

CAPÍTULO 2

AUTOINCOMPATIBILIDADE DE AÇÃO TARDIA E POLINIZAÇÕES MISTAS EM *TABEBUIA AUREA* (BIGNONIACEAE)

RESUMO

Espécies que apresentam autoincompatibilidade de ação tardia (AIT) podem apresentar uma flexibilidade neste sistema quando ocorrem polinizações mistas (grãos de pólen próprios + grãos de pólen cruzados), de forma que sementes autofecundadas possam ser formadas. *Tabebuia aurea* parece apresentar AIT, no entanto, estudos moleculares verificaram a ocorrência de progênie oriunda de autofecundação em uma população desta espécie. Os objetivos deste estudo foram tentar corroborar a ocorrência do ATI na espécie, além de verificar a formação de frutos e sementes autofecundadas a partir de polinizações mistas. Para tal, foram realizadas autopolinizações, polinizações cruzadas e polinizações mistas controladas em duas populações de *T. aurea*. Os eventos pós-polinização foram analisados em óvulos de todos os tratamentos e um teste de paternidade foi realizado nas progênies oriundas de polinizações mistas. Apenas uma população formou frutos por polinizações mistas, entretanto, a taxa de frutificação foi cerca de oito vezes menor que a observada em polinizações cruzadas. Não foram formados frutos por autopolinizações. Os tubos polínicos de polinizações cruzadas cresceram e atingiram o ovário mais rapidamente do que os de autopolinização. No entanto, algum tipo de interação entre estes tubos polínicos deve ocorrer no caso de polinizações mistas, levando a uma menor penetração e fecundação dos óvulos, a qual levaria a uma pequena proporção de óvulos fecundados e não permitiria o desenvolvimento dos pistilos, causando seu aborto, explicando assim a baixa frutificação verificada em polinizações mistas. Os óvulos que foram fecundados no tratamento de polinizações mistas apresentaram o endosperma num estágio de desenvolvimento similar ao observado em óvulos de pistilos submetidos às polinizações cruzadas, enquanto o endosperma de óvulos de pistilos autopolinizados foi mais lento em seu desenvolvimento inicial. Estes resultados corroboram outros estudos que indicam a ocorrência do AIT em *T. aurea*. Não foram detectadas plântulas de autofecundação provenientes de polinizações mistas nos testes

de paternidade, indicando que este seja um evento bastante raro na espécie. Embora este estudo não tenha confirmado a flexibilidade do AIT em *T. aurea*, a elevada proporção de progênie de autofecundação encontrada em outro estudo com marcadores moleculares pode ser resultante de indivíduos que apresentem uma autocompatibilidade parcial, os quais não teriam sido amostrados no presente trabalho.

Palavras-chave: caraíba, desenvolvimento do endosperma, interação entre tubos polínicos, sistema reprodutivo

Introdução

A maioria das plantas apresenta flores perfeitas, as quais recebem, frequentemente, grãos de pólen de outros indivíduos (pólen cruzado) juntamente com o grão de pólen próprio (autopólen) no estigma caracterizando a ocorrência de polinização mista (Kalisz et al. 2004, Bianchi et al. 2005, Goodwillie et al. 2005). Este tipo de polinização é comum na natureza, devido ao comportamento dos polinizadores que podem transferir os dois tipos de grãos de pólen para o estigma (Kalisz et al. 2004).

A polinização e fecundação cruzadas são importantes para que haja uma maior variabilidade genética na população, no entanto, pode ocorrer uma plasticidade nos sistemas de autoincompatibilidade, levando a planta a produzir também sementes provenientes de autofecundação (Lipow & Wyatt 2000, Stephenson et al. 2000). A autocompatibilidade parcial pode assegurar a reprodução por meio da autofecundação, sendo um importante fator em condições desfavoráveis, como: a baixa densidade populacional, limitação do pólen cruzado e a ausência do polinizador, levando uma deficiência de polinizações cruzadas (Stephenson et al. 2000).

Quando a reprodução ocorre tanto por autofecundação quanto por fecundação cruzada, o sistema reprodutivo é considerado misto, com a taxa de frutificação proveniente de autopolinização variável de acordo com a espécie (Murawski et al. 1994, Rausher & Chang 1999, Goodwillie et al. 2005). Algumas espécies consideradas autoincompatíveis, com ação de um sistema de autoincompatibilidade tardia (AIT), apresentaram uma proporção significativa de sementes autofecundadas em frutos produzidos através de polinizações mistas (Bertin et al. 1989, Gribel et al. 1999, Gribel & Gibbs 2002). Uma possível explicação para que ocorra a formação de sementes por autofecundação em espécies com AIT é que quando ocorre a polinização mista e a maioria dos óvulos é fecundado por gametas oriundos de pólen cruzado, estes atraem recursos maternos, permitindo que o pistilo se desenvolva em fruto,

mesmo com alguns óvulos autofecundados (Bertin & Sullivan 1988, Bertin et al. 1989, Gibbs et al. 2004).

A autoincompatibilidade de ação tardia difere dos outros sistemas de autoincompatibilidade, pois pode não ocorrer uma rejeição imediata do pólen ou dos tubos polínicos de autopolinização, sendo que estes crescem até o ovário e podem penetrar e fecundar os óvulos (De Nettancourt 1977, Seavey & Bawa 1986, Sage et al. 1994), o que permitiria a formação de sementes autofecundadas. Em muitos casos, a AIT é confundida com a ação precoce da depressão endogâmica, que é causada pela expressão de alelos recessivos deletérios (Seavey & Bawa 1986, Hufford & Hamrick 2003). Apesar da dificuldade de se identificar a AIT, a observação do tempo necessário para a abscisão dos pistilos autopolinizados juntamente aos estudos histológicos dos eventos pós-polinização podem ajudar a elucidar que tipo de rejeição esteja ocorrendo (Seavey & Bawa 1986, Gibbs & Bianchi 1999, Bittencourt Jr. & Semir 2005, Gandolphi & Bittencourt Jr. 2010).

Estudando o sistema reprodutivo de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore foi constatada a presença do AIT por meio de análises do crescimento dos tubos polínicos, os quais estes chegavam até o ovário e fecundavam os óvulos em pistilos autopolinizados e o posterior aborto uniforme destes pistilos (Gibbs & Bianchi 1993, Barros 2001). Além disso, foi observado o desenvolvimento inicial normal do endosperma e do zigoto nos óvulos destes pistilos antes de sua abscisão (Gibbs & Bianchi 1993). Entretanto, Braga & Collevatti (2011) realizaram um trabalho de genotipagem em outra população da mesma espécie e encontraram taxas elevadas de sementes provenientes de autofecundação em frutos desenvolvidos naturalmente. Estes achados levantaram a hipótese de que a espécie apresentaria um sistema reprodutivo misto.

Para esclarecer a estratégia reprodutiva de *Tabebuia aurea*, os objetivos deste estudo foram: (1) investigar se ocorre a formação de frutos decorrentes de polinização mista, e (2) se

sementes provenientes de autofecundação se desenvolvem nestes frutos. Além disso, (3) verificar se existem indícios da ação do AIT por meio da análise dos eventos pós-polinização.

Material e métodos

Espécie estudada e áreas de estudo

O estudo com *Tabebuia aurea* foi conduzido em áreas de cerrado sentido restrito. Duas populações nativas foram estudadas, sendo uma localizada na cidade de Luziânia, Goiás (16°14'36''S 47°54'20.4''W), onde foram estudados 11 indivíduos em 2012. E outra localizada na Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE), Planaltina, Distrito Federal (15°35'41.07''S 47°40'34.80''W), onde foram estudados 34 indivíduos em 2013, sendo esta a mesma população utilizada por Braga & Collevatti (2011), onde foram encontradas progênies oriundas de autofecundação. O material testemunho está depositado no *Herbarium Uberlandense* da Universidade Federal de Uberlândia, com os números de registro HUFU 68146 para a população de Luziânia e HUFU 68092 para a população de ESECAE.

Tabebuia aurea é uma espécie arbórea bastante comum no Cerrado, mas também pode ser encontrada em outros biomas (Lorenzi 2002). É caracterizada por apresentar folhas com 3-7 folíolos coriáceos de margem lisa; flores com cálice que apresenta tricomas peltados, sésseis e corola de coloração amarela (Gentry 1992). As flores apresentam antese diurna e duram aproximadamente por cinco dias, sendo as abelhas de grande porte seus principais polinizadores (Barros 2001). A floração ocorre durante a estação seca por cerca de quatro semanas, sendo do tipo cornucópia, e a frutificação ocorre no final da estação seca e início da estação chuvosa (Barros 2001). *Tabebuia aurea* é considerada uma espécie autoestéril com autoincompatibilidade de ação tardia (Gibbs & Bianchi 1993, Barros 2001).

Polinizações experimentais

Nas duas populações foram realizados tratamentos de polinizações experimentais, em que botões florais foram ensacados com sacos de organza para evitar o contato com visitantes florais. As polinizações experimentais foram realizadas com no mínimo 100 flores de primeiro dia de antese. Na polinização cruzada grãos de pólen de indivíduos localizados a mais de 10 metros de distância foram depositados no estigma das flores de outros indivíduos. Na autopolinização os grãos de pólen foram depositados no estigma da mesma flor de que foram retirados. Na polinização mista grãos de pólen retirados de uma teca da antera de uma mesma flor (autopólen) e de uma teca da antera da flor de outro indivíduo localizado a mais de 10 metros de distância (pólen cruzado), foram misturados em um placa na proporção de 1:1 e depositados no estigma da flor. Após as polinizações controladas as flores foram marcadas com linhas coloridas para a identificação de cada tratamento, re-ensacadas com o saco de organza e acompanhadas até a maturação do fruto ou a abscisão da flor.

As análises dos frutos maduros foram realizadas somente na população que formou frutos em mais de um tratamento de polinização. Os frutos maduros foram coletados e registrou-se o tamanho, o número de sementes por fruto e a porcentagem de sementes por fruto que não apresentava embrião (sementes vazias ou com embrião pouco desenvolvido). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Lilliefors. Para verificar se houve diferença entre os tratamentos de polinização em relação aos parâmetros analisados, foi realizado o teste de Mann–Whitney utilizando o software BioEstat 5.0 (Ayres et al. 2007).

A fim de estabelecer a porcentagem de óvulos que foram convertidos em sementes, 30 ovários coletados em pelo menos cinco indivíduos diferentes na população de Luziânia foram dissecados sob microscópio estereoscópico Olympus SZ40 para a contagem do número de óvulos. Para o cálculo da conversão de óvulos em sementes dividiu-se o número médio de sementes por fruto de cada tratamento pelo número médio de óvulos por ovário, e o total foi multiplicado por 100.

Para avaliar o crescimento dos tubos polínicos, a fim de observar o tempo em que estes levam para alcançar o ovário, foram realizadas autopolinizações e polinizações cruzadas adicionais em cinco indivíduos na população da ESECAE. Foram coletados cinco pistilos de cada tratamento e intervalo após a polinização (3, 6, 9 e 12 horas após as polinizações experimentais) nos diferentes indivíduos, totalizando 40 pistilos. Após a coleta, os pistilos foram armazenados em etanol 70%. Os pistilos foram amolecidos em solução aquosa de NaOH 9N em estufa de 54 a 56 °C por 15 minutos e, posteriormente, foram lavados em água corrente. Estes foram, então, colocados sobre lâminas histológicas, corados com solução aquosa de Azul de Anilina e esmagados com lamínula (Martin 1959). Foi utilizado o microscópio óptico Olympus BX51® com aparato de epifluorescência e durante as análises foi registrado para cada pistilo se havia tubos polínicos percorrendo o estilete, mas não atingiram o ovário, ou se havia tubos polínicos alcançando o ovário.

Para avaliação do comprimento e da largura dos ovários nos diferentes tratamentos de polinização experimental e em diferentes intervalos de tempo após as polinizações na população de Luziânia, os pistilos foram coletados e fixados em solução de glutaraldeído 1% e formaldeído 4% (Mc Dowell & Trump 1976) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2. Foram analisados ovários de pistilos coletados nos seguintes intervalos de tempo: 24 (cruzada: n=7, auto: n=6, mista: n=6); 48 (n= 6 pistilos de cada tratamento); 72 (cruzada n=7, auto: n=5, mista=5); 96 (cruzada n=5, auto n =6, mista=5); 120 (cruzada n=7, auto n=5, mista n=6); 144 (cruzada n=6, auto n=5, mista n=3) horas após as polinizações. As medições de cada ovário foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital Digimess®.

Para testar se houve diferença entre os tratamentos de polinização cruzada, autopolinização e polinização mista em relação ao comprimento e largura dos ovários nos diferentes intervalos após as polinizações, a normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Lilliefors e, posteriormente, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA dois

fatores) no programa Sisvar 5.3 (Ferreira 2010). Os tratamentos e os horários de coleta foram considerados variáveis categóricas, e o comprimento e a largura dos ovários foram consideradas as variáveis numéricas. Foram realizados os testes *post hoc* de Tukey, Scott-Knott e de Regressão linear, utilizando o programa Sisvar 5.3 (Ferreira 2010).

Análise de paternidade

As sementes formadas a partir de polinizações mistas na população de Luziânia foram armazenadas em sacos de papel e mantidas em geladeira por três semanas até serem colocadas para germinar. Todas as sementes com embrião foram colocadas para germinar em caixas Gerbox® forradas com algodão e papel filtro sob luz natural e temperatura ambiente. Após a emissão da radícula as sementes foram transplantadas para bandejas de poliestireno forradas com substrato comercial tipo Bioplant® e mantidas em casa de vegetação até o desenvolvimento das plântulas.

As folhas dos onze indivíduos adultos (parentais) da população de Luziânia e as folhas das progênies oriundas de polinizações mistas foram coletadas e o DNA foi extraído utilizando o protocolo CTAB 2% (Doyle & Doyle 1987). Para a quantificação do DNA foi realizada eletroforese em gel de agarose 3% juntamente com amostras de DNA λ em diferentes concentrações (20, 50 e 100 ng). O DNA de cada amostra foi diluído em TE (Tris-HCl 20 μ l pH8) para atingir uma concentração final de 3 ng/ μ l.

Os indivíduos adultos e as progênies foram genotipados utilizando-se nove *primers* microssatélites (Tau 12, Tau 13, Tau 14, Tau 16, Tau 21, Tau 24, Tau 27, Tau 28 e Tau 31) desenvolvidos por Braga et al. (2007). Os *primers forward* estavam marcados com três corantes fluorescentes (6-FAM, HEX e NED) (Invitrogen e Applied Biosystems). Para a reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizou-se uma solução com volume total de 10 μ l contendo 9 ng de DNA, 2,65 μ l de água mili-q, 1 μ l de *primer*, 0,9 μ l de DNTP, 0,15 μ l de

taqDNA polimerase, 1 µl de tampão e 1,3 µl de BSA. Para as reações de PCR foi utilizado o termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems), sob as seguintes condições: 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min, 72 °C durante 1 min e extensão final a 72 °C por 30 min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

Para testar a presença de sementes autofecundadas em frutos provenientes de polinização mista, foi realizado o teste de paternidade (Marshall et al. 1998) para verificar qual o provável doador de pólen, através do software Cervus 3.0 (Kalinowski et al. 2007). Para encontrar o doador de pólen mais provável, conhecendo-se a mãe, foi realizada uma simulação considerando que todos os pais foram amostrados (onze indivíduos), com 10000 ciclos, com uma proporção de 0,01 de erro e obtendo o valor crítico de Δ com confiança de 99,99% (nível restrito) e 90% (nível relaxado).

Análise histológica de eventos pós-polinização

Três pistilos de cada tratamento foram coletados nos intervalos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a polinização. Os pistilos foram fixados em solução de gluteraldeído 1% e formaldeído 4% (Mc Dowell & Trump 1976) em tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2. Os ovários foram dissecados, mantendo os óvulos presos ao septo. Os óvulos foram desidratados em série etílica e passados em uma série de etanol:clorofórmio (3:1, 1:1, 3:1) para a retirada de ceras epicuticulares. Posteriormente, os óvulos foram incluídos em hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid 1983). Foram realizados cortes seriados de 3µm de espessura em micrótomo de rotação Leica® modelo 2135 equipado com navalha de vidro de 8 mm. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina O 0,05% em tampão benzoato, pH 4,4 (Feder & O'Brien 1968) e as lâminas foram montadas com Permount®.

As análises foram realizadas em microscópio óptico Olympus BX51®, sendo o material documentado com auxílio de câmera fotográfica Olympus DP70.

Todos os óvulos dos três pistilos de cada tratamento e de cada intervalo foram analisados totalizando 2.668 óvulos de 54 ovários. Os critérios utilizados para a análise de cada óvulo foram: *óvulos penetrados* - óvulo em que o tubo polínico penetrou a micrópila, no entanto, nenhuma sinérgide foi penetrada; *óvulos fecundados* - presença de uma das sinérgides penetrada, o que é evidenciado pelo conteúdo citoplasmático denso; *endosperma em desenvolvimento* - presença de duas ou mais células do endosperma.

As análises estatísticas que comparam os diferentes estádios após a polinização entre os três tratamentos foram realizadas através do teste de qui-quadrado (χ^2) e do teste exato de Fisher utilizando o programa BioEstat 5.0.

Resultados

Sistema Reprodutivo

Registrou-se a formação de frutos resultantes apenas de polinização cruzada em oito indivíduos e de polinização mista em quatro indivíduos na população de Luziânia (Tabela 1). Já para a população da ESECAE foram formados somente frutos provenientes de polinização cruzada em nove indivíduos diferentes (Tabela 1).

O comprimento médio dos frutos formados através de polinizações cruzadas na população de Luziânia foi de $17,9 \pm 4,4$ cm (média $\pm$ desvio padrão) ($n=42$ frutos), estes continham, em média, $63,0 \pm 11,1$ sementes por fruto ($n=39$), sendo que $11,9 \pm 16,2\%$ das sementes não apresentavam embrião desenvolvido. Os frutos formados por polinização mista apresentaram, em média, $16,1 \pm 6,7$ cm de comprimento ($n=5$ frutos), com $58,5 \pm 11,2$ sementes por fruto ($n=4$ frutos), sendo que $8,6 \pm 4,7\%$ das sementes não apresentavam embrião desenvolvido. Não houve diferença significativa entre os tratamentos de polinização cruzada e

Tabela 1. Porcentagem de frutos desenvolvidos (n=número de flores/número de frutos) 30 dias após os tratamentos de polinização experimental em duas populações de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore localizadas em áreas de cerrado sentido restrito em Luziânia, Goiás e na Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE), Distrito Federal.

Tratamentos de polinização	População de Luziânia	População de ESECAE
Polinização cruzada	26,25% (n=160/42)	10,7% (n=121/13)
Autopolinização	0% (n=171/0)	0% (n=135/0)
Polinização mista	3,05% (n=164/5)	0% (n=118/0)

polinização mista em relação ao comprimento dos frutos ($U=96,5$, $p=0,384$), ao número de sementes formadas ($U=52,5$, $p=0,157$) e a porcentagem média de sementes que não apresentavam embrião desenvolvido ($U=63$, $p=0,288$). A população de Luziânia apresentou, em média, $66 \pm 7,1$ óvulos por ovário, sendo que a conversão de óvulos em sementes foi de 95,5% nos frutos de polinização cruzada e 88,6% nos frutos de polinização mista.

A análise do crescimento de tubos polínicos provenientes de polinização cruzada mostrou que os mesmos alcançaram o ovário 6 horas após as polinizações em 40% dos pistilos analisados. Nos intervalos de 9 e 12 horas após a polinização os tubos polínicos atingiram o ovário 60% e 20% dos pistilos analisados. Os restantes dos pistilos analisados de polinização cruzada apresentavam apenas tubos polínicos percorrendo o estilete. Já 80% dos pistilos autopolinizados analisados apresentavam tubos polínicos percorrendo o estilete em todos os horários observados. Apenas em um dos pistilos analisados (20%) os tubos polínicos chegaram ao ovário 9 horas após a polinização.

Houve interação entre os tratamentos e os intervalos após as polinizações em relação à largura dos ovários ($F_{10;84} = 2,471$, $p=0,0121$). Os pistilos submetidos à polinização cruzada apresentaram ovários mais largos que os pistilos autopolinizados e pistilos submetidos à polinização mista no intervalo de 144 horas após a polinização (teste Tukey, $p<0,05$) (Figura 1A). Apenas os pistilos submetidos à polinização cruzada e mista seguiram um modelo de regressão linear ao longo dos intervalos após as polinizações (Figura 1A).

Para o comprimento dos ovários não houve interação entre os tratamentos e os intervalos após as polinizações ($F_{10;84}=0,772$, $p=0,655$). Houve diferença entre os intervalos após as polinizações ($p<0,001$), seguindo o modelo de regressão linear (Figura 1B). Os pistilos submetidos à polinização cruzada apresentaram ovários com comprimento maior em relação aos outros tratamentos (teste Scott-knott, $p < 0,05$).

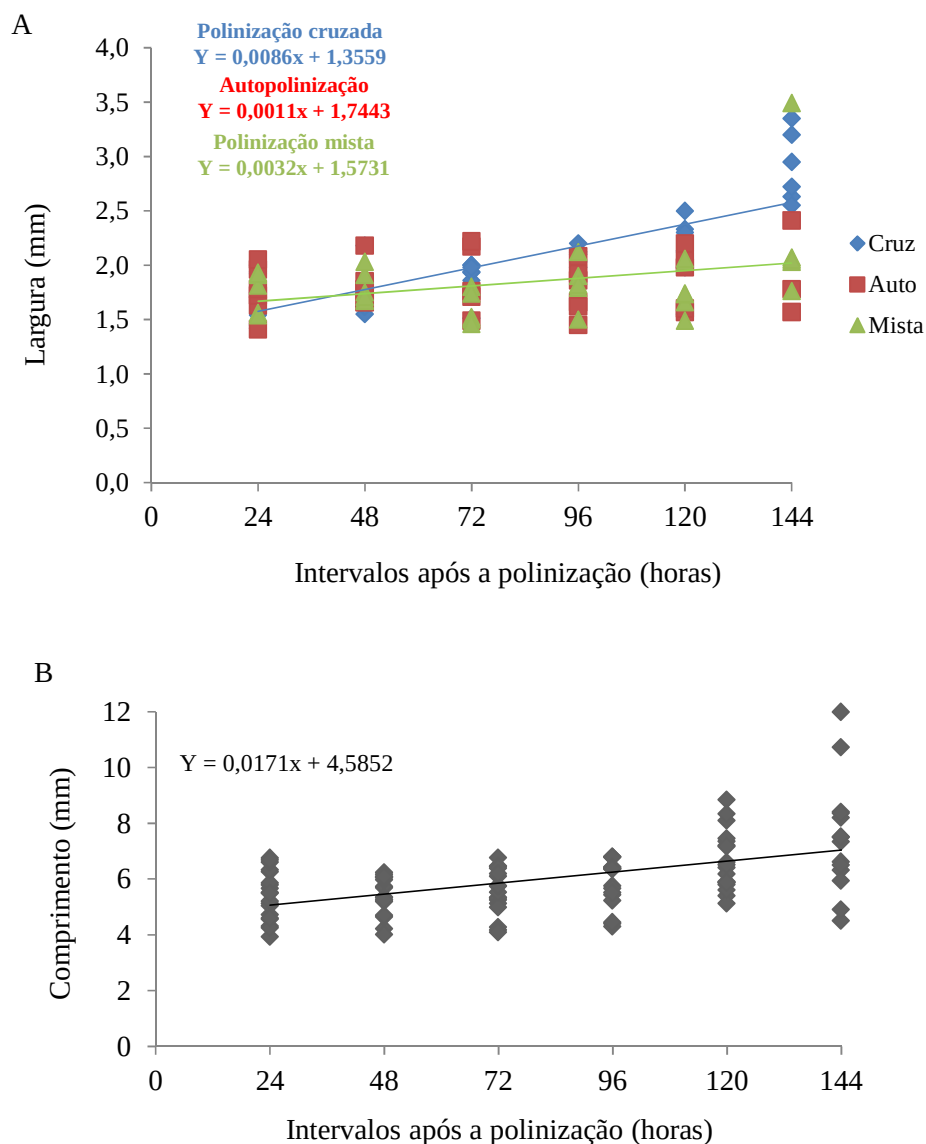


Figura 1. (A) largura dos ovários de pistilos submetidos aos tratamentos de polinização cruzada, autopolinização e polinização mista. Apenas os tratamentos de polinização cruzada e de polinização mista seguiram um modelo de regressão linear. (B) comprimento dos ovários em diferentes intervalos após as polinizações em *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore, localizada em Luziânia, Goiás.

Análise de Paternidade

Dos cinco frutos formados a partir de polinizações mistas na população de Luziânia, dois estavam se degenerando e não foram aproveitados. Das 192 sementes retiradas dos três frutos bem formados, apenas as sementes com embrião (n=78) foram colocadas para germinar.

Devido à qualidade do DNA de algumas plântulas, apenas 29 plântulas oriundas de um único fruto foram analisadas. A análise de paternidade mostrou que os prováveis doadores de pólen foram indivíduos distintos da planta mãe (Δ crítico = 0,00 com intervalo de confiança de 90%), ou seja, nenhuma plântula oriunda de autofecundação foi detectada.

Análise dos eventos pós- polinização

Caracterização do óvulo, dupla fecundação e início do desenvolvimento do endosperma

Os óvulos são anátropos, unitegumentados e o saco embrionário é do tipo *Polygonum* (Figuras 2A-C). Um conjunto de células diferenciadas na região calazal, as quais apresentam células de paredes espessas, pode ser considerada uma hipóstase (Figura 2A).

Independente dos tipos de tratamento de polinização, os óvulos apresentaram características semelhantes nos diferentes intervalos após as polinizações. Após o tubo polínico penetrar pela micrópila e descarregar o seu conteúdo citoplasmático na sinérgide, esta passou a apresentar uma coloração bastante escura (Figuras 2C, D). Observou-se a formação de uma alça citoplasmática na sinérgide penetrada, a qual apresenta aspecto granular e envolve o tubo pró-embriônico em sua extremidade calazal (Figuras 2D-F). A presença do núcleo primário do endosperma pôde ser observada 24 horas após a polinização (Figuras 2C, D) e as antípodas ainda permanecem íntegras no início do desenvolvimento do endosperma (Figura 2G).

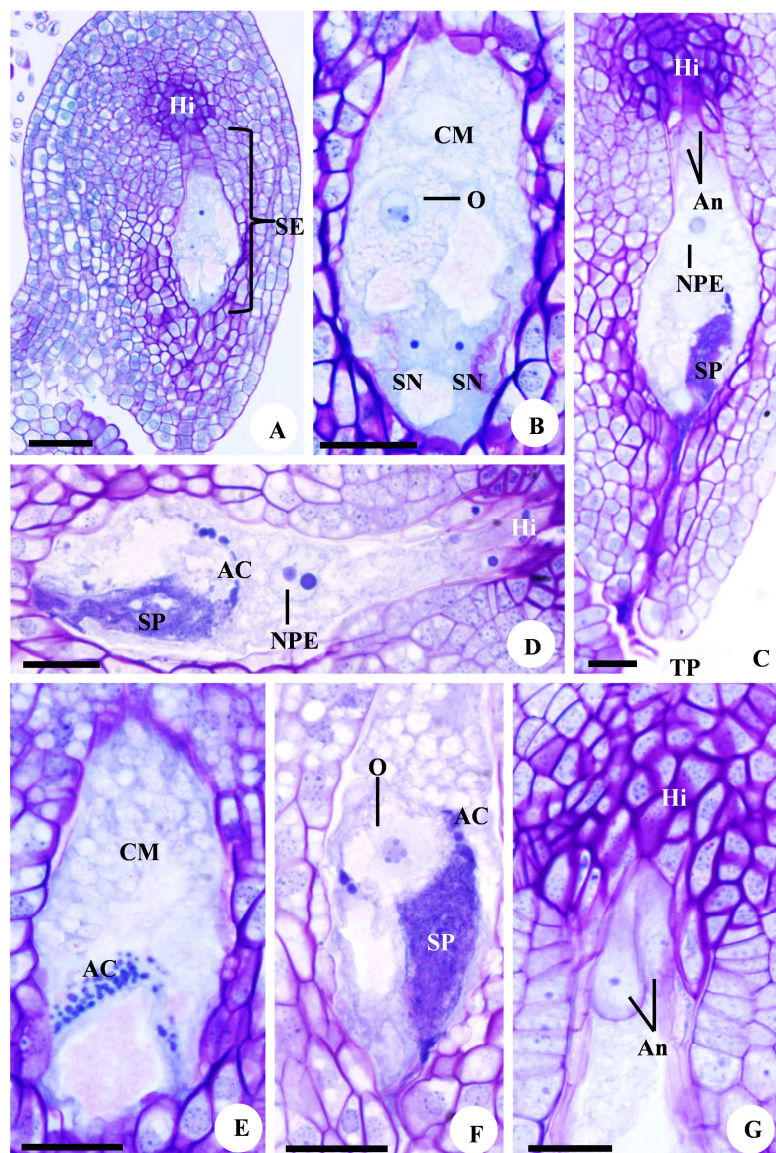


Figura 2. Secções longitudinais dos óvulos de pistilos coletados 24 horas após as polinizações em *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. (A) Aspecto geral do saco embrionário de pistilo submetido à polinização mista. (B) Saco embrionário de pistilo submetido à polinização mista com duas sinérgides não penetradas, oosfera e célula média aparente. (C) Pistilo submetido à autopolinização evidenciando o tubo polínico atravessando a micrópila e descarregando o seu conteúdo citoplasmático em uma das sinérgides. (D) Pistilo submetido à polinização cruzada evidenciando uma sinérgide penetrada, sua alça citoplasmática e o núcleo primário do endosperma. (E) Pistilo submetido à autopolinização evidenciando a alça citoplasmática granular. (F) Pistilo submetido à polinização cruzada evidenciando a alça citoplasmática de uma sinérgide penetrada envolvendo a oosfera/zigoto. (G) Pistilo submetido à autopolinização evidenciando as antípodas e as células diferenciadas da hipóstase. Legendas: An= Antípoda(s); AC= Alça Citoplasmática; CM= Célula Média; Hi= Hipóstase; NPE= Núcleo Primário do Endosperma; O= Oosfera; SE= Saco Embrionário; SN= Sinérgide Não Penetrada; SP= Sinérgide Penetrada; TP= Tubo Polínico. Barras=25µm (A-F) e 50 µm (G).

A partir de 48 horas após as polinizações observou-se a primeira divisão do núcleo primário do endosperma nos óvulos de pistilos submetidos a todos os tratamentos (Tabela 2). A cariocinese foi seguida de citocinese, sendo esta primeira divisão transversal, com uma célula voltada para região calazal e outra para região micropilar, originando um endosperma bicelular (Figura 3A). O segundo ciclo mitótico, geralmente longitudinal, também foi observado a partir deste intervalo, em que as divisões podem ocorrer simultaneamente ou não nas células das câmaras micropilar e calazal do endosperma. As divisões podem ser assincrônicas, formando um endosperma com três células (Figura 3B), ou sincrônicas, originando o endosperma com quatro células (Figura 3C).

O terceiro ciclo mitótico foi observado principalmente a partir de 72 horas após as polinizações, e geralmente ocorreu no par de células da região micropilar originando o endosperma de seis células (Tabela 2). Neste intervalo observou-se o tubo pró-embriônico adquirindo uma forma tubular, expandindo-se em meio ao endosperma em direção à região calazal (Figuras 3D, E). As próximas divisões do endosperma também são transversais e ocorrem nos pares centrais de células do endosperma (Figuras 3D, F). A partir do intervalo de 96 horas após as polinizações as duas células mais calazais do endosperma tornam-se bastante alongadas e adquirem um citoplasma denso, constituindo o haustório calazal do endosperma (Figura 3G).

Comparação dos eventos pós-polinização entre os diferentes tratamentos de polinização

Em 24 horas após as polinizações os pistilos já apresentavam óvulos penetrados e fecundados independentemente do tratamento (Tabela 2). No entanto, a incidência de óvulos penetrados e fecundados foi maior nos pistilos submetidos à polinização cruzada que nos outros dois tratamentos (Tabelas 2 e 3). No intervalo de 48 horas após as polinizações, os pistilos de autopolinização apresentaram mais óvulos com endosperma do que os pistilos

Tabela 2. Número e porcentagem de óvulos não penetrados, penetrados, fecundados e com endosperma em diferentes estádios de desenvolvimento em pistilos coletados de 24 a 144 horas após as polinizações experimentais em uma população de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore localizada em Luziânia, Goiás. Legendas: Cruz=pistilos submetidos à polinização cruzada; Auto=pistilos submetidos à autopolinização; Mista=pistilos submetidos à polinização mista; N Pen=óvulos não penetrados; Pen=óvulos penetrados; Fec=óvulos fecundados; E=óvulos com endosperma. Os números que seguem o E representam o número de células do endosperma. Foram utilizados três pistilos para cada tratamento e intervalo após as polinizações.

	Intervalos após as polinizações																	
	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h			144 h		
	Cruz	Auto	Mista	Cruz	Auto	Mista	Cruz	Auto	Mista	Cruz	Auto	Mista	Cruz	Auto	Mista	Cruz	Auto	Mista
N Pen	74 (43%)	91 (66%)	134 (87,6%)	75 (45,5%)	17 (10,1%)	66 (50,8%)	34 (23,6%)	35 (28,5%)	177 (95,2%)	10 (5,6%)	15 (7,8%)	81 (55,8%)	55 (40,7%)	6 (4,2%)	14 (7,8%)	31 (23%)	52 (42,3%)	52 (43,3%)
Pen	7 (4,0%)	2 (1,4%)	0	2 (1,2%)	5 (3%)	2 (1,5%)	1 (0,7%)	0	0	1 (0,6%)	1 (0,5%)	2 (1,4%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)	0	1 (0,7%)	1 (0,8%)	2 (1,7%)
Fec	91 (53%)	45 (32,6%)	19 (12,4%)	38 (23%)	43(25,4%)	11 (8,5%)	10 (6,9%)	11 (8,9%)	5 (2,6%)	4 (2,3%)	5 (2,6%)	4 (2,8%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	1 (0,6%)	0	1 (0,8%)	0
E2	0	0	0	10 (6,1%)	103 (60,9%)	25 (19,2%)	31 (21,5%)	29 (23,6%)	2 (1,1%)	11 (6%)	3 (1,5%)	8 (5,5%)	6 (4,4%)	3 (2,1%)	3 (1,7%)	2 (1,5%)	0	0
E3	0	0	0	20 (12,1%)	1 (0,6%)	18 (13,8%)	11 (7,7%)	9 (7,3%)	2 (1,1%)	5 (2,8)	13 (6,7%)	0	0	0	6 (3,3%)	0	0	0
E4	0	0	0	20 (12,1%)	0	6 (4,6%)	16 (11,1%)	25 (20,3%)	0	55 (31,1%)	53 (27,5%)	26 (17,9%)	18 (13,3%)	65 (45,1%)	24 (13,3%)	12 (8,9%)	3 (2,5%)	11 (9,2%)
E5	0	0	0	0	0	0	0	6 (4,9%)	0	7 (4%)	5 (2,6%)	0	1 (0,7%)	2 (1,4%)	5 (2,8%)	0	0	0
E6	0	0	0	0	0	2 (1,6%)	35 (24,3%)	8 (6,5%)	0	58 (32,8%)	83 (43%)	21 (14,5%)	27 (20%)	32 (22,2%)	69 (38,3%)	41 (30,4%)	41 (33,3%)	29 (24,2%)
E8	0	0	0	0	0	0	6 (4,2%)	0	0	24 (13,6%)	15 (7,8%)	3 (2,1%)	17 (12,6%)	27 (18,7%)	46 (25,6%)	35 (25,9%)	23 (18, 7%)	10 (8,3%)
E10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,6%)	0	0	4 (3%)	6 (4,2%)	7 (3,9%)	5 (3,7%)	2 (1,6%)	13 (10,8%)
E12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,6%)	0	0	4 (3%)	1 (0,7%)	5 (2,7%)	5 (3,7%)	0	2 (1,7%)
E14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (2,2%)	0	0
E16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,8%)
Total de óvulos	172	138	153	165	169	130	144	123	186	177	193	145	135	144	180	135	123	120

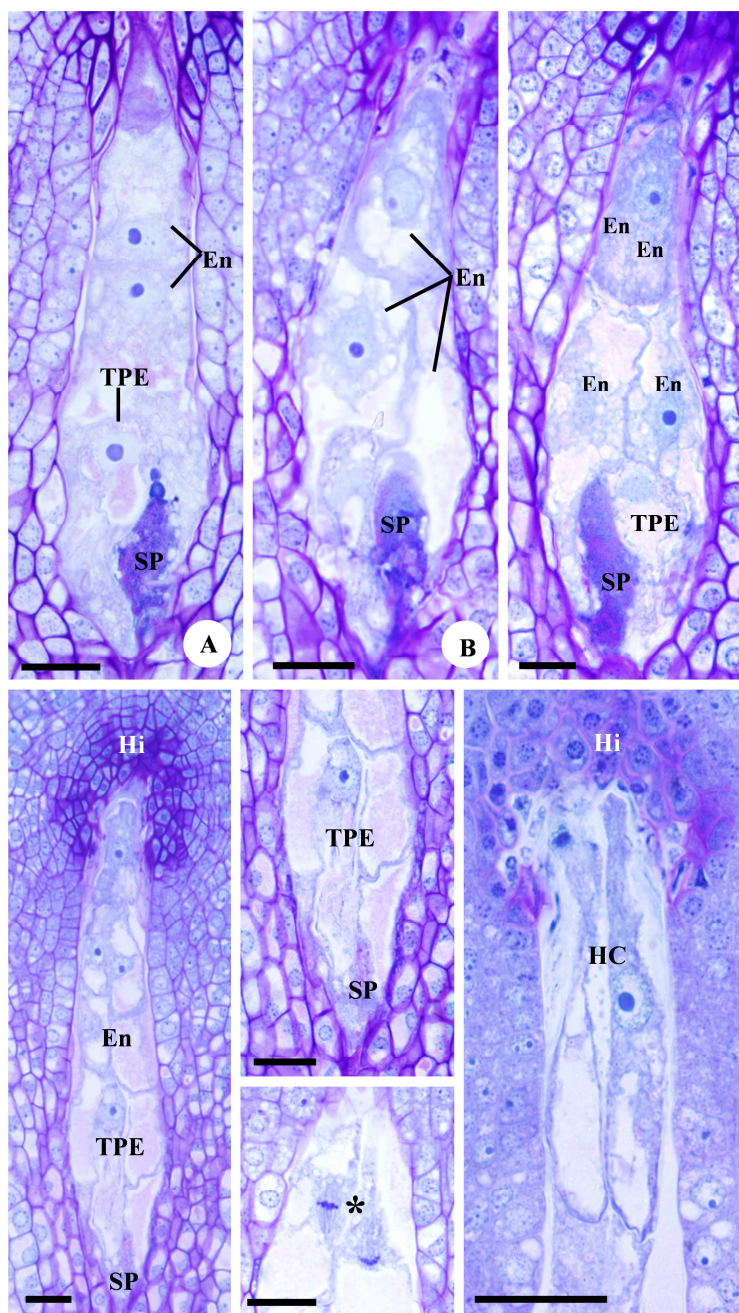


Figura 3. Secção longitudinal de óvulos e sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore localizada em Luziânia, Goiás nos intervalos de 48 horas (A-C), 72 horas (D-F) e 96 horas (G) após as polinizações. (A) Pistilo submetido à polinização cruzada evidenciando a sinérgide penetrada, o tubo proembriônico inicial e o endosperma com duas células. (B) Pistilo submetido à polinização mista evidenciando a sinérgide penetrada e três células do endosperma. (C) Pistilo submetido à polinização mista evidenciando o endosperma com quatro células. (D) Pistilo submetido à polinização cruzada com 9 células do endosperma e o tubo proembriônico. (E) Detalhe da figura D evidenciando o tubo proembriônico. (F) Pistilo submetido à polinização cruzada, onde nota-se a presença de duas células com placa metafásica (*). (G) Pistilo submetido à polinização cruzada evidenciando as duas células do haustório calazal. Legendas: An= Antípoda(s); En= Células do Endosperma; HC= Haustório Calazal; Hi= Hipóstase, SP= Sinérgide Penetrada; TPE= Tubo Proembriônico. Barras= 25μm.

Tabela 3. Valores do teste χ^2 e do teste Exato de Fisher (valor do p bilateral= pb) para as comparações dos estádios de desenvolvimento do óvulo que apresentaram resultados significativos entre os tratamentos de polinização cruzada, autopolinização e polinização mista para cada intervalo após as polinizações em pistilos coletados de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth & Hook. f. ex S. Moore em Luziânia, Goiás. ns = não significativo.

Intervalos após as polinizações e estádios de desenvolvimentos		Polinização cruzada X Autopolinização	Polinização cruzada X Polinização mista	Autopolinização X Polinização mista
24 h	Óvulos não penetrados vs. óvulos penetrados e fecundados	$\chi^2 = 16, 2, p < 0,0001$	$\chi^2 = 69,8, p < 0,0001$	$\chi^2 = 19,4, p < 0,0001$
48 h	Óvulos fecundados vs. óvulos com endosperma	$\chi^2 = 4, 7, p < 0,05$	$\chi^2 = 10, 7, p < 0,001$	ns
	Óvulos com endosperma de duas células vs. óvulos com endosperma de três células ou estádios posteriores	$\chi^2 = 107,9, p < 0,0001$	ns	$\chi^2 = 59,515, p < 0,0001$
72 h	Óvulos com endosperma de até quatro células vs. óvulos com endosperma com mais de quatro células	$\chi^2 = 10,9, p < 0,001$	pb=0,0016	ns
96 h	Óvulos com endosperma com menos de seis células vs. óvulos com endosperma com seis células ou estádios posteriores	ns	ns	$\chi^2 = 4,2, p < 0,05$
120 h	Óvulos com endosperma com menos de seis células vs. óvulos com endosperma de seis células ou estádios posteriores	$\chi^2 = 9, 6, p < 0,005$	ns	$\chi^2 = 26,2, p < 0,0001$
144 h	Óvulos com endosperma de oito células vs. óvulos com endosperma com mais de oito células	ns	$\chi^2 = 8,4, p < 0,05$	$\chi^2 = 15,99, p < 0,005$
	Óvulos com endosperma de dez células vs. óvulos com endosperma com mais de dez células	ns	pb < 0,05	ns

tratados por polinização cruzada e por polinização mista (Tabelas 2 e 3). Entretanto, a maioria dos óvulos de pistilos submetidos à polinização cruzada e polinização mista apresentava de três a quatro células do endosperma, enquanto 99% dos óvulos com endosperma de pistilos autopolinizados ainda estavam com duas células do endosperma (Tabelas 2 e 3) (Figuras 4A-C).

No intervalo de 72 horas após as polinizações, pistilos submetidos à polinização cruzada apresentavam mais óvulos com endospermas com mais de quatro células que os dos outros tratamentos (Tabelas 2 e 3) (Figuras 4A-C). Pistilos de polinização cruzada chegaram a apresentar óvulos com endosperma de até 8 células, enquanto que os de autopolinização apresentavam óvulos com endosperma de até 6 células (Figuras 4A, B).

Embora não tenha encontrado diferença significativa entre os tratamentos de polinização cruzada e autopolinização em 96 horas após as polinizações, os óvulos de pistilos submetidos à polinização cruzada chegaram a apresentar até 12 células do endosperma, enquanto que poucos óvulos de pistilos autopolinizados e de pistilos submetidos à polinização mista apresentavam no máximo 8 células do endosperma (Tabela 2) (Figuras 4A-C).

A partir de 120 horas após a polinização os óvulos de todos os tratamentos apresentavam até 12 células do endosperma (Tabela 2). Entretanto, pistilos submetidos à polinização cruzada e à polinização mista apresentavam mais óvulos com seis ou mais células do endosperma do que os óvulos de pistilos autopolinizados (Tabela 3) (Figuras 4A-C).

No último intervalo monitorado, 144 horas após as polinizações, os pistilos submetidos às polinizações cruzadas e mistas apresentavam óvulos de até 14-16 células do endosperma e pistilos de autopolinização apresentavam óvulos com no máximo 8 células do endosperma (Tabela 2). Embora não tenha havido diferença significativa entre o número de células do endosperma nos óvulos de pistilos submetidos à polinização cruzada e de pistilos autopolinizados, cerca de 50% dos óvulos com endosperma de pistilos de polinização cruzada

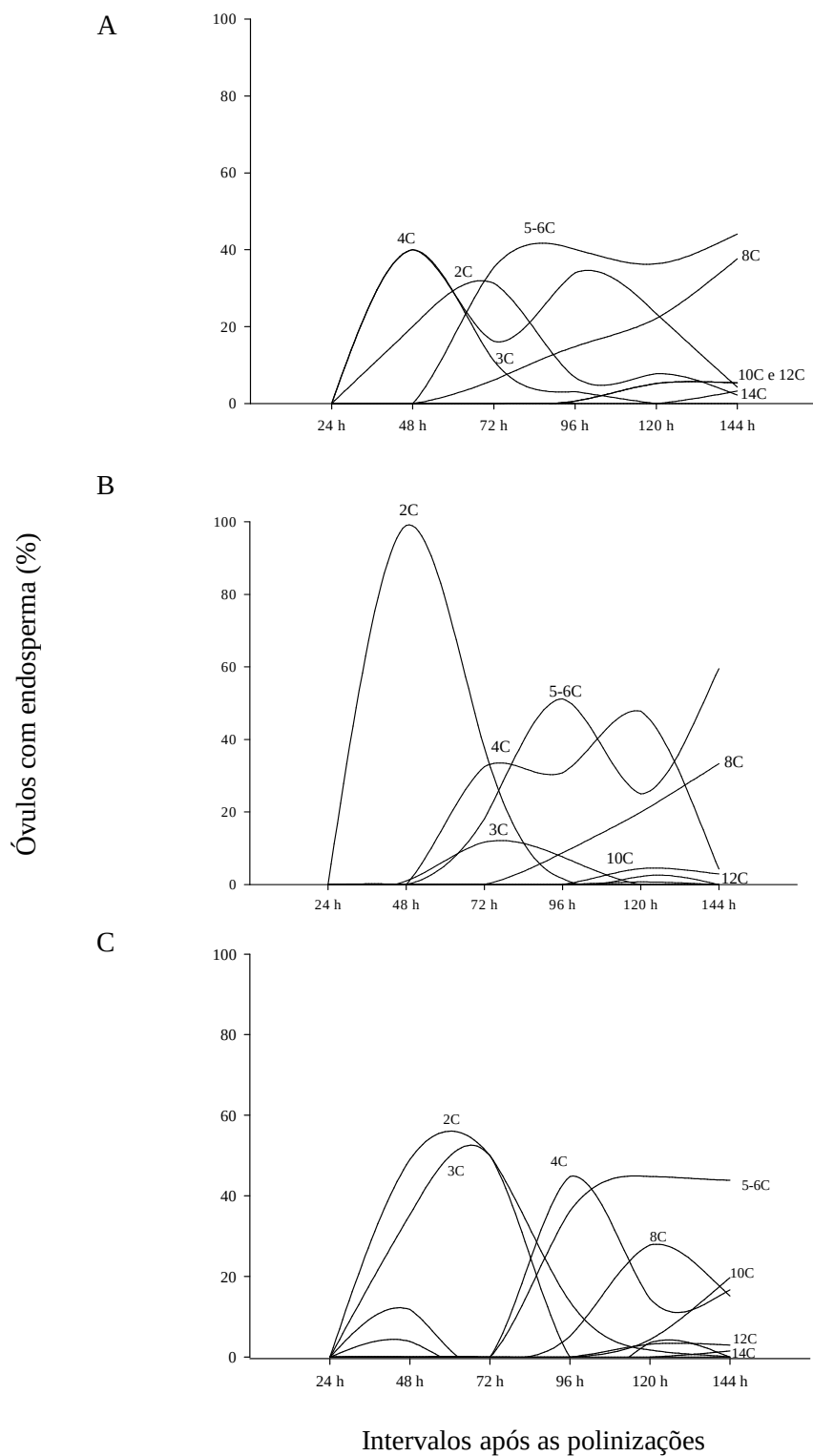


Figura 4. Porcentagem de óvulos com endosperma em sucessivos estádios de desenvolvimento ao longo de diferentes intervalos após as polinizações na população de Luziânia de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth & Hook. f. ex S. Moore. (A) pistilos submetidos à polinização cruzada, (B) pistilos submetidos à autopolinização e (C) pistilos submetidos à polinização mista. Os números seguidos pela C sobre as linhas indicam o número de células do endosperma.

apresentavam oito ou mais células, enquanto que apenas 35% dos óvulos com endosperma de pistilos autopolinizados apresentavam oito ou mais células (Tabela 2) (Figuras 4A, B). Os pistilos submetidos à polinização mista apresentavam mais óvulos com oito ou mais células do endosperma do que os pistilos dos outros tratamentos (Tabela 3) (Figuras 4A-C).

Discussão

Sistema reprodutivo

Tabebuia aurea se mostrou autoestéril em ambas às populações como verificado em outros estudos de polinização experimental (Gibbs & Bianchi 1993, Barros 2001) e como verificado para a maioria das espécies de Bignoniaceae (Bittencourt Jr. et al. 2003, Bittencourt Jr. & Semir 2005, Maués et al. 2008, Gandolphi & Bittencourt Jr. 2010). Embora tenha-se observado uma taxa de formação de frutos bem inferior em polinizações mistas do que em polinizações cruzadas na população de Luziânia, não houve diferença em relação ao tamanho dos frutos, o número de sementes por fruto e à porcentagem de sementes com embrião entre estes tratamentos.

Um número elevado de abortos em pistilos provenientes de polinizações mistas também foi encontrado para outras espécies que apresentam AIT, como na Bignoniaceae, *Campsis radicans* (Bertin & Sullivan 1988), e nas Malvaceae-Bombacoideae *Ceiba pentandra* (Gribel et al. 1999) e *Pseudobombax munguba* (Gribel & Gibbs 2002). Nestas espécies observou-se que os tubos polínicos provenientes de autopolinizações chegavam ao ovário e penetravam os óvulos ao mesmo tempo em que os tubos polínicos provenientes de polinizações cruzadas. Logo, a maioria dos óvulos poderia ter sido penetrada por autopólen, levando à abscisão destes pistilos, o que justificaria a baixa formação de frutos de polinizações mistas nestas espécies.

Entretanto, era de se esperar quantidades semelhantes de frutos formados por polinizações mistas em relação ao número de frutos formados por polinizações cruzadas em *T. aurea*, já que às análises de crescimento dos tubos polínicos revelaram que os tubos de polinização cruzada atingiram o ovário mais cedo que os tubos de autopolinizações na população de ESECAE. Além disso, houve uma maior incidência de óvulos penetrados e fecundados em 24 horas após as polinizações por tubos polínicos de polinização cruzada que por tubos de autopolinizações na população de Luziânia. Em outra espécie com AIT, *Ceiba chodatii* (Malvaceae-Bombacoideae), os tubos polínicos de polinizações cruzadas também foram mais velozes, no entanto, observou-se um menor número de sementes formadas em frutos de polinizações mistas em relação ao número de sementes de frutos de polinizações cruzadas (Gibbs et al. 2004).

A baixa taxa de frutificação por polinização mista encontrada para *T. aurea* poderia ser explicada pela interação entre os tubos polínicos compatíveis e incompatíveis, que segundo Gibbs et al. (2004), os tubos polínicos incompatíveis (autópólen), que geralmente são mais lentos, teriam a taxa de crescimento aprimorada, e os tubos compatíveis (pólen cruzado), geralmente mais rápidos, teriam a taxa de crescimento prejudicada, o que levaria a penetração de vários óvulos por tubos polínicos incompatíveis (Gibbs et al. 2004). Ou, no caso de *T. aurea* esta interação entre os tubos polínicos prejudicou o crescimento de ambos os tubos, no qual poucos conseguiram penetrar e fecundar os óvulos, e assim levando ao aborto destes pistilos.

Os ovários de pistilos de polinizações cruzadas apresentaram maior comprimento em relação aos ovários de pistilos autopolinizados e pistilos submetidos a polinizações mistas, bem como maior largura a partir de 144 horas após as polinizações. Indicando que os efeitos do sistema de autoincompatibilidade foram verificados a partir do quinto dia após a polinização e acarretando a abscisão destes pistilos, como também foi observado em

Tabebuia roseo alba (Gandolphi & Bittencourt Jr. 2010) e *Cybistax antisiphilitica* (Bittencourt Jr. et al. 2011). Como os pistilos de polinização mista se comportam como os de autopolinização quanto a este aspecto, é possível que um maior número de óvulos não foi fecundado, impedindo que os ovários crescessem tanto quanto os de polinização cruzada.

Análise de paternidade

O teste de paternidade revelou que as progênes analisadas foram oriundas de fecundação cruzada. No entanto, a extrapolação destes resultados deve ser analisada com cautela, devido ao baixo número de progênes analisadas. Também deve-se levar em consideração que as sementes que não germinaram poderiam ser oriundas de óvulos autofecundados, como encontrado para *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae), em que as sementes abortadas de frutos produzidos por polinização natural eram provenientes de autofecundação (Collevatti et al. 2009).

A flexibilidade no sistema de autoincompatibilidade e a tendência de um possível sistema reprodutivo misto foram encontradas em várias espécies que apresentam AIT, com taxas variáveis de progênes resultantes de autofecundação. Em *Campsis radicans* (Bignoniaceae) os autores encontraram em frutos decorrentes de polinização mista até 33% de sementes autofecundadas viáveis (Bertin & Sullivan 1988). Para *Ceiba pentrandia* (Malvaceae-Bombacoideae) a taxa de sementes autofecundadas foi menor que 2% em frutos decorrentes de polinização mista (Gribel et al. 1999). Em *Pseudobombax munguba* (Malvaceae-Bombacoideae) os autores encontraram uma taxa variável de 0 a 22% de sementes autofecundadas viáveis (Gribel & Gibbs 2002). Para *T. aurea* (ESECAE) proporções de 20 a 42,5% de progênes oriundas de autofecundação foram encontradas em frutos formados por polinizações naturais (Braga & Collevatti 2011). Como foram detectadas progênes oriundas de autofecundação na população de ESECAE (Braga & Collevatti 2011),

no entanto neste estudo os tratamentos de polinizações experimentais não desenvolveram nenhum fruto por polinização mista é provável que a autofertilidade críptica não ocorra desta população.

Análises histológicas dos eventos pós-polinização

Tabebuia aurea apresentou óvulos com características comuns a todos os tratamentos de polinizações no que se refere à penetração, fecundação e desenvolvimento do endosperma. A endospermogênese é do tipo celular como relatado para as outras Bignoniaceae investigadas (Gibbs & Bianchi 1993, Bittencourt Jr et al. 2003, Sampaio et al. 2007, Gandolphi & Bittencourt Jr. 2010, Sampaio et al. 2013).

Uma alta proporção de óvulos de pistilos submetidos à polinização mista que não estavam penetrados nos intervalos após as polinizações (exceto para 96 e 120 horas após as polinizações) foi observada. Neste caso, a interação entre os tubos polínicos em pistilos submetidos à polinização mista poderia ser a explicação mais plausível para ter limitado a fecundação nestes óvulos. Nos intervalos de 48, 120 e 144 horas após as polinizações os pistilos submetidos à polinização cruzada e à polinização mista apresentaram maiores semelhanças quanto ao número de células do endosperma, indicando que a maioria dos óvulos de pistilos submetidos à polinização mista pode ter sido penetrada por pólen cruzado.

Ao longo dos intervalos após as polinizações, os pistilos de polinização cruzada apresentaram mais óvulos em estádios adiantados no desenvolvimento do endosperma do que os óvulos de pistilos submetidos à autopolinização. O desenvolvimento mais lento do endosperma em óvulos oriundos de autofecundação e sem sinais de malformações são evidências de que um sistema de autoincompatibilidade de ação tardia deva estar atuando em detrimento à presença de depressão endogâmica (Bittencourt Jr. et al. 2003). Diferente do encontrado para as espécies que apresentam a AIT, a depressão endogâmica pode ocorrer em

diferentes fases após a fecundação, podendo se esperar malformações durante o desenvolvimento das sementes e também pelo baixo vigor das progênes (Chang & Rausher 1998, Hufford & Hamrick 2003, Goodwillie & Knight 2006).

Os resultados encontrados neste estudo confirmaram que *T. aurea* é uma espécie autoestéril, e as análises da população de Luziânia confirmaram a ocorrência da autoincompatibilidade de ação tardia, indicando que a fecundação cruzada é a principal forma de reprodução desta espécie. A flexibilidade do AIT pode ocorrer em alguns casos, formando frutos com uma proporção baixa de sementes provenientes de autofecundação (Bertin & Sullivan 1989, Gibbs et al. 1999, Bianchi et al. 2005, Braga & Collevatti 2011), no entanto, no presente estudo não foi possível confirmar esta flexibilidade no sistema de AIT na população de Luziânia.

Os tratamentos de polinização mista na população de Luziânia juntamente com as análises do desenvolvimento do endosperma e do teste de paternidade indicaram que os grãos de pólen de polinizações cruzadas são mais eficazes na formação de frutos viáveis. Já na população da ESECAE as progênes oriundas de autofecundação detectadas em outro estudo (Braga & Collevatti 2011) devem estar relacionadas à presença de alguns indivíduos com autocompatibilidade parcial em meio a uma população autoestéril, mas que não parecem ter sido amostrados no presente estudo.

Referências bibliográficas

- Ayres, M.; Ayres Jr., M.; Ayres, D.L. & Santos, A.A. 2007. **Bioestat** - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA.
- Barros, M.G. 2001. Pollination ecology of *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. and *T. ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae) in Central Brazil Cerrado vegetation. **Revista Brasileira de Botânica** 24: 255-261.

- Bertin, R.I. & Sullivan, M. 1988. Pollen interference and cryptic self-fertility in *Campsis radicans*. **American Journal of Botany** 75: 1140-1147.
- Bertin, R.I.; Barnes, C. & Guttman, S.I. 1989. Self-sterility and cryptic self-fertility in *Campsis radicans* (Bignoniaceae). **Botanical Gazette** 150: 397-403.
- Bianchi, M.B.; Harris, S.A.; Gibbs, P.E. & Prado, D.E. 2005. A study of the mating system in *Dolichandra cynanchoides* (Bignoniaceae): an Argentinian Chaco woodlands liana with a late-acting self-incompatibility. **Plant Systematics and Evolution** 251: 173-181.
- Bittencourt Jr., N.S.; Gibbs, P.E. & Semir, J. 2003. Histological study of post-pollination events in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), a species with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany** 91: 827-834.
- Bittencourt Jr., N.S. & Semir, J. 2005. Late-acting, self incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Sciences** 166: 493-506.
- Bittencourt Jr., N.S.; Pereira Jr., E.J.; São-Thiago, P.S. & Semir, J. 2011. The reproductive biology of *Cybistax antisiphilitica* (Bignoniaceae), a characteristic tree of the South American savannah-like “Cerrado” vegetation. **Flora** 206: 872- 886.
- Braga, A.C.; Reis, A.M.M.; Leoi, L.T.; Pereira, R.W. & Collevatti, R.G. 2007. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology** 7: 53-56.
- Braga, A.C. & Collevatti, R.G. 2011. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity** 106: 911-919.
- Chang, S. & Rausher, M.D. 1998. The Role of Inbreeding depression in maintaining the mixed mating system of the common morning glory, *Ipomoea purpurea*. **Evolution** 53: 1366-1376.

- Collevatti, R.G.; Estolano, R.; Garcia, S.F. & Hay, J.D. 2009. Seed abortion in the bat pollinated Neotropical tree species, *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). **Botany** 87: 1110-1115.
- De Nettancourt, D. 1977. **Incompatibility in angiosperms**. Berlin. Springer. 230p.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19: 11-15.
- Feder, N. & O'Brien, T.P. 1968. Plant microtechnique, some principles and new methods. **American Journal of Botany** 55: 123-142.
- Ferreira, D.F. 2010. **Sisvar** - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-Mg:Ufla.
- Gandolphi, G. & Bittencourt Jr., N.S. 2010. Sistema reprodutivo do Ipê-Branco – *Tabebuia roseo- alba*. (Ridley) Sandwith. **Acta Botanica Brasilica** 24: 840-851.
- Gentry, A.H. 1992. Bignoniaceae - Part. II. (Tribe Tecomae). Monograph. **Flora Neotropica** 25: 1-370.
- Gerrits, P.O. & Smid, L. 1983. A new, less toxic polymerisation system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy** 132: 81-85.
- Gibbs, P.E. & Bianchi, M.B. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta** 106: 64-71.
- Gibbs, P.E. & Bianchi, M.B. 1999. Does Late-acting self-incompatibility (LSI) Show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany** 84: 449-457.
- Gibbs, P.E.; Bianchi, M.B. & Ranga, N.T. 2004. Effects of self-, chase and mixed self/cross-pollinations on pistil longevity and fruit set in *Ceiba* species (Bombacaceae) with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany** 94: 305-310.

- Goodwillie, C.; Kalisz, S. & Eckert, C.G. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating system in plants occurrence, theoretical, explanations, and empirical evidence. **Annals Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 36: 47-79.
- Goodwillie, C. & Knight, M.C. 2006. Inbreeding depression and mixed mating in *Leptosiphon jepsonii*: A comparison of three populations. **Annals of Botany** 98: 351-360.
- Gribel, R.; Gibbs, P.E. & Queiroz, A.L. 1999. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. **Journal of Tropical Ecology** 15: 247–263.
- Gribel, R. & Gibbs, P.E. 2002. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). **International Journal of Plant Sciences** 163: 1035–1043.
- Hufford, K.M. & Hamrick, L.L. 2003. Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). **Evolution** 57: 518–526.
- Kalinowski, S.T.; Taper, M.L. & Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology** 16: 1099-1106.
- Kalisz, S.; Vogler, D.W. & Hanley, K.M. 2004. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. **Nature** 430: 884-886.
- Lipow, S.R. & Wyatt, R. 2000. Single gene control of postzygotic self-incompatibility in poke milkweed, *Asclepias exaltata* L. **Genetics** 154: 893-907.
- Lorenzi, H. 2002. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP. 368p.

- Marshall, T.C.; Slate, J.; Kruuk, L.E.B. & Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology** 7: 639-655.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain. Technology** 34: 125-128.
- Maués, M.M.; Oliveira, P.E.A.M. & Kanashiro, M. Pollination biology in *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don. (Bignoniaceae) at the “Floresta Nacional do Tapajós”, Central Amazon, Brazil. 2008. **Revista Brasileira de Botânica** 31: 517-527.
- Mc Dowell, E.M. & Trump, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine** 100: 405-414.
- Murawski, D.A.; Dayanandan, B. & Bawa, K.S. 1994. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri lankan tropical rain forests. **Biotropica** 26: 23-29.
- Rausher, M.D. & Chang, S.M. 1999. Stabilization of mixed-mating systems by differences in the magnitude of inbreeding depression for male and female fitness components. **The American Naturalist** 154: 242-248.
- Sage, T.L.; Bertin, R.I. & Williams, E.G. 1994. Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. In Williams, E.G.; Clarke, A.E. & Knox, R.B. (Eds.). **Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp:116-140.
- Sampaio, D.S.; Costa, M.E. & Paoli, A.P.S. 2007. Ontogenia da semente de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 30: 289-302.
- Sampaio, D.S.; Bittencourt Jr., N.S. & Oliveira, P.E. 2013. Mating in the pseudogamic apomictic *Anemopaegma acutifolium* DC: Another case of pseudo-self-compatibility in Bignoniaceae? **Plant Biology** 15: 919-924.

Seavey, S.F. & Bawa, K.S. 1986. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. **Botanical Review** 52: 195-218.

Stephenson, A.G.; Good, S.V. & Vogler, D.W. 2000. Interrelationships among inbreeding depression, plasticity in the self-incompatibility system, and the breeding system of *Campanula rapunculoides* L. (Campanulaceae). **Annals of Botany** 85: 211-219.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos neste estudo mostraram que as três espécies são autoestéreis com autoincompatibilidade de ação tardia, como relatado em outros trabalhos (Gibbs & Bianchi 1993, Barros 2001, Sampaio 2010). As espécies estudadas formaram frutos decorrentes de polinização mista, como encontrado para outras espécies com AIT (Bertin & Sullivan 1988, Gribel & Gibbs 2002, Gibbs et al. 2004). No entanto, a taxa de frutificação por este tipo de polinização foi relativamente baixa quando comparada à frutificação por polinização cruzada nas três espécies.

A menor germinabilidade das sementes de polinizações mistas em *Adenocalymma peregrinum* indica a presença de sementes autofecundadas, as quais estariam sofrendo os efeitos da depressão endogâmica. Esses dados indicam que embora possa haver alguma flexibilidade do AIT, permitindo a formação de sementes autofecundadas, a depressão endogâmica parece evitar que estas sementes deem origem a plântulas viáveis e capazes de se estabelecer.

Como os tubos polínicos de autopolinização e polinização cruzada em *F. platyphylla* e *A. peregrinum* parecem apresentar a mesma velocidade de crescimento para atingir o ovário (Sampaio 2010), a grande proporção de óvulos autofecundados levaria a uma maior taxa de aborto dos pistilos de polinização mista nesta espécie. Por outro lado, análises do crescimento de tubos polínicos mostraram que os tubos de polinização cruzada chegam mais cedo ao ovário que os de autopolinização em *T. aurea*. Provavelmente, os frutos resultantes de polinização mista que se desenvolveram e chegaram à maturidade devem apresentar um maior número de sementes oriundas de fecundação cruzada, o que é corroborado pelo desenvolvimento inicial mais rápido do endosperma e pela análise de paternidade. Embora os tubos de polinização cruzada sejam mais velozes para atingir o ovário, algum tipo de

interação entre os tubos dos diferentes tratamentos parece prejudicar a penetração e fecundação dos óvulos como um todo em *T. aurea*, de forma que o baixo número de óvulos fecundados nestes pistilos submetidos à polinização mista seria responsável pelo seu aborto.

A ocorrência de polinizações mistas, a qual deve ser bastante frequente na natureza (Bianchi et al. 2005), pode ser uma das causas da baixa frutificação natural nas espécies de Bignoniaceae. O que poderia ocorrer tanto pela elevada proporção de óvulos autofecundados, quanto pela interação entre tubos polínicos que impediria a fecundação da maioria dos óvulos, em que ambas às situações levariam ao aborto dos pistilos submetidos à polinização mista.

Embora a flexibilidade do AIT diante de polinizações mistas tenha sido verificada em algumas espécies (Bertin & Sullivan 1988, Gribel et al. 1999), a polinização mista em proporções de 1:1, mostrou-se pouco eficiente na produção de frutos viáveis e sementes autofecundadas em *T. aurea*. Dessa forma, a autofertilidade críptica nesta espécie não parece ser o principal fator que possa explicar a presença da elevada taxa de plântulas autofecundadas encontradas na população de ESECAE em outro estudo.

Referências bibliográficas

- Barros, M.G. 2001. Pollination ecology of *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. and *T. ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae) in Central Brazil Cerrado vegetation. **Revista Brasileira de Botânica** 24: 255-261.
- Bertin, R.I & Sullivan, M. 1988. Pollen interference and cryptic self-fertility in *Campsis radicans*. **American Journal of Botany** 75: 1140-1147.
- Bianchi, M.B.; Harris, S.A.; Gibbs, P.E. & Prado, D.E. 2005. A study of the mating system in *Dolichandra cynanchoides* (Bignoniaceae): an Argentinian Chaco woodlands liana with a late-acting self-incompatibility. **Plant Systematics and Evolution** 251: 173-181.

- Gibbs, P.E. & Bianchi, M.B. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta** 106: 64-71.
- Gibbs, P.E.; Bianchi, M.B. & Ranga, N.T. 2004. Effects of self-, chase and mixed self/cross-pollinations on pistil longevity and fruit set in *Ceiba* Species (Bombacaceae) with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany** 94: 305-310.
- Gribel, R.; Gibbs, P.E. & Queiroz, A.L. 1999. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. **Journal of Tropical Ecology** 15: 247–263.
- Gribel, R. & Gibbs, P.E. 2002. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). **International Journal of Plant Sciences** 163: 1035–1043.
- Sampaio, D.S. 2010. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil.