses. This work was supported through a research grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (ID number).

For SHORT COMMUNICATIONS note that the editorial guidelines applying to original papers must also applying here. In general, the difference between original papers and short communications is the lack of subsections in the text and limited space for illustrations in the latter. Figures and tables can be present, assuming that the overall size of the manuscript does not exceed the five printed page limit (supplementary material can be added). The abstract (as described for original articles) must be followed by a “running text” (a single section, without subheadings), followed by the acknowledgments and references.

Preparing Figures, Tables and Supplementary material

All figures (photographs, maps, drawings, graphs, diagrams, etc.) and tables must be cited in the text, in ascending order. Citations of figures in the text should appear in an abbreviated, capitalized form (e.g., Fig. 1, Fig. 2A-D, Fig. 3A, Figs. 3A, 4C, Tab.1).

The maximum dimensions of individual figures should be 170 × 240 mm. The width of an individual component can be 170 mm or 85 mm, without exception, whereas the height can be ≤ 240 mm. For continuous tone images (e.g., photographs), please supply TIFF files at 300 dpi. More complex drawings, such as detailed botanical illustrations will not be redrawn and should be supplied as 600 dpi TIFF files.

Grouping of related graphics or images into a **single figure** (a plate) is strongly encouraged. When a block of illustrative material consists of several parts, each part should be labelled with sequential capital letters, in the order of their citation in the text (A, B, C, etc.). The letters that identify individual images should be inserted within white circles in the lower right-hand corner. For separate the grouped images, authors should insert white bars (1mm thickness).

Individual images (not grouped as a plate) should be identified with sequential Arabic numerals, in the order of their citation in the text (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, etc.), presented in the same manner as the letters identifying individual images (described above).

The number that identifies a grouped figure (e.g., Fig. 2) should not be inserted into the plate but should rather be referenced only in the figure caption and the text (e.g., Fig. 2A-C).

Scale bars, when required, should be positioned in the lower right-hand corner of the figure. The scale bar units should be given either at the end of the figure caption or, when a figure contains multiple scale bars with different units, above each bar.

Details within a figure can be indicated with arrows, letters or symbols, as appropriate.

Tables should be preceded by titles, indicated with sequential Arabic numerals (Table 1, 2, 3, etc.; do not abbreviate). Tables should be created using the Table function of Microsoft Word™. Columns and rows should be visible, although no dark lines should be used to separate them. Horizontal rules should be used only at the top (below the title) and bottom (below the final row) of the table. Do not use fills, shading or colors in the tables.

When appropriate, excess (but important) data can be submitted as Supplementary Files, which will be published online and will be made available as links. This might include additional figures, tables, or other materials that are necessary to fully document the research contained in the paper or to facilitate the readers' ability to understand the work.

Supplementary Materials are linked from the main article webpage. They can be cited using the same DOI as the paper.

Supplementary Materials should be presented in appropriate .doc file for text and tables and .tiff file at 300dpi for figures and graphics. The full title of the paper and author names should be included in the header. All supplementary figures and tables should be referred in the manuscript body as “Table S1” and/or “Figure S1”.

Acta bot. bras. intends to maintain archives of Supplementary Materials but does not guarantee their permanent availability. Acta bot. bras. reserves the right to remove Supplementary Materials from a published article in the future.