

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

**«O GÊNERO *DAHLSTEDTIA* MALME: EMBRIOLOGIA, SISTEMA
REPRODUTIVO E BIOSISTEMÁTICA»**

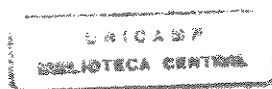
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Simone de Pádua Teixeira
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Neusa Taroda Ranga

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
como parte dos requisitos necessários para
a obtenção do título de doutor em Biologia
Vegetal.

SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. NEUSA TARODA RANGA

2001



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	T235g
V.	Ex. 1
TOMBO BC	46043
PROC.	16-392/04
C	☐
D	☒
PREC.	2811,00
DATA	16-08-04
N.º CPD	

CM00158803-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Teixeira, Simone de Pádua

T235g

O gênero *Dahlstedtia* Malme: embriologia, sistema reprodutivo e biosistemática/Simone de Pádua Teixeira. -- Campinas, S.P. [s.n.], 2001.

146f: illus.

Orientadora: Neusa Taroda Ranga

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Anatomia. 2. Reprodução. 3. Leguminosae. 4. Embriologia.
I. Ranga, Neusa Taroda. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 25 de maio de 2001.

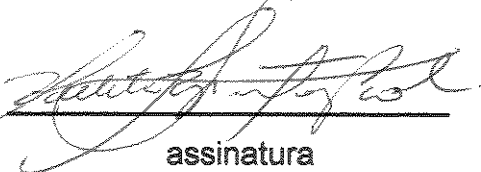
BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Neusa Taroda Ranga (Orientadora)



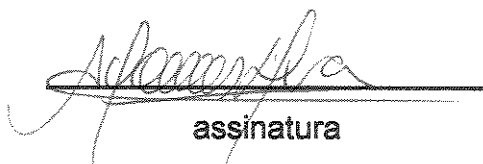
assinatura

Profa. Dra. Adelita Ap. Sartori Paoli



assinatura

Prof. Dr. Ary Gomes da Silva



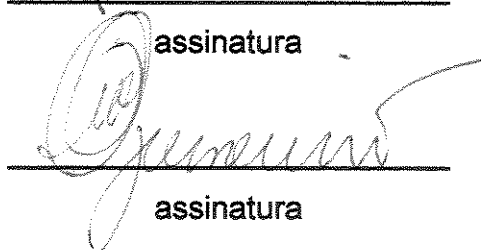
assinatura

Profa. Dra. Milene Faria Vieira



assinatura

Profa. Dra. Sandra M. Carmello Guerreiro



assinatura

Profa. Dra. Ana Maria G. A. Tozzi



assinatura

Profa. Dra. Eliana R. Forni Martins



assinatura

Dedico todo o meu trabalho de doutorado
ao Prof. Dr. Antonio Carlos Gabrielli

Todo o meu amor e a minha admiração por
Rodrigo A. Santinelo Pereira

Agradeço a

Deus.

Profa. Dra. Neusa Taroda Ranga, pela orientação da tese, pela confiança no meu trabalho e pela amizade em todos os momentos do meu doutoramento.

Prof. Dr. Nallamilli Prakash, pela disponibilidade em auxiliar na interpretação e discussão dos resultados de embriologia e por me fornecer condições de trabalho na Universidade de "New England", na Austrália.

Profa. Dra. Eliana R. Forni-Martins, pela discussão do projeto de doutorado, pelo auxílio com as técnicas, a interpretação e a discussão dos resultados citológicos e por participar como membro da banca da tese.

Capes e CNPq pela concessão do primeiro ano e meio de bolsa de doutoramento e a Fapesp (processo nº 97/11242-0) pela concessão de dois anos e meio de bolsa e pelo financiamento do projeto de doutorado.

CATI, Esalq, IAC, IF (núcleos de Picinguaba e Intervalos) e aos responsáveis pelo edifício Tambaqui (Campinas), por permitirem a coleta de materiais das espécies encontradas nestes locais.

Prof. Dr. Ary Gomes da Silva e Profa. Dra. Milene Faria Vieira pela colaboração na discussão do projeto, na fase de pré-banca e por aceitarem participar como membros da banca desta tese.

Profa. Dra. Sandra M. Carmello Guerreiro pela colaboração na pré-banca e participação na banca desta tese.

Profa. Dra. Adelita Ap. Sartori e Profa. Dra. Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi por aceitarem participar como membros da banca da tese.

Dr. Volker Bittrich pela discussão do projeto de doutorado.

Prof. Dr. Fernando Roberto Martins, Prof. Dr. João Semir e Profa. Dra. Marília de Moraes Castro por participarem como membros da banca de qualificação.

Todos os demais professores do Departamento de Botânica.

NAP/MEPA – Esalq e Laboratórios de Microscopia Eletrônica do IB, Unicamp, pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Rodrigo Augusto Santinelo Pereira pelo auxílio na coleta do material botânico, na confecção dos gráficos, nas análises estatísticas e pelas opiniões sensatas em vários aspectos da discussão da tese.

Cirlene Ap. de Pádua Teixeira, por me auxiliar na escolha de vocábulos que melhor se aplicassem no texto.

Todos os funcionários do Departamento de Botânica, em especial Sebastião Henrique Militão Júnior, Iara de Fátima Bresser e Maria Lúcia Pinto.

Todos os alunos, professores e funcionários da Universidade de "New England", Armidale, Austrália.

Ângela, Carolina Engler e Esmeralda Borghi pela confecção das ilustrações da tese.

Adriano, Aloysio, Andréa Barbosa, Cibele, Irani, Ivone, Luciana e Valeska pelo auxílio na coleta de material botânico.

Dedéia e Valéria por tão gentilmente me abrigarem em São José do Rio Preto e Fatinha, por ter cuidado da minha casa durante o período em que estive fora do país.

Todos os meus colegas do curso de pós-graduação em Biologia Vegetal.

Toda minha família, em especial minha mãe, Cirlene, meus irmãos, Maysa, Aloysio e Claryssa, sr. Valdir e meus tios Irani, Simone e Eliseu.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
RESUMO DA TESE	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Capítulo I: Desenvolvimento floral e seus efeitos no processo reprodutivo de <i>Dahlstedtia pinnata</i> e <i>D. pentaphylla</i> (Leguminosae, Papilionoideae)	
Resumo	7
Introdução	8
Materiais e métodos	9
Resultados	10
Discussão	14
Capítulo II: Microsporogênese e citologia do grão de pólen em <i>Dahlstedtia</i> <i>pinnata</i> e <i>D. pentaphylla</i> (Leguminosae, Papilionoideae)	
Resumo	40
Introdução	41
Materiais e métodos	42
Resultados	44
Discussão	46
Capítulo III: Desenvolvimento do óvulo e dos primeiros estádios da semente e sua relação com o aborto de sementes em <i>Dahlstedtia pinnata</i> e <i>D.</i> <i>pentaphylla</i> (Leguminosae, Papilionoideae)	
Resumo.....	62
Introdução	63
Materiais e métodos	64
Resultados	65
Discussão	69
Capítulo IV: Efeito dos componentes de fecundidade no processo reprodutivo de <i>Dahlstedtia pentaphylla</i> (Leguminosae, Papilionoideae)	
Resumo	90
Introdução	91
Materiais e métodos	92
Resultados	94
Discussão	98

Capítulo V: Estudos da distribuição geográfica e de seus efeitos no processo reprodutivo de *Dahlstedtia pinnata* e *D. pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoideae)

Resumo	104
Introdução	105
Materiais e métodos	106
Resultados	107
Discussão	115
CONSIDERAÇÕES FINAIS	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Flores papilionáceas das espécies de <i>Dahlstedtia</i>	25
Figura 2. Morfologia externa da flor papilionácea de <i>Dahlstedtia</i>	27
Figura 3. Desenvolvimento floral de <i>D. pinnata</i> (Fotomicrografias de MEV)	29
Figura 4. Desenvolvimento floral de <i>D. pentaphylla</i> (Fotomicrografias de MEV).	
Organogênese	31
Figura 5. Desenvolvimento floral de <i>D. pentaphylla</i> (Fotomicrografias de MEV)	33
Figura 6. Cortes longitudinais da flor em desenvolvimento em <i>D. pentaphylla</i>	35
Figura 7. Estruturas secretoras nas peças florais em <i>D. pentaphylla</i>	37
Figura 8. Cortes transversais de botões florais na altura das anteras mostrando a distribuição das cavidades secretoras no cálice e nas pétalas em <i>Dahlstedtia</i>	39

Capítulo 2

Figura 1. Índices meióticos em indivíduos de <i>D. pinnata</i> e <i>D. pentaphylla</i>	46
Figura 2. Microsporogênese em <i>Dahlstedtia</i>	57
Figura 3. Fotomicrografias de MEV dos grãos de pólen de <i>Dahlstedtia</i>	59
Figura 4. Observações citológicas em <i>Dahlstedtia</i>	61

Capítulo 3

Figura 1. Seções longitudinais da estrutura do óvulo em diferentes estádios de desenvolvimento em <i>Dahlstedtia</i>	79
Figura 2. Seções longitudinais mostrando os tecidos ovulares após os diferentes tratamentos de polinização	81
Figura 3. Germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em <i>D. pinnata</i>	83
Figura 4. Germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em <i>D. pentaphylla</i>	85
Figura 5. Óvulos de <i>D. pentaphylla</i> observados em Nomarski DIC	87
Figura 6. Envoltório da semente: estádios iniciais do desenvolvimento	89

Capítulo 4

Figura 1. Proporção de óvulos em degeneração no ovário de <i>D. pentaphylla</i>	96
Figura 2. Proporção de sementes em desenvolvimento no fruto em <i>D. pentaphylla</i>	97

Capítulo 5

Figura 1. Mapa da distribuição geográfica das espécies de <i>Dahlstedtia</i>	121
Figura 2. Mapa da distribuição geográfica das espécies de <i>Dahlstedtia</i> no Estado de São Paulo	123
Figura 3. Distribuição das duas espécies de <i>Dahlstedtia</i> por altitude	108
Figura 4. Germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em <i>D. pentaphylla</i> x <i>D. pinnata</i>	125
Figura 5. Crescimento do tubo polínico em <i>D. pinnata</i> x <i>D. pentaphylla</i>	127
Figura 6. Corte longitudinal do óvulo de <i>D. pinnata</i> após 96h de fertilização por grãos de pólen de <i>D. pentaphylla</i>	129

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 4

Tabela 1. Número de flores e frutos (média $\pm$ desvio padrão) produzidos por indivíduo de <i>Dahlstedtia pentaphylla</i> em 1998 e de frutos em 2000	94
Tabela 2. Número de óvulos por ovário e de sementes (média $\pm$ desvio padrão) por fruto em <i>Dahlstedtia pentaphylla</i>	94
Tabela 3. Tamanho médio do fruto e da semente madura (média $\pm$ desvio padrão) em <i>Dahlstedtia pentaphylla</i>	94
Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão do número de grãos de pólen depositados em estigmas de flores de <i>D. pentaphylla</i> em três posições da inflorescência	95
Tabela 5. Média $\pm$ desvio padrão do número de frutos produzidos em três posições da inflorescência de <i>D. pentaphylla</i>	95
Tabela 6. Regressão logística de posição (variável independente) e presença de calose nos tecidos maternos do óvulo (variável resposta)	96
Tabela 7. Regressão logística de posição (variável independente) e semente em desenvolvimento no fruto (variável resposta)	98

Capítulo 5

Tabela 1. Regressão logística de presença de <i>D. pentaphylla</i> (ou ausência de <i>D. pinnata</i>) (variável resposta) e de latitude e altitude de ocorrência (variáveis independentes)	109
Tabela 2. Dados mensais de floração e frutificação das espécies de <i>Dahlstedtia</i> em seus locais de ocorrência	110

RESUMO DA TESE

Estudos reprodutivos em Leguminosae são escassos e restritos principalmente a espécies de importância agrícola e às encontradas em regiões temperadas. As informações disponíveis mostram uma alta incidência de aborto de flores e frutos na família, fenômeno também observado nas duas espécies brasileiras de *Dahlstedtia* Malme. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a ocorrência de aborto nos representantes de *D. pinnata* e *D. pentaphylla* e, para tal, procurou-se: 1. investigar o desenvolvimento da flor, do grão de pólen, do óvulo e dos primeiros estádios da semente, compará-lo ao de outros representantes de Papilionoideae e, então, verificar a ocorrência de anomalias no decorrer do processo; 2. verificar o comportamento e a contagem dos cromossomos meióticos, e a normalidade das tétrades para avaliar se o grão de pólen pode ser considerado um fator limitante nos eventos de fertilização; 3. verificar a relação entre o aborto e a posição das flores/frutos na inflorescência/planta e dos óvulos/sementes no ovário/fruto e, 4. levantar a distribuição geográfica, os períodos de floração e frutificação e verificar a possibilidade de fertilização interespecífica, a fim de relacionar seus efeitos no processo reprodutivo das espécies e, juntamente aos resultados de morfologia externa e interna, esclarecer melhor a delimitação entre elas. Botões, flores fertilizadas e não fertilizadas, frutos e sementes em vários estádios de desenvolvimento foram utilizados em análises cito-histológicas e em testes da estratégia reprodutiva adotada pelas plantas. As características encontradas no desenvolvimento floral são comuns à subfamília Papilionoideae. Anomalias e supressão de órgãos florais não foram encontrados. Diferenças em níveis taxonômicos infragenéricos são raras nos primeiros estádios da ontogênese; entretanto as espécies diferiram na distribuição de cavidades secretoras nos órgãos florais. O número cromossômico encontrado foi $n = 11$, contagem inédita para as espécies. Como o estudo citológico abrangeu todas as espécies do gênero, conclui-se que o número básico é igual a 11. *D. pentaphylla* é uma espécie meioticamente estável e os grãos de pólen não são limitantes da fertilização. Já *D. pinnata* apresenta regularidade meiótica menor, resultando num maior número de grãos de pólen estéreis e, tal dado, juntamente com observações de grande número de rebrotas nas plantas, pode indicar que a propagação vegetativa tem maior importância no processo reprodutivo desta espécie. O desenvolvimento do óvulo é do tipo «Polygonum» e o do endosperma Nuclear. Não foram encontradas diferenças entre a autopolinização e a polinização cruzada quanto à germinação do pólen, ao crescimento do tubo polínico, à megagametogênese, à dupla fertilização e à embriogênese. Em todos os tratamentos foram

observados a retração e o espessamento prematuros das paredes celulares dos tegumentos e da placenta, seguidos de colapsos do saco embrionário (óvulo) ou do zigoto e do endosperma (semente). As espécies são autocompatíveis, não tendo sido observados mecanismos pré- ou pós-zigóticos atuando como barreiras à autofertilização. Em *D. pentaphylla* não há diferenças na polinização de flores e na formação de frutos em determinada região da inflorescência. Não se encontrou também relação entre o acúmulo de calose no óvulo e sua posição no ovário, bem como entre semente em desenvolvimento e sua posição no fruto. O aborto nas espécies está mais relacionado à limitação de recursos maternos ao nível do fruto e ao nível do embrião, devido aos altos custos da frutificação e maturação das sementes, o que pode ser confirmado pela presença de características abortivas ocorrendo primeiro nos tecidos maternos dos óvulos e sementes e depois nos embriogênicos. As duas espécies apresentam distribuição restrita às áreas de Floresta Atlântica, mas não se observou sobreposição geográfica. Plantas de *D. pinnata* podem ser encontradas nos Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo e de *D. pentaphylla* nos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Não se observou a formação de embriões após os cruzamentos interespecíficos. A fertilização em *D. pinnata* foi evitada pela presença de uma secreção micropilar densa e em grande quantidade, impedindo a penetração do tubo polínico. As espécies não estão isoladas sazonalmente, mas estão geograficamente separadas. Provavelmente, não trocam pólen na natureza e, se trocassem, não haveria formação de sementes.

ABSTRACT

Flowers, fruits and seed abortion was studied in two Brazilian species: *Dahlstedtia pinnata* e *D. pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoideae). Such a study was developed through investigations of: 1. floral development, microsporogenesis, ovule and early seed development following open, self- and cross-pollination, in order to compare the results to other papilionoids and to verify the occurrence of abnormalities in the process; 2. chromosome number, meiotic behavior and meiotic index, in order to verify if pollen grains can limit the fertilization events; 3. fruiting pattern related with position within the inflorescence and ovule degeneration and seed development related with position within ovaries and fruits; 4. geographical distribution, flowering and fruiting, gene flow possibility and their effects in the reproductive process and delimitation of the species. Buds, fertilized and unfertilized flowers, fruits and seeds in several developmental stages were utilized in histological studies and in tests of the reproductive strategies adopted by plants. *D. pinnata* and *D. pentaphylla* shared common developmental pathways in flower formation of other papilionoids. Anomalies and suppression of floral organs were not found. Differences in characters expressed in early stages of ontogeny in infrageneric taxa are scarce; however, species differed in the distribution of secretory cavities on floral organs. Both species have $n = 11$ and such a chromosome number has not been reported before. The basic number is also 11, because cytological observations included all species in *Dahlstedtia*. Plants of *D. pentaphylla* are meiotically stable and pollen grains do not limit fertilization. *D. pinnata* showed lower meiotic index, and a high number of adventitious shoots, which can indicate that vegetative propagation has a great importance in that species. Embryo sac development is of the «Polygonum» type and endosperm development follows the «Nuclear» type. No differences were observed between cross- and self-pollination in pollen germination, pollen tube growth, megagametogenesis, double fertilization and embryogenesis. In all treatments premature thickening and retraction of cell walls were observed in the integuments and placenta, followed by embryo sac collapse (ovule) or endosperm and zygote failures (seed). Species are self-compatible, with no occurrence of pre- or post-zygotic mechanisms as barriers to selfing. In *D. pentaphylla* no differences were found in flower pollination and in fruit production according to the region in the inflorescence; or in degenerating ovule and developing seed according to their position within ovary and fruit. Seed abortion is mostly related to the limited maternal resource at fruit and embryo levels rather than the high degree of self-pollination, which can be confirmed by the

occurrence of abortive characteristics first in maternal tissues and later in the offspring. Both species present distribution restrict to Atlantic Forest, but are geographically isolated in State of São Paulo. There are reports for *D. pinnata* plants in State of Rio de Janeiro and São Paulo, and for *D. pentaphylla* in State of São Paulo, Paraná and Santa Catarina. No embryos were observed after interspecific crossing. Fertilization in *D. pinnata* was avoided by a dense secretion occupying all micropilar cavity, obstructing the pollen tube enter. Species are not sazonnally isolated, but geographically, and it seems that there is not gene flow between species.

INTRODUÇÃO GERAL

Leguminosae Adans. compreende 650 gêneros e mais de 18000 espécies representando uma das maiores famílias de Angiospermas, superada apenas em número de espécies pelas famílias Orchidaceae e Compositae. Está amplamente distribuída, apresentando representantes em várias formações vegetacionais, além de possuir grande importância econômica. Diversas características de sua biologia têm contribuído para seu sucesso ecológico e evolutivo; entre elas, os mecanismos de polinização e a coevolução com Hymenoptera, culminando com a presença de flores papilionadas (Polhill *et al.* 1981).

O gênero *Dahlstedtia* Malme está subordinado à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Millettieae, sendo constituído por duas espécies: *D. pinnata* (Benth.) Malme (espécie-tipo) e *D. pentaphylla* (Taub.) Burkart (Geesink 1984). Os representantes das espécies são arbustivo-arbóreas, apresentam flores vistosas e polinizadas por beija-flores, numa tribo em que, segundo Sousa & Sousa (1981) as outras espécies são geralmente polinizadas por abelhas. As espécies de *Dahlstedtia* são diferenciadas pela cor da corola, pink em *D. pinnata* e vermelha em *D. pentaphylla* e pela ocorrência de lenticelas nos ramos florais e de cavidades secretoras nas folhas de *D. pentaphylla* (Teixeira 1996). Sua distribuição é restrita às regiões de Floresta Atlântica brasileira, sendo *D. pinnata* registrada nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo e *D. pentaphylla* nos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina.

Observações pessoais registraram uma baixa produção de frutos e de sementes por indivíduo de *D. pinnata* e *D. pentaphylla*, embora haja um grande número de flores por inflorescência. O processo de aborto de flores, frutos e sementes não é exclusivo de Leguminosae. Em várias famílias de Angiospermae sementes viáveis são formadas de pequena proporção de óvulos; os demais óvulos não se desenvolvem pela ausência de fertilização, ou, se são fertilizados, os embriões são abortados durante o desenvolvimento (Sedgley 1980, Bawa & Webb 1984, Queller 1985). Pouco se conhece sobre as causas e implicações da mortalidade entre a fertilização e a maturidade da semente (Lloyd 1980, Lloyd *et al.* 1980, Stephenson 1981, Udovic & Aker 1981). Para explicar a ocorrência de abortos existem várias hipóteses, como a de seleção sexual, atribuindo os abortos à otimização do sucesso reprodutivo masculino e feminino (Lloyd 1980), a que envolve a paternidade do zigoto (Janzen 1977) e a combinação de gens letais (Martin & Lee 1993).

O conhecimento do sistema reprodutivo das espécies é fundamental na investigação das causas de ocorrência de aborto (Bawa 1979). A utilização conjunta de dados de anatomia e de ecologia reprodutiva pode acrescentar informações ao conhecimento das possíveis causas e conseqüências dos abortos, direcionando pesquisas tanto de produtividade de sementes como de perspectivas evolutivas (Sedgley 1980, Bawa & Webb 1984, Ebadi *et al.* 1996). No entanto, pouco se tem estudado a respeito das modificações histológicas que ocorrem desde o desenvolvimento dos órgãos florais até a maturação da semente. Há registros de evidências citológicas de aborto de óvulos após a fertilização para *Medicago sativa* e *Pisum sativum* (Brink & Cooper 1947, Linck 1961) e dados anatômicos de frutos e flores abortados em *Persea americana* (Sedgley 1980).

A importância do presente trabalho reside em estudar espécies nativas de uma floresta tropical, ecossistema carente de informações sobre reprodução, apresentando, quase sempre, informações iniciais sobre o sistema reprodutivo das espécies (Brazier *et al.* 1976, Hawkes 1976). Para as espécies de *Dahlstedtia*, os únicos dados reprodutivos existentes referem-se à morfologia do pólen de *D. pinnata*, que foi analisada e comparada à de outras espécies de Papilionoideae (Ferguson & Skvarla 1982). Além disso, dados iniciais de fitossociologia obtidos na Mata Atlântica em Picinguaba, Ubatuba, SP, revelaram uma baixa densidade de indivíduos de *D. pinnata*, sugerindo uma tendência à raridade para a espécie (Takahasi 1997, comunicação pessoal).

No decorrer deste trabalho pretendeu-se estudar a embriologia (*sensu* Johri *et al.* 1992), o sistema reprodutivo e a biossistemática de *Dahlstedtia* e identificar as prováveis deficiências encontradas no processo reprodutivo das duas espécies que compõem o gênero. Para isto, algumas proposições foram formuladas:

1. Anormalidades existentes no decorrer do desenvolvimento dos órgãos florais estariam acarretando o aborto das flores (cf. Tucker 1987, 1990, 1993 e 1994). (Capítulo 1)
2. Anormalidades existentes no decorrer da microsporogênese, principalmente no processo meiótico, bem como nos tecidos da antera, estariam limitando a viabilidade e a capacidade competitiva dos grãos de pólen e, portanto, impedindo a fertilização ou originando embriões pouco vigorosos e propensos ao aborto (cf. Kronestedt-Robards & Rowley 1989, Loukides *et al.* 1995, Peel *et al.* 1997). (Capítulo 2)
3. As espécies seriam autocompatíveis, como esperado para aquelas de distribuição restrita (cf. Kaye 1999), e estariam abortando seletivamente, devido: (Capítulo 3 e 4)

- à limitação dos recursos maternos, acarretando competição entre os óvulos ou sementes, estando em desvantagem os mais distantes do pedúnculo; da mesma forma os frutos formados em posições mais distantes do pedúnculo da inflorescência teriam menos chance de se desenvolver (cf. Bawa & Buckley 1989).
- à não fertilização dos óvulos devido à insuficiência no número de grãos de pólen, sendo que os posicionados nas regiões mais distantes do estilete estariam em desvantagem (cf. Mogensen 1975).
- à fertilização do óvulo por um grão de pólen geneticamente inferior, gerando embriões propensos a serem abortados. Grãos de pólen mais competitivos e rápidos efetuam a fertilização primeiro que os outros, e os embriões podem se desenvolver antes que a planta inicie o processo de abscisão do fruto (cf. Janzen 1977, Niesenbaum 1999).

4. As espécies seriam auto-incompatíveis e a planta estaria produzindo poucos frutos (cf. Dorken & Husband 1999, Sage et al. 1999) porque: (Capítulos 3 e 4)

- A deposição de grãos de pólen incompatíveis é alta (ausência de barreira espacial ou temporal entre anteras e estigma, proximidade de indivíduos geneticamente semelhantes, ausência de polinizador), não ocasionando a fertilização dos óvulos devido à presença de barreiras pré-zigóticas no estigma ou nos tecidos do estilete.
- A deposição de grãos de pólen incompatíveis é alta e a sua entrada no ovário não permite que os óvulos completem seu desenvolvimento (ausência de alongamento do saco embrionário e de fusão dos núcleos polares), a ausência de secreção na micrópila ou a degeneração de tecidos ovarianos, entre outros eventos. Neste caso as barreiras pré-zigóticas estariam atuando ao nível do ovário (cf. Sage et al. 1999).
- A deposição de grãos de pólen incompatíveis é alta, há fertilização, mas o aborto ocorreria antes do desenvolvimento completo da semente. Neste caso existiriam barreiras pós-zigóticas ou mesmo depressão endogâmica, dois fenômenos de difícil distinção sem que se estude a embriogênese (cf. Gibbs & Sasaki 1998).

5. As espécies seriam auto-incompatíveis e o aborto de frutos e sementes poderia estar ocorrendo por alguma das causas citadas em 4, mas também pelas citadas em 3, o que seria de difícil distinção, ou seja, se as espécies forem autocompatíveis, os gradientes existentes no ovário poderiam explicar o aborto, mas se forem auto-incompatíveis, tanto as causas genéticas como as de alocação de recursos poderiam estar ocorrendo.

Algumas perguntas foram formuladas no decorrer do trabalho: 1) As espécies poderiam trocar pólen na natureza? Sua distribuição é disjunta? Os grãos de pólen de uma espécie são capazes de germinar e penetrar o óvulo da outra espécie? 2) Que caracteres poderiam auxiliar na delimitação das espécies, um tanto controversa na literatura? (Capítulo 5)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAWA KS. 1979. Breeding systems of trees in a tropical wet forest. *N. Z. J. Bot.* **17**(4): 521-524.
- BAWA KS & WEBB CJ. 1984. Flower, fruit, and seed abortion in tropical forest trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *Am. J. Bot.* **71**(5): 736-751.
- BAWA KS & BUCKLEY DP. 1989. Seed: ovule ratios, selective seed abortion, and mating systems in Leguminosae. *Monogr. Syst. Bot.* **29**: 243-262.
- BRAZIER JD; HUGHES JF & TABB CB. 1976. Exploitation of natural tropical resources and the need for genetic and ecological conservation. *In* . J Burley & BT Styles (eds). **Tropical Trees. Variation, Breeding and Conservation**. Academic Press, London.
- BRINK RA & COOPER C. 1947. The endosperm in seed development. *Bot. Rev.* **13**: 423-542.
- DORKEN ME & HUSBAND BC. 1999. Self-sterility in the understory herb *Clintonia borealis* (Liliaceae). *Int. J. Pl. Sci.* **160**(3): 577-584
- EBADI A; SEDGLEY M; MAY P & COOMBE BG. 1996. Seed development and abortion in *Vitis vinifera* L., cv. Chardonnay. *Int. J. Plant Sci.* **157**(6): 703-712.
- FERGUSON IK & SKVARLA JJ. 1982. Pollen morphology in relation to pollinators in Papilionoideae (Leguminosae). *Bot. J. Linn. Soc.* **84**: 183-193.
- GEESINK R. 1984. *Scala Millettiearum: a survey of the genera of the tribe Millettieae* (Leguminosae, Papilionoideae). E. J. Brill & Leiden University Press, Leiden (Leiden Botanical Series, 1).
- GIBBS P & SASSAKI R. 1998. Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* (Leguminosae - Papilionoideae) in SE Brazil: the effects of pistillate sorting on fruit-set. *Ann. Bot.* **81**: 735-740.
- HAWKES 1976. Introduction. *In* J Burley & BT Styles (eds). **Tropical Trees. Variation, Breeding and Conservation**. Academic Press, London.

- JANZEN DH. 1977. A note on optimal mate selection by plants. *Amer. Nat.* **11**: 365-371.
- JOHRI BM, AMBEGAOKAR KB & SRIVASTAVA PS. 1992. **Comparative Embryology of Angiosperms**, Berlin: Springer-Verlag, v.1.
- KAYE TN. 1999. From flowering to dispersal: reproductive ecology of an endemic plant, *Astragalus australis* var. *olympicus* (Fabaceae). *Am. J. Bot.* **86**: 1248-1256.
- KRONESTEDT-ROBARDS EC & ROWLEY JR. 1989. Pollen grain development and tapetal changes in *Strelitzia reginae* (Strelitziaceae). *Am. J. Bot.* **76** (6): 856-870.
- LINCK AJ. 1961. The morphological development of the fruit of *Pisum sativum*, var. Alaska. *Phytomorphology* **11**: 79-84.
- LLOYD DG. 1980. Sexual strategies in plants. 1. An hypothesis of sexual adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytol.* **86**: 69-79.
- LLOYD DG, WEBB CJ & PRIMACK RB. 1980. Sexual strategies in plants. 2. Data on the temporal regulation of maternal investment. *New Phytol.* **86**: 81-92.
- LOUKIDES CA, BROADWATER AH & BEDINGER PA. 1995. Two new male-sterile mutants of *Zea mays* (Poaceae) with abnormal tapetal cell morphology. *Am. J. Bot.* **82** (8): 1017-1023.
- MARTIN ME & LEE TD. 1993. Self pollination and resource availability affect ovule abortion in *Cassia fasciculata* (Caesalpiniaceae). *Oecologia* **94**: 503-509.
- MOGENSEN HL. 1975. Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* **62**(2): 160-165.
- NIESENBAUM RA. 1999. The effects of pollen load size and donor diversity on pollen performance, selective abortion, and progeny vigor in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). *Am. J. Bot.* **86**(2): 261-268.
- PEEL MD, CARMAN ZWL. & WANG RR-C. 1997. Meiotic anomalies in hybrids between wheat and apomictic *Elymus rectisetus*. *Crop Science* **37**(3): 717-723.
- POLHILL RM, RAVEN PH & STIRTON CH. 1981. Evolution and Systematics of the Leguminosae. In RM Polhill & PH Raven (eds). **Advances in Legume Systematics**, part 1, pp. 1-26. Royal Botanic Gardens, Kew.
- QUELLER DC. 1985. Proximate and ultimate causes of low fruit production in *Asclepias exaltata*. *Oikos* **44**: 373-381.
- SAGE TL, STRUMAS F, COLE WW & BARRETT SCH. 1999 Differential ovule development following self- and cross-pollination: the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* **86**(6): 855-870.

- SEDGLEY M. 1980. Anatomical investigation of abscised avocado flowers and fruitlets. *Ann Bot.* **46(6)**: 771-777.
- SOUSA M & SOUSA MP. 1981. New World Lonchocarpaceae. *In* RM Polhill & PH Raven (ed.). **Advances in Legume Systematics**, part 1, pp. 261-281. Royal Botanic Gardens, Kew.
- STEPHENSON AG. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **12**: 253-279.
- TEIXEIRA SP. 1996. **Anatomia comparativa dos órgãos vegetativos de *Dahlstedtia Malme* (Leguminosae, Papilionoideae)**. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, S.P.
- TUCKER SC. 1987. Floral initiation and development in legumes. *In* C. H. Stirton (ed.). **Advances in Legume Systematics**, part 3, pp. 183-239. Royal Botanic Gardens, Kew.
- 1990. Loss of floral organs in *Ateleia* (Leguminosae, Papilionoideae). *Am. J. Bot.* **77(6)**: 750-761.
- 1993. Floral ontogeny in Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae). I *Myroxylon* (*Myroxylon* group) and *Castanospermum* (*Angylocalyx* group). *Am. J. Bot.* **80(1)**: 65-75.
- 1994. Floral ontogeny in Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae). II. *Sophora* "sensu lato" (*Sophora* group). *Am. J. Bot.* **81(3)**: 368-380.
- UDOVIC D & AKER CL. 1981. Fruit abortion and the regulation of fruit number in *Yucca whipplei*. *Oecologia* **49**: 245-248.

**CAPÍTULO I: “DESENVOLVIMENTO FLORAL E SEUS EFEITOS NO PROCESSO REPRODUTIVO DE
DAHLSTEDTIA PINNATA E *D. PENTAPHYLLA* (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE)”**

RESUMO

Estudos de reprodução em Leguminosae demonstram uma alta ocorrência de aborto de flores e frutos na família, fenômeno observado nas duas espécies de *Dahlstedtia* (Leguminosae). O desenvolvimento floral em *Dahlstedtia pinnata* e *D. pentaphylla*, espécies típicas de Floresta Atlântica, com distribuição restrita às regiões sudeste e sul do Brasil, foi investigado e comparado a outras espécies de Papilionoideae. A presença de anomalias que possam acarretar o aborto de flores e frutos também foi verificada. Características morfológicas que possam auxiliar no entendimento dos mecanismos de polinização e do sistema reprodutivo e na delimitação das espécies foram ressaltadas. Botões em várias fases de desenvolvimento e flores em pré-antese foram coletados, fixados, sendo os órgãos florais observados em Microscopia Eletrônica de Varredura e em seções seriadas. A ordem de iniciação das flores na inflorescência e dos verticilos na flor das duas espécies é acrópeta; em cada verticilo, os órgãos são iniciados unidirecionalmente, a partir da face abaxial; a fissura do carpelo é adaxial; o estandarte desenvolve-se mais que as demais pétalas, cobrindo as quilhas e o tubo de filetes, dando origem ao formato tubuloso da flor já no estágio intermediário. O tubo de filetes é formado no último estágio, logo após a formação do segundo verticilo de estames. As características encontradas no desenvolvimento floral em *Dahlstedtia* são comuns à subfamília Papilionoideae, e principalmente às espécies das tribos Phaseoleae e Sophoreae. Não ocorrem processos de supressão, perda e mesmo anormalidades na ordem de aparecimento e na estrutura dos primórdios dos órgãos nestas espécies, o que resultaria na má-formação dos órgãos e, conseqüentemente, no aborto de flores e frutos. Diferenças infragenéricas nos primeiros estádios da ontogênese são raras; entretanto as espécies de *Dahlstedtia* diferiram na distribuição de cavidades secretoras nos órgãos florais.

PALAVRAS-CHAVE: Leguminosae, *Dahlstedtia*, Desenvolvimento Floral, Sistema Reprodutivo, Polinização, Cavidades Secretoras.

INTRODUÇÃO

Dahlstedtia Malme está subordinado à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Millettieae, sendo constituído por duas espécies: *D. pinnata* (Benth.) Malme (espécie-tipo) e *D. pentaphylla* (Taub.) Burkart (Geesink 1984). É um gênero neotropical, com registros de coleta para a Floresta Atlântica brasileira (Malme 1905), cujas espécies ocorrem em baixas densidades em áreas de planície e encosta das regiões sudeste e sul.

As espécies são arbustivo-arbóreas, apresentam flores papilionáceas vistosas e foram caracterizadas na síndrome de ornitofilia por Arroyo (1981) e Sousa & Sousa (1981) em seus trabalhos de revisão na família Leguminosae, embora o gênero esteja posicionado numa tribo essencialmente melitófila (Sousa & Sousa 1981). Segundo Polhill et al. (1981), os gêneros *Dahlstedtia*, *Millettia* e *Piscidia* em Millettieae e algumas espécies da tribo Phaseolae e Sophoreae são os únicos citados como ornitófilos em Papilionoideae e, de acordo com estudos filogenéticos recentes, não são estreitamente relacionados, estando *Dahlstedtia* mais próximo aos representantes de Lonchocarpinae (Millettieae).

Observações de campo mostraram a ocorrência de uma baixa produção de frutos nas espécies de *Dahlstedtia*, geralmente um por inflorescência, em detrimento de uma alta produção de flores. Além disso, os frutos, muitas vezes, foram abortados ou abortaram as sementes. A maioria dos trabalhos tratando da taxa de aborto de flores, frutos e sementes tem investigado a sobrevivência das plantas em populações naturais. Pouco se tem estudado a respeito das modificações histológicas que ocorrem desde o desenvolvimento dos órgãos florais até a maturação da semente (Lloyd 1980, Lloyd et al. 1980, Stephenson 1981, Udovic & Aker 1981).

A ontogenia, de uma forma mais abrangente, é conceituada como o desenvolvimento atual de uma planta ou de um dos seus órgãos, tecidos ou células componentes, tratando dos vários estádios que resultam na formação dos órgãos florais: os iniciais ou organogenéticos, os intermediários ou de formação e os finais ou de diferenciação. Esses mesmos estádios também podem ser utilizados no estudo do desenvolvimento da inflorescência. A utilização de estudos de ontogênese em discussões filogenéticas é bastante comum, já que, de acordo com a Teoria da Recapitulação, a ontogenia de um organismo tende, de forma abreviada, a repetir ou recapitular sua história evolutiva. Entretanto, deve ser vista com cuidado neste caso, pois a história ontogenética de uma

estrutura pode ser muito abreviada e, portanto, de pequeno ou nenhum valor em questões filogenéticas (Foster & Gifford 1974, Fahn 1992).

Por outro lado, estudos ontogenéticos podem revelar as bases para vários aspectos da diversidade de um grupo de plantas, sendo essenciais na solução de muitos problemas morfológicos. A ontogenia de órgãos foliares, por exemplo, tem auxiliado na interpretação estrutural de estípulas, brácteas e, particularmente de órgãos florais (Foster & Gifford 1974, Tucker 1997) e também na solução de problemas de estruturas consideradas enigmáticas e de homologias incertas. Aspectos da arquitetura, simetria, ordem de iniciação, fusão, perda ou adição de órgãos têm sido muito utilizados tanto numa mesma flor como entre as flores de uma inflorescência (Tucker 1987, 1990, 1993, 1994). Tais estudos evoluíram muito após as publicações de Tucker (Hufford & Diggle 1997), nas quais a utilização da microscopia eletrônica de varredura tornou-se um método usual, por ser rápido e simples no acompanhamento do crescimento, da diferenciação e do alargamento dos órgãos florais, processos que puderam, então, ser observados externamente (Tucker 1997).

A partir de vários estudos de desenvolvimento floral, principalmente em Leguminosae, uma hipótese aliando a taxonomia aos vários estádios de formação dos órgãos florais foi proposta por Tucker (ver Tucker 1997). Caracteres encontrados nos primeiros estádios da ontogenia floral, como por exemplo simetria floral, número e posição de órgãos, seriam mais estáveis e, assim, utilizados na delimitação de taxa supra-genéricos. Por outro lado, caracteres encontrados nos últimos estádios, tais como fusão de órgãos, heterogeneidade num verticilo, são mais variáveis e considerados adaptativos, podendo ser utilizados na delimitação de taxa genéricos e infragenéricos.

O desenvolvimento da inflorescência e da flor em *Dahlistedtia pentaphylla* e *D. pinnata* foi investigado e comparado a outras espécies de Papilionoideae e, então, verificada a ocorrência de anomalias que possam levar ao aborto de flores e frutos. Características morfológicas que possam auxiliar no entendimento dos mecanismos de polinização e do sistema reprodutivo e na delimitação das espécies foram ressaltadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material de *Dahlistedtia pentaphylla* foi coletado de dois indivíduos cultivados no Campus da ESALQ, Piracicaba, quatro cultivados no CATI, Campinas, SP e quatro ocorrendo naturalmente na Fazenda Intervalles, SP. O material de *D. pinnata* foi coletado de

dois indivíduos cultivados no IAC, Campinas, SP e de sete ocorrendo naturalmente no Parque Estadual da Serra do Mar, em Picinguaba, SP. O material testemunho das duas espécies está depositado no herbário UEC (Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP) sob os números 300, 17936, 28637, 28746, 109266, 109267.

O processo de desenvolvimento das inflorescências e das flores foi acompanhado no campo semanalmente, no período de agosto/98 a dezembro/98, em quatro indivíduos de *D. pentaphylla* e em dois de *D. pinnata*, cultivados em Campinas.

Flores frescas ou conservadas em álcool 70% foram observadas em estereomicroscópio para os estudos de morfologia externa. Os esquemas florais foram obtidos em microscópio acoplado a câmara clara e as escalas nas mesmas condições ópticas. A coloração dada às peças florais seguiu o índice de cores de Smithe (1975).

Os estudos de desenvolvimento floral foram realizados através de observações em Microscopia Eletrônica de Varredura e de cortes histológicos seriados. Para tal, flores e botões florais foram coletados em vários estádios de desenvolvimento e fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965).

Para Microscopia Eletrônica de Varredura os materiais foram dissecados em álcool 95%, desidratados em série acetona-etílica (Tucker 1993), submetidos ao ponto crítico em um aparelho Balzers CPD 030, montados em suportes metálicos, colados sobre fita adesiva de Carbono e, então, cobertos com Ouro em um Balzers SCD 050 sputter coater por 280s. As observações foram efetuadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura DSM 940 A (Zeiss) em 5 kv, sendo as fotomicrografias obtidas em uma câmera Sinar 67.

Para Microscopia de Luz os materiais foram incluídos em historresina "Basic Resin" após desidratação em série etílica (Gerrits 1991) e em "paraplast" após desidratação em série butílica terciária, seccionados transversal e longitudinalmente (4 a 6µm de espessura) em micrótomo rotativo, e corados com Safranina e Azul de Astra ("paraplast") ou em Azul de Toluidina (historresina) (Gerlach 1969). As fotomicrografias foram registradas em um fotomicroscópio Olympus BX 40 e as escalas obtidas nas mesmas condições ópticas.

RESULTADOS

O desenvolvimento floral será descrito conjuntamente para as duas espécies, sendo apenas ressaltadas as diferenças que surgirem.

ORGANOGRAFIA -

A inflorescência é do tipo pseudo-racemo; a de *D. pinnata* é congesta e ereta e a de *D. pentaphylla* pêndula e menos congesta. Apresentam cauliflora, sendo que em alguns indivíduos as inflorescências ocorrem no tronco, próximas ao solo. O número de flores por inflorescência varia de 12 a 50 para *D. pinnata* e de oito a 35 para *D. pentaphylla*. As flores são papilionáceas (figs. 1; 2B,F), muito vistosas e de conformação tubulosa, sendo o estandarte o responsável por tal conformação. O estandarte, as asas e quilhas apresentam guias de néctar brancos em suas faces adaxiais. A filotaxia é verticilada. O cálice é gamossépalo, 5-lobado. Em *D. pinnata* a corola é «pink» (fig. 1A) e em *D. pentaphylla*, vermelha (fig. 1B). Os dez estames formam um tubo de filetes, fenestrado na base (figs. 2D,H) no lado oposto à inserção do estandarte. As anteras são dorsifixas, com deiscência longitudinal. O ovário é súpero, a placentação é submarginal, com os óvulos distribuídos linearmente (fig. 6G). O estigma é puntiforme. Um disco nectarífero está presente na região entre a base do tubo de filetes e a base do ovário (figs. 2C,G).

Um indivíduo cultivado (CATI, Campinas, SP) de *D. pentaphylla* apresentou algumas flores com dois pistilos.

A deiscência das anteras já ocorre nos botões em pré-antese. Embora o estigma e as anteras estejam posicionados na mesma altura e mantidos próximos pelas quilhas, não há retenção de pólen na região subestigmática do botão em pré-antese ou da flor em antese. O movimento suposto para que ocorra polinização deve envolver o abaixamento da quilha juntamente com o tubo de filetes e pistilo, ficando o estandarte flexionado para cima, para que o polinizador alcance a região fenestrada do tubo de filetes e, assim, colete néctar. Os grãos de pólen são liberados após ocorrer movimentação da quilha e devem aderir à região ventral do corpo do polinizador.

DESENVOLVIMENTO DA INFLORESCÊNCIA -

Os ápices florais são formados em ordem acrópeta, de três em três e originando flores sucessivamente (fig. 6A,B). Cada tríade de ápices florais localiza-se na axila de um par de brácteas (fig. 6A). Os ápices florais são achatados e completam seu desenvolvimento em cerca de 60 dias. Cada ápice floral produz um par de bractéolas lateralmente (fig. 6C). Brácteas e bractéolas não permanecem até o final do desenvolvimento e não foram observadas após os botões atingirem cerca de 1,5cm de comprimento. A zona de revestimento do ápice floral é constituída por duas camadas de células densamente coradas (fig. 6C), que se dividem anticlinalmente. As células localizadas logo abaixo da zona de

revestimento, no centro do ápice, apresentam núcleos evidentes (fig. 6C) e intensa atividade mitótica, sendo que as divisões ocorrem nos planos anticlinal e periclinal.

ONTOGENIA FLORAL -

Estádios iniciais (organogênese): Os primórdios dos órgãos florais são formados a partir de divisões anticlinais da protoderme e, após, por divisões anticlinais e periclinais de células situadas abaixo da protoderme no ápice floral. A ordem de iniciação dos verticilos é acrópeta: sépalas (5), pétalas (5), carpelo (1) e estames antessépalos (5) e, por último, estames antepétalos (5). A ordem de iniciação das sépalas é unidirecional (fig. 4B), sendo o primeiro e segundo primórdios abaxiais, um par de primórdios laterais e o último adaxial; após a iniciação, os primórdios desenvolvem-se simultaneamente formando o tubo do cálice (figs. 3A-B, 4C). O primeiro primórdio de pétala surge após a formação de todos os primórdios de sépalas; a ordem de iniciação é unidirecional a partir da face abaxial. O carpelo inicia-se na região mediana, como uma coluna arredondada (figs. 3A, 4C, 6D-E). A ordem de iniciação dos estames antessépalos é unidirecional, formando o ciclo externo (fig. 5A); os estames antepétalos iniciam sua formação na base do carpelo (figs. 5B, 6E), em ordem unidirecional a partir da face abaxial, formando o ciclo interno (figs. 4B, 5B, 6D).

Estádios intermediários: As pétalas se diferenciam pelo tamanho e pela forma em estandarte, asas e quilhas (figs. 3D-E, 5D-E) e tornam-se imbricadas. O carpelo apresenta tricomas não glandulares em sua base (figs. 3E, 5D-E), fenda adaxial (figs. 3C, 5C), estilete curvo (figs. 2A,E), um feixe vascular central e dois feixes não fundidos na região da sutura. Os óvulos (fig. 6F) iniciam seu desenvolvimento na região próxima às margens do carpelo e antes da fusão marginal.

Estádios finais: as sépalas se unem por crescimento lateral, o estandarte torna-se muito alargado, caracterizando a zigomorfia, e cobre as outras pétalas, funcionando como um tubo para a corola. Os 10 filetes unem-se em um tubo, e formam duas aberturas em sua base. O estilete torna-se ereto e o estigma puntiforme apresenta coloração amarelada. O crescimento do estilete é anterior ao do tubo de filetes, mas, no final do desenvolvimento, o estigma e as anteras estão posicionados na mesma altura.

ESTRUTURAS SECRETORAS NAS PEÇAS FLORAIS -

Tricomas glandulares, cavidades secretoras, epiderme secretora e nectário foram catalogados nas peças florais (fig. 7)

Tricomas secretores ocorrem nas bractéolas e nas sépalas (fig. 7A-B). O início do seu desenvolvimento ocorre nos primeiros estádios, quando os primórdios de sépalas e de pétalas estão sendo formados. São pedunculados (2 a 3 células em altura) e possuem uma cabeça multisseriada (fig. 7A-B), na qual as células apresentam núcleo grande e densamente corado.

Cavidades secretoras (fig. 7C) ocorrem no cálice, nas asas e nas quilhas (fig. 8); em *D. pinnata* ainda ocorrem nas bractéolas e no estandarte (fig. 8). Em *D. pentaphylla*, as cavidades secretoras foram registradas apenas para a região basal do cálice, enquanto que em *D. pinnata* as cavidades foram catalogadas em toda a extensão deste. O aparecimento das cavidades secretoras acompanha a ordem de formação de cada peça floral: primeiro nas bractéolas, depois nas sépalas e por último nas pétalas modificadas (estandarte, asas e quilhas). Tais estruturas iniciam seu desenvolvimento concomitante à formação da fenda carpelar, e, portanto, nos estádios intermediários do desenvolvimento da flor. Estão completamente diferenciadas no início do desenvolvimento do óvulo e da antera. O epitélio que delimita o lume é unisseriado, as células epiteliais apresentam núcleo e citoplasma densamente corados e núcleo grande em relação ao tamanho celular. Algumas células formam trabéculas que atravessam o lume de um lado a outro. As cavidades são isodiamétricas, mas em algumas peças florais podem ocorrer estruturas mais alongadas quando observadas em cortes longitudinais.

O nectário está presente na base da flor, ao redor do ovário (figs. 2C,G), sendo do tipo epitelial, toral anular, segundo a classificação de Fahn (1992). O início do seu desenvolvimento ocorre quando o estigma está completamente diferenciado e, portanto, nos estádios finais do desenvolvimento floral. As células epidérmicas estão dispostas em paliçada, apresentam citoplasma granuloso e núcleo densamente corado. As células parenquimáticas localizadas abaixo da epiderme possuem citoplasma densamente corado. Vários feixes vasculares chegam até o tecido nectarífero (fig. 7D), sendo constituídos por elementos do floema e do xilema. As células do nectário apresentam coloração mais evidente no citoplasma no período de pré-antese da flor. Já há secreção de néctar em botões com cerca de 2,5cm de comprimento. O néctar é transparente e produzido em grande quantidade, sendo armazenado na região entre o ginóforo e o tubo de filetes. É

liberado em gotas através das duas aberturas presentes na base do tubo de filetes, na região oposta à inserção do estandarte.

No estágio final do desenvolvimento das pétalas foi observada uma epiderme secretora disposta em paliçada, constituída por células densamente coradas, com núcleos evidentes, citoplasma granuloso e parede espessa (fig. 7E-F). Tal estrutura está localizada no ápice das quilhas, asas e do estandarte e, a secreção, em forma de gotas, cora em vermelho pela Safranina (fig. 7F).

DISCUSSÃO

CONSIDERAÇÕES MORFOLÓGICAS

As espécies de *Dahlstedtia* não apresentaram muitas diferenças entre os ápices reprodutivo e vegetativo (Teixeira & Gabrielli 2000). Segundo estes autores, o ápice vegetativo apresenta forma cônica, túnica bisseriada, corpo constituído por células densamente citoplasmáticas e região central com células vacuoladas e maiores que as demais. A organização túnica-corpo não é evidente nos ápices reprodutivos de *D. pentaphylla* e *D. pinnata*, fato de comum ocorrência em Angiospermae (Fahn 1992), mas, pode-se perceber que a zona de revestimento é bisseriada, da mesma forma que a túnica do ápice vegetativo destas espécies. A ausência de uma região com características de um «*méristème d'attente*» (sensu Gifford 1954), bem como a presença de células em intensa atividade mitótica, localizadas abaixo da zona de revestimento, mostram que em *Dahlstedtia* o meristema floral apresenta crescimento determinado, ou seja o meristema floral produz todo o conjunto de órgãos florais, culminando com a completa diferenciação do carpelo e, então cessa sua função (Tucker 1997).

As inflorescências pseudo-racemosas das espécies de *Dahlstedtia*, tipo comum em cinco das 32 tribos de Papilionoideae (Tucker 1997), apresentam os ápices reprodutivos em grupos de três, originando apenas tríades florais, o que caracteriza um ápice não persistente. O ápice reprodutivo, se persistente, pode produzir até mais duas tríades (Tucker 1997). O tipo de inflorescência apresentado por uma espécie é a expressão da ordem em que as flores são iniciadas (acrópeta em *Dahlstedtia*) tanto pelo meristema apical como pelos meristemas presentes nas axilas das brácteas (Fahn 1992).

Em *Dahlstedtia pentaphylla* e em *D. pinnata* a filotaxia verticilada e a zigomorfia das flores expressam-se, respectivamente, nos primeiros e nos últimos estádios de

desenvolvimento (em que ocorre o alargamento das pétalas), padrão já encontrado para outras espécies de Leguminosae com flores zigomórficas (Tucker 1997). Entretanto, segundo a mesma autora, a filotaxia e a simetria florais são, no geral, determinadas nos primeiros estádios do desenvolvimento floral.

O ovário súpero e unicarpelar nas espécies de *Dahlstedtia* originou-se de um primórdio localizado centralmente e este apresenta estrutura diferente da encontrada no ápice floral, contrariando a idéia de que remanescentes das células meristemáticas do ápice estariam relacionados à formação do carpelo (Fahn 1992, Tucker 1997). Há apenas um indivíduo com registro de flor com dois carpelos em *Dahlstedtia pentaphylla*, uma condição certamente teratológica, e compartilhada por outros representantes unicarpelares de Leguminosae, como *Amherstia nobilis* e *Albizia lophanta*, espécies nas quais foram encontradas divisões nas regiões laterais do ápice floral (Derstine & Tucker 1991).

A fusão do cálice, a formação do tubo de filetes e o imbricamento das pétalas em *D. pentaphylla* e *D. pinnata* resultam do crescimento lateral destes órgãos e como ocorrem nos últimos estádios do desenvolvimento, e não nos primeiros, são processos considerados pós-gênicos (Fahn 1992). O estudo da vascularização de estames e sépalas é considerado um bom indicador da maneira como se deu a fusão; entretanto, a posição ocupada pelos vasos está mais direcionada para a fisiologia funcional e ontogenética destes órgãos que para sua história evolutiva. A fusão de órgãos possibilita um rearranjo da estrutura floral e, assim, uma variabilidade de formas que representa maneiras novas e facultativas de ocupação de ambientes pela progênie. Famílias numerosas em espécies, como Orchidaceae e Compositae e mesmo Leguminosae, apresentam esta variabilidade gerada pela fusão de órgãos (Robinson 1985).

Em *Dahlstedtia*, os primórdios ovulares são iniciados antes da fusão carpelar e próximos à fissura marginal, o que caracteriza ontogênese precoce do carpelo e placentação submarginal, diferente da maioria dos representantes de Leguminosae, nos quais os primórdios ovulares são iniciados após a fusão das margens (Tucker 1997). Gineceu unicarpelar com óvulos dispostos em placenta submarginal já haviam sido registrados para os representantes de Leguminosae, sendo exceções as espécies de *Affonsea* e de *Swartzia* (Barroso et al. 1999)

ONTOGENIA X SISTEMA REPRODUTIVO X POLINIZAÇÃO

Estudos sobre a polinização das flores em *Dahlstedtia pinnata* e *D. pentaphylla* não foram encontrados na literatura, apesar de terem sido consideradas ornitófilas por Arroyo

(1981) e Sousa & Sousa (1981). Estas espécies apresentam as chamadas «flores com quilhas» e, segundo Westerkamp (1996), 99% das espécies com tais flores são polinizadas por abelhas. Características relacionadas à polinização por beija-flores, citadas por Tucker (1994) e encontradas nas flores das espécies de *Dahlstedtia*, como por exemplo o nectário intra-estaminal, as aberturas na base do tubo de filetes e o imbricamento das pétalas, também são encontradas nas «flores com quilhas» polinizadas por abelhas em outras espécies de Papilionoideae. De todas as características citadas como adaptações à ornitofilia (Tucker 1994), como flores grandes, estames exsertos, ausência de escultura nas asas e hipanto profundo, apenas o posicionamento não flexionado do estandarte nas flores de *Dahlstedtia*, não proporcionando, assim, o apoio necessário para que o visitante mova as asas e movimente a quilha, indica que o provável polinizador seja um pássaro, já tendo sido observadas visitas de beija-flores (*Rhamphodon naevius* - Phaetorninae).

A apresentação do pólen em *Dahlstedtia* é primária e o mecanismo envolvido é semelhante ao valvar, no qual a movimentação da quilha é a responsável pela liberação de grande parte dos grãos de pólen pelas anteras. Nas «flores com quilha» o tubo de filetes e o pistilo encontram-se encobertos pelas asas e quilhas, havendo, portanto, a necessidade da apresentação do pólen ao polinizador (Howell et al. 1993, Westerkamp & Weber 1999). A liberação do pólen já em botões em pré-antese e a própria morfologia floral em *Dahlstedtia* sugerem a atuação do mecanismo de apresentação secundária, e apesar de pouco observado em flores polinizadas por pássaros, ocorre em *Clianthus puniceus* e em algumas espécies de *Phaseolus* (Yeo 1993). Entretanto, não foram observados tricomas na região subestigmática, nem um pistão («rosto») na extremidade da quilha em *Dahlstedtia*, estruturas citadas para os dois mecanismos de apresentação secundária do pólen em Papilionoideae (Howell et al. 1993, Westerkamp & Weber 1999). A ausência de grãos de pólen aderidos ao estilete na flor em antese e o tipo de movimento da quilha na liberação do pólen indicam que as «flores com quilha» de *Dahlstedtia* possuem apresentação primária de pólen associada ao mecanismo valvar, já citado para Papilionoideae (Westerkamp & Weber 1999). As flores de *Dahlstedtia* apresentam muitas similaridades com flores de espécies polinizadas por abelhas, como por exemplo o estandarte vistoso, a presença de peças florais móveis e fixas, o armazenamento de néctar, a presença de guias de néctar e a proteção ao pólen e, mesmo a conformação tubulosa da flor conferida pelo estandarte em *Dahlstedtia* foi observada em espécies de Polygalaceae por Westerkamp & Weber (1999) e citada como um elemento que amplia o espectro de polinizadores da flor.

A presença da epiderme secretora nas pétalas pode estar relacionada à atração de polinizadores, mas é provável que não represente uma atração olfativa, como observado em espécies de *Rosa* e em *Viola odorata*, nas quais a secreção das pétalas é constituída por terpenos de baixo peso molecular e outras substâncias aromáticas derivadas (Buvat 1989). Já foram catalogados óleos essenciais, bálsamos, resinas, mucilagem, sais minerais, polissacarídeos e substâncias lipofílicas na secreção de epidermes secretoras (Buvat 1989). Testes histoquímicos devem ser realizados nas pétalas de *Dahlstedtia pentaphylla* e *D. pinnata*, a fim de se detectar o tipo de substância secretada e, assim, prover indícios para a função desempenhada pela epiderme secretora na flor.

Características consideradas adaptativas à polinização aparecem nos últimos estádios da ontogênese floral, segundo os trabalhos de Tucker (1993, 1994), o que também demonstra similaridade das espécies de *Dahlstedtia* com outras espécies polinizadas por pássaros, como *Castanospermum australe*, *Miroxylon balsamum* (Tucker 1993) e espécies de *Sophora* (Tucker 1994).

As espécies de *Dahlstedtia* são consideradas autocompatíveis (capítulo 3), o que pôde ser corroborado pelo estudo de sua ontogenia floral. O desenvolvimento carpelar precoce, caracterizado pela iniciação do primórdio carpelar antes do estaminal e pela iniciação dos primórdios ovulares anterior à fusão da fenda carpelar, o término do desenvolvimento do óvulo e do pólen e a deiscência da antera anteriores à antese são características que propiciam a autopolinização em espécies de *Dahlstedtia*. Em espécies de *Agalinis* foram encontradas características que indicam a presença de um sistema reprodutivo misto, tais como: desenvolvimento precoce do óvulo, do pólen (anterior à formação do estilete) e do estigma (anterior ao alongamento do estilete), deiscência da antera anterior à antese, a germinação do grão de pólen e o início da receptividade do estigma posteriores à antese, permanência da corola na flor por um período longo, posição paralela das anteras em relação aos filetes, curvatura dos lobos da corola na região entre a antera e o estigma, presença de tricomas na base do estigma (Stewart & Canne-Hilliker 1998). Entretanto, em *Dahlstedtia*, não há características que atestem a presença de hercogamia e dicogamia como observado em *Agalinis*. Apesar das plantas de *Dahlstedtia* apresentarem alta longevidade da corola (cerca de dois dias), proporcionando tempo para que haja deposição de pólen proveniente flores de outros indivíduos, a germinação dos grãos de pólen provenientes de autopolinização é rápida (cerca de 6h), do que se pode

constatar que a ausência de frutos deve-se mais certamente a problemas nos tecidos ovulares, ocorrendo antes ou mesmo após a fertilização (ver capítulo 3).

ANOMALIAS E SUPRESSÃO DE ÓRGÃOS – PROBLEMAS EM *DAHLSTEDTIA*?

A partir dos resultados de ontogenia floral em *Dahlstedtia pentaphylla* e *D. pinnata*, comparados a outros já realizados em Leguminosae por Tucker (1988a, 1988b, 1990, 1991, 1992, 1997, 1998), constata-se que não ocorrem processos de supressão, perda e mesmo anormalidades na ordem de aparecimento e na estrutura dos primórdios dos órgãos nestas espécies, o que resultaria na má-formação dos órgãos e, conseqüentemente, no aborto de flores e frutos.

O estudo da ontogenia floral em *Dahlstedtia* baseou-se em trabalhos cujos principais objetivos estavam relacionados à taxonomia de grupos de delimitação confusa e até artificial, como em *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna* (Tucker 1997). Além disso, há estudos de anomalias e supressão de órgãos florais nas três subfamílias de Leguminosae, com a finalidade de se estabelecer relações evolutivas entre os taxa (Tucker 1990, 1991, 1998) e de verificar o funcionamento do sistema sexual das espécies (Tucker 1988a, 1988b, 1992).

Segundo a Teoria da Morfogênese Floral estabelecida por Heslop-Harrison (1964), os órgãos florais em desenvolvimento nos sucessivos verticilos interagem especificamente, de forma que a remoção ou supressão de uma área, como por exemplo, o local onde se iniciarão os primórdios das sépalas, suprime completamente a formação do próximo verticilo, no caso, o das pétalas.

A supressão e a perda de função de órgãos florais, principalmente de verticilos estaminais, já foram correlacionadas ao aumento da esterilidade em Leguminosae, sendo estudadas detalhadamente em *Dialium*, *Labichea* e *Petalostylis* (Tucker 1998). As plantas destes gêneros ainda carecem de informações sobre o sistema sexual, já que a supressão de estames também pode ser explicada funcionalmente, como no caso do desenvolvimento diferencial das flores unissexuais e hermafroditas em *Neptunia pubescens* (Tucker 1988a) e *Ceratonia siliqua* (Tucker 1992).

Em linhagens estéreis de *Licopersycon*, os primórdios estaminais apresentam características carpelóides e os estames são mais tarde substituídos por estruturas anormais nas quais surgem óvulos externos. Tal anomalia está provavelmente relacionada às baixas concentrações de ácido giberélico, pois experimentos em que ocorria a sua aplicação nos primeiros estádios ontogenéticos resultam em estames normais. A comparação de linhagens

férteis e os experimentos com hormônios mostram que os primórdios estaminais normais e anormais só são distinguíveis nos últimos estádios da ontogenia floral, mas que já são determinados no início do processo (Steeves & Sussex 1989).

CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS

As espécies de *Dahlistedtia* assemelham-se a outras espécies de Papilionoideae quanto à iniciação sucessiva das tríades florais na inflorescência, à ordem de iniciação unidirecional de sépalas, pétalas e estames e à posição abaxial do surgimento do primeiro primórdio de sépala (Tucker 1997). A ordem de iniciação dos órgãos florais – sépalas seguidas das pétalas e, após, dos estames - é comumente encontrada em Leguminosae, sendo o período da iniciação do primórdio carpelar variável (Tucker 1997). Em *Dahlistedtia*, o primórdio carpelar aparece juntamente com o primórdio do primeiro ciclo de estames (antessépalos), diferente de *Castanospermum australe*, *Myroxylon balsamum* (Tucker 1993) e espécies de *Sophora* (Tucker 1994), estas também pertencentes à subfamília Papilionoideae, que apresentam o primórdio carpelar aparecendo após o do primeiro ciclo de estames.

Tricomas e cavidades secretores iniciam seu desenvolvimento nos primeiros estádios florais e são caracteres considerados diagnósticos na delimitação infragenérica (Fahn 1979), como visto em *Dahlistedtia* (Teixeira 1996, Teixeira & Gabrielli 2000) e em *Lonchocarpus* (Teixeira et al. 2000). Entretanto, de acordo com a hipótese proposta por Tucker (ver Tucker 1997), diferenças que podem separar espécies tendem a ser determinadas nos estádios finais da ontogenia. Caracteres propostos como diagnósticos para espécies e que são determinados no final da ontogenia incluem pigmentação das peças florais, distribuição e quantidade de estruturas que constituem o indumento e outros caracteres quantitativos, como por exemplo o tamanho dos órgãos (Tucker 1997). Nestes termos, as duas espécies de *Dahlistedtia* podem ser distinguidas pela coloração da corola (pink em *D. pinnata* e vermelha em *D. pentaphylla*), pela diferença no tamanho (maiores em *D. pinnata*) e pela distribuição das cavidades secretoras nas peças florais.

Embora diferenças em níveis taxonômicos infragenéricos não sejam comumente encontradas nos primeiros estádios da ontogênese (Tucker 1993, 1997), as espécies de *Dahlistedtia* diferiram quanto à distribuição de cavidades secretoras nos órgãos florais. A ocorrência destas cavidades já havia sido estudada na folha e no eixo vegetativo, sendo encontradas diferenças para as duas espécies (Teixeira 1996, Teixeira & Gabrielli 2000). *D.*

pentaphylla apresenta cavidades secretoras no caule, na folha, na base do cálice, nas asas e quilhas, enquanto que em *D. pinnata* tais estruturas ocorrem no caule, bractéolas, toda a extensão do cálice e em todas as pétalas modificadas, estando ausentes na folha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arroyo MTK. 1981. Breeding Systems in Leguminosae. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in Legume Systematics*. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, part 1, 1-26.
- Barroso GM, Morim MP, Peixoto AL & Ichaso CLF. 1999. *Frutos e Sementes. Morfologia aplicada à Sistemática de Dicotiledôneas*. Editora UFV, Viçosa.
- Buvat R. 1989. *Ontogeny, Cell Differentiation, and Structure of Vascular Plants*. Berlin: Springer-Verlag.
- Derstine KS & Tucker SC. 1991. Organ initiation and development of inflorescences and flowers of *Acacia baileyana*. *American Journal of Botany* **78**: 816-832.
- Fahn A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press Inc, London.
- 1992. *Plant Anatomy*. 4th ed. Oxford: Pergamon Press.
- Foster AS & Gifford EM Jr. 1974. *Comparative Morphology of Vascular Plants*. 2nd ed. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Geesink R. 1984. *Scala Millettiearum: a survey of the genera of the tribe Millettieae (Leguminosae, Papilionoideae)*. Leiden: E. J. Brill & Leiden University Press (Leiden Botanical Series, 1).
- Gerlach D. 1969. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart: Georg. Thieme Verlag.
- Gerrits PO. 1991. *The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles*. Netherlands: Department of Anatomy and Embriology, State University Groningen.
- Gifford Jr EM. 1954. The shoot apex in Angiosperms. *The Botanical Review* **20**: 477-529.
- Heslop-Harrison J. 1964. Sex expression in flowering plants. *Brookhaven Symposium of Biology* **16**: 109-125.
- Howell GJ, Slater AT & Knox RB. 1993. Secondary pollen presentation in Angiosperms and its biological significance. *Australian Journal of Plant Science* **41**: 417-438.
- Hufford L & Diggle PK. 1997. The morphology and evolution of flowers: a tribute to the work of Shirley Tucker: an introduction. *International Journal of Plant Science* **158 (Suppl.)**: S1-S2.

- Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A-138A.
- Lloyd DG. 1980. Sexual strategies in plants. 1. An hypothesis of sexual adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytologist* **86**: 69-79.
- Lloyd DG, Webb CJ & Primack RB. 1980. Sexual strategies in plants. 2. Data on the temporal regulation of maternal investment. *New Phytologist*. **86**: 81-92.
- Malme G. 1905. *Dahlstedtia*, eine neue Leguminosen – Gattung. *Ark. Bot.* **4**: 1-7.
- Polhill RM, Raven PH & Stirton CH. 1981. Evolution and Systematics of the Leguminosae. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in Legume Systematics*. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, part 1, 1-26.
- Robinson H. 1985. Observations on fusion and evolutionary variability in the Angiosperm flower. *Systematics Botany* **10**: 105-109.
- Smithe FB. 1975. *Naturalist's Color Guide*. The American Museum of Natural History, New York.
- Sousa M & Sousa MP. 1981. New World Lonchocarpaceae. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in Legume Systematics*. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, part 1, 261-281.
- Steeves TA & Sussex IM. 1989. *Patterns in Plant Development*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Stephenson AG. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics* **12**: 253-279.
- Stewart HM & Canne-Hiliker JM. 1998. Floral development of *Agalinis neoscotica*, *Agalinis paupercula* var. *borealis*, and *Agalinis purpurea* (Scrophulariaceae): implications for taxonomy and mating system. *International Journal of Plant Science* **159**: 418-439.
- Teixeira SP. 1996. *Anatomia Comparativa dos órgãos vegetativos de Dahlstedtia Malme (Leguminosae, Papilionoideae)*. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, S.P.
- - & Gabrielli AC. 2000. Anatomia Comparativa do Eixo Vegetativo em *Dahlstedtia pinnata* e *D. pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoideae). *Revista brasileira de Botânica* **23**: 1-11.
- -, Castro MM & Tozzi AMGA. 2000. Secretory cavities and pellucid dots in leaflets of *Lonchocarpus* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). *Plant Systematics and Evolution* **221**: 61-68.

- Tucker SC. 1987. Floral initiation and development in legumes. In: Stirton CH, ed. *Advances in Legume Systematics*, Kew, UK: Royal Botanic Gardens, part 3, 183-239.
- 1988a. Heteromorphic flower development in *Neptunia pubescens*, a mimosoid legume. *American Journal of Botany* **75**: 205-224.
 - 1988b. Dioecy in *Bauhinia* resulting from organ suppression. *American Journal of Botany* **75**: 1584-1597.
 - 1990. Loss of floral organs in *Ateleia* (Leguminosae, Papilionoideae). *American Journal of Botany* **77**: 750-761.
 - 1991. Helical floral organogenesis in *Gleditsia*, a primitive caesalpinoid legume. *American Journal of Botany* **78**: 1130-1149.
 - 1992. The role of floral development in studies of legume evolution. *Canadian Journal of Botany* **70**: 692-700.
 - 1993. Floral ontogeny in Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae). I *Myroxylon* (*Myroxylon* group) and *Castanospermum* (*Angylocalyx* group). *American Journal of Botany* **80**: 65-75.
 - 1994. Floral ontogeny in Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae). II. *Sophora* "sensu lato" (*Sophora* group). *American Journal of Botany* **81**: 368-380.
 - 1997. Floral evolution, Development, and Convergence: The Hierarchical-Significance Hypothesis. *International Journal of Plant Science* **158**(Suppl.): 143-161.
 - 1998. Floral ontogeny in legume genera *Petalostylis*, *Labichea*, and *Dialium* (Caesalpinioideae : Cassieae), a series in floral reduction. *American Journal of Botany* **85**: 184-208.
- Udovic D & Aker CL. 1981. Fruit abortion and the regulation of fruit number in *Yucca whipplei*. *Oecologia* **49**: 245-248.
- Westerkamp C. 1996. Pollen in bee-flower relations. Some considerations on melittophily. *Botanica Acta* **109**(4): 261-340.
- Westerkamp C & Weber A. 1999. Keel flowers of the Polygalaceae and Fabaceae: a functional comparison. *Botanical Journal of the Linnean Society* **129**: 207-221.

Figura 1. Flores papilionáceas. **A.** *Dahlistedtia pinnata*. Escala = 0,6cm. **B.** *D. pentaphylla*. Escala = 0,5cm.



Figura 2. Morfologia externa das flores papilionáceas de *Dahlstedtia*. **A-D.** *D. pinnata*. **E-H.** *D. pentaphylla*; **A, E.** Botões em estágio final de desenvolvimento. **B, F.** Flores em antese mostrando que não há exposição dos órgãos reprodutivos. **C, G.** Estigmas puntiformes; ovários súperos; disco nectarífero na base dos ovários. **D, H.** Tubos de filetes (monadelfia), com aberturas na base; estigmas acima das anteras. Escalas = 1cm.

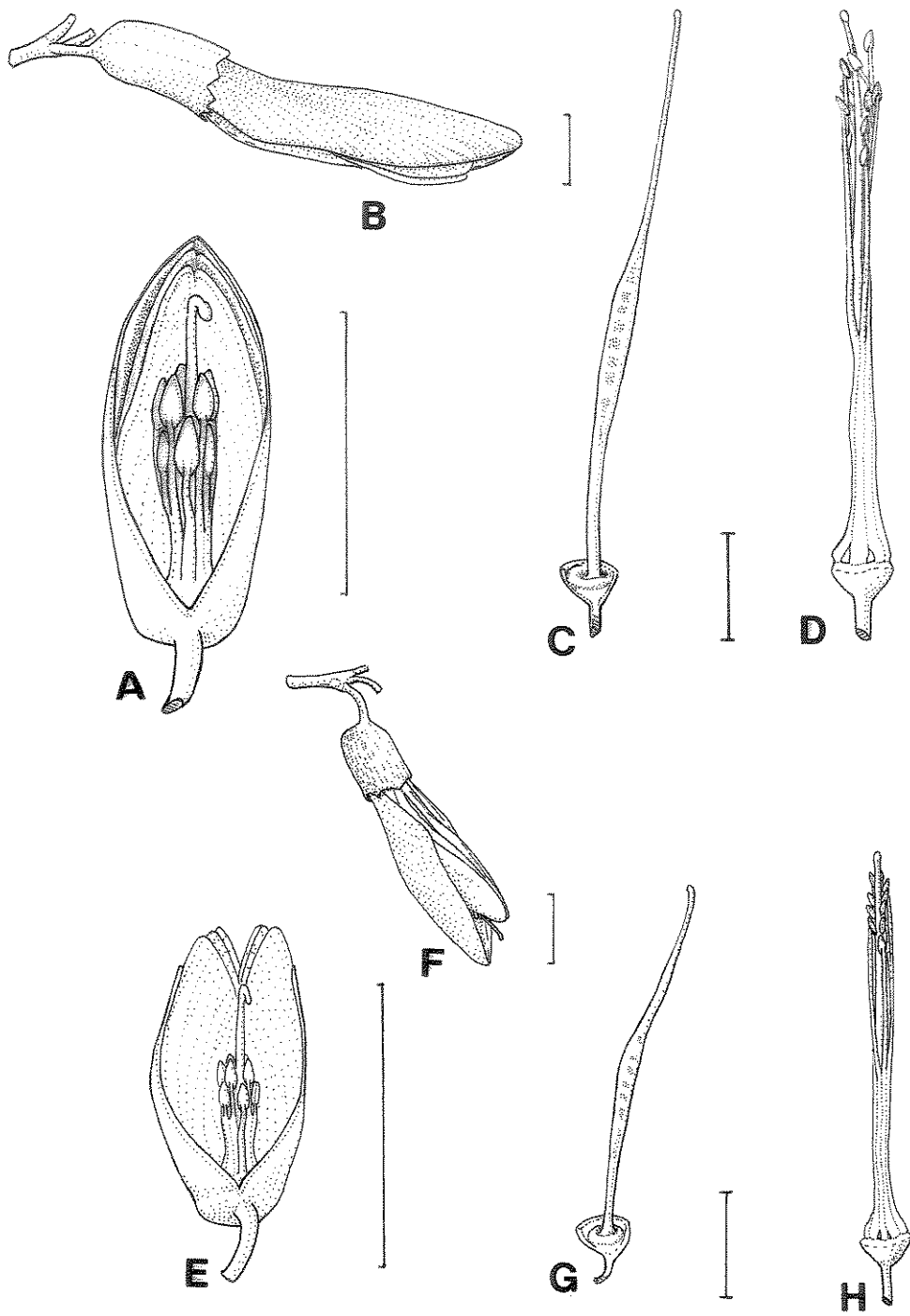


Figura 3. Desenvolvimento floral de *Dahlstedtia pinnata* (Fotomicrografias de MEV). A-C. Organogênese. A, B. Iniciação unidirecional das sépalas. C. Formação da fenda carpelar voltada para o estandarte. D, E. Estádio intermediário de desenvolvimento dos órgãos. A seta em D indica a formação de um estame antepétalo. a – asa, c – carpelo, e – estame antessépalo, es – estandarte, q – quilha, s – sépala. O estandarte marca o lado adaxial da flor. Sépalas removidas em C, D e E. Escalas = 50µm.

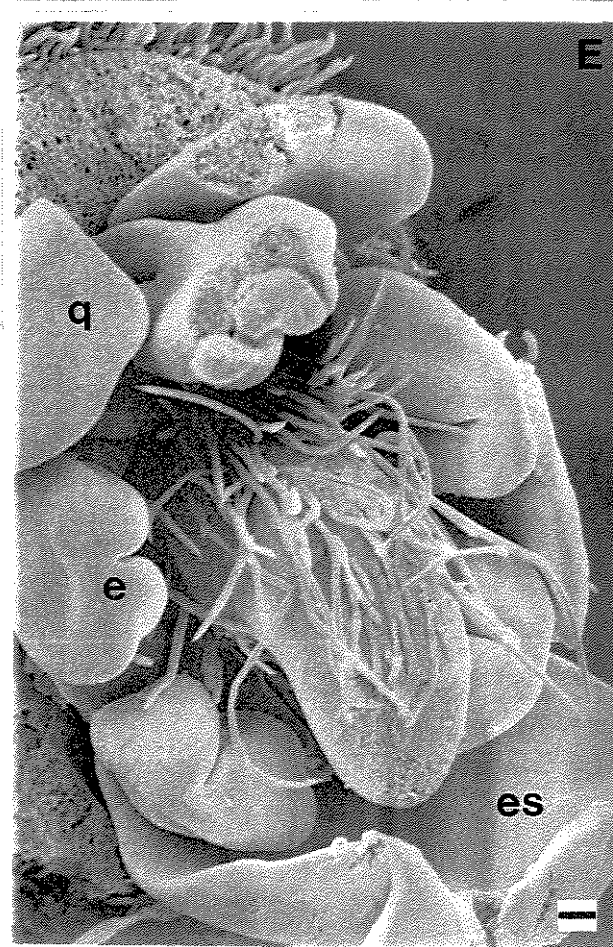
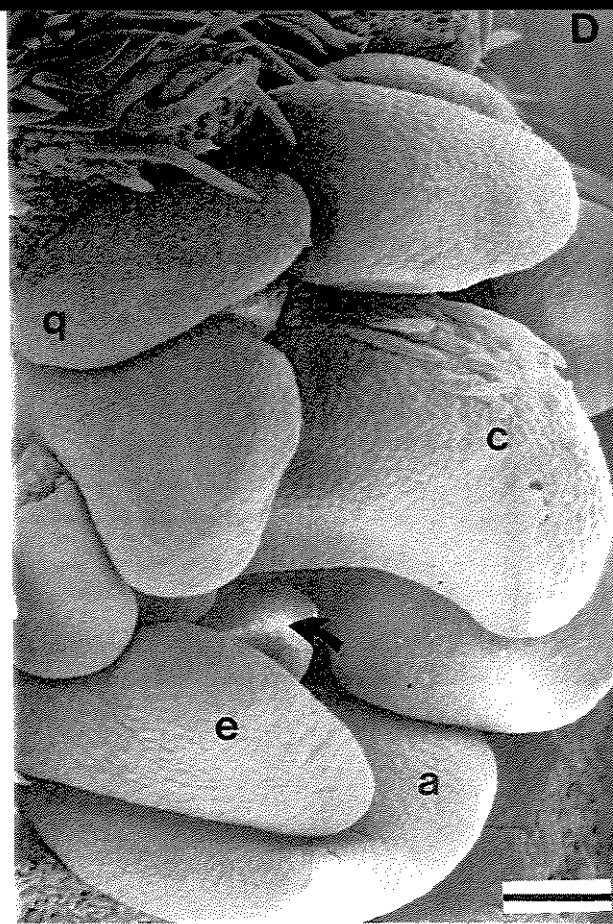
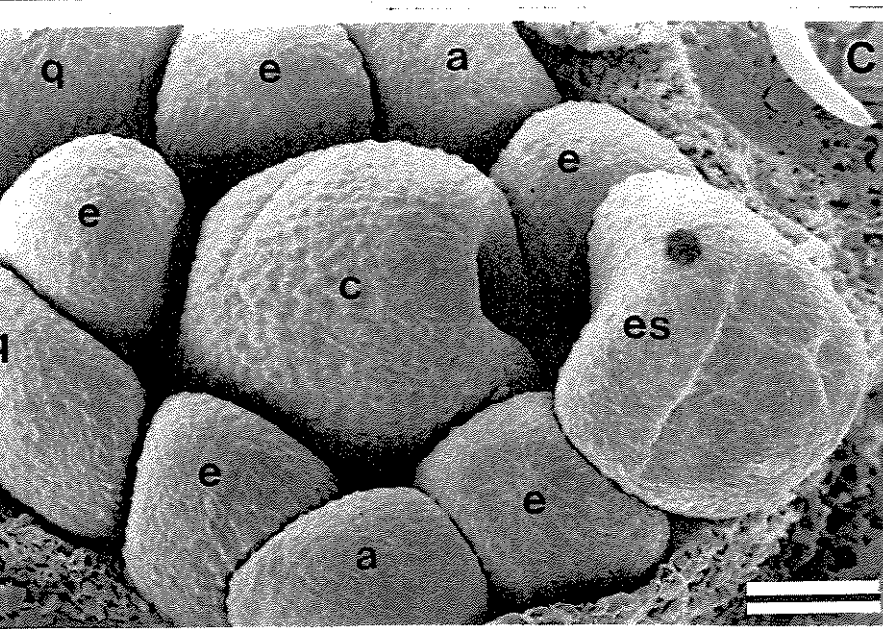
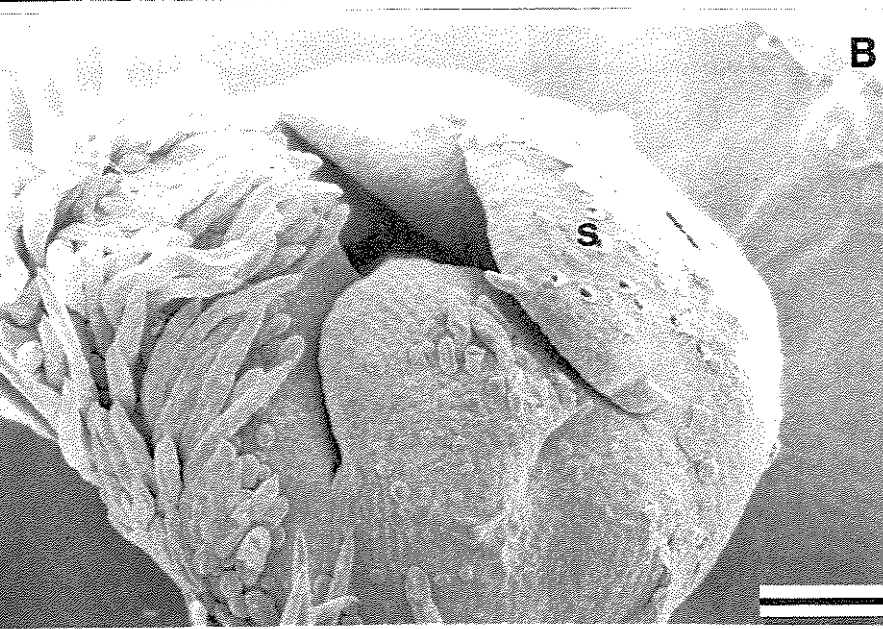
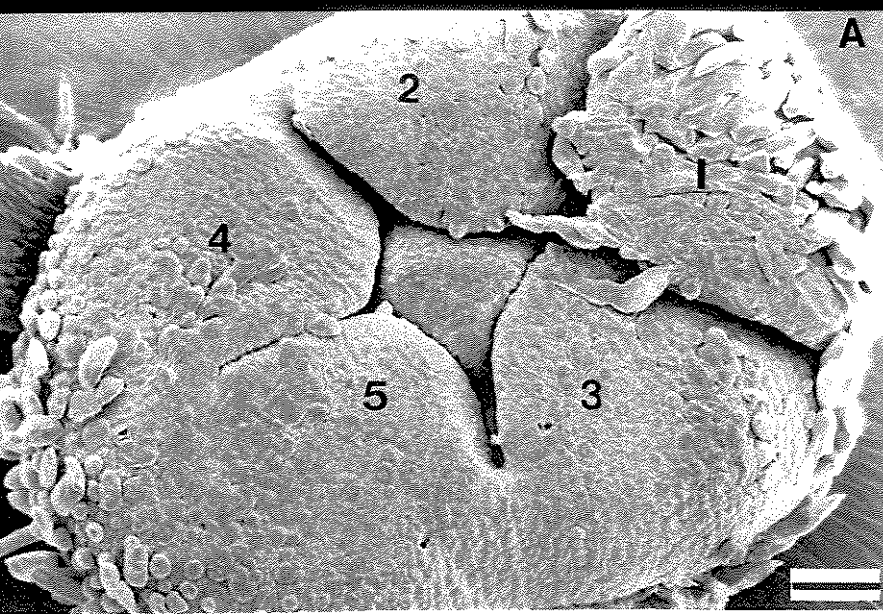


Figura 4. Desenvolvimento floral de *Dahlistedtia pentaphylla* (Fotomicrografias de MEV). Organogênese. **A.** Sequência de formação das bractéolas. **B.** Formação unidirecional das sépalas. **C.** Aparecimento da coluna carpelar no centro do botão com as sépalas já formadas. b – bractéola, s - sépala. Escalas = 50µm.

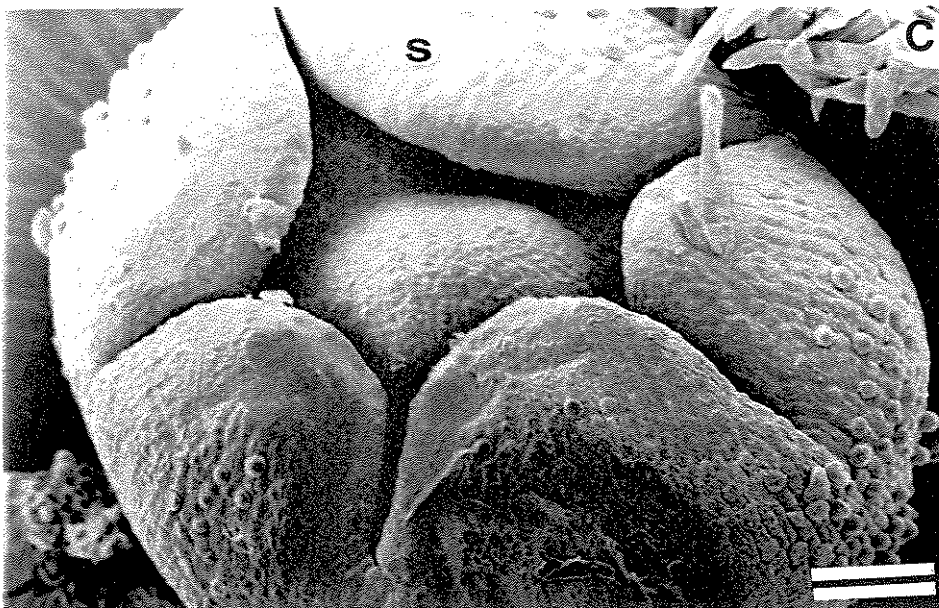
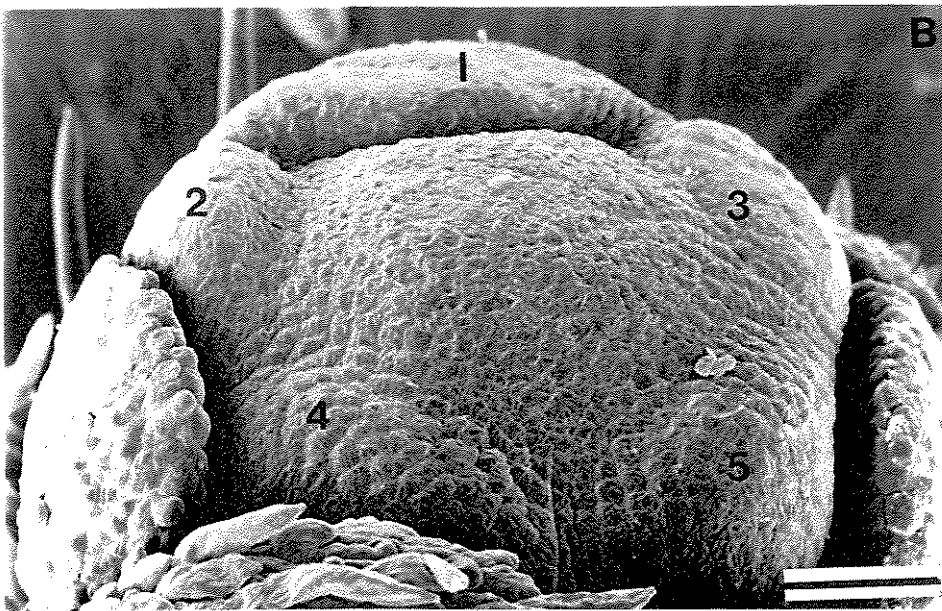
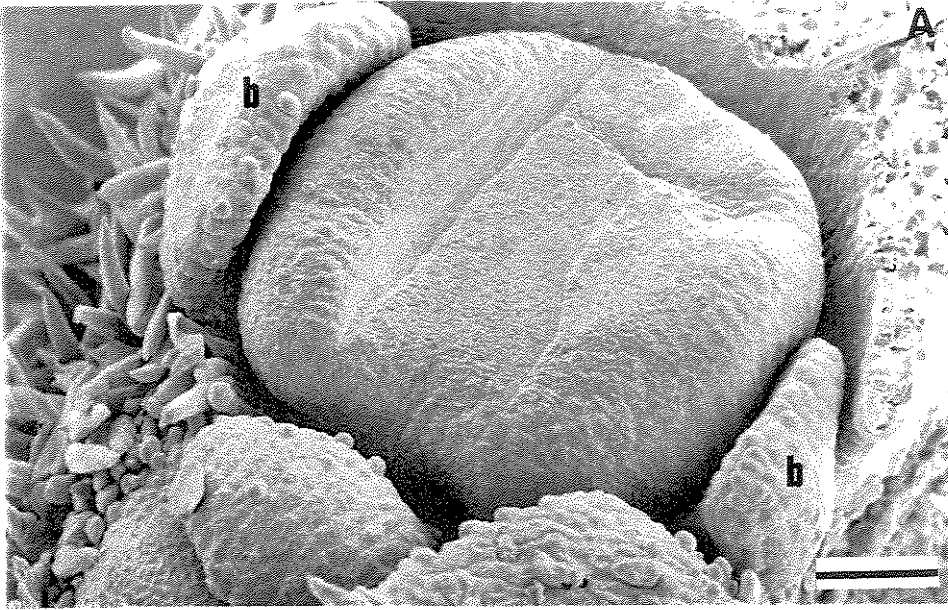


Figura 5. Desenvolvimento floral de *Dahlstedtia pentaphylla* (Fotomicrografias de MEV). **A.** Estames antessépalos. **B.** Estames antepétalos; seta mostrando um dos estames. **C.** Formação da fenda carpelar voltada para o estandarte. **D.** Vista lateral das pétalas, estames e carpelo em formação. **E.** Vista polar das pétalas, estames e carpelo em formação. Sépalas removidas de A a E. a – asa, c – carpelo, e – estame antessépalo, es – estandarte, q – quilha. Escalas = 50µm.

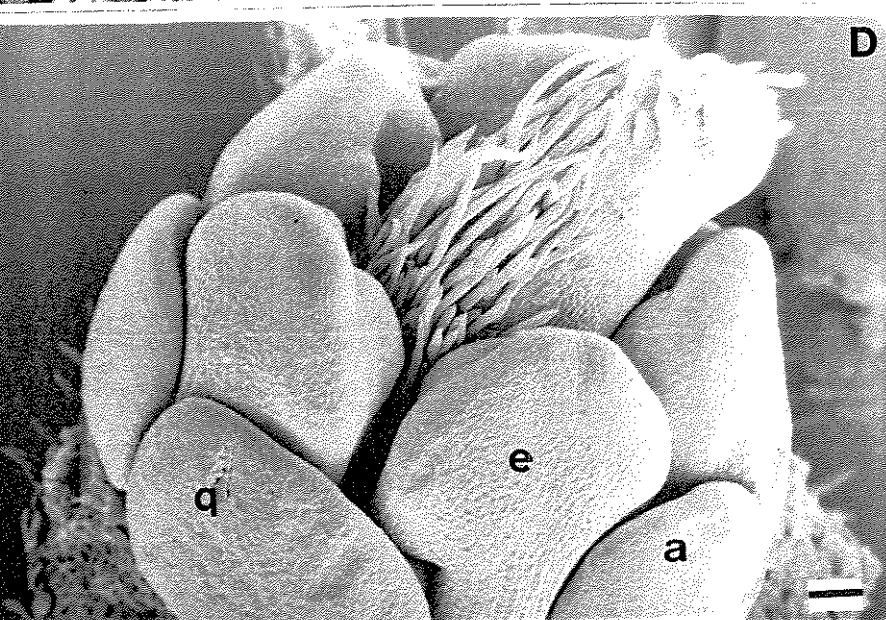
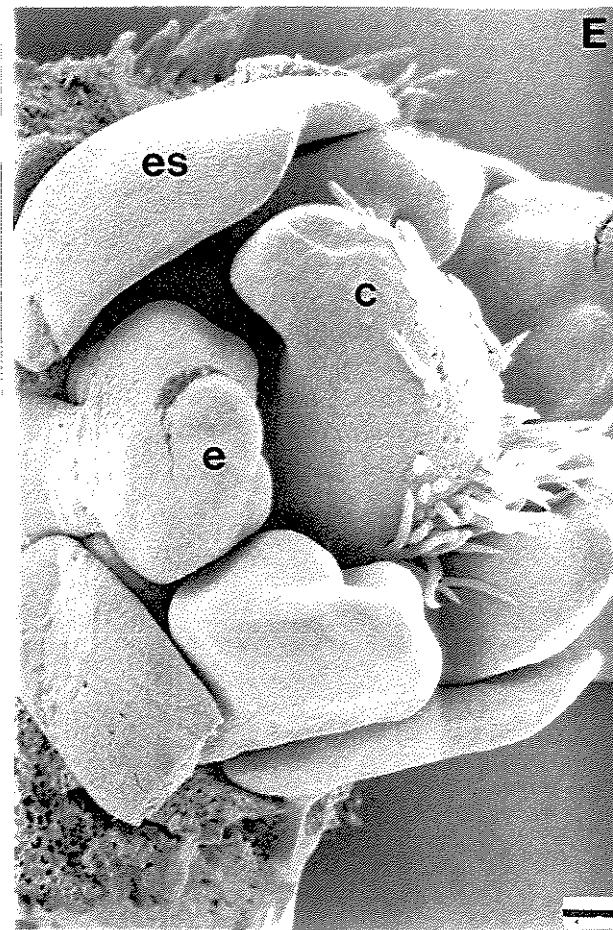
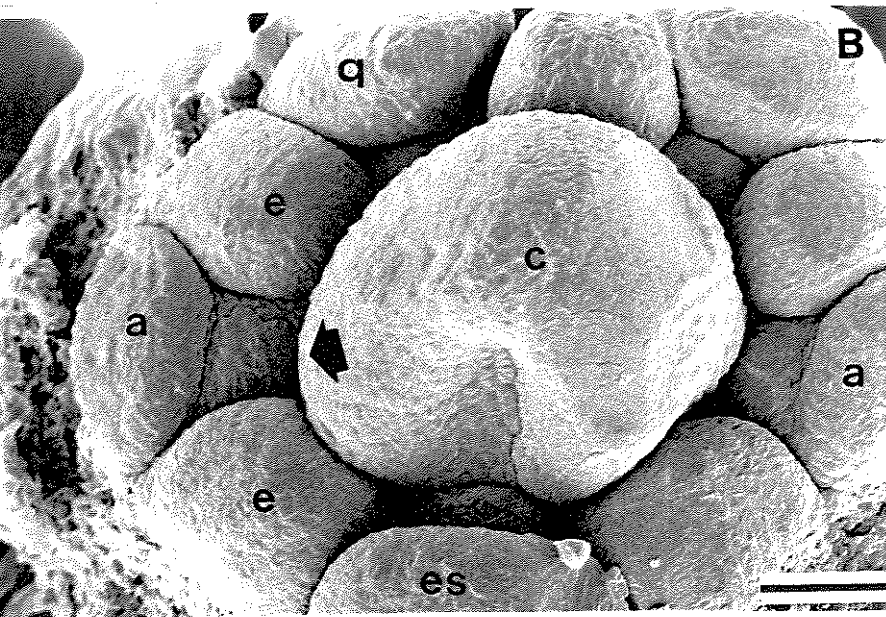
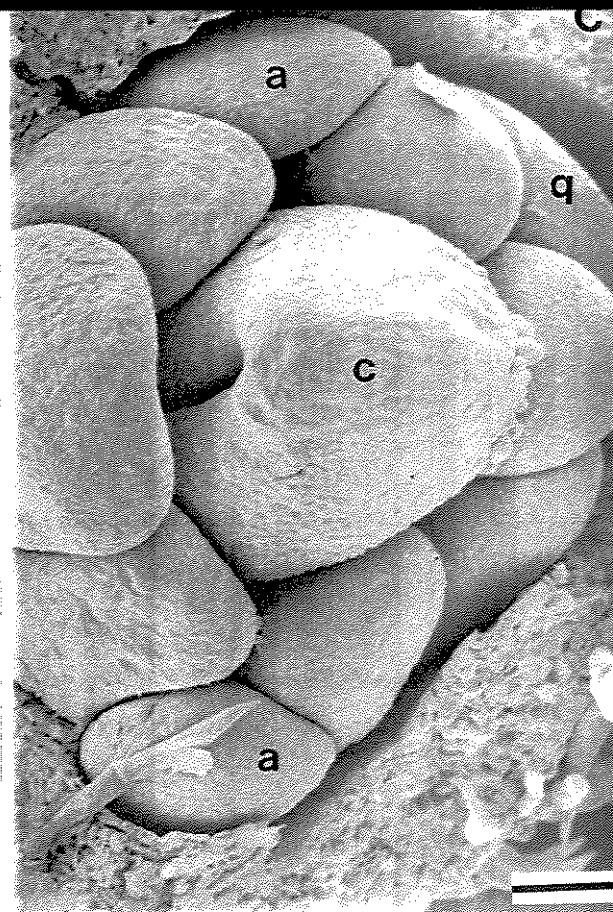
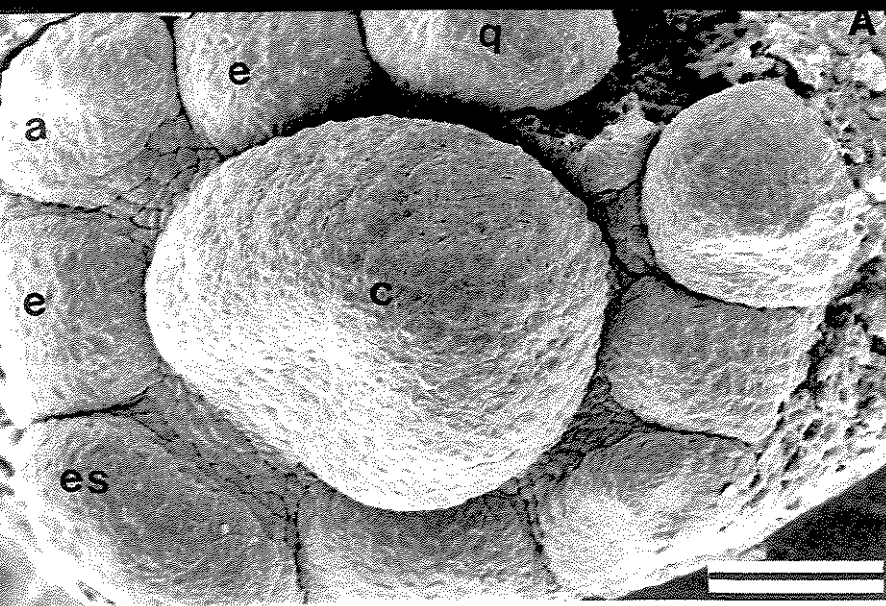


Figura 6. *Dahlstedtia pentaphylla*. A-E, G. Cortes longitudinais. A. Formação de três ápices florais na axila de um par de brácteas. Seta indica o início da formação da bractéola. B. Vista lateral de uma tríade de gemas florais. C. Detalhe de um ápice floral. Seta indica o primórdio de uma sépala. D. Formação unidirecional de estames antessépalos (setas). E. Divisões celulares nos primórdios do carpelo e do estame. F. Corte transversal. Formação do óvulo (seta) anterior à fusão da fenda carpelar. G. Disposição linear dos óvulos no ovário. b – bráctea, br – bractéola, c – primórdio do carpelo, g – gema floral, o – ovário, p – primórdio da pétala, pe- primórdio do estame, s – sépala. Escalas: fig. A, C, F = 43µm; figs. B, D, G = 91µm; fig. E = 22µm.

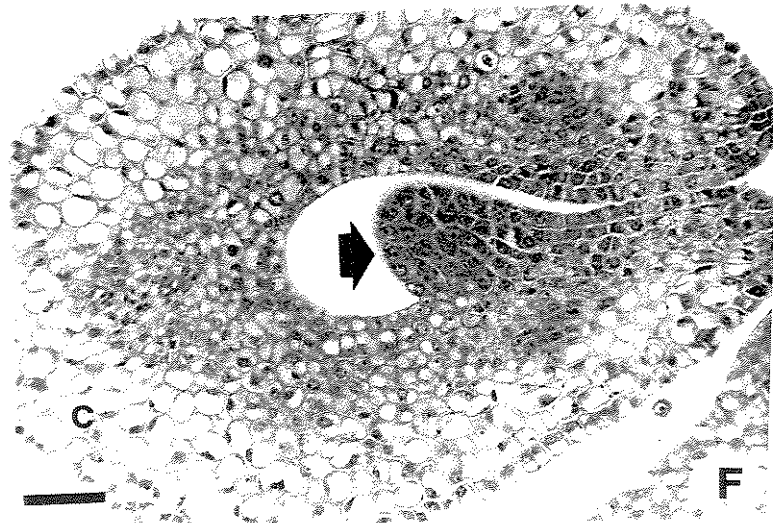
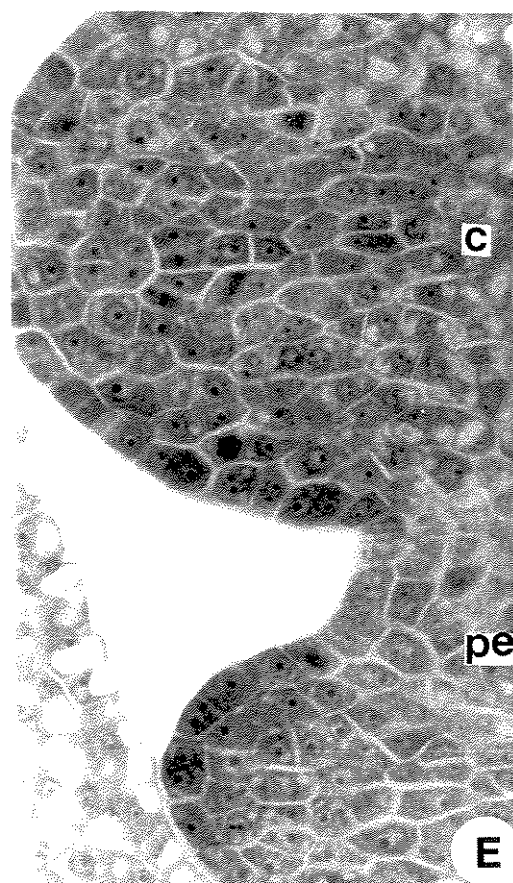
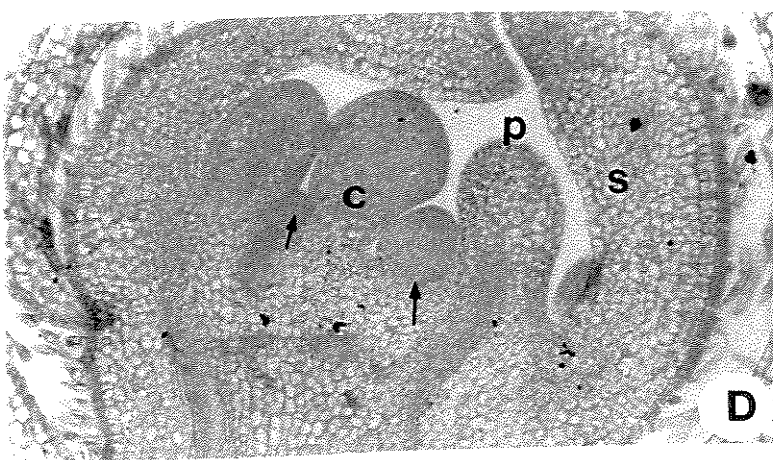
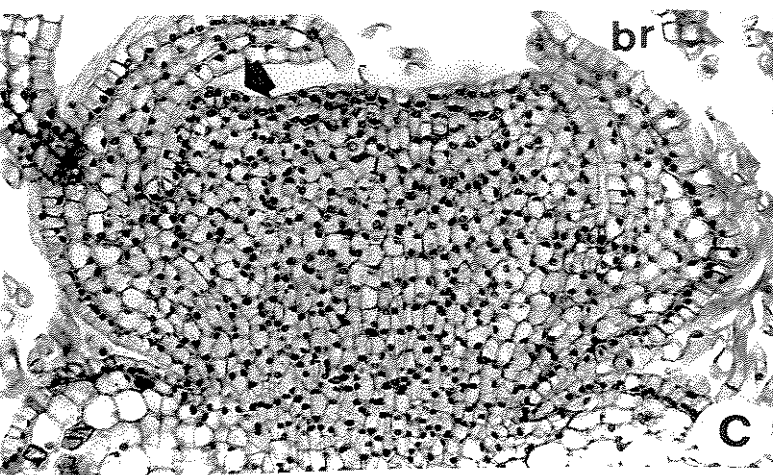
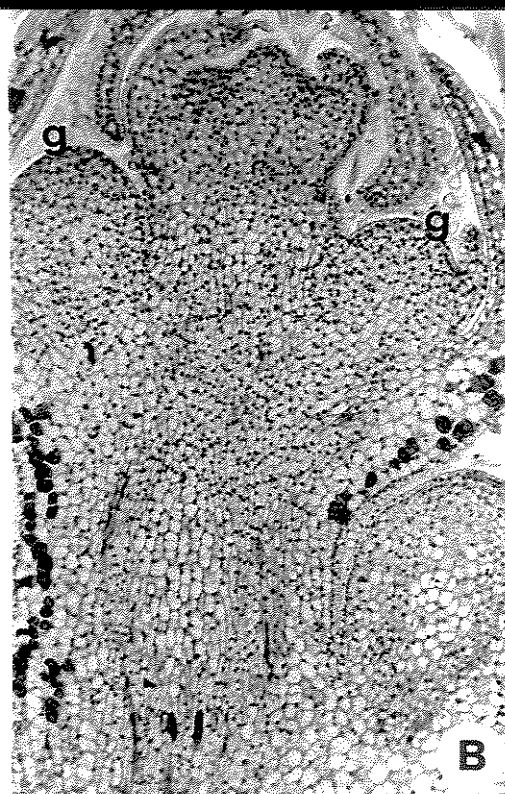
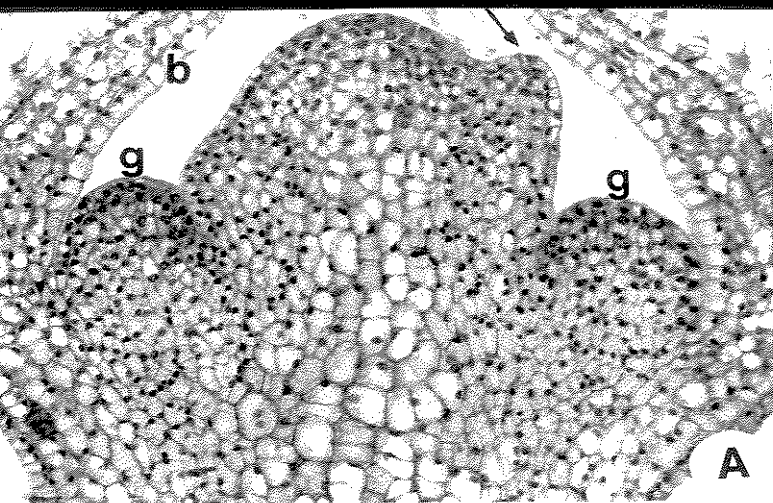
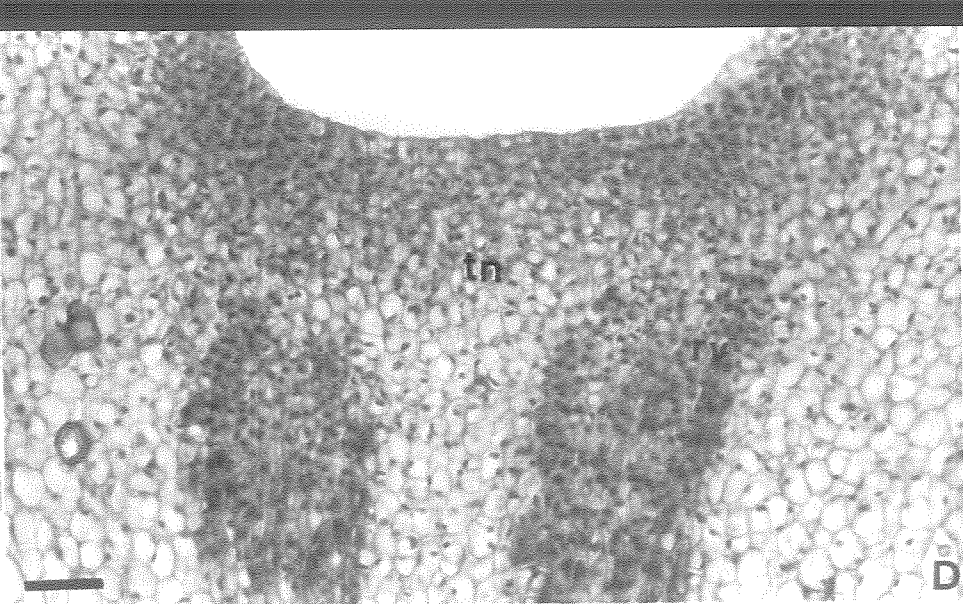


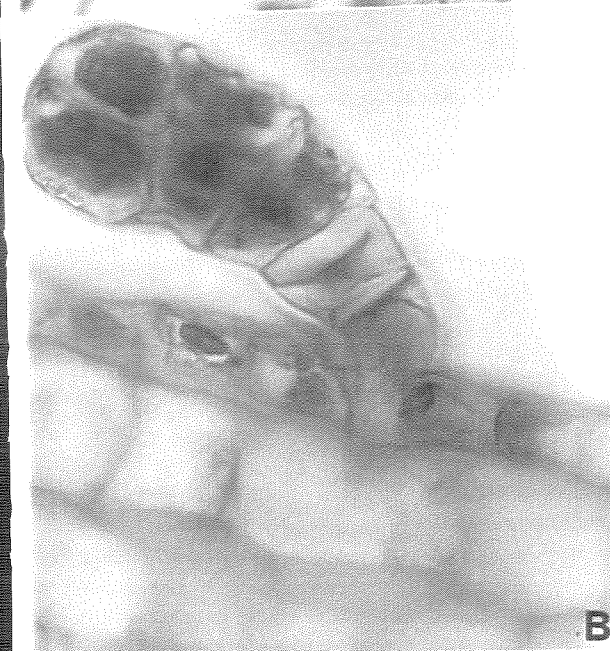
Figura 7. Estruturas secretoras nas peças florais em *Dahlstedtia pentaphylla*. Cortes longitudinais. **A.** Tricoma secretor na sépala em estágio anterior à secreção. **B.** Tricoma secretor na sépala em estágio posterior à secreção. **C.** Cavidade secretora na sépala. **D.** Nectário na base da flor. **E.** Epiderme secretora no ápice da quilha em início do processo de secreção. **F.** Epiderme secretora após a secreção. Observe a secreção (seta) em forma de gotas e corada em vermelho pela Safranina. tn – tecido nectarífero, rv – região vascular. Escalas: figs. A, B, E e F = 9,5µm; fig. C = 43µm; fig. D = 91µm.



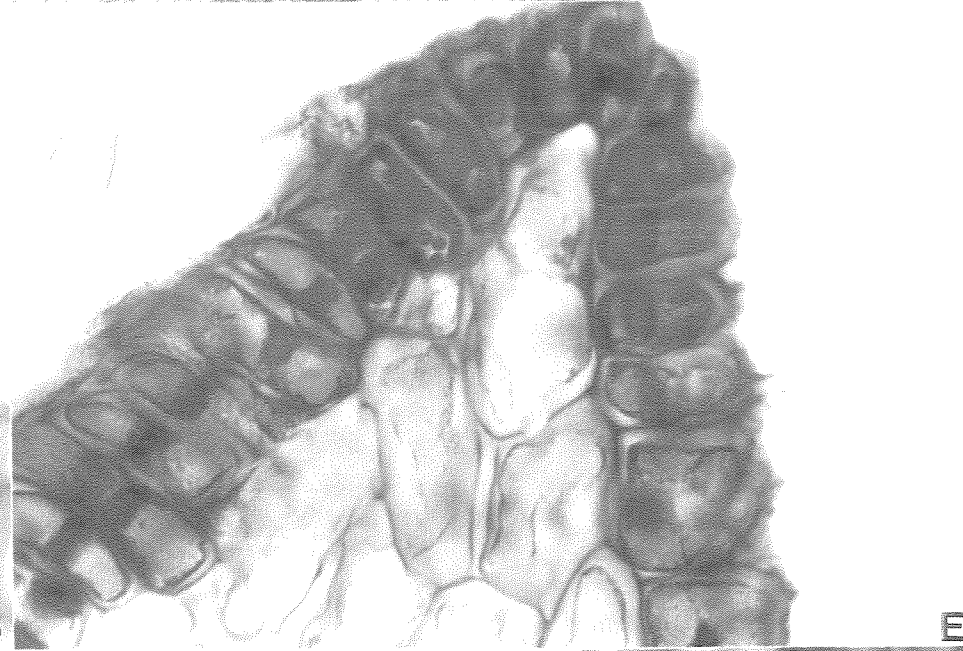
A



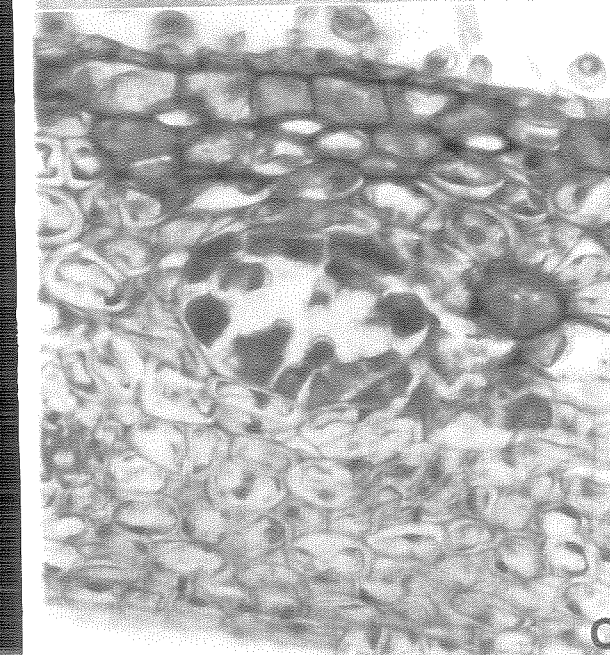
D



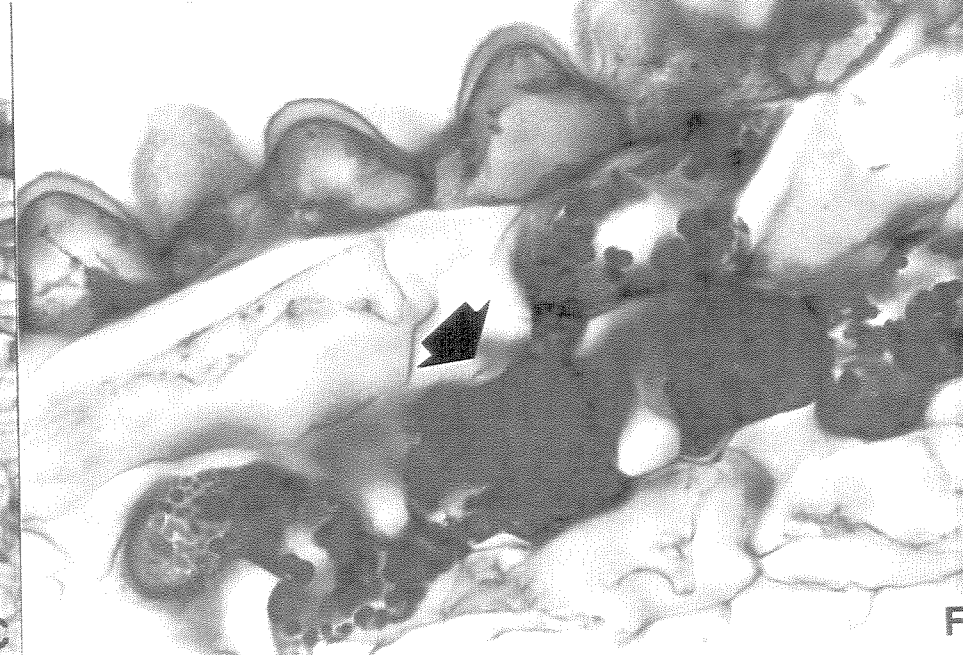
B



E



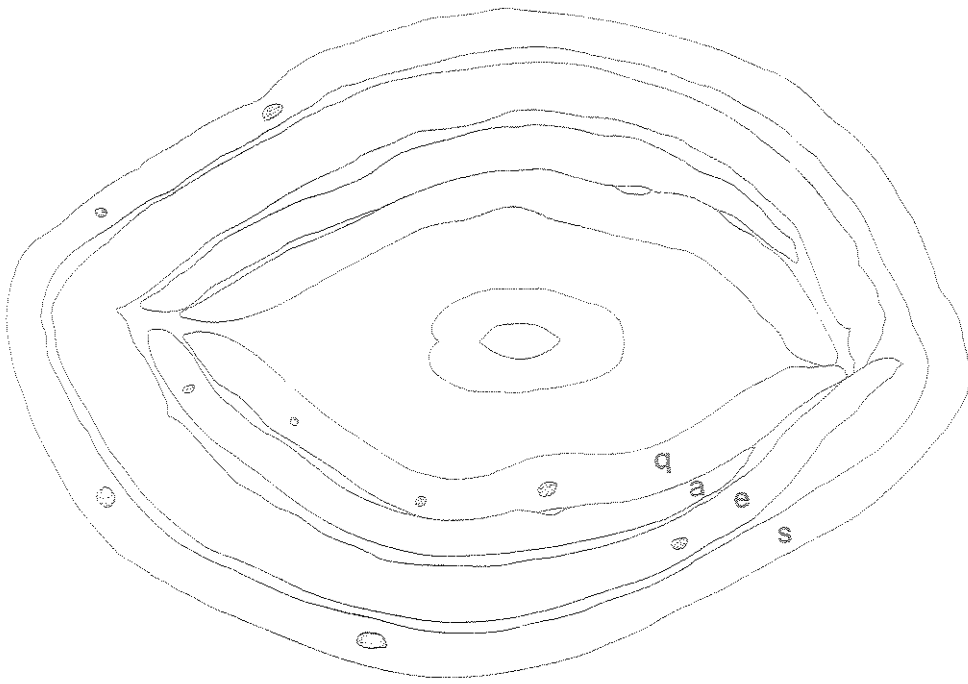
C



F

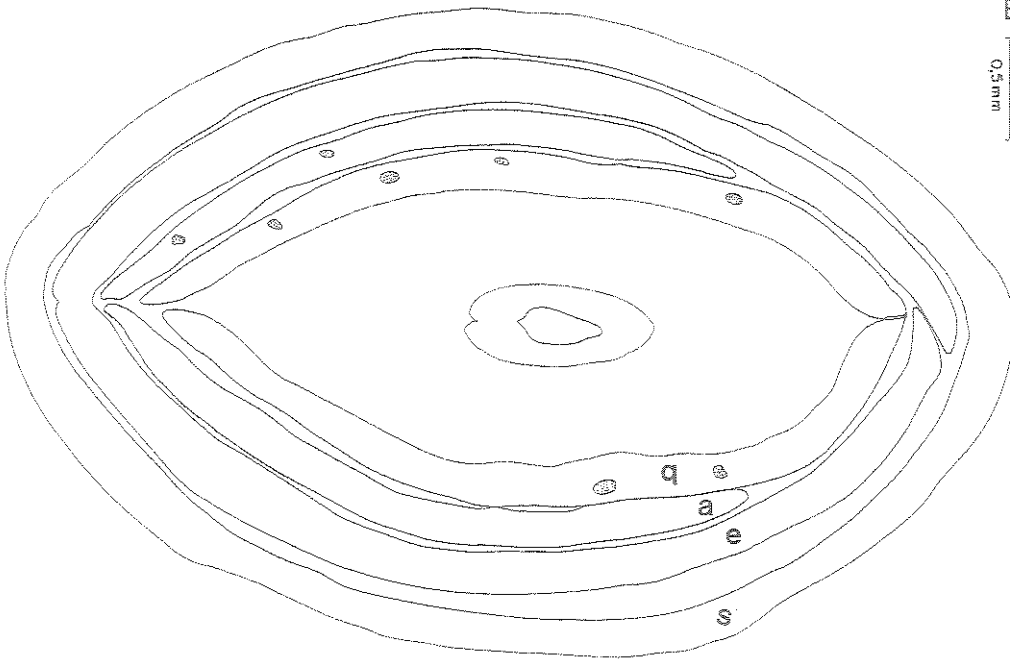
Figura 8. Cortes transversais de botões florais na altura das anteras mostrando a distribuição das cavidades secretoras no cálice e nas pétalas em *Dahlstedtia*. A. *D. pinnata*. B. *D. pentaphylla*. a – asa, c – cálice, e – estandarte, o – ovário, q – quilha.

A



0.5 mm

B



0.5 mm

CAPÍTULO II: "MICROSPOROGÊNESE E CITOLOGIA DO GRÃO DE PÓLEN EM *DAHLSTEDTIA PINNATA* E *D. PENTAPHYLLA* (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE)"

RESUMO

O desenvolvimento do grão de pólen, o comportamento e a contagem dos cromossomos meióticos, e a normalidade das tétrades foram estudados nas duas espécies do gênero *Dahlstedtia* e, então, foi verificado se o grão de pólen pode ser considerado um fator limitante nos eventos de fertilização. Para o estudo do desenvolvimento do grão de pólen botões florais de vários tamanhos foram seccionados em série e corados em Safranina-Azul de Astra ou em Azul de Toluidina. Para o estudo dos cromossomos meióticos e das tétrades anteras foram esmagadas e coradas em Carmin Acético. Ápices radiculares foram tratados para analisar as células mitóticas e realizar a contagem cromossômica. A antera é tetrasporangiada e apresenta deiscência longitudinal anterior à antese da flor. Células arquesporais, em cada microsporângio, originam as células esporogênicas primárias e as células precursoras da parede da antera. O tapete é unisseriado, uninucleado e glandular. A citocinese é do tipo simultâneo, resultando tétrades polínicas tetraédricas ou decussadas. Os micrósporos apresentam parede espessa e sinuosa, com pequenas projeções. Os grãos de pólen maduros são tricolpados e bicelulares. Não foram registradas irregularidades no comportamento dos cromossomos meióticos e nem em outras fases do desenvolvimento do grão de pólen. O número cromossômico encontrado para as duas espécies foi $n = 11$ e as análises mitóticas (em metáfase) mostraram a ocorrência de $2n = 22$. A contagem de cromossomos para as espécies de *Dahlstedtia* é inédita e como o estudo citológico abrangeu todas as espécies do gênero, conclui-se que $x = 11$ (número básico). *D. pentaphylla* apresentou índices meióticos mais altos e menor variação de valores entre indivíduos que *D. pinnata*, sendo considerada, portanto, meioticamente estável; os grãos de pólen não são limitantes da fertilização. Já em *D. pinnata*, o grão de pólen pode ser considerado um dos fatores limitantes da fertilização, pois esta espécie apresenta regularidade meiótica baixa. Tal dado, juntamente com observações de grande número de rebrotas nas plantas, pode estar indicando que a propagação vegetativa tem grande importância no processo reprodutivo desta espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Leguminosae, *Dahlstedtia*, Microsporogênese, Índice Meiótico, Número cromossômico.

INTRODUÇÃO

Na impossibilidade de prover recursos para a maturação de todos os frutos e sementes, as plantas abortam aqueles de qualidade inferior (Janzen 1977, Stephenson 1981, Bawa & Webb 1984). Frutos e sementes produzidos após intensa competição polínica são mais aptos para a maturação porque o grão de pólen geneticamente superior é que efetuará a fertilização (Janzen 1977). Niesenbaum (1999) constatou que a competição no ambiente polínico e a diversidade genética do pólen afetam tanto a germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico quanto os padrões de aborto no fruto.

O número de grãos de pólen depositados no estigma também foi apontado como um fator importante na produção de frutos e sementes. Segundo Charlesworth (1988), com o aumento no número dos grãos de pólen no estigma é provável que os recursos maternos sejam dirigidos para o ovário e os embriões se desenvolvam rapidamente. Por outro lado, embriões mais vigorosos podem ser produzidos através da fertilização pelo grão de pólen mais rápido e competitivo (Snow & Spira 1996, Niesenbaum 1999). Tubos polínicos com crescimento mais rápido possibilitam um aumento na velocidade da fertilização e, assim, o embrião se desenvolve antes da planta iniciar o processo de abscisão, reduzindo o aborto (Niesenbaum 1999).

O futuro sucesso reprodutivo masculino de um táxon pode ser avaliado já nas primeiras etapas do desenvolvimento do grão de pólen, através da caracterização citológica da microsporogênese (Gibson & Diggle 1998, Ilarslan et al. 1999). Anormalidades podem ser constatadas logo nas divisões do tecido esporogênico e no processo meiótico, bem como na separação das tétrades (Loukides et al. 1995, Gibson & Diggle 1998, Ilarslan et al. 1999). No processo de maturação do micrósporo, eventos como a formação da exina e da intina podem acarretar o aborto dos grãos (Kronestedt-Robards & Rowley 1989, Gibson & Diggle 1998). As células do tapete, responsáveis pela nutrição do micrósporo, parecem também estar envolvidas no aborto, apresentando anormalidades em certas etapas do seu ciclo (hiperatividade, desdiferenciação, mitose, hiperatividade novamente e declínio). A desintegração precoce destas células pode ser caracterizada pela presença de corpos lipídicos e pelo aumento da vacuolização (Kronestedt-Robards & Rowley 1989, Loukides et al. 1995). Ilarslan et al. (1999) descreveram a hipertrofia celular da camada parietal acarretando o colapso das células do tapete e dos micrósporos como um dos eventos do processo abortivo. Em *Ocotea tenera*, há a formação de um tecido colunar subepidérmico

na região de deiscência da antera, constituído por células de paredes espessadas, sem, no entanto, ocorrer abertura para a liberação dos grãos de pólen (Gibson & Diggle 1998).

Baixa qualidade polínica tem sua origem mais comumente associada às irregularidades que podem ocorrer no processo meiótico, como a não disjunção dos cromossomos, a migração cromossômica para um dos pólos ou para vários, assinapsia, resultando em micrósporos desbalanceados ou não reduzidos (Peel et al. 1997).

O objetivo deste trabalho é estudar a citologia do grão de pólen nas várias fases de seu desenvolvimento e, então, verificar se este pode ser considerado um fator limitante no processo reprodutivo de *Dahlistedtia pinnata* (Benth.) Malme e *D. pentaphylla* (Taub.) Burkart (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). Além disso, serão ressaltadas as características que possam auxiliar a taxonomia destas espécies, cuja ocorrência é restrita à Floresta Atlântica brasileira e cujos representantes apresentam baixa produção de frutos e sementes em condições naturais. Para tal, pretende-se responder as seguintes questões: Como é o desenvolvimento do grão de pólen? Sua maturação é concomitante à do óvulo? Como é o comportamento dos cromossomos meióticos? As espécies são meioticamente estáveis? Como e quando ocorre a liberação dos grãos de pólen? Há anormalidades na formação do grão de pólen ou nos tecidos da antera?

MATERIAIS E MÉTODOS

O material de *Dahlistedtia pinnata* foi coletado de indivíduos cultivados no IAC, Campinas, SP e de indivíduos que ocorrem naturalmente no Parque Estadual da Serra do Mar em Picinguaba, SP. O material de *Dahlistedtia pentaphylla* foi coletado de indivíduos cultivados no CATI e no Complexo Botânico Monjolinho, em Campinas e no Campus da Esalq, Piracicaba, SP e de indivíduos que ocorrem naturalmente na Fazenda Intervalles, SP. O material testemunho das duas espécies está depositado no herbário UEC (Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP) sob os números 300, 17936, 28637, 28746, 109265, 109266, 109267, 109535, 109536.

As diferentes fases de formação do grão de pólen (microsporogênese) e dos tecidos da antera foram estudadas em cortes histológicos de botões florais, em vários estádios de desenvolvimento. Os materiais foram fixados em solução de Karnovsky por 24h (Karnovsky 1965) e estocados em álcool 70%. Lâminas permanentes foram obtidas após desidratação gradual do material em álcool butílico terciário e inclusão em paraplast (Prakash 1986), e

após desidratação em série etílica e inclusão em historresina "Basic Resin" (Gerrits 1991), seccionamento seriado longitudinal e transversal (4 a 6µm de espessura), coloração com Azul de Toluidina (historresina) (O'Brien et al. 1964) ou Safranina e Azul de Astra (paraplast) e montagem em resina sintética Epoxi (Gerlach 1969).

A morfologia externa do grão de pólen foi investigada através de Microscopia Eletrônica de Varredura. As anteras foram dissecadas em álcool 95%, desidratadas em série acetona-etílica (Tucker 1993), sendo o material submetido ao ponto crítico em um aparelho Balzers CPD 030, montado em suportes metálicos, colado sobre fita adesiva de Carbono e, então, coberto com Ouro em um Balzers SCD 050 sputter coater por 280s. As observações foram efetuadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura DSM 940 A (Zeiss) em 5 kv, sendo as fotomicrografias obtidas em uma câmera Sinar 67.

Para o estudo do comportamento e a contagem dos cromossomos meióticos e da normalidade das tétrades, botões florais de vários tamanhos foram coletados em horários diferentes do dia, fixados em Carnoy (álcool etílico-ácido acético glacial-clorofórmio 6:1:3) por 24h e estocados em álcool etílico 70%. Todas as anteras, de cada botão, foram dissecadas, esmagadas e montadas em Carmim Acético (Medina & Conagin 1964). As lâminas foram observadas imediatamente após a montagem para a verificação do estágio das células. Quando em estádios meióticos, o material foi aquecido para clarear o citoplasma e pressionado entre lâmina e lamínula para espalhar as células e os cromossomos.

Não há registros de contagem cromossômica para *Dahlstedtia*, informação importante no estudo do comportamento dos cromossomos meióticos. Portanto, para a determinação do número cromossômico, células mitóticas também foram observadas. Sementes foram germinadas em laboratório e os ápices radiculares foram excisados e pré-tratados com solução saturada de PDB (paradiclorobenzeno) a 15°C a fim de bloquear o ciclo mitótico em metáfase. Após, foram fixados em Carnoy (álcool etílico-ácido acético glacial-clorofórmio 6:1:3) e estocados em álcool etílico 70%. As raízes foram digeridas em HCl 5N por 20min, lavadas em água destilada, esmagadas em ácido acético 45% e coradas com uma solução de Giemsa 2% por 10min (Guerra 1983). As lâminas foram montadas em resina sintética.

Tétrades foram analisadas em dez botões retirados de dez inflorescências (um botão para cada inflorescência) em quatro indivíduos de *D. pentaphylla* (três cultivados e um proveniente de população natural) e em 10 botões retirados de 10 inflorescências (um botão para cada inflorescência) de quatro indivíduos de *D. pinnata* (três provenientes de população natural e um cultivado). Aproximadamente 200 células em estágio de formação de tétrades por

botão foram contadas e avaliadas quanto à forma e ao número. Com base nestas contagens foi calculado o índice meiótico de Love (1949), que indica a porcentagem de tétrades normais ($MI = \text{número de tétrades normais} \times 100 / \text{número total de células analisadas}$). O índice meiótico das espécies foi comparado por análise de variância aninhada (considerando a estruturação de indivíduos dentro de cada espécie – Zar 1996) no programa S-Plus 2000. Os valores de índice meiótico foram transformados pelo arcosseno da raiz quadrada, conforme sugerido por Zar (1996), para dados em porcentagem, pois uma análise prévia constatou que a distribuição dos resíduos com dados transformados foram mais próximos de uma normal.

RESULTADOS

MICROSPOROGÊNESE E MATURAÇÃO DO GRÃO DE PÓLEN (fig. 2):

A antera é tetrasporangiada, apresenta um feixe vascular mediano delimitado por células coradas em vermelho, cujo conteúdo é provavelmente fenólico (fig. 2F). O desenvolvimento das anteras na flor não é sincronizado. Células arquesporais em cada microsporângio originam as células esporogênicas primárias (fig. 2A) e as células precursoras da parede da antera. As células esporogênicas apresentam núcleo proeminente e citoplasma densamente corado e divisões nos dois planos, periclinal e anticlinal (fig. 2C), formando duas fileiras no centro do microsporângio (fig. 2B). A formação do tapete, das camadas parietais e do endotécio é posterior à formação das células esporogênicas secundárias.

Células mãe-do-micrósporo (microsporocitos) (fig. 2D) são originadas das divisões mitóticas das células esporogênicas secundárias. São vacuoladas, apresentam citoplasma granuloso, núcleo proeminente e parede celular calósica. O tapete é unisseriado (fig. 2D), uninucleado e do tipo glandular, e nesta fase encontra-se muito vacuolado, em degeneração, juntamente com as células das camadas parietais. As células mãe-do-micrósporo entram em meiose, formando tétrades polínicas tetraédricas (fig. 2E) e/ou decussadas, envolvidas por uma espessa parede calósica. A citocinese é do tipo simultâneo. Os micrósporos, após serem liberados das tétrades, apresentam um aumento em tamanho e desenvolvem uma parede espessa e sinuosa, com pequenas projeções (figs. 3D-E).

A antera na maturidade apresenta uma camada epidérmica e o endotécio (fig. 2G), cujas células apresentam espessamentos constituídos por celulose, pectina e lignina. A

deiscência da antera é longitudinal (figs. 3A-B) e anterior à antese da flor. Na região de deiscência, o endotécio torna-se descontínuo, permanecendo apenas algumas células epidérmicas, rompidas para a liberação dos grãos de pólen (figs. 2F-G). Os grãos de pólen maduros (figs. 3C-E) são bicelulares, densamente corados (fig. 2H), envoltos numa secreção viscosa e tricolpados, sendo os colpos mais aparentes em *D. pinnata* que em *D. pentaphylla*. Os colpos nas duas espécies são largos, rasos e não especializados. A escultura da exina é densamente rugosa e na região polar torna-se lisa (fig. 3D-E).

A formação das células-mãe do megásporo é concomitante à das células-mãe do micrósporo. Entretanto, a maturação do grão de pólen é anterior à do saco embrionário, sendo que a deiscência da antera ocorre antes do alongamento deste.

ANÁLISE MEIÓTICA DOS MICROSPOROCITOS:

Várias fases da meiose foram analisadas (diacinese, metáfase I, anáfase I, II) e o número cromossômico encontrado para as duas espécies foi $n = 11$ (fig. 4D). As observações não demonstraram a ocorrência de irregularidades meióticas. As análises mitóticas (em metáfase) mostraram a ocorrência de $2n = 22$ cromossomos (fig. 4A-C).

As anormalidades mais freqüentes encontradas na contagem das tétrades em ambas as espécies foram tríades, pêntades, tétrades vazias ou com uma das células-filha reduzida.

Os índices meióticos estão apresentados na figura 1. *D. pinnata* apresentou maior heterogeneidade nos valores individuais e entre os indivíduos. O indivíduo com menor variação (R3) é proveniente de cultivo em área urbana. Os demais indivíduos são provenientes de populações naturais da região de Picinguaba. Os valores máximo e mínimo encontrados foram respectivamente 93,86 (indivíduo cultivado) e 34,97 (indivíduo de população natural). Três dos quatro indivíduos amostrados apresentaram 100% dos valores abaixo de 90 e apenas 25% dos valores do indivíduo R3 foram iguais ou superiores a 90.

Dahlistedtia pentaphylla apresentou indivíduos com índices meióticos mais homogêneos e, também, menor variação destes valores entre os indivíduos. O menor índice encontrado para a espécie foi 69,60 e o maior 98,59, ambos em indivíduos cultivados. Três dos quatro indivíduos analisados apresentaram a maioria dos valores igual ou acima de 90. Apenas um indivíduo apresentou 100% dos valores abaixo de 90. O único indivíduo (V4) que apresentou 75% dos valores iguais ou superiores a 90 é proveniente de uma população natural

encontrada em Intervalles. Os demais indivíduos encontram-se cultivados em regiões urbanas (fig. 1).

Ao se comparar as duas espécies, tem-se que *D. pentaphylla* apresentou índice meiótico ($87,4 \pm 6,6$, média $\pm$ desvio padrão) significativamente maior que *D. pinnata* ($75,1 \pm 14,1$) [*D. pentaphylla* (n = 39 botões, 4 indivíduos), *D. pinnata* (n = 40 botões, 4 indivíduos); $F = 31,997$; $p = 0,0000003$].

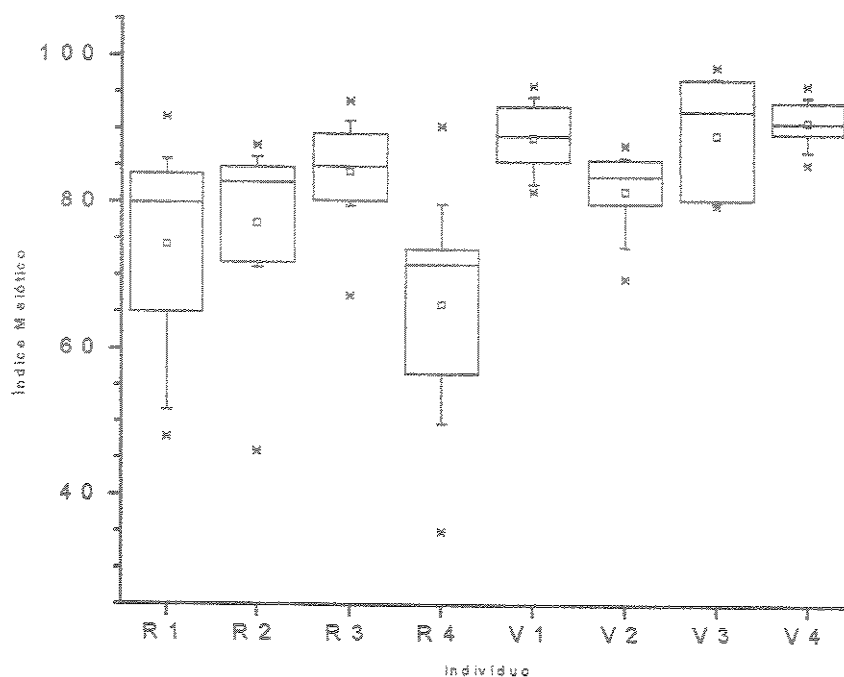


Figura 1. Índices meióticos em indivíduos de *Dahlstedtia pinnata* (diagramas em preto) e *D. pentaphylla* (diagramas em azul). Número de botões analisados/indivíduo = 10. Número de tétrades analisadas/botão = 200. O retângulo delimita 50% do número de observações e o traço central representa a mediana. As barras indicam os valores do 5° e do 95° percentis. Os símbolos abaixo e acima das barras indicam a amplitude total. O símbolo quadrado representa a média dos valores.

DISCUSSÃO

MICROSPOROGÊNESE:

A microsporogênese em *Dahlstedtia pentaphylla* e em *D. pinnata* é bastante similar à de outras espécies de Papilionoideae, o que inclui antera tetrasporangiada, tapete do tipo

glandular formado por células uninucleadas, citocinese do tipo simultâneo, resultando em tétrades tetraédricas, e grãos de pólen bicelulares (Johansen 1950).

Não foram observadas anormalidades no desenvolvimento do feixe vascular das anteras, o que pressupõe que o transporte de nutrientes não é um fator limitante para as espécies de *Dahlstedtia*. A correlação esterilidade polínica - vascularização das anteras foi relatada numa linhagem estéril de *Beta*, na qual se observou que a deficiência nutricional das anteras resultava da atividade reduzida dos feixes vasculares. Em *Sorghum* e *Triticum* também se observou uma redução no desenvolvimento dos feixes vasculares estaminais, ocasionando problemas no transporte de nutrientes e no acúmulo de amido nas camadas médias da antera, no tapete e no endotécio. Os produtos resultantes da quebra do amido são considerados essenciais para a nutrição dos micrósporos em desenvolvimento, atuando como precursores de carotenóides, esporopolenina e lipídios (Bhandari 1984). No entanto, nas espécies de *Dahlstedtia*, deve-se ressaltar a presença de várias camadas de células de conteúdo desconhecido (possivelmente fenólico) delimitando cada feixe vascular na antera. Apesar de não se ter observado qualquer tipo de bloqueio dos elementos do floema e do xilema, a quantidade e a proximidade daquelas células ao sistema vascular devem desempenhar algum papel na senescência da flor. No entanto, estudos adicionais devem ser feitos para a obtenção de dados conclusivos sobre o papel destas células.

A presença de espessamentos no endotécio em *Dahlstedtia* e o fato da deiscência das anteras ocorrer já nos botões em pré-antese indicam que a liberação dos grãos de pólen não representa um problema para estas espécies, como relatado na literatura para espécies com esterilidade masculina (Gibson & Diggle 1998). Segundo estes autores, a ausência destes espessamentos ocasionaria a não liberação dos grãos de pólen e, conseqüentemente, acarretaria esterilidade masculina. Em outros representantes de Leguminosae, assim como em *Dahlstedtia*, é comum a presença de espessamentos fibrosos nas células do endotécio, constituídos por lignina, além de pectina e celulose, sendo relacionados ao tipo longitudinal de deiscência da antera (Prakash 1987).

A partir de comparações da microsporogênese de *Dahlstedtia pentaphylla* e *D. pinnata* e de trabalhos com linhagens estéreis de plantas como *Capsicum*, *Lycopersicon*, *Petunia*, *Phaseolus*, *Sorghum* e *Triticum*, pode-se afirmar que as espécies de *Dahlstedtia* não apresentaram problemas no desenvolvimento do grão de pólen, como observado nos eventos simultâneos de degeneração do tapete e das camadas parietais da antera, de dissolução da calose antes do término do processo meiótico e, ainda, a estruturação da

parede do pólen, principalmente a escultura da exina, que se manteve constante nos vários materiais analisados. Comparações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das etapas da microsporogênese em espécies que não apresentam interesse econômico não constam na literatura. Por isso, trabalhos com linhagens férteis e estéreis de espécies com potencial agrícola e ornamental (Frankel et al. 1969, Izhar & Frankel 1971, Horner 1977, Knox 1984, Gibson & Diggle 1998) foram utilizados aqui, para uma melhor compreensão das alterações típicas que levam à esterilidade polínica.

O tecido esporogênico, na etapa meiótica da microsporogênese, tem sido relacionado ao tapete na maioria dos trabalhos, e estes atestam que as células do tapete, através da alteração de fatores físicos e fisiológicos, são as responsáveis pelo início do processo abortivo do grão de pólen (Bhandari 1984). No processo normal do desenvolvimento do grão de pólen, a desintegração das camadas parietais da teca e das células do tapete ocorre somente após a formação das células-mãe do micrósporo, o que é de extrema importância para o processo trófico do tecido esporogênico e para a formação da intina e da exina do pólen (Johri et al. 1992). Em linhagens estéreis constatou-se que a degeneração prematura tanto das células do tapete como das camadas parietais acarreta a degeneração das células esporogênicas (Llarslan et al. 1999). Por outro lado, a persistência do tapete bloqueia o transporte de nutrientes necessário para a formação de grãos de pólen viáveis. A degeneração dos micrósporos também pode ser ocasionada por pressões mecânicas efetuadas pelo aumento do volume das células do tapete, observado pelo aumento na vacuolização e pela perda na densidade citoplasmática destas células, causando obstrução do saco polínico. Em *Capsicum*, observou-se a modificação do tapete do tipo glandular para plasmodial, resultando na assincronia meiótica dos microsporocitos (Bhandari 1984). Linhagens estéreis apresentam grande quantidade de ácido aspártico, alanina e glicina e baixa quantidade de aminoácidos livres em relação às linhagens férteis. Tais variações resultam de alterações citoplasmáticas ou em organelas e, conseqüentemente ocorre distúrbio no balanço entre o tecido esporogênico e o tapete, como visto em *Helianthus annuus* (Horner 1977).

Estudos sobre a calose no processo meiótico em *Petunia* e *Tradescantia* mostraram que a sua dissolução precoce está relacionada ao aumento da atividade da calase sintetizada no tapete (Frankel et al. 1969), que por sua vez é resultado do aumento do pH na antera, levando ao aborto do grão de pólen (Izhar & Frankel 1971).

Embora, na maioria dos casos de esterilidade masculina genética ou citoplasmática, as anormalidades ocorram mais freqüentemente nos microsporocitos, se o

desenvolvimento do grão de pólen já foi iniciado, a expressão da esterilidade estará relacionada ao tamanho atingido pelo pólen e/ou à estrutura da parede (Gibson & Diggle 1998). A esterilidade em *Vicia*, por exemplo, está diretamente relacionada às alterações na deposição de polissacarídeos na intina, incluindo a calose. Já em *Phaseolus*, ocorre redução na escultura da exina. Outras alterações podem ocorrer nos componentes químicos da exina e também na báculo e no teto, camadas nas quais há registro de proliferação desorganizada em plantas estéreis (Knox 1984).

ESTUDOS MEIÓTICOS DOS MICROSPOROCITOS:

De acordo com Goldblatt (1981), a maior parte das espécies estudadas na família Leguminosae apresenta número cromossômico básico igual a 8 e na maior parte dos gêneros este número é igual a 11, como observado em *Dahlstedtia*. A maioria dos representantes tropicais da subfamília Papilionoideae apresenta números cromossômicos básicos entre 12 e 10. Apesar de Papilionoideae apresentar o maior número de espécies conhecidas quanto à contagem cromossômica, a tribo Millettieae tem sido muito pouco estudada e, por enquanto, esta tribo apresenta o mesmo número básico da subfamília. *Dahlstedtia* consta na lista de Goldblatt (1981) como um dos 280 gêneros de Leguminosae sem nenhuma informação citológica. Portanto, as contagens cromossômicas para *Dahlstedtia pinnata* e *D. pentaphylla* efetuadas neste trabalho são inéditas.

Apesar da ocorrência de anormalidades nas tétrades, como por exemplo a presença de tríades e pântades, sugerir erros na separação dos bivalentes, a análise das fases meióticas em ambas as espécies de *Dahlstedtia* mostrou que não há irregularidades quanto à disjunção dos cromossomos e nem há formação de pontes entre eles, o que acarretaria a formação de grãos de pólen inviáveis, como encontrado em *Sesbania macrocarpa* (Zadoo 1984) e nas espécies apomíticas *Miconia fallax* e *M. stenostachya* (Goldenberg & Shepherd 1998).

A maior parte dos valores de índice meiótico observada em *D. pentaphylla* está em torno de 90%. Esta espécie, portanto, de acordo com Love (1949), pode ser considerada meioticamente estável.

Os valores de índices meióticos apresentados pelos indivíduos de *D. pinnata* são significativamente diferentes dos apresentados por *D. pentaphylla* e baixos, mesmo se comparados aos apresentados por outras espécies de Papilionoideae: aproximadamente 97 para espécies de *Vigna* (Senff et al. 1992, Senff et al. 1995), 100 para *Arachis pintoi*,

aproximadamente 99 para espécies de *Desmodium* (Senff et al. 1995) e acima de 95 para espécies de *Adesmia* (Coelho & Battistin 1998). *Dahlstedtia pinnata*, então, apresentaria uma baixa estabilidade meiótica, acarretando um aumento no número de grãos de pólen estéreis, o que pode refletir numa baixa produção de sementes viáveis. Observações de campo desta espécie, realizadas no Parque Estadual da Serra do Mar, em Ubatuba e Picinguaba, têm mostrado a baixa ocorrência de frutos e sementes maduros nas plantas, ao mesmo tempo em que são observadas até mais de três rebrotas por indivíduo, indicando que a propagação vegetativa deve ser mais importante para o processo reprodutivo desta espécie.

Os indivíduos amostrados para *D. pinnata* são cultivados ou provenientes de populações naturais. A menor variação de valores, bem como a maior porcentagem de índices meióticos (ao redor de 90), ocorreram no indivíduo cultivado. Resultados semelhantes foram encontrados para *Callistemon citrinus* (Myrtaceae), espécie em que os grãos de pólen de indivíduos cultivados apresentaram desenvolvimento normal e aqueles provenientes de populações naturais apresentaram alto grau de esterilidade, com anormalidades ocorrendo em várias fases do desenvolvimento, inclusive no processo meiótico (Prakash 1969). Estudos sobre os efeitos das condições ambientais na microsporogênese têm demonstrado que a herbivoria, a fertilidade do solo, a infecção por micorrizas e mesmo as condições climáticas afetam o número e a forma do grão de pólen, a composição química da parede e mesmo os eventos relacionados à fertilização, como a velocidade de germinação do grão de pólen, o crescimento do tubo polínico e a habilidade em se efetuar a dupla fecundação (Johannsson & Stephenson 1998). Pode-se inferir, portanto, que a microsporogênese em *D. pinnata* é afetada pelas condições ambientais em que se encontram os indivíduos analisados; os indivíduos cultivados estariam em locais mais favoráveis que aqueles encontrados em populações naturais (Floresta Atlântica, em Picinguaba, SP).

Por outro lado, em *D. pentaphylla*, o indivíduo cuja maior parte dos valores de índice meiótico estava acima de 90 é proveniente de uma população natural, o que sugere que as condições ambientais encontradas por esta espécie em Intervales, SP (Floresta Atlântica) seriam favoráveis à microsporogênese. Entretanto, os valores apresentados pelos demais indivíduos são próximos ou superiores a 90 e, desta forma, não se pode associar a microsporogênese a diferenças nas condições natural e de cultivo, como encontrado por Prakash (1969) e por Johannsson & Stephenson (1998).

Estudos do comportamento meiótico têm sido realizados a fim de se verificar o potencial reprodutivo de espécies principalmente agrícolas. Espécies com altos índices meióticos, como *D. pentaphylla*, são consideradas meioticamente estáveis e potencialmente férteis, podendo ser utilizadas em programas de seleção, cruzamento e produção de sementes (Coelho & Battistin 1998).

CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS:

O número cromossômico básico igual a 11 encontrado nas espécies de *Dahlistedtia* é comparável ao de gêneros próximos, como *Lonchocarpus*, *Millettia* e *Piscidia*, cujas espécies também apresentam $n=11$ (tab. 1) (Goldblatt 1981), embora *Millettia* apresente uma variação entre 8 e 16 (Goldblatt & Johnson 1990, 1998). Segundo estudos de Goldblatt (1981), não existe grande variação numérica ao nível de tribo e, como o número cromossômico é constante em muitos gêneros e em grupos genéricos, deve-se utilizá-lo em conjunto com outros dados para se delimitar grupos ou estabelecer relações filogenéticas.

As espécies de *Dahlistedtia* também se assemelham a *Millettia ovalifolia* quanto ao tapete unisseriado e grão de pólen bicelular (tab. 1) (Prakash 1987). Quanto à morfologia do grão de pólen maduro, as espécies de *Dahlistedtia* e *Lonchocarpus laxiflorus* possuem o mesmo tipo de escultura no teto da exina (tab. 1). Entretanto, o tipo de pólen encontrado em *D. pinnata* e *D. pentaphylla* é considerado especializado devido à estratificação da exina, sendo mais próximo ao encontrado em espécies de *Erythrina* e *Mucuna*, pertencentes à tribo Phaseoleae (Ferguson & Skvarla 1981). A especialização do grão de pólen é considerada extrema nos representantes de Phaseoleae, sendo que o espessamento da endexina e a presença de poros ao invés de colpos ocorrem em muitas espécies de *Erythrina*.

Características relacionadas aos poros e colpos e à estratificação da parede do grão de pólen são menos variáveis e, no caso das espécies de *Dahlistedtia*, *Erythrina* e *Mucuna*, podem estar associadas à polinização por pássaros. Já a escultura da exina representa um caráter secundário em delimitações taxonômicas, pois ocorre muita variação dentro de tribos e gêneros (Ferguson & Skvarla 1981).

O fato de *Dahlistedtia pinnata* e *D. pentaphylla* apresentarem o mesmo número cromossômico ($2n=22$, $n=11$) deve refletir a semelhança morfológica destas espécies (Teixeira & Gabrielli 2000, Teixeira et al. 2000), ao mesmo tempo em que reafirma o

posicionamento deste gênero na tribo Millettieae (Geesink 1984). Conclui-se, então, que estudos embriológicos, citológicos e morfológicos do grão de pólen podem prover informações importantes na tribo Millettieae.

Tabela 1. Semelhanças encontradas para o grão de pólen em algumas espécies da tribo Millettieae.

Caráter		Espécies
Morfologia externa	Teto com escultura densamente rugosa	<i>Dahlistedtia pentaphylla</i>
		<i>Dahlistedtia pinnata</i>
		<i>Lonchocarpus laxiflorus</i>
Citologia	n = 11	<i>Dahlistedtia pentaphylla</i>
		<i>Dahlistedtia pinnata</i>
		<i>Lonchocarpus laxiflorus</i>
		<i>Millettia peguensis</i>
		<i>Piscidia</i> sp.
Embriologia	Tapete unisseriado Grão de pólen bicelular	<i>Dahlistedtia pentaphylla</i>
		<i>Dahlistedtia pinnata</i>
		<i>Millettia ovalifolia</i>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bawa KS & Webb CJ. 1984. Flower, fruit, and seed abortion in tropical forest trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *American Journal of Botany* 71: 736-751.
- Bhandari NN. 1984. The Microsporangium. In: Johri BM, ed. *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag, 53-121.
- Charlesworth D. 1988. Evidence for pollen competition in plants and its relationships to fitness: a comment. *American Naturalist* 132: 298-302.
- Coelho LGM & Battistin A. 1998. Meiotic behavior of *Adesmia* DC. (Leguminosae-Faboideae) species native to Rio Grande do Sul, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 21: 403-406.
- Ferguson IK & Skvarla JJ. 1981. The Pollen Morphology of the subfamily Papilionoideae (Leguminosae). In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in Legume Systematics*. Kew: Royal Botanic Gardens, part 2, 859-895.
- Frankel R, Izhar S & Nitsen J. 1969. The timing of callose activity and cytoplasmic male sterility in *Petunia*. *Biochemical Genetics* 3: 451-455.

- Geesink R. 1984. *Scala Millettiearum: a survey of the genera of the tribe Millettieae (Leguminosae - Papilionoideae)*. Leiden: E.J. Brill & Leiden University Press (Leiden Botanical Series, 1).
- Gerlach D. 1969. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart: Georg. Thieme Verlag.
- Gerrits PO. 1991. *The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles*. Netherlands: Department of Anatomy and Embriology, State University Groningen.
- Gibson PJ & Diggle PK. 1998. Flower development and male sterility in *Ocotea tenera*. *International Journal of Plant Science* **159**: 405-417.
- Goldblatt P. 1981. Cytology and the Philogeny of Leguminosae. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in Legume Systematics*. Kew: Royal Botanic Gardens, part 2, 427-463.
- Goldblatt P & Johnson DE. 1990. Index to plant cromosome numbers 1986-1987. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* **30**: 90.
- - 1998. Index to plant cromosome numbers 1994-1995. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* **69**: 87.
- Goldenberg R & Shepherd GJ. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in «cerrado» vegetation. *Plant Systematics and Evolution* **211**: 13-29.
- Guerra M. 1983. O uso do Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura* **35**: 190-193.
- Horner HT Jr. 1977. A comparative light and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *American Journal of Botany* **64**: 745-759.
- Ilarslan H, Horner HT & Palmer RG. 1999. Genetics and cytology of a new male-sterile, female-fertile soybean mutant. *Crop Science* **39**: 58-63.
- Izhar S & Frankel R. 1971. Mechanism of male-sterility in *Petunia*. I. The relantionship between pH, callase activity in the anthers and the breakdown of microsporogenesis. *Theoretical Applied Genetics*. **41**: 104-108.
- Janzen DH. 1977. A note on optimal mate selection by plants. *American Naturalist* **11**: 365-371.
- Johannsson MH & Stephenson AG. 1998. Effects of temperature during microsporogenesis on pollen performance in *Cucurbita pepo* L. (Cucurbitaceae). *International Journal of Plant Science* **159**: 616-626.

- Johansen DA. 1950. Plant Embryology: Embryogeny of Spermatophyta. Chronica Botanica Co., Waltham, MA.
- Johri BM, Ambegaokar KB & Srivastava PS. 1992. *Comparative Embryology of Angiosperms*, Berlin: Springer-Verlag, v.1.
- Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137A-138A.
- Knox RB. 1984. The Pollen Grain. In: Johri BM, ed. *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag, 197-271.
- Kronstedt-Robards EC & Rowley JR. 1989. Pollen grain development and tapetal changes in *Strelitzia reginae* (Strelitziaceae). *American Journal of Botany* 76: 856-870.
- Loukides CA, Broadwater AH & Bedinger PA. 1995. Two new male-sterile mutants of *Zea mays* (Poaceae) with abnormal tapetal cell morphology. *American Journal of Botany* 82: 1017-1023.
- Love RA. 1949. Estudos Citológicos Preliminares de Trigos Riograndenses. Circular 74, Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Medina DM & Conagin CHTM. 1964. Técnica citológica. Publicação 2610, Instituto Agronômico, Campinas.
- Niesenbaum RA. 1999. The effects of pollen load size and donor diversity on pollen performance, selective abortion, and progeny vigor in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* 86: 261-268.
- O'Brien TP, Feder N & McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Peel MD, Carman ZWL & Wang RR-C. 1997. Meiotic anomalies in hybrids between wheat and apomictic *Elymus rectisetus*. *Crop Science* 37: 717-723.
- Prakash N. 1969. Some aspects of the life story of *Callistemon citrinus* (Curt) Skeels. *American Journal of Botany* 17: 107-117.
- Prakash N. 1986. *Methods in Plant Microtechnique*. 2nd ed. Armidale, NSW: The University of New England.
- Prakash N. 1987. Embryology of the Leguminosae. In: *Advances in Legume Systematics*. Stirton CH, ed. Kew, U.K.: Royal Botanic Gardens, part 3, 241-278.

- Senff MI, Hickenbick MCM & Paim NR. 1992. Cytogenetic studies in species of the genus *Vigna* Savi (Leguminosae-Papilionoideae). *Revista Brasileira de Genética* **15**: 407-418.
- Senff MI, Schifino-Wittmann MT & Paim NR. 1995. Cytogenetic studies of populations of *Arachis*, *Desmodium* and *Vigna* species (Leguminosae-Papilionoideae) from Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Genética* **18**: 629-631.
- Snow AA & Spira TP. 1996. Pollen-tube competition and male fitness in *Hibiscus moscheutos*. *Evolution* **50**: 1866-1870.
- Stephenson AG. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics* **12**: 253-279.
- Teixeira SP & Gabrielli AC. 2000. Anatomia Comparativa do Eixo Vegetativo em *Dahlstedtia pinnata* e *D. pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoideae). *Revista brasileira de Botânica* **23**: 1-11.
- Teixeira SP, Prakash N & Ranga NT. 2001. Ovule and early seed development related to seed abortion in *Dahlstedtia pinnata* and *D. pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytomorphology* **51**: 61-70.
- Tucker S. 1993. Floral ontogeny in Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae). I *Myroxylon* (*Myroxylon* group) and *Castanospermum* (*Angylocalyx* group). *American Journal of Botany* **80**: 65-75.
- Zadoo SN. 1984. Cytogenetic observations on a monosomic in *Sesbania macrocarpa* Muhl. (Leguminosae). *Experientia* **40**: 1414.
- ZAR J.H. 1996. *Biostatistical analysis*, 3rd ed. Prentice Hall.

Figura 2. Microsporogênese em *Dahlstedtia*. Cortes transversais. **A.** Células esporogênicas primárias em divisão (*) e células precursoras da parede da antera (m). **B.** Antera em início de desenvolvimento, mostrando as células esporogênicas secundárias (seta) dispostas em duas fileiras. **C.** Detalhe das células esporogênicas secundárias em divisão mitótica. **D.** Células-mãe do grão de pólen delimitadas pelo tapete glandular unisseriado e pelas camadas médias da antera. Observe que são vacuoladas e apresentam núcleo proeminente. **E.** Tétrades em arranjo tetraédrico. **F.** Antera tetrasporangiada com feixe vascular mediano delimitado por células provavelmente fenólicas (seta). **G.** Deiscência da antera (seta) após espessamento do endotécio. **H.** Grãos de pólen bicelulares. cmp – célula-mãe do grão de pólen, e – epiderme, en – endotécio, m - camadas médias da antera, t – tapete, v – feixe vascular. Escalas: fig. A, C-E, H = 9,7µm; fig. B, G = 43µm; fig. F = 91µm

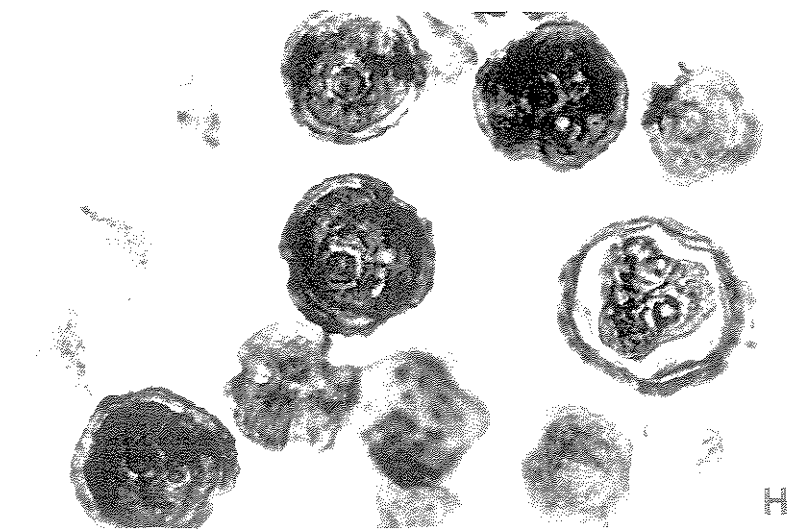
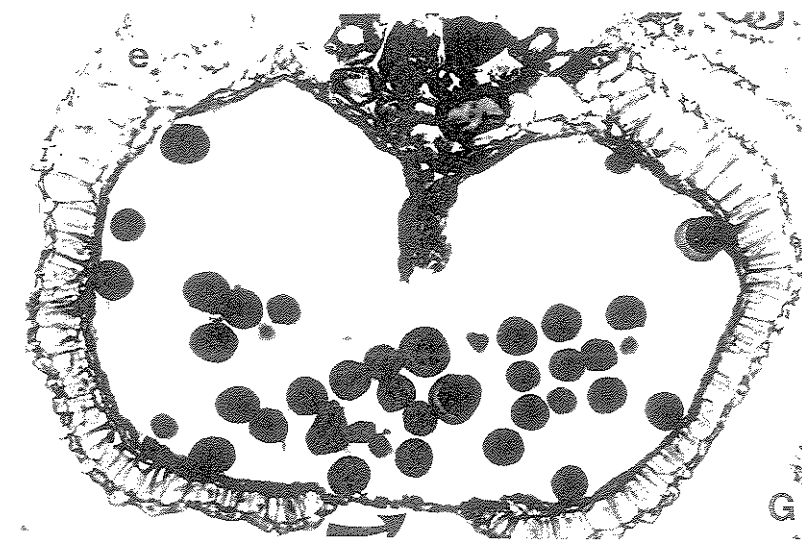
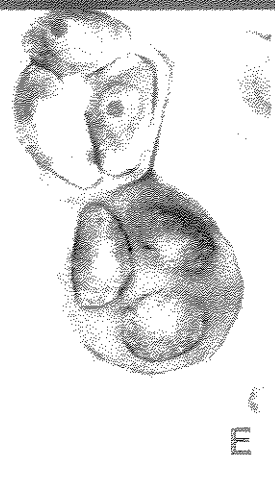
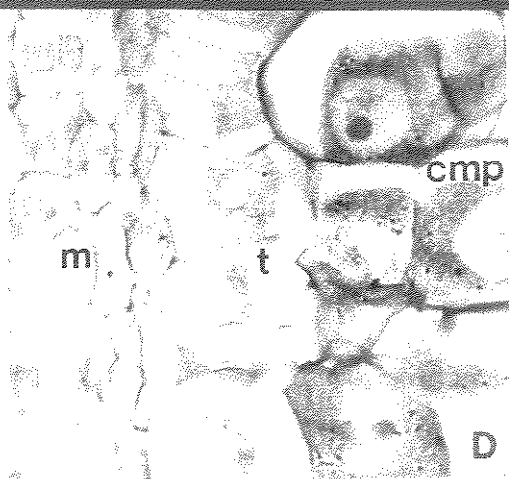
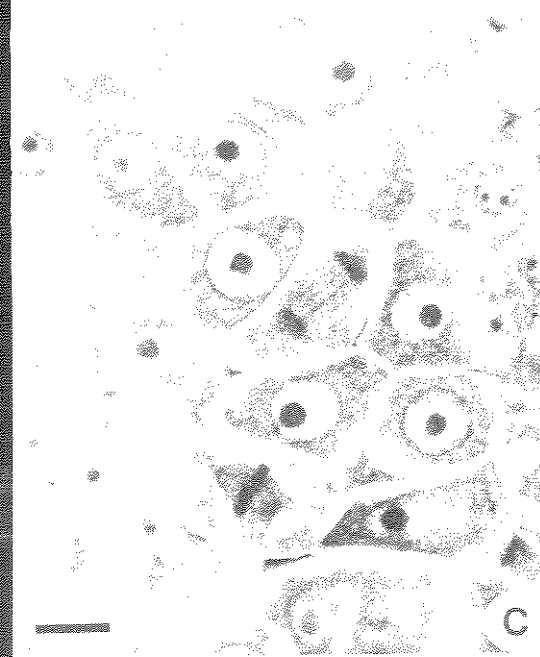
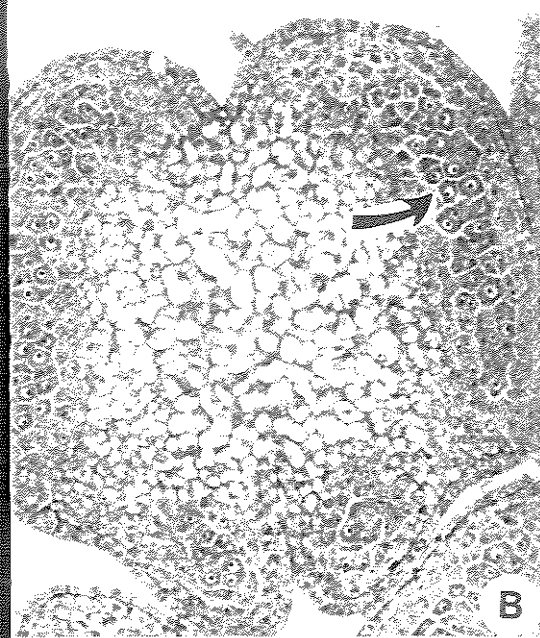


Figura 3. Fotomicrografias de MEV em *Dahlstedtia*. A-B. Deiscência longitudinal da antera. C. Grãos de pólen depositados no estigma. D. Grãos de pólen de *D. pinnata*. E. Grãos de pólen de *D. pentaphylla*. Escalas=100µm.

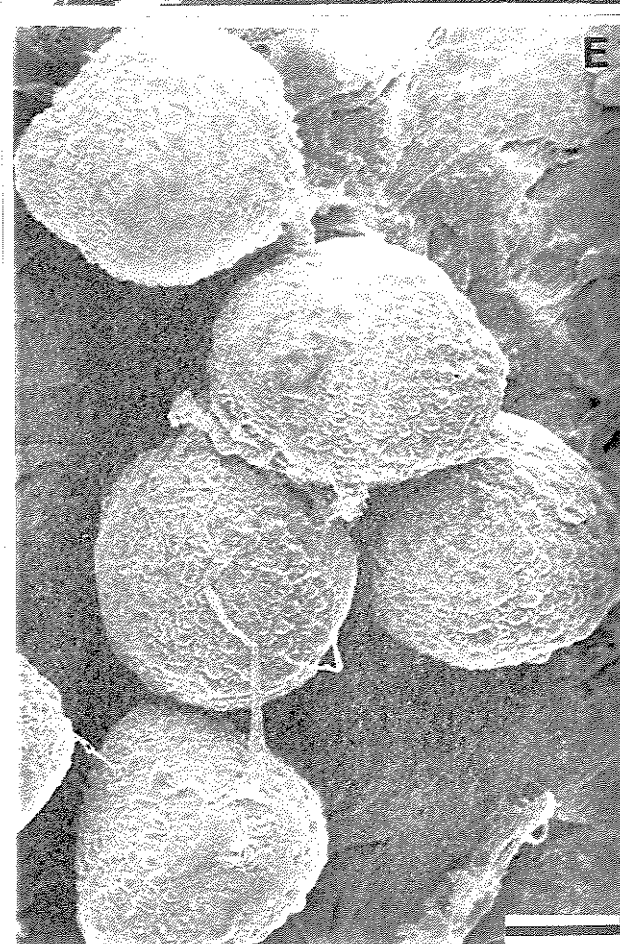
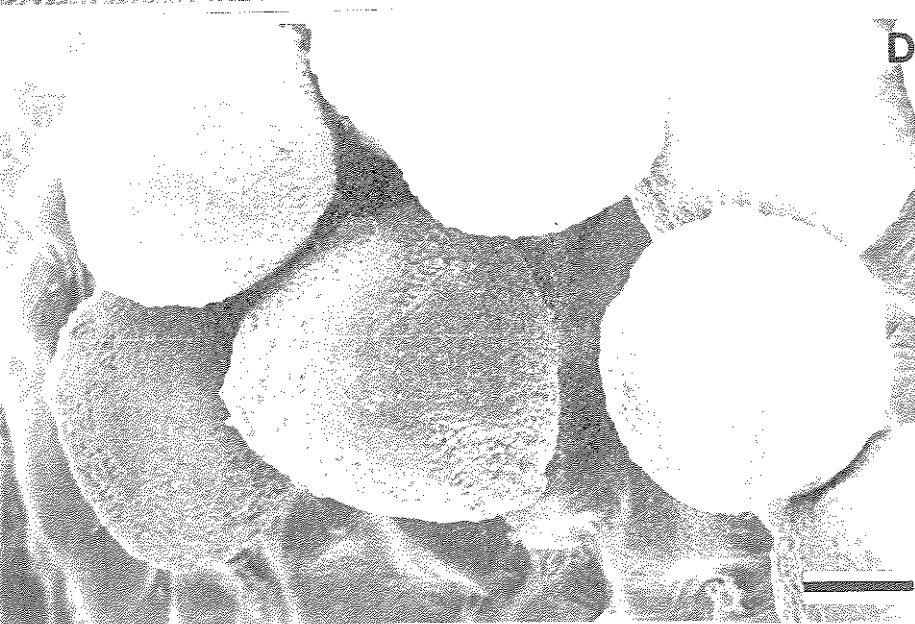
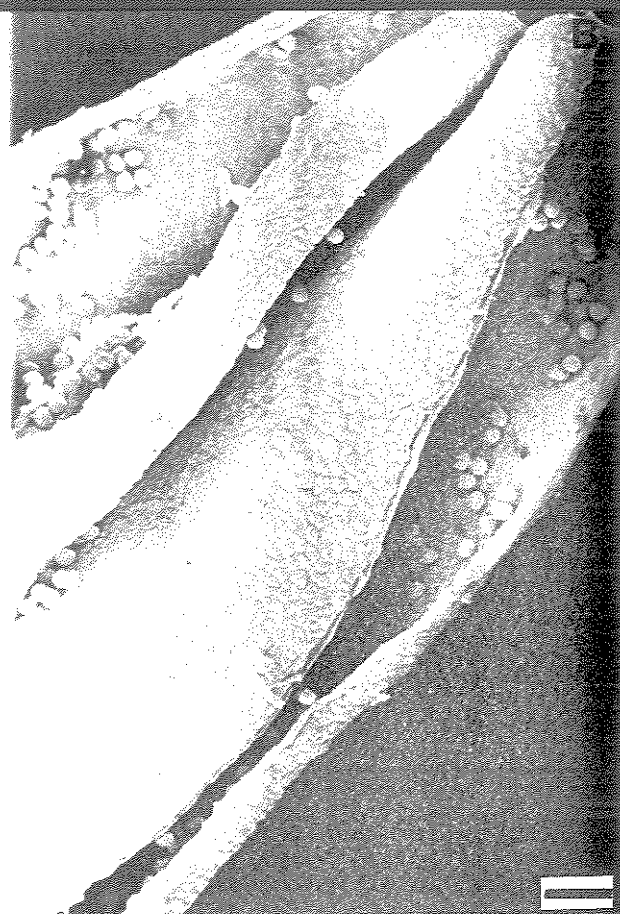
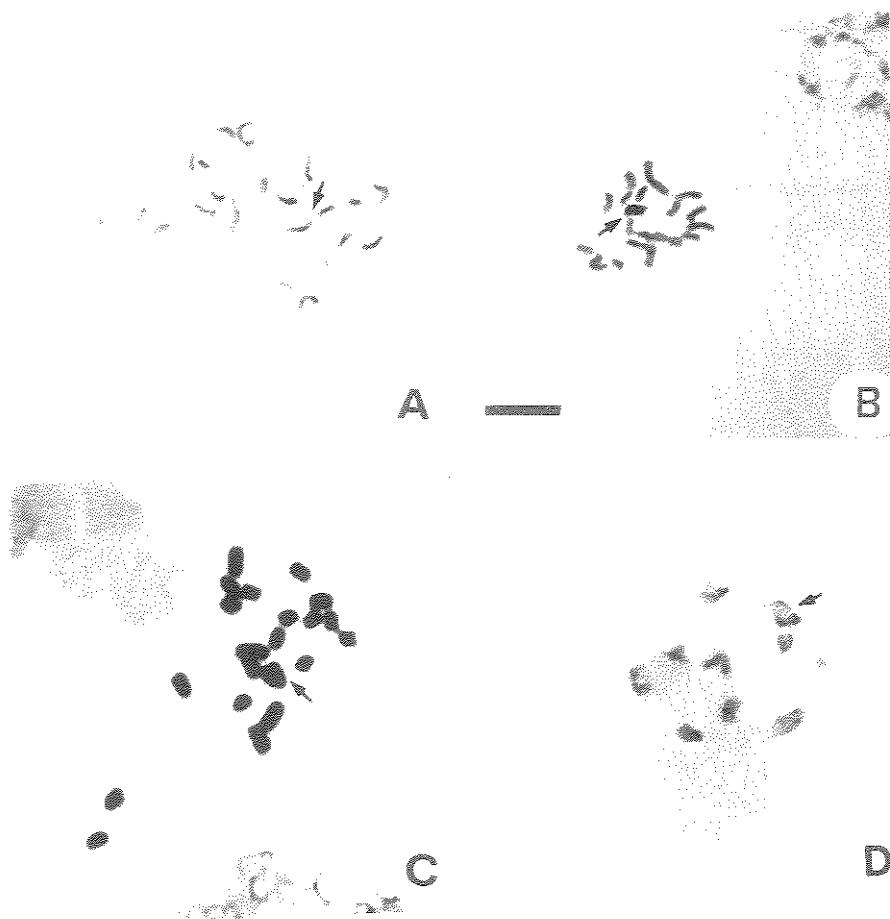


Figura 4. Observações citológicas em *Dahlistedtia*. A-B. Células em mitose de *Dahlistedtia pentaphylla* ($2n = 22$). C-D. *D. pinnata*. C. Mitose ($2n = 22$). D. Meiose – Metáfase I ($n = 11$). Setas apontando a sobreposição de dois cromossomos. Escalas = $9,7\mu\text{m}$.



**CAPÍTULO III: “DESENVOLVIMENTO DO ÓVULO E DOS PRIMEIROS ESTÁDIOS DA SEMENTE E SUA
RELAÇÃO COM O ABORTO DE SEMENTES EM *DAHLSTEDTIA PINNATA* E *D. PENTAPHYLLA*
(LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE)”**¹

RESUMO

O desenvolvimento do óvulo e dos primeiros estádios da semente após polinizações controladas e aberta foi investigado nas duas espécies de *Dahlstedtia* (Leguminosae) e verificou-se se, durante o desenvolvimento, haveriam fatores acarretando o aborto de sementes. A germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico foram analisados utilizando-se pistilos clarificados em NaOH, corados em Azul de Anilina e observados em Microscopia de Fluorescência. A fertilização foi verificada utilizando-se óvulos seccionados (Microscopia Fotônica) e clarificados em Fluido de Herr (Normarsky DIC); o desenvolvimento do óvulo e da semente foram verificados por meio de seções seriadas. Não foram encontradas grandes diferenças entre as espécies. O óvulo é bitegumentado, crassinucelado e ortocampilótropo. O desenvolvimento do óvulo é do tipo «Polygonum», o do endosperma é Nuclear e o do embrião provavelmente é «Onagrad». A dupla fertilização é aparente 72h após as polinizações controladas e 48h após polinização aberta. Não foram encontradas diferenças entre a autopolinização e a polinização cruzada quanto à germinação do pólen, ao crescimento do tubo polínico, à megagametogênese, à dupla fertilização e à embriogênese. Em todos os tratamentos foram observados o espessamento e a retração prematuros das paredes celulares dos tegumentos e da placenta, seguidos de degeneração do saco embrionário (óvulo) ou do zigoto e do endosperma (semente). As espécies são autocompatíveis, não tendo sido observados mecanismos pré- ou pós-zigóticos atuando como barreiras à autofertilização. O aborto de sementes está mais relacionado à limitação de recursos maternos, o que pôde ser confirmado pela presença de características abortivas nos tecidos maternos anterior à nos embriogênicos.

PALAVRAS-CHAVE: Leguminosae, *Dahlstedtia*, Aborto, Desenvolvimento do Óvulo, Embriogênese, Restrições Maternas.

¹ Publicado como: Teixeira SP, Prakash N & Ranga NT. 2001. Ovule and early seed development related to seed abortion in *Dahlstedtia pinnata* and *D. pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytomorphology* 51: 61-70.

INTRODUÇÃO

Na maioria das Angiospermas poucas flores produzem frutos e sementes (Lloyd 1980, Stephenson 1981, Bawa & Webb 1984). A regulação desta taxa é feita através do aborto de flores, óvulos e sementes, o que possibilita o ajuste no suprimento dos recursos maternos para a progênie, maximizando o sucesso reprodutivo da espécie. O aborto, no entanto, tem sido considerado uma anomalia e não um processo adaptativo, resultando numa carência de estudos embriológicos a respeito (Briggs et al. 1987).

O estudo da morfologia e do desenvolvimento do óvulo antes, durante e após a fertilização, tem contribuído para o conhecimento da expressão do aborto de frutos e sementes nas Angiospermas. Plantas com altas taxas de aborto apresentam anormalidades no desenvolvimento do saco embrionário, do embrião e do endosperma (Pimienta & Polito 1983, Rim et al. 1990, Palupi & Owen 1997, Arathi et al. 1999, Sage et al. 1999), além de ausência de secreção micropilar no momento da penetração do tubo polínico (Herrero & Arbeloa 1989) e mudanças em alguns tecidos ovulares, como por exemplo, deposição de calose e lignina na região vascular (Briggs et al. 1987, Vishnyakova 1991).

A ausência de fertilização do saco embrionário acarretando o aborto de óvulos também pode estar relacionada à esterilidade do grão de pólen (Mogensen 1975), a reações de incompatibilidade no estigma ou no estilete da flor (Seavey & Bawa 1986, Sage et al. 1999), e mesmo, à posição ocupada pelo óvulo dentro do ovário, o que tem sido amplamente estudado em Leguminosae (Hossaert & Valero 1988, Bawa & Buckley 1989, Martin & Lee 1993, Gibbs & Sassaki 1998).

O desenvolvimento anormal do embrião e do endosperma, por sua vez, pode ter origem em restrições dos recursos maternos à progênie e em mecanismos pós-zigóticos que atuam como barreiras à autofertilização, conhecidos como auto-incompatibilidade tardia (ou ovariana) e depressão endogâmica. Tais mecanismos requerem estudos dos eventos que ocorrem durante a fertilização, para que possam ser distinguidos na prática, apesar de serem conceitualmente bem diferenciados. O aborto causado pela auto-incompatibilidade tardia é mais comumente expresso num único estágio de desenvolvimento do embrião, ao passo que as anormalidades resultantes da depressão endogâmica são observadas em vários estádios após a fertilização (Seavey & Bawa 1986).

A auto-incompatibilidade é um fenômeno difundido em Leguminosae, sendo mais comumente encontrado em Papilionoideae. Na tribo Millettieae encontrou-se três espécies auto-incompatíveis, duas de *Lonchocarpus* e uma de *Piscidia* (Arroyo 1981). Auto-incompatibilidade tardia foi verificada em *Lotus jacobaeus*, *L. tenuis*, *L. uliginosus* (Seavey & Bawa 1986) e em espécies de *Sesbania* (Heering 1994). Já em *Dalbergia miscolobium*, a baixa taxa de produção de frutos resultantes de autopolinização foi atribuída ao efeito de alelos recessivos letais, nos vários estádios de desenvolvimento do embrião (Gibbs & Sasaki 1998). Restrições dos recursos maternos à progênie também podem ser investigadas através de seções histológicas. O aborto, neste caso, é iniciado e controlado nos tecidos maternos (Briggs et al. 1987).

O gênero *Dahlistedtia* Malme é exclusivamente brasileiro e constituído por duas espécies, *D. pentaphylla* (Taub.) Burkart e *D. pinnata* (Benth.) Malme. Os representantes destas espécies ocorrem em áreas de Floresta Atlântica nas regiões sudeste e sul. Observações de campo mostraram uma baixa produção de frutos e sementes, apesar da grande quantidade de flores produzida pelos indivíduos de ambas as espécies.

O objetivo deste estudo é caracterizar o desenvolvimento do óvulo e dos primeiros estádios da semente e verificar a ocorrência de anormalidades no processo reprodutivo de *Dahlistedtia pinnata* e *D. pentaphylla*. Também será verificado se tais anormalidades podem ser atribuídas a restrições nos recursos maternos e/ou a mecanismos pré- ou pós-zigóticos, que atuam como barreiras à autofertilização. A fim de se testar as causas do aborto, foram formuladas as seguintes questões: Há diferenças no crescimento do tubo polínico no pistilo após autopolinização ou polinização cruzada? Há diferenças no desenvolvimento do óvulo e da semente após os tratamentos de autopolinização ou polinização cruzada? As anormalidades expressando o aborto estão restritas a alguns tecidos?

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo do desenvolvimento do óvulo e da semente, botões florais e frutos em vários estádios de desenvolvimento de ambas as espécies foram coletados de indivíduos cultivados em Campinas, SP, e de indivíduos de populações naturais: de *Dahlistedtia pinnata*, no Parque Estadual da Serra do Mar em Picinguaba, Ubatuba e Caraguatatuba, SP, e de *Dahlistedtia pentaphylla*, na Fazenda Intervalles, SP. O material testemunho das duas espécies está depositado no herbário UEC (Universidade Estadual

de Campinas, Campinas, SP) sob os números 300, 17936, 28637, 28746, 109265, 109266, 109267, 109535, 109536.

Além disso, pistilos foram polinizados manualmente com grãos de pólen provenientes do mesmo indivíduo e de indivíduos de populações diferentes da mesma espécie e, coletados 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144h após a polinização (seguindo as recomendações de Radford et al. 1974). Pistilos apenas marcados e não ensacados foram coletados nos mesmos períodos (polinização aberta).

Parte dos pistilos foi clarificada em NaOH e corada em Azul de Anilina para observação de características do crescimento do tubo polínico no estigma e no estilete, por meio de Microscopia de Fluorescência (Martin 1959).

A outra parte dos pistilos, os botões e os frutos em vários estádios de desenvolvimento foram fixados em solução de Karnovsky por 24h (Karnovsky 1965) e estocados em álcool 70%. Após, foram submetidos à desidratação alcoólica gradual, inclusão em paraplast (desidratação butílica) (Gerlach 1969) e em historresina "Basic Resin" (desidratação etílica) (Gerrits 1991), seccionamento seriado (5 a 8µm), coloração com Azul de Toluidina (historresina) (O'Brien et al. 1964) ou Safranina e Fast Green (paraplast) e montagem em resina sintética Epoxi (Gerlach 1969).

Óvulos dentro do ovário foram clarificados em Fluido de Herr (Herr 1971) e examinados em interferência por contraste diferencial de fase de Nomarski, a fim de se determinar o tempo de fertilização após as polinizações controladas.

Fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Olympus BH2 e as escalas nas mesmas condições ópticas.

RESULTADOS

Os resultados serão apresentados para as duas espécies, sendo apenas ressaltadas as diferenças quando ocorrerem.

DESENVOLVIMENTO DO ÓVULO –

O desenvolvimento de todos os óvulos é concomitante. Células arquesporais múltiplas ocorrem em grupo, localizado na porção apical do nucelo (fig. 1A). O megásporo funcional (fig. 1B) é rodeado por uma espessa parede calósica e apresenta citoplasma rico em grãos de amido e núcleo proeminente. O núcleo do megásporo divide-se originando

dois núcleos que migram para pólos opostos. Cada núcleo sofre duas divisões mitóticas originando oito núcleos, sendo quatro em cada pólo. Um núcleo de cada pólo migra para o centro originando a célula central binucleada (fig. 1C). Os três núcleos do pólo micropilar diferenciam-se em oosfera e em duas sinérgides e os três núcleos do pólo calazal em três antípodas. O desenvolvimento do saco embrionário é do tipo «Polygonum». Cada sinérgide apresenta um aparato micropilar filiforme, citoplasma densamente corado e núcleo micropilar proeminente. A oosfera apresenta núcleo calazal proeminente. As antípodas são efêmeras. A célula central apresenta dois núcleos polares (fig. 1C) que se fundem para formar o núcleo secundário.

No momento em que o saco embrionário é 4-nucleado, os grãos de pólen já estão diferenciados e os tegumentos, através de divisões anticlinais, já se expandiram em torno do nucelo. O alongamento do saco embrionário só ocorre após a diferenciação das suas sete células, período que corresponde à antese e não é homogêneo nos óvulos num ovário.

MORFOLOGIA DO ÓVULO NA ANTESE -

Os óvulos estão arranjados linearmente na placenta, sendo 5-7 em *D. pentaphylla* e 7-9 em *D. pinnata*. São bitegumentados, crassinucelados e ortocampilótrofos, sendo que a micrópila e a região nucelar do saco embrionário formam um ângulo de 90° (fig. 2C) e o feixe vascular termina na região calazal do saco embrionário. A micrópila é larga e extensa, em zig-zag e está em estreito contato com a placenta.

O tegumento externo é massivo e o interno é 2-3-seriado, formando a protuberância em direção à micrópila (fig. 2A). A camada mais interna do tegumento interno assemelha-se a um endotélio, sendo as células caracterizadas por um citoplasma densamente corado e núcleo proeminente. Tais células continuam se dividindo mesmo após a formação da semente. As células epidérmicas do tegumento externo em *D. pentaphylla* apresentam conteúdo provavelmente fenólico, tornando o óvulo escuro. Grãos de amido proeminentes ocorrem no citoplasma das células nucleares e das células do tegumento interno.

CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO APÓS AUTOPOLINIZAÇÃO E POLINIZAÇÃO CRUZADA – (figs. 3, 4)

Não foram encontradas diferenças na germinação do grão de pólen e no crescimento do tubo polínico após autopolinização e polinização cruzada. Os grãos de pólen germinam na superfície estigmática 6h após a polinização. Os tubos polínicos

crecem adjacentes às células do canal estilar e após 12h atingem a região mediana do estilete. Após 24h são observados tanto na placenta como na micrópila. Em *D. pentaphylla* alguns tubos polínicos desviaram da micrópila após autopolinização, mas, neste caso, os óvulos estavam fluorescentes, indicando a presença de calose nos tecidos.

DUPLA FERTILIZAÇÃO APÓS POLINIZAÇÃO ABERTA -

A fertilização é porogâmica. O tubo polínico rompe as células nucelares, passa por uma das sinérgides e atinge a oosfera, desorganizando o saco embrionário (fig. 2D). Grãos de amido acumulam-se no vacúolo da célula central. Não foi encontrada evidência de secreção na micrópila antes da fertilização. A tripla fusão é anterior à singamia. O núcleo endospermico primário é proeminente e bem delimitado e formado antes da polinização. Há um aumento no volume das células nucelares devido à intensa vacuolização.

DUPLA FERTILIZAÇÃO APÓS AUTOPOLINIZAÇÃO E POLINIZAÇÃO CRUZADA-

Apenas alguns óvulos, em cada ovário, foram fertilizados. A ausência de fertilização foi deduzida pela presença das duas sinérgides intactas e pela organização do saco embrionário. A dupla fertilização é aparente 72h após autopolinização (fig. 5A) e polinização cruzada e 48h após polinização aberta, examinada em seções seriadas e em Normarsky DIC. O zigoto e as divisões do endosperma foram encontrados em todos os tratamentos. Um pró-embrião foi observado 120h após autopolinização, utilizando-se Normarsky DIC (fig. 5B). Grãos de amido proeminentes estavam presentes nas células nucelares e no saco embrionário.

Sinais de degeneração em alguns óvulos não fertilizados foram observados no nucelo, nos tegumentos e, posteriormente, no saco embrionário (figs. 2B, C, D). O espessamento prematuro das paredes periclinais externas das células nucelares representa um dos primeiros sinais da degeneração e ocorre 24h após a polinização. Após 96h, as células nucelares também aumentam em volume, tornam-se anucleadas e sem conteúdo amilífero. As paredes celulares dos tegumentos e da micrópila tornam-se espessadas (fig. 2C), calósicas e células de conteúdo provavelmente fenólico aparecem na região vascular (fig. 2C) 72 e 120h após a polinização, respectivamente. As células do tegumento interno apresentam citoplasma retraído e paredes sinuosas. Alguns óvulos emitem fluorescência (Normarsky DIC) 96h após a polinização. Nos sacos embrionários em colapso, as sinérgides apresentam-se retraídas e escuras e a célula central não apresenta

citoplasma translúcido e núcleo distinto; os grãos de amido na cavidade do saco embrionário estão precipitados.

DESENVOLVIMENTO DO ENDOSPERMA -

O desenvolvimento do endosperma é do tipo Nuclear. O núcleo endospérmico primário divide-se originando dois núcleos livres. Após divisões sucessivas, os núcleos livres no citoplasma estão distribuídos por toda a cavidade do saco embrionário, ao redor do embrião. O endosperma permanece nuclear no estágio globular (fig. 1I) do pró-embrião. A região calazal funciona como um pequeno haustório em "caecum" (fig. 1J). Grãos de amido proeminentes estão presentes no citoplasma do endosperma. As células nucelares da calaza degeneram-se à medida que o endosperma se expande.

DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO -

O zigoto é micropilar e polar, ou seja, o núcleo proeminente e o citoplasma densamente corado estão em pólos opostos (fig. 1E). A divisão zigótica é transversal, resultando num pró-embrião bicelular (figs. 1F, G). A próxima divisão parece ser longitudinal. Um pequeno suspensor no pró-embrião (figs. 1H, I) é formado pela célula basal. O desenvolvimento do embrião é provavelmente do tipo «Onagrad». No decorrer da embriogênese o conteúdo amilífero diminui nas células nucelares e aumenta no endosperma. As células nucelares da região micropilar apresentam hiperplasia e lise, restando poucas na maturidade da semente.

Ocasionalmente, em ambas as espécies, foi encontrado uma célula mãe do embrião num local atípico da região micropilar.

ENVOLTÓRIO DA SEMENTE: ESTÁDIOS INICIAIS -

O envoltório da semente origina-se de várias camadas celulares do tegumento externo e de 2-3 camadas do tegumento interno (figs. 6 A-D).

Todas as células epidérmicas do tegumento externo apresentam conteúdo de aparência fenólica, levando à coloração castanha da semente madura. As outras células do tegumento externo apresentam paredes anticlinais retas, arranjadas em séries, núcleos basais e são menos volumosas que as células do tegumento interno. Ocorrem divisões intensas nos planos anticlinal, periclinal e oblíquo nos tegumentos na fase de pró-embrião (fig. 6C). Quando o embrião apresenta-se globoso, as células do tegumento externo

apresentam espessamentos nos ângulos formados pelas paredes celulares e o citoplasma retrai-se próximo à parede (fig. 6D).

As divisões das células do tegumento interno são mais freqüentes na fase em que o zigoto inicia suas divisões (fig. 6 A-B). Após esta fase, torna-se cada vez mais comprimido pelo tegumento externo e as paredes de suas células apresentam-se espessadas. A abertura micropilar torna-se obstruída devido ao acúmulo de calose e as células adjacentes parecem acumular fenóis.

EXPRESSÃO DO ABORTO -

Em alguns pistilos submetidos aos tratamentos de autopolinização ou polinização cruzada, observa-se o colapso das células do saco embrionário, que se tornam enegrecidas e colabadas (figs. 2B, C, D). As células nucelares apresentam citoplasma escuro e núcleo achatado e os grãos de amido estão ausentes. Há deposição de calose, além de espessamento e retração prematuros das paredes celulares dos tegumentos, da placenta e da região vascular. Nos pistilos não polinizados manualmente (polinização aberta), as mesmas características foram observadas nos mesmos períodos, o que significa que não são provenientes de manipulação da flor.

Características que expressam o aborto também foram encontradas nos primeiros estádios após a fertilização, antes da formação do embrião. Colapsos do zigoto e do endosperma posteriores à compressão prematura dos tegumentos foram observados (figs. 2D, E).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento do saco embrionário e do endosperma das espécies de *Dahlstedtia* segue o padrão encontrado em Leguminosae. Similaridades também foram encontradas quanto à morfologia do óvulo, incluindo óvulo bitegumentado e crassinucelado e micrópila em zig-zag. Os representantes da família, apesar de pouco estudados, apresentam alguns padrões, como óvulo campilótropo com algumas variações, bitegumentado e crassinucelar, saco embrionário do tipo "Polygonum" e desenvolvimento do endosperma do tipo nuclear (Rim et al. 1990, Ashrafunnisa & Pullaiah 1994, 1999, Prakash 1987).

O desenvolvimento do embrião em *Dahlstedtia* é provavelmente do tipo «Onagrad» (Johansen 1950), comum em outros representantes de Papilionoideae (Ashrafunnisa & Pullaiah 1994, 1999). O tipo de embriogênese não pôde ser definido com certeza devido à ausência de algumas seções nos estádios de desenvolvimento que levam ao estágio de pró-embrião.

A presença de uma célula mãe do embrião em local atípico da micrópila em ambas as espécies de *Dahlstedtia* deve ser estudada com mais detalhes, principalmente devido ao registro de apomixia em algumas espécies de Leguminosae por Prakash (1997).

Não foram notadas características que levariam ao aborto nos primeiros estádios de desenvolvimento do óvulo em *Dahlstedtia*. Como o saco embrionário completa o seu desenvolvimento já no botão em pré-antese e, portanto, antes da polinização, grãos de pólen provenientes de autopolinização não poderiam ter efeito na megagametogênese. Em *Prunus dulcis* (Pimienta & Polito 1983) e *Narcissus triandrus* (Sage et al. 1999) a diversidade genética do grão de pólen interfere na diferenciação da célula-mãe do megásporo, sendo que a polinização por grãos oriundos da própria planta acarreta a ausência de fusão dos núcleos polares na célula central e de alongamento do saco embrionário.

Óvulos estéreis apresentam anormalidades nos estágios pré- e pós-meióticos do desenvolvimento do saco embrionário, como por exemplo, ausência de megásporos, megásporos menores que os normais e em degeneração e a degeneração dos núcleos após as divisões mitóticas. O saco embrionário completamente diferenciado também pode se degenerar, o que se comprova pela observação da desintegração dos núcleos celulares, pela compressão dos tecidos nucelares e pelo aparecimento de calose e lignina nas paredes celulares do tegumento interno (Pimienta & Polito 1983, Rim et al. 1990).

Estudos histológicos caracterizando o processo abortivo de óvulos e sementes foram relatados para algumas espécies de Leguminosae (Briggs et al. 1987, O'Donoghue & Grant 1988, Rim et al. 1990, Vishnyakova 1991), Rosaceae (Pimienta & Polito 1983), Brassicaceae, Poaceae e Solanaceae (Vishnyakova 1991).

Em óvulos fertilizados e abortados podem ser verificadas a ausência de fusão dos núcleos polares, de alongamento do megagametofito e de lise das células nucelares, a hiperplasia dos tecidos maternos e a deposição de calose na região da hipóstase, obstruindo o fluxo de nutrientes (Pimienta & Polito 1983, Briggs et al. 1987, Vishnyakova 1991). Em *Pisum sativum* os núcleos do endosperma sofrem hipertrofia e desintegram-se e

a penetração haustorial é interrompida devido à presença de calose na hipóstase, o que acarreta a expulsão do haustório. Os núcleos do embrião também se tornam hipertrofiados, há o aumento da vacuolização celular e a perda de turgor nas células do suspensor (Briggs et al. 1987).

A fertilização preferencial em determinada posição ocupada pelo óvulo no ovário não foi verificada nas espécies de *Dahlstedtia* (cap. 4). O fato de que todos os óvulos apresentam desenvolvimento concomitante sugere que a ocorrência de fertilização pode estar relacionada à performance do grão de pólen, como por exemplo, à velocidade de crescimento do tubo polínico. Em algumas espécies de *Lotus*, o desenvolvimento assincrônico dos óvulos foi relacionado à alta longevidade floral e às visitas pouco freqüentes dos polinizadores, o que garantiria a ocorrência de fertilização (Bubar 1958). Conclusão similar foi encontrada para *Narcissus triandrus* (Sage et al. 1999), mas em *Dahlstedtia* são necessárias mais investigações sobre a biologia floral para que se possa estabelecer tais relações.

A maioria dos sacos embrionários em *Dahlstedtia* não foi fertilizada, apesar de sua completa diferenciação. Alguns pontos podem ser discutidos, buscando explicar a ausência de fertilização. Primeiro, os pistilos teriam sido coletados antes da fertilização. Entretanto, a fertilização foi observada 48h após polinização aberta e a coleta dos pistilos foi feita até 144h, após a polinização. Segundo, foi observada a presença de óvulos estéreis no ovário, devido ao espessamento e à retração das paredes das células dos tegumentos, da região vascular e da placenta, além de colapso do saco embrionário. Por outro lado, tanto o espessamento quanto a retração das paredes nos tecidos também podem ter sido conseqüências da ausência de fertilização, pressupondo um curto período de viabilidade do saco embrionário. Finalmente, comparando as polinizações controladas à polinização aberta, pode-se concluir que a o número de grãos de pólen depositados na superfície estigmática não foi um fator limitante para a fertilização, pois em todos os tratamentos somente alguns óvulos foram fertilizados, e nas polinizações controladas (manuais) não há limitação no número de grãos de pólen depositados. A influência da performance do grão de pólen na maturação ou no aborto de frutos jovens e de sementes foi testada em *Mirabilis jalapa* (Niesenbaum 1999), sendo que o número e a diversidade de grãos de pólen depositados foram fatores importantes na determinação do aborto.

Sinais de degeneração nos tecidos maternos e colapso do zigoto e endosperma foram encontrados logo nos primeiros estádios da embriogênese, o que indica que as plantas estão selecionando óvulos/sementes a serem fertilizados/maturadas.

Em *Dahlistedtia*, além de envolver o megásporo no decorrer das suas divisões, a calose acumula-se prematuramente ao redor do saco embrionário, nos tegumentos, na região vascular e na placenta, logo nos primeiros momentos após a polinização, o que foi observado após todos os tratamentos. Além disso, tubos polínicos não penetram óvulos observados emitindo fluorescência. Segundo o estudo de Vishnyakova (1991), a emissão de fluorescência indica a presença de calose nos tecidos e, conseqüentemente, esterilidade do óvulo. Em *Dahlistedtia* não foi possível confirmar se a deposição de calose seria causa ou conseqüência do aborto, mas foi de grande utilidade na caracterização da expressão do aborto nas espécies.

A presença de calose é usual nos primeiros estádios da megagametogênese, principalmente em saco embrionários do tipo "Polygonum", mas tende a desaparecer nos estádios pós-meióticos (Pimienta & Polito 1983). A associação da presença de calose nos tecidos maternos ao processo abortivo foi amplamente discutida por Vishnyakova (1991). Em seu artigo, a autora discute a deposição de calose como conseqüência da degeneração de óvulos fertilizados, sugerindo que seja uma resposta a uma mudança metabólica e que teria uma importante função no isolamento da área em degeneração do restante da planta. Resultados similares foram encontrados por Sedgley (1977), Pimienta & Polito (1983) e Briggs et al. (1987). Entretanto, tais autores consideraram a deposição de calose na hipóstase do óvulo fertilizado como causa da degeneração ovular, pois, ou a calose estaria obstruindo o fluxo de nutrientes e causando a estivação dos elementos embrionários (Pimienta & Polito 1983), ou estaria impedindo a penetração haustorial do endosperma (Briggs et al. 1987). Independente de ser considerada causa ou conseqüência da degeneração de óvulos e sementes, a presença de calose constitui-se um instrumento útil na investigação do aborto.

Dahlistedtia pinnata e *D. pentaphylla* apresentam características semelhantes às de espécies autocompatíveis. Grãos de pólen provenientes de autopolinização ou de polinização cruzada germinaram em toda a superfície estigmática. Do mesmo modo, a morfologia dos tubos polínicos em crescimento no estilete não é semelhante à encontrada em reações de auto-incompatibilidade em angiospermas, com sistema de incompatibilidade gametofítica (Richards 1997). A ausência de fertilização e a presença de anormalidades no

desenvolvimento do embrião e do endosperma não foram observadas preferencialmente após autopolinização ou polinização cruzada. Não há, portanto, mecanismos pré- ou pós-zigóticos atuando como barreiras à autofertilização. Além disso, espécies com auto-incompatibilidade tardia, quando submetidas aos tratamentos de polinização, apresentaram resultados não encontrados em *Dahlstedtia*, como: 1. desenvolvimento diferencial do óvulo no ovário, 2. evidência de secreção micropilar poucos dias após a antese, 3. presença de um mecanismo controlando a germinação do pólen no estigma e 4. anormalidades no desenvolvimento do saco embrionário após autopolinização (Bubar 1958, Pimienta & Polito 1983, Kaul et al. 1986, Rim et al. 1990, Dorken & Husband 1999, Sage et al. 1999).

Considerando que as espécies de *Dahlstedtia* são autocompatíveis, sugere-se, da mesma forma que em *Pisum sativum* (Briggs et al. 1987), que o aborto de óvulos e sementes está mais relacionado à limitação de recursos maternos para a progênie que ao alto grau de autopolinização, o que pôde ser confirmado pelas alterações morfológicas observadas primeiro nos tecidos maternos e, depois, nos tecidos embriogênicos. A presença de características abortivas nos tegumentos e na região vascular, tanto dos óvulos como das sementes em início de desenvolvimento, estariam indicando que o transporte de nutrientes para o embrião está sendo bloqueado e que a «planta-mãe» seria selecionada para diminuir o custo da produção e maturação de sementes. Westoby & Rice (1982) já haviam mencionado o papel dos tegumentos como barreira no controle da distribuição de nutrientes para a progênie, após a formação da célula-mãe do megásporo, e também após a fertilização; da mesma forma a presença da hipóstase, um tecido formado por células espessadas localizado na região calazal do óvulo, é responsável pela obstrução do transporte de nutrientes da região vascular do óvulo/semente para o saco embrionário/embrião (Queller 1983).

Briggs et al. (1987) trabalharam na caracterização do aborto em sementes de *Pisum sativum* e encontraram alterações morfológicas nos tecidos maternos. A partir da hipótese de Queller (1983) concluíram que o aborto nos primeiros estádios da embriogênese seria devido aos conflitos existentes entre a «planta-mãe» e a progênie, havendo limitação dos recursos maternos, pois as primeiras modificações expressando o aborto de sementes ocorreram primeiro nos tecidos maternos e mais tarde nos tecidos embriogênicos.

Queller (1983) propôs que a teoria da Seleção de Parentesco («kin selection») fosse estendida para o processo de maturação da semente. Sua hipótese admite que haja pressões seletivas diferentes nos tecidos que compõem a semente em desenvolvimento,

de acordo com o grau de parentesco entre eles, o que resultaria em conflitos no decorrer da embriogênese. Desta forma, a planta-mãe seria selecionada para encontrar um ótimo na distribuição de recursos para os diferentes embriões em formação e, cada embrião, por sua vez, estaria sendo selecionado para adquirir mais nutrientes que o endosperma poderia provê-lo e assim o endosperma, o gametofito e o esporofito sucessivamente. Evidências da teoria da seleção de parentesco podem ser observadas através da alta atividade metabólica de tecidos mais relacionados ao embrião; da presença, em grande parte das Angiospermas, de expansões haustoriais no endosperma ou mesmo no embrião, funcionando como captadores de nutrientes dos tecidos vizinhos e, do armazenamento de nutrientes em tecidos mais relacionados ao embrião, como o endosperma e o cotilédone. Se o embrião e o endosperma adquirem recursos além da distribuição ótima materna, podem ocorrer manifestações morfológicas atuando como barreiras ao crescimento do endosperma e do embrião.

Investigações ecológicas e genéticas são necessárias pra avaliar se a depressão endogâmica também estaria ocorrendo nas espécies de *Dahlistedtia*, resultando numa alta taxa de aborto de frutos e sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARATHI H S, GANESHAIAH K N, UMA SHAANKER, R & HEGDE S G 1999 Seed abortion in *Pongamia pinnata* (Fabaceae); Am. J. Bot. 86 659-662
- ARROYO M T K 1981 Breeding Systems in Leguminosae; In *Advances in Legume Systematics*; part 1, pp 1-26 ed. R M Polhill & P H Raven (Kew, U.K.: Royal Botanic Gardens)
- ASHRAFUNNISA & PULLAIAH T 1994 Embryology of *Galactia* (Fabaceae); Phytomorphology 44 253-260
- ASHRAFUNNISA & PULLAIAH T 1999 Embryology of *Teramnus labialis* (Fabaceae); Phytomorphology 49 197-207
- BAWA K S & BUCKLEY D P 1989 Seed: ovule ratios, selective seed abortion, and mating systems in Leguminosae. Monogr. Syst. Bot. 29 243-262.
- BAWA K S & WEBB C J 1984 Flower, fruit, and seed abortion in tropical forest trees implications goes the evolution of paternal and maternal reproductive patterns; Am. J. Bot. 71 736-751

- BRIGGS C L, WESTOBY M, SELKIRK P M & OLDFIELD R J 1987 Embryology of early abortion due to limited maternal resources in *Pisum sativum* L; Ann. Bot. 59 611-619
- BUBAR J S 1958 An association between variability in ovule development within ovaries and self-incompatibility in *Lotus* (Leguminosae); Can. J. Bot. 36 65-72
- DORKEN M E & HUSBAND B C 1999 Self-sterility in the understory herb *Clintonia borealis* (Liliaceae); Int. J. Plant Sci. 160 577-588
- GERLACH D 1969 *Botanische Mikrotechnik*; (Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag)
- GERRITS P O 1991 *The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles*; (Groningen, Netherlands: Department of Anatomy and Embriology, State University Groningen)
- GIBBS P & SASSAKI R 1998 Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* (Leguminosae - Papilionoideae) in SE Brazil the effects of pistillate sorting on fruit-set; Ann. Bot. 81 735-740
- HEERING J H 1994 The reproductive biology of three perennial *Sesbania* species (Leguminosae); Euphytica 74 143-148
- HERR J M Jr 1971 A new clearing-squash technique for the study of ovule development in Angiosperms; Am. J. Bot. 58 785-790
- HERRERO M & ARBELOA A 1989 Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*); Am. J. Bot. 76 1441-1447
- HOSSAERT M & VALÉRO M 1988 Effect of ovule position in the pod on patterns of seed formation in two species of *Lathyrus* (Leguminosae, Papilionoideae); Am. J. Bot. 75 1714-1731
- JOHANSEN D A 1950 *Plant Embryology*; (Waltham: Chronica Botanica)
- KARNOVSKY M J 1965 A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in eletron microscopy; J. Cell Biol. 27 137A-138A
- KAUL V, ROUSE J L & WILLIAMS E G 1986 Early events in the embryo sac after intraspecific and interspecific pollinations in *Rhododendron kawakamii* and *R. retusum*; Can. J. Bot. 64 282-291
- LLOYD D G 1980 Sexual strategies in plants 1 An hypothesis of sexual adjustment of maternal investment during one reproductive session; New Phytol. 86 69-79
- MARTIN F N 1959 Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence; Stain Technol. 34 125-128

- MARTIN M E & LEE T D 1993 Self pollination and resource availability affect ovule abortion in *Cassia fasciculata* (Caesalpiniaceae); *Oecologia* 94 503-509
- MOGENSEN H L 1975 Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae); *Am. J. Bot.* 62(2) 160-165
- NIESENBAUM R A 1999 The effects of pollen load size and donor diversity on pollen performance, selective abortion, and progeny vigor in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae); *Am. J. Bot.* 86 261-268
- O'BRIEN T P, FEDER N & MCCULLY M E 1964 Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O; *Protoplasma* 59 368-373
- O'DONOUGHUE L S & GRANT W F 1988 New sources of indehiscence for birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*, Fabaceae) produced by interspecific hybridization; *Genome* 30 459-468
- PALUPI E R & OWENS J N 1997 Pollination, fertilization, and embryogenesis of teak (*Tectona grandis* Lf); *Int. J. Plant Sci.* 158 259-(15)
- PIMIENTA E & POLITO V S 1983 Embryo sac development in almond (*Prunus dulcis* (Mill) D A Webb) as affected by cross, self and non-pollination; *Ann. Bot.* 51 469-479
- PRAKASH N 1987 Embryology of the Leguminosae; In *Advances in Legume Systematics, part 3*, pp 241-278 ed. C H Stirtton (Kew, U.K.: Royal Botanic Gardens)
- PRAKASH N 1997 *Sexual Reproduction in Seed Plants - An Embryological Approach*; 2nd ed (Armidale, Australia: The University of New England)
- QUELLER D C 1983 Kin selection and conflict in seed maturation; *J. theor. Biol.* 100 153-172
- RADFORD A E; DICKISON W C, MASSEY J R & BELL C R 1974 *Vascular Plant Systematics*; (New York, USA: Harper & Row Publishers)
- RICHARDS A J 1997 *Plant Breeding Systems*; 2nd ed (London, U.K.: Allen & Unwin)
- RIM Y W, BEUSSELINCK P R, MCGRAW R L & SOMERS D A 1990 Megagametophyte development in *Lotus corniculatus*, *L. conimbricensis*, and their protoplast fusion hybrid; *Am. J. Bot.* 77 1084-1094
- SAGE T L, STRUMAS F, COLE W W & BARRETT S C H 1999 Differential ovule development following self- and cross-pollination the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae); *Am. J. Bot.* 86 855-870
- SEAVEY S R & BAWA K S 1986 Late-acting self-incompatibility in Angiosperms; *Bot. Rev.* 52 195-219

- SEDGLEY M 1977 Reduced pollen tube growth and the presence of callose in the pistil of the male floral stage of the avocado; Sci. Hort. 7 27-36
- STEPHENSON A G 1981 Flower and fruit abortion proximate causes and ultimate functions; Ann. Rev. Ecol. Syst. 12 253-279
- VISHNYAKOVA M A 1991 Callose as an indicator of sterile ovules; Phytomorphology 41 245-252
- WESTOBY M & RICE B 1982 Evolution of the seed plants and inclusive fitness of plant tissues; Evolution 36 713-724

Figura 1. A-C. Seções longitudinais da estrutura do óvulo em diferentes estádios de desenvolvimento em *Dahlstedtia*. **A.** Células arquesporais múltiplas (seta), ocorrendo em grupo na região apical do nucelo. Escala = 12µm. **B.** Megásporo funcional (seta), envolto pelo nucelo. Escala = 12µm. **C.** Saco embrionário organizado. Célula central binucleada (seta). Escala = 20µm. **D-J.** Embriogênese. **D.** Saco embrionário desorganizado após a entrada do tubo polínico (48h após polinização aberta) em *D. pinnata*. Escala = 20µm. **E.** Zigoto (seta) na região micropilar, com núcleo proeminente e citoplasma densamente corado em pólos opostos. Escala = 12µm. **F.** Primeira divisão zigótica (seta), resultando em pró-embrião bicelular. Escala = 12µm. **G.** Divisão zigótica transversal seguida de divisão nuclear (seta). Escala = 12µm. **H.** Proembrião (seta) com um pequeno suspensor preso às células nucelares. Escala = 12µm. **I.** Proembrião globular (seta). Escala = 20µm. **J.** Haustório endospermico calazal do tipo "caecum" (seta). Escala = 20µm. m – micrópila, * - nucelo, ★ - células nucelares da região calazal s – sinérgide.

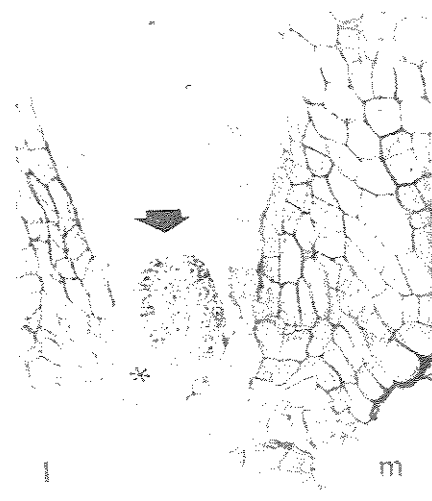
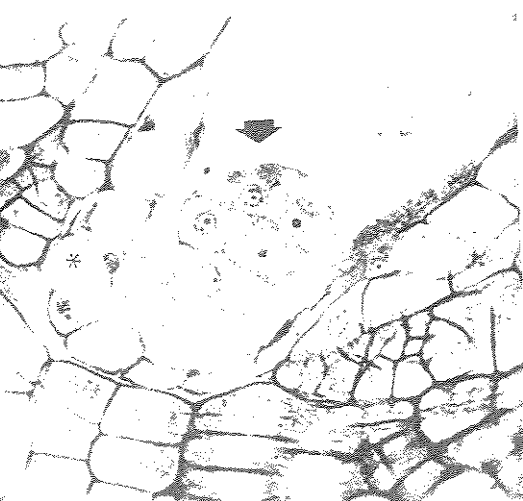
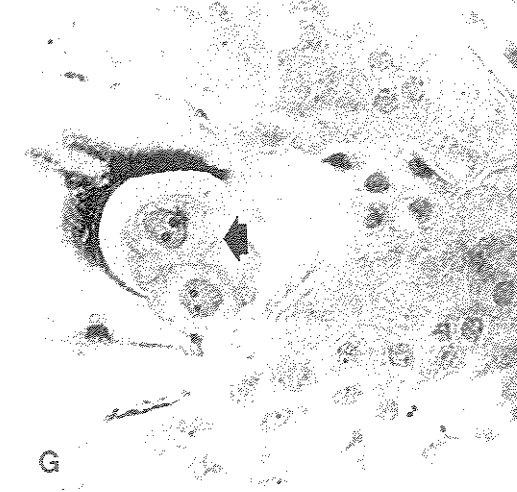
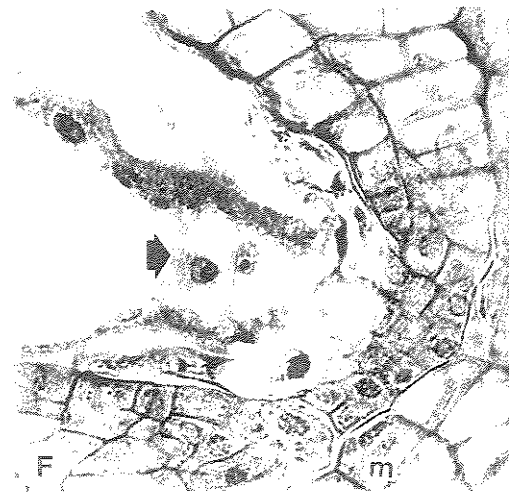
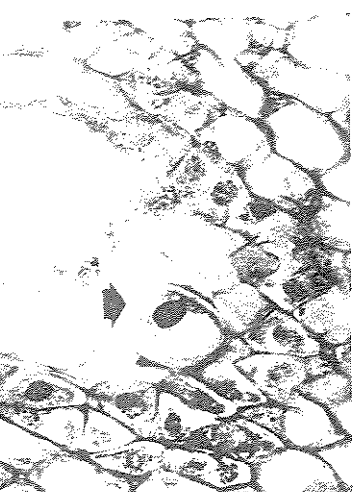
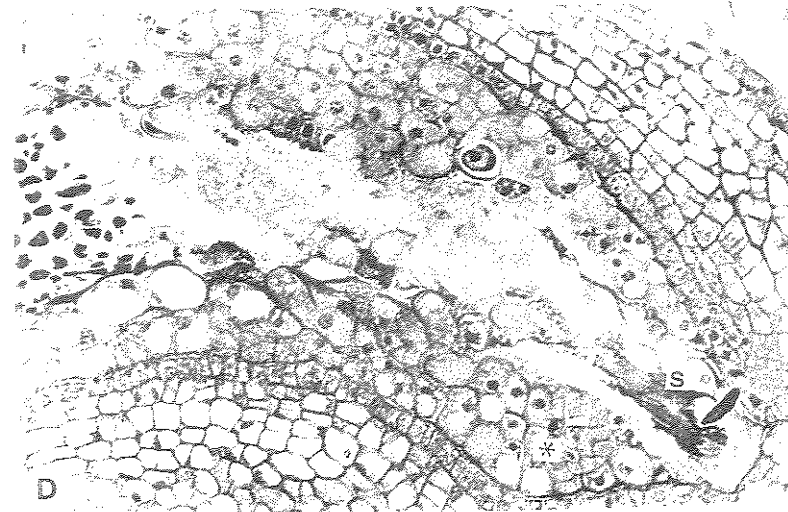
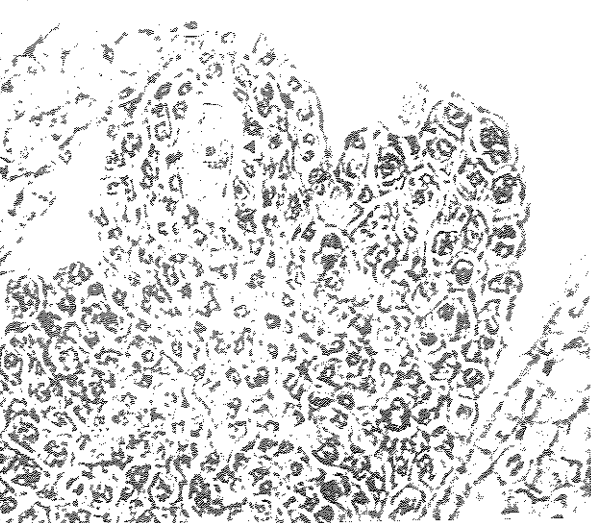
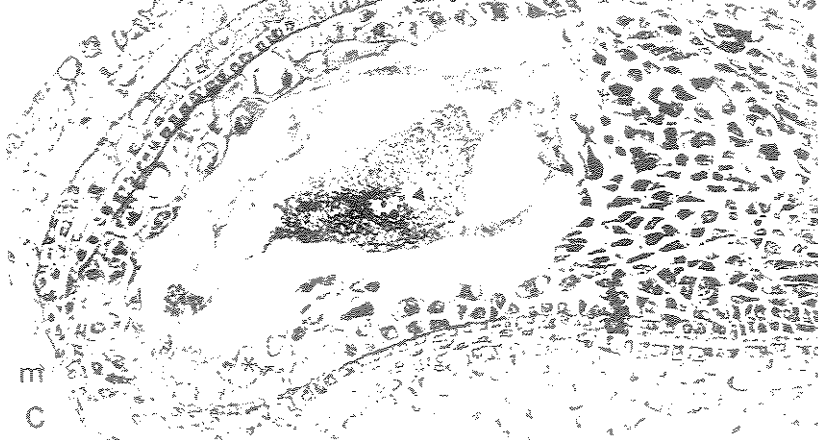


Figura 2. Seções longitudinais mostrando os tecidos ovulares após os diferentes tratamentos de polinização. **A.** Óvulo não fertilizado 24h após autopolinização. i – tegumento interno, m - micrópila, n - nucelo, s - sinérgide. Escala = 20 μ m. **B.** Óvulo colapsado 48h após polinização cruzada. m - micrópila, * - nucelo. Escala = 52 μ m. **C.** Óvulo colapsado 96h após polinização cruzada. Seta menor apontando células fenólicas na região vascular. Seta maior apontando espessamento do canal micropilar. Escala = 52 μ m. **D.** Hiperplasia e degeneração do nucelo 120h após polinização aberta. m - micrópila, * - nucelo. Escala = 52 μ m. **E.** Colapso do zigoto (z) e do endosperma (seta) 144h após polinização aberta. Escala = 12 μ m. **F.** Semente abortada. m – micrópila. Escala = 52 μ m.

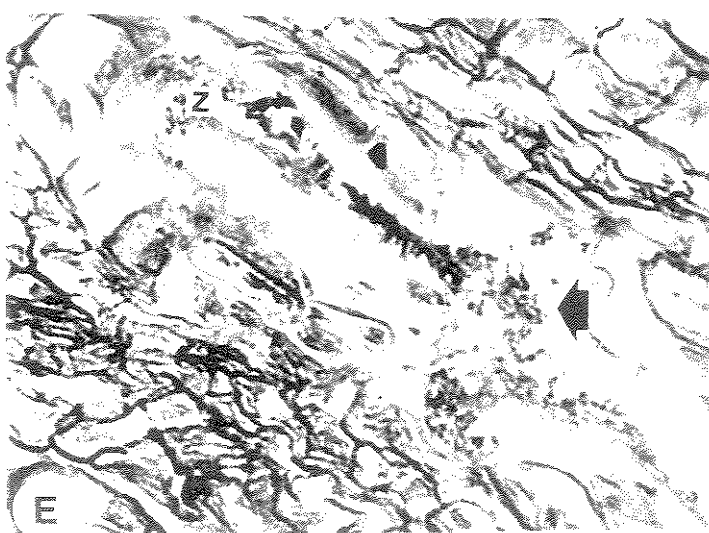
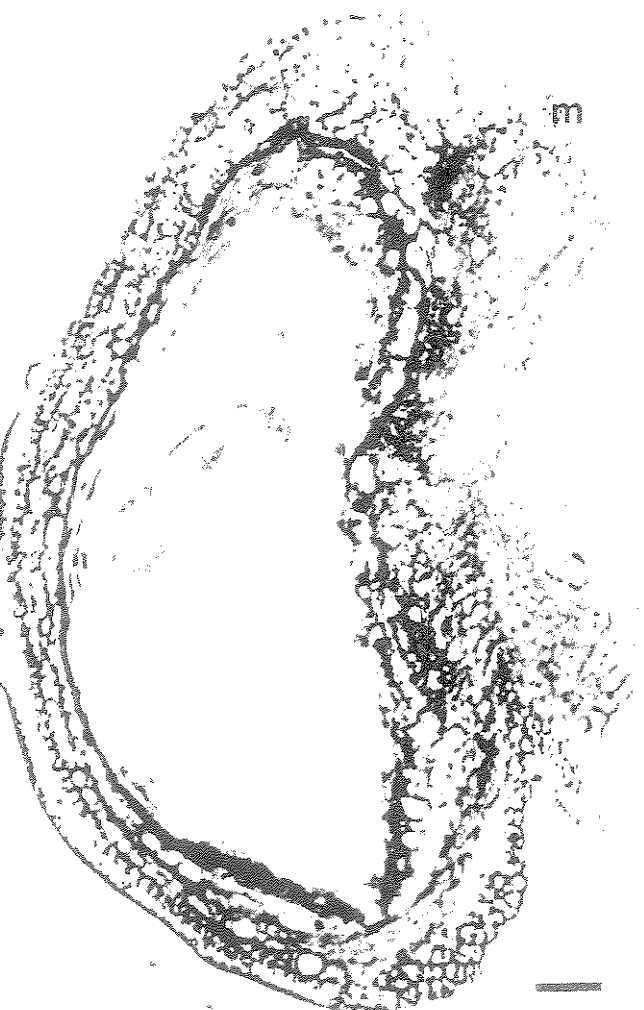


Figura 3. Germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em *Dahlistedtia pinnata*. **A-B.** Autopolinização. **A.** Grãos de pólen germinando no estigma. **B.** Tubos polínicos na placenta. **C-D.** Polinização cruzada. **C.** Grãos de pólen germinando no estigma. **D.** Tubo polínico penetrando o óvulo através da micrópila. Escalas=70µm.

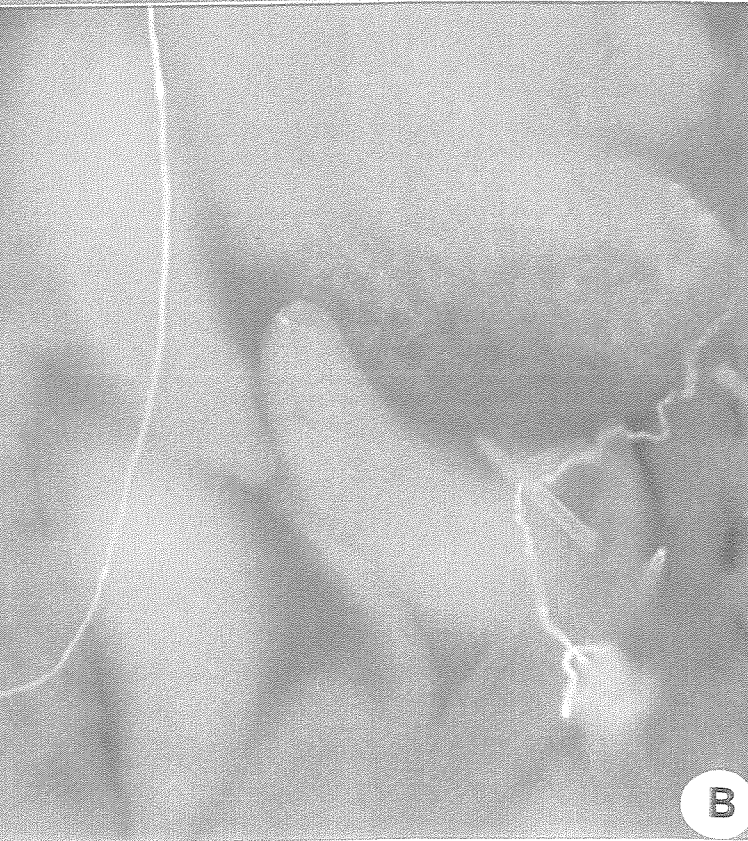


Figura 4. Germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em *Dahlstedtia pentaphylla*. **A-B.** Autopolinização. **A.** Grãos de pólen germinando no estigma. **B.** Tubo polínico penetrando o óvulo. **C-D.** Polinização cruzada. **C.** Grãos de pólen germinando no estigma. **D.** Tubo polínico próximo ao óvulo. Escalas=70µm.

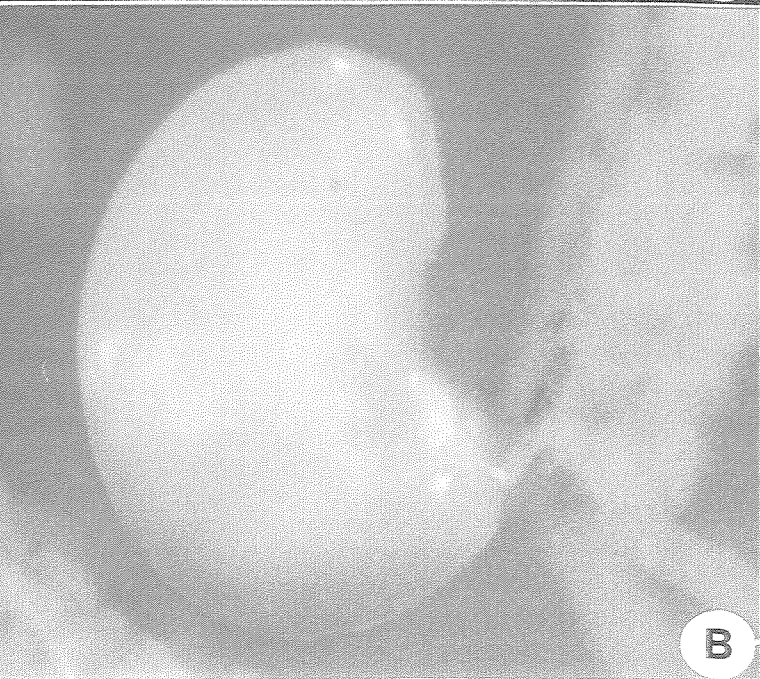
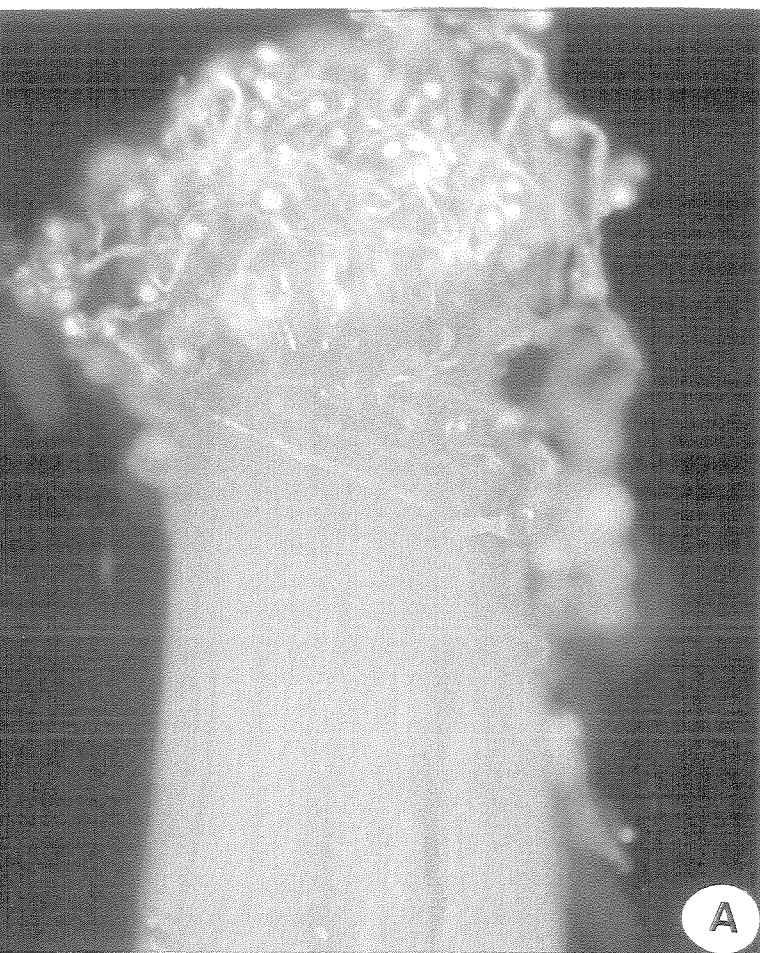
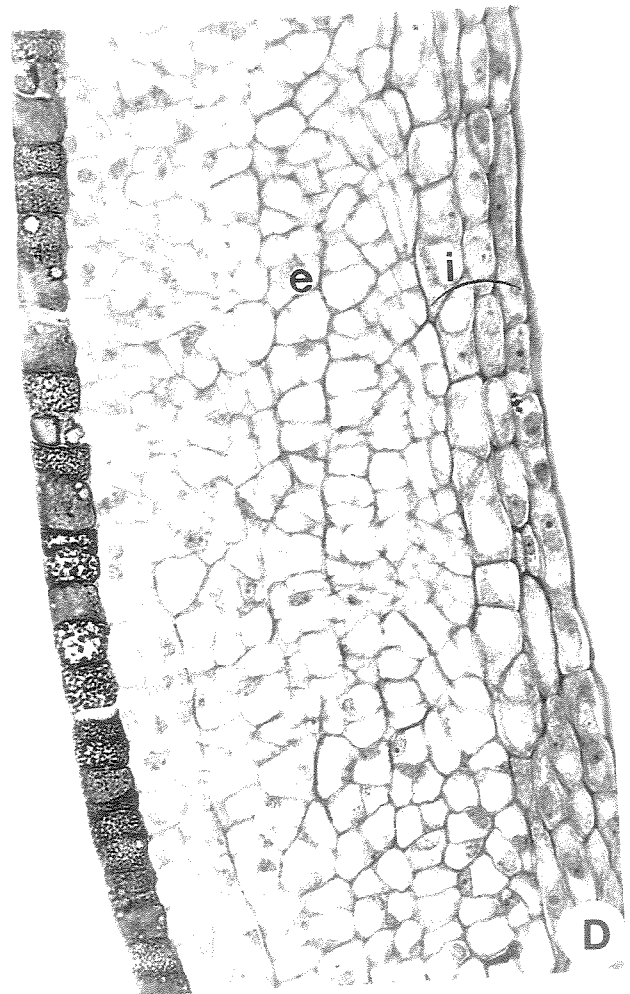
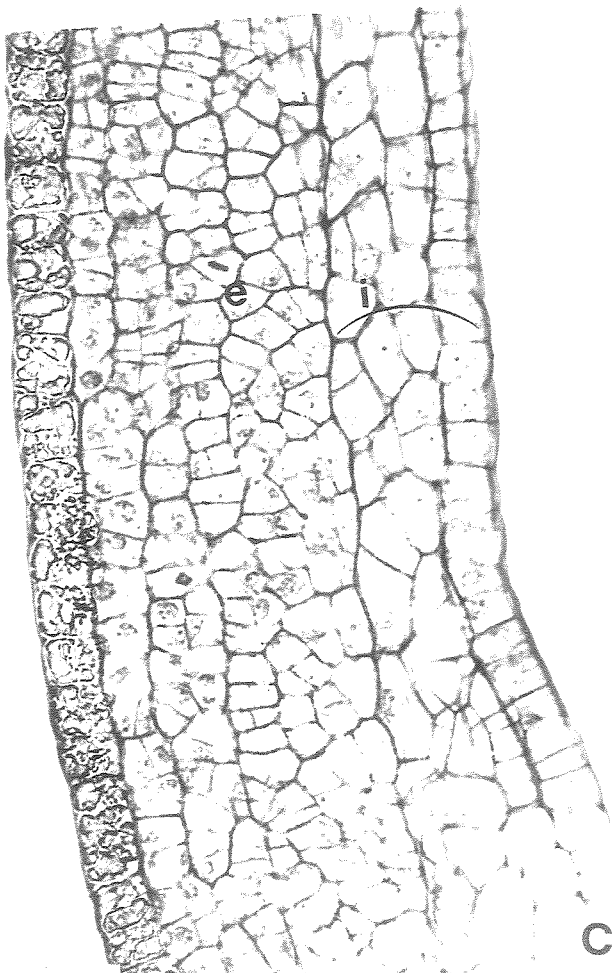
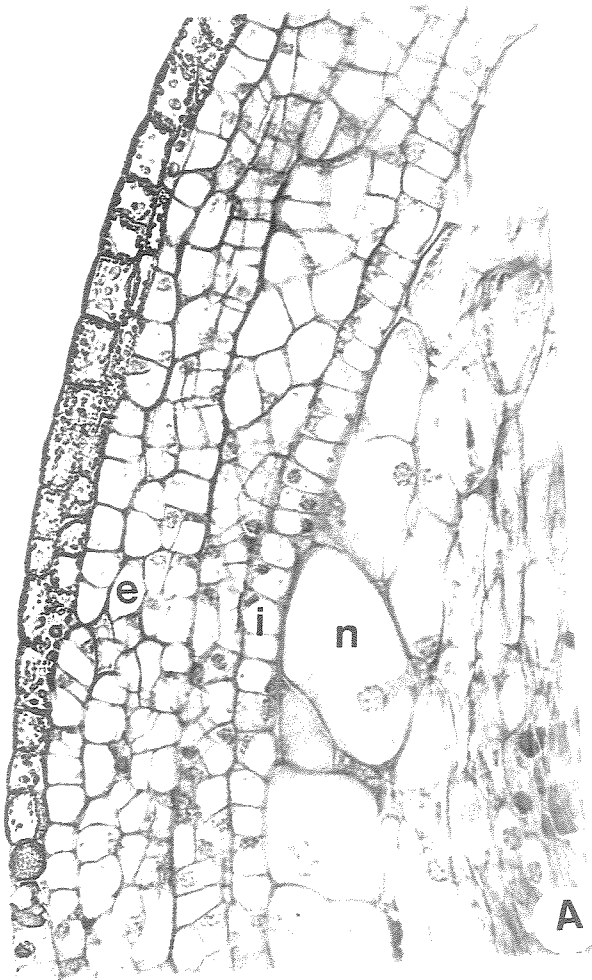


Figura 5. Óvulos de *Dahlstedtia pentaphylla* observados em Nomarski DIC. **A.** Divisão zigótica (seta) após 72h de autopolinização. **B.** Presença do suspensor (seta) após 120h de autopolinização. Escalas=20µm.



Figura 6. Envoltório da semente: estádios iniciais do desenvolvimento. **A.** Fase após a fertilização do óvulo. **B.** Fase da primeira divisão zigótica. A seta está apontando núcleos do endosperma. **C.** fase de pró-embrião. As células do tegumento externo estão em intensa divisão. **D.** Fase em que o embrião está globoso. As células do tegumento interno tornam-se alongadas no sentido longitudinal e comprimidas pelo tegumento externo. e – tegumento externo; i – tegumento interno; n – nucelo. Escalas = 22µm.



**CAPÍTULO IV: “EFEITO DOS COMPONENTES DE FECUNDIDADE NO PROCESSO REPRODUTIVO DE
DAHLSTEDTIA PENTAPHYLLA (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE)”**

RESUMO

Fatores acarretando o aborto seletivo de óvulos ou sementes, como a limitação do número de grãos de pólen depositados no estigma e a competição entre os óvulos por determinada quantidade de recursos exigida para a formação de sementes, podem ser mais facilmente testados em ovários e frutos que apresentam arranjo linear de óvulos e sementes, como é o caso de espécies de Leguminosae. *Dahlstedtia pentaphylla* (Leguminosae) é uma espécie brasileira de distribuição restrita à Floresta Atlântica, cujos representantes apresentam baixa produção de frutos e sementes. O efeito dos componentes de fecundidade (óvulos por ovário, sementes por fruto, padrões de polinização e de formação de frutos e de sementes) no processo reprodutivo desta espécie foi investigado por meio de análises das relações da posição das flores na inflorescência e dos óvulos/sementes no ovário/fruto com o aborto de flores, frutos e sementes. Não há diferenças na deposição de pólen em flores e na formação de frutos de determinada região da inflorescência. Não se encontrou também relação entre o acúmulo de calose no óvulo e sua posição no ovário, bem como entre semente em desenvolvimento e sua posição no fruto. A limitação dos recursos maternos em relação aos frutos e aos embriões, devido ao alto custo de formação de frutos e maturação das sementes, é um dos fatores responsáveis pelas altas taxas de aborto de óvulos, sementes e frutos em *D. pentaphylla*.

PALAVRAS-CHAVE: Leguminosae, *Dahlstedtia pentaphylla*, Aborto, Seleção de Parentesco, Recursos Maternos.

INTRODUÇÃO

Em várias famílias de Angiospermae sementes viáveis são formadas de pequena proporção de óvulos; alguns óvulos não se desenvolvem devido à ausência de fertilização e outros, que são fertilizados, os embriões são abortados durante o desenvolvimento (Sedgley 1980, Bawa & Webb 1984). Portanto, o processo de aborto de sementes não é exclusivo de Leguminosae, mas é interessante notar que esta família oferece facilidades nesta linha de estudo, devido à disposição linear dos óvulos no ovário e, conseqüentemente, aos gradientes lineares de formação das sementes (Hossaert & Valéro 1988).

Vários fatores, sem causa genética conhecida, podem acarretar o aborto de flores e frutos (Lloyd 1980, Stephenson 1981, Bawa & Webb 1984). Um deles é a limitação do número de grãos de pólen depositados no estigma, não permitindo a fertilização de todos os óvulos no ovário (Mogensen 1975). O outro fator é a competição entre os óvulos por determinada quantidade de recursos exigida para a formação das sementes (Lloyd 1980). Tal competição, em caso de limitação de recursos, levaria ao aborto seletivo de óvulos ou sementes (Hossaert & Valéro 1988).

A situação mais freqüente em Leguminosae é o aumento das taxas de aborto do embrião, ocorrendo em direção às posições mais distantes do estilete (Bawa & Buckley 1989). Óvulos basais seriam fertilizados pelos tubos polínicos com crescimento mais lento ou com menor capacidade competitiva, resultando numa progênie menos vigorosa e, portanto, mais propensa a ser abortada (Bawa & Buckley 1989, Martin & Lee 1993, Gibbs & Sasaki 1998). Por outro lado, a limitação dos recursos maternos pode ocasionar o aborto dos óvulos fertilizados nas regiões próximas ao estilete, o que daria uma vantagem espacial para os óvulos basais. Tal padrão também foi encontrado em espécies de Leguminosae (Horovitz et al. 1976, Heering, 1994).

Dahlstedtia pentaphylla (Taub.) Burkart (Leguminosae, Millettieae) apresenta ocorrência restrita às regiões de Floresta Atlântica brasileira dos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. É arbustivo-arbórea, com flores papilionáceas dispostas em inflorescências pseudo-racemosas. Os óvulos, em número de 5-7, estão arranjados linearmente ao longo da placenta. Os frutos são secos e indeiscentes, contendo de uma a três sementes. A produção de frutos e sementes por indivíduo é extremamente baixa, apesar da produção de grande número de flores por inflorescência (obs. pes.).

O objetivo deste trabalho é investigar o efeito dos componentes de fecundidade, ou seja, óvulos por ovário, sementes por fruto, padrões de polinização e formação de frutos e de sementes, no processo reprodutivo de *Dahlstedtia pentaphylla*. Algumas questões foram, então, formuladas: Há diferença na deposição de pólen (polinização) em flores de determinadas posições na inflorescência? Há diferença na fertilização de óvulos e no desenvolvimento das sementes em determinadas posições no ovário/fruto? Estas diferenças se expressam no favorecimento pelos recursos maternos ou pela habilidade competitiva do grão de pólen?

MATERIAIS E MÉTODOS

O material foi coletado de indivíduos cultivados no CATI, Campinas e no Campus da Esalq, Piracicaba, SP e de indivíduo de população natural, na Fazenda Intervalles, SP e na Serra da Graciosa, em Curitiba, PR. O material testemunho está depositado no herbário UEC (Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP) sob os números 300, 17936, 28637, 28746, 109265, 109266, 109267, 109535, 109536.

Para avaliar a taxa de formação de frutos (polinização aberta), todas as flores de quatro indivíduos cultivados em Campinas foram contadas em agosto de 1998 e após um, dois e quatro meses, foram contados os números de frutos em formação. Em agosto de 2000 foi feita uma nova contagem de frutos em cinco indivíduos cultivados em Campinas. A caracterização do tamanho de frutos e sementes maduros foi feita pelas medidas de seus comprimentos e maiores larguras, em dois indivíduos. A contagem do número de óvulos/ovário foi realizada em 18 flores por planta e do número de sementes/fruto em todos os 72 frutos amostrados em três indivíduos.

Diferenças na polinização em relação à posição da flor na inflorescência foram investigadas pela contagem do número de grãos de pólen germinando/flor, sem que as flores fossem submetidas a polinizações controladas. As flores foram coletadas no segundo dia após a antese, previamente separadas em três classes, segundo sua posição na inflorescência: apical, mediana e basal. O número utilizado foi 3 flores/posição/inflorescência em 3 inflorescências/planta em 3 indivíduos.

Diferenças na formação de frutos em determinada posição da inflorescência foram analisadas em três indivíduos cultivados, sendo amostrados todos os frutos em

desenvolvimento de cada planta e contados o número de frutos por posição (apical, mediana e basal).

O número de grãos de pólen depositados no estigma e o número de frutos produzidos em três posições da inflorescência foram analisados por análise de variância (Zar 1996) no programa S-Plus 2000. Inicialmente foi analisado o delineamento experimental considerando a estrutura hierárquica (posição dentro de inflorescência e inflorescência dentro de plantas amostradas). Como a estrutura hierárquica não acrescentou informação significativa ao modelo, as análises finais consideraram apenas a posição na inflorescência sem a estrutura hierárquica. Os dados de contagem (número de grãos de pólen e de frutos) foram transformados pela raiz quadrada de $x + 0,5$, visando corrigir desvios da distribuição dos dados em relação à distribuição normal, como sugerido por Zar (1996).

A presença e a posição de óvulos em degeneração dentro do ovário foram verificadas através da clarificação dos óvulos com o Fluido de Herr (Herr 1971), usando interferência por contraste diferencial de fase de Nomarski. Óvulos emitindo fluorescência foram considerados degenerativos, indicados pela presença de calose (Vishnyakova 1991). Para tal, foram marcados 10 flores em antese/planta em cinco indivíduos e os ovários foram coletados após 72h (polinização aberta), período necessário para que haja deposição de calose nos tecidos maternos em óvulos fertilizados ou não (como já observado no capítulo 3).

A posição de sementes abortadas e em desenvolvimento foi verificada em frutos imaturos com cerca de 5,5 cm (nos estádios anteriores à ocorrência de aborto) e registrada em 10 frutos/planta, em 10 indivíduos.

As posições de óvulos em degeneração no ovário e das sementes em desenvolvimento no fruto foram analisadas graficamente comparando-se a frequência observada em determinada posição contra o intervalo de confiança de 95% da média da frequência da amostra total (Herrera 1999). Para uma melhor comparação na análise das sementes em desenvolvimento, o intervalo de confiança foi calculado apenas com os dados das posições 1-5, que apresentaram, cada uma, 40 ou mais observações.

As relações do acúmulo de calose no óvulo e a posição deste no ovário e a da formação da semente e sua posição no fruto foram analisadas por regressão logística (Hosmer & Lemeshow 1989) no programa Systat 9, utilizando como observação cada óvulo/semente. Como a regressão logística pode falhar em detectar associações caso a relação de posição e formação de sementes (ou acúmulo de calose) não seja monotônica,

ajustando um modelo com inclinação igual a zero, as frequências em cada posição (tratadas como não ordenadas) foram também testadas para independência de valores pelo teste de χ^2 (Zar 1996) no programa Systat 9.

RESULTADOS

As inflorescências apresentam oito a 35 flores e estas têm duração de dois a três dias. A antese inicia-se na região basal da inflorescência, caracterizando o tipo acrópeto de maturação. O número médio de flores produzidas é bem maior que o de frutos por planta (tab. 1). O número médio de óvulos por ovário é maior que o de sementes por fruto (tab. 2). A semente apresenta tamanho relativamente grande, como indicado juntamente com o tamanho de fruto na tabela 3.

Tabela 1. Número de flores e frutos (média $\pm$ desvio padrão) produzidos por indivíduo de *Dahlstedtia pentaphylla*, em 1998 (N=4 indivíduos) e de frutos, em 2000 (N=5 indivíduos).

Ano	Flores	Frutos		
		Início de desenvolvimento	Após 2 meses	Após 4 meses
1998	530,3 $\pm$ 279,1	12,0 $\pm$ 12,8	5,5 $\pm$ 4,5	0
2000	-	14,4 $\pm$ 20,2	5,3 $\pm$ 2,5	0

Tabela 2. Número de óvulos por ovário e de sementes (média $\pm$ desvio padrão) por fruto em *Dahlstedtia pentaphylla*. N=54 ovários e 72 frutos (3 indivíduos).

óvulos/ovário	sementes/fruto	Semente/óvulo
5,8 $\pm$ 1,1	1,2 $\pm$ 0,4	0,2

Tabela 3. Tamanho médio do fruto e da semente madura (média $\pm$ desvio padrão) em *Dahlstedtia pentaphylla*. N=8 frutos e 10 sementes (2 indivíduos).

	Comprimento (cm)	Maior largura (cm)
fruto	10,1 $\pm$ 1,9	4,0 $\pm$ 0,7
semente	2,3 $\pm$ 1,2	4,0 $\pm$ 0,6

Não foram observadas diferenças significativas no número de grãos de pólen depositados nos estigmas das flores posicionadas na base, no ápice ou na região mediana da inflorescência (N = 18 flores; F = 1,018; p = 0,368) (ver tab. 4).

Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão do número de grãos de pólen depositados em estigmas de flores de *Dahlstedtia pentaphylla*, em três posições da inflorescência. Número de flores analisadas em cada posição = 18.

Posição	Grãos de pólen
apical	30,2 $\pm$ 33,5
mediana	30,3 $\pm$ 20,7
basal	38,0 $\pm$ 22,8

Não foram observadas diferenças significativas no número de frutos produzidos nas três posições das inflorescências (N = 50 inflorescências; F = 0,885; p = 0,415) (tab. 5).

Tabela 5. Média $\pm$ desvio padrão do número de frutos produzidos em três posições de inflorescências de *Dahlstedtia pentaphylla*. Número de inflorescências analisadas = 50.

Posição	Frutos
apical	0,5 $\pm$ 0,8
mediana	0,7 $\pm$ 0,8
basal	0,6 $\pm$ 0,7

De 310 óvulos analisados em 50 ovários de cinco indivíduos, 91% estavam em degeneração, apresentando deposição de calose nos tegumentos interno e externo. A maior proporção de óvulos com acúmulo de calose foi encontrada para a posição peduncular (basal) do ovário, representada na fig. 1 pela única barra situada fora do intervalo de confiança da média da amostra. Entretanto, as análises dos dados por regressão logística (tab. 6) e por teste de igualdade de frequências de acúmulo de calose em tecidos maternos do óvulo (Pearson χ^2 = 2,471; g.l. = 5; p = 0,781) mostraram que não há relação entre acúmulo de calose e a posição do óvulo no ovário.

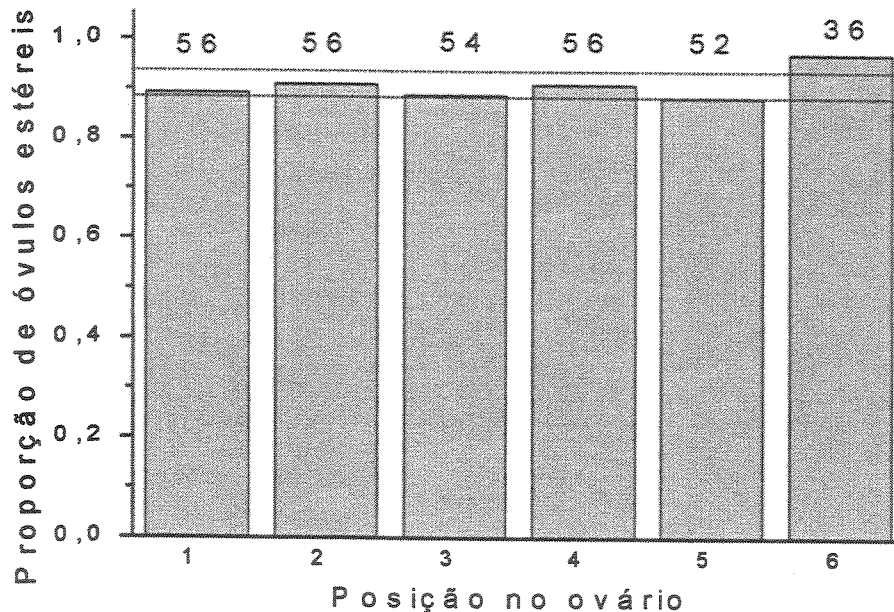


Figura 1. Proporção de óvulos em degeneração no ovário de *Dahlstedtia pentaphylla*. As barras representam a proporção de óvulos em degeneração em cada posição do ovário, sendo que a posição 1 é a mais próxima ao estilete e a 6 a mais próxima ao pedúnculo da flor. Os números posicionados no topo de cada barra indicam o tamanho amostral. As linhas pontilhadas horizontais delimitam o intervalo de confiança de 95% da média de proporção de óvulos em degeneração na amostragem total.

Tabela 6. Regressão logística de posição (variável independente) e presença de calose nos tecidos maternos do óvulo (variável resposta). N = 310 óvulos (50 ovários de 5 indivíduos).

Parâmetro	Valor estimado	Erro padrão	t	p	«Odds ratio» e intervalo de confiança (95%)		
					«ratio»	inferior	superior
Constante	-1,979	0,423	-4,676	0,000			
Posição	-0,091	0,120	-0,753	0,451	0,913	0,722	1,156

*Log Likelihood = -96,022; G = 0,573; p = 0,449; g.l. = 1

*McFadden's Rho-quadrado = 0,003

*Decis de risco:

Pearson = 309,591; p = 0,464; g.l. = 308

Deviance = 192,043; p = 1,000; g.l. = 308

De 253 sementes analisadas, 56% estavam abortadas, apresentando coloração enegrecida, retração dos tecidos e tamanho reduzido quando comparado ao das sementes em desenvolvimento. A quarta posição no fruto apresentou maior proporção de sementes em desenvolvimento (não abortadas), estando acima do intervalo de confiança da média da espécie (fig. 2). Nota-se que as posições 6 e 8, mais próximas ao pedúnculo, apresentaram baixas proporções de formação de sementes, mas devido ao pequeno tamanho amostral, estes valores não foram incluídos na análise por intervalo de confiança e devem ser considerados com cautela (fig. 2).

A análise dos dados por regressão logística mostrou que não há relação entre a semente em desenvolvimento e sua posição no fruto (tab. 7). A frequência de sementes em desenvolvimento também não mostrou relação com a posição no fruto, considerando tanto as oito (Pearson $\chi^2 = 7,336$; g.l. = 7; $p = 0,395$) como as cinco primeiras posições com tamanhos amostrais maiores ou iguais a 40 sementes (Pearson $\chi^2 = 3,050$; g.l. = 4; $p = 0,550$).

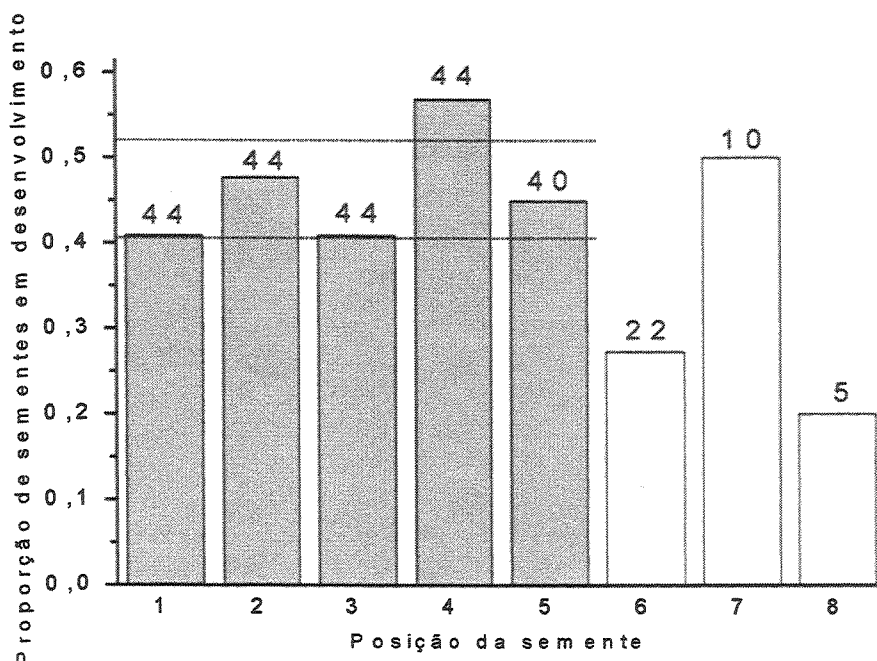


Figura 2. Proporção de sementes em desenvolvimento no fruto em *Dahlstedtia pentaphylla*. As posições 6, 7 e 8 (barras vazias) não foram incluídas no cálculo do intervalo de confiança devido aos seus pequenos tamanhos amostrais. Ver figura 1 para explicações.

Tabela 7. Regressão logística de posição (variável independente) e semente em desenvolvimento no fruto (variável resposta). N = 253 sementes (49 frutos de 5 indivíduos).

Parâmetro	Valor estimado	Erro padrão	t	p	«Odds ratio» e intervalo de confiança (95%)		
					«ratio»	inferior	superior
Constante	-0,106	0,272	-0,390	0,697			
Posição	-0,036	0,069	-0,515	0,606	0,965	0,842	1,105

*Log Likelihood = -173,568; G = 0,266; p = 0,606; g.l. = 1

*McFadden's Rho-quadrado = 0,001

*Decis de risco:

Pearson = 252,987; p = 0,453; g.l. = 251

Deviance = 347,135; p = 0,000; g.l. = 251

DISCUSSÃO

Em *Dahlstedtia pentaphylla* tanto a taxa de formação de frutos por flores como a de sementes por óvulos são extremamente baixas (tabelas 1 e 3), o que torna necessária a discussão do aborto em dois níveis: flores que não originam frutos e óvulos que não originam sementes. Tal distinção deve ser feita porque o padrão de aborto de embriões dentro do fruto é diferente do de frutos na planta. Há espécies de Mimosoideae, por exemplo, em que a taxa de produção de frutos por flores é extremamente baixa, mas a de sementes por óvulo é alta; o inverso também pode ocorrer em muitas espécies (Bawa et al. 1989).

O alto número de frutos abortados no início do desenvolvimento em *D. pentaphylla* (tab. 1) sugere que a seleção do fruto a ser desenvolvido está ocorrendo em função dos custos de sua produção e da maturação das sementes. Adiciona-se, ainda, o fato de que as sementes desta espécie são grandes (tab. 2), exendospérmicas, com cotilédones bem desenvolvidos, fotossintetizantes e carnosos, ocupando toda a cavidade do fruto, e cujo pericarpo deve ser rompido pela própria semente para que ocorra germinação (obs. pes.).

Como não há diferenças significativas na formação de frutos e deposição de pólen em flores de determinada região da inflorescência (tabelas 4 e 5) e o número médio de semente por fruto é baixo (próximo de um, tab. 3), as hipóteses de que o aborto dos frutos estaria relacionado (1) à ordem de maturação das flores na inflorescência e, conseqüentemente ao tempo de fertilização, e (2) ao número de sementes/fruto são

improváveis. No caso da maturação floral acrópeta encontrada na maioria das espécies de Leguminosae, inclusive em *Dahlstedtia pentaphylla*, tem-se que as flores localizadas na base da inflorescência, por entrarem em antese antes que as demais, seriam as primeiras a serem fertilizadas e os frutos produzidos teriam mais chances de se desenvolver (Arista et al. 1999) e, entre os frutos num mesmo estágio de desenvolvimento, aqueles com maior número de sementes teriam vantagem sobre os demais (Nakamura 1986, Bawa et al. 1989).

Há outros fatores que devem ser discutidos em relação à formação dos frutos ao acaso na inflorescência em *D. pentaphylla*. A ausência de diferenças significativas na deposição de grãos de pólen em flores de determinada posição na inflorescência sugere que (1) ou a visita do polinizador é realizada ao acaso na inflorescência ou (2) a ausência de polinizadores nas áreas estudadas e um alto grau de autopolinizações espontâneas estariam atuando na frutificação. A predação de frutos também é um fator fortemente relacionado ao aborto de frutos (Arista et al. 1999). Entretanto, em *D. pentaphylla* foi observada a pilhagem de flores por formigas, danificando as regiões do cálice e do tubo de filetes próximas às aberturas por onde o néctar é liberado. Tais danos são visíveis no cálice que ainda permanece no fruto em desenvolvimento, mas não há impedimento da continuação deste processo. Danos no próprio fruto não foram observados.

A probabilidade de fertilização do óvulo em determinada posição do ovário em *D. pentaphylla* não foi levada em conta, pois óvulos fertilizados e não fertilizados podem ser abortados, caracterizados pela deposição de calose e lignina ao redor do saco embrionário e nos tegumentos (capítulo 3). A partir desta informação, a probabilidade de ocorrer deposição de calose no óvulo em determinada posição do ovário foi analisada e verificou-se que o acúmulo de calose não está relacionado à posição do óvulo dentro do ovário (tab. 6). A probabilidade de uma semente se desenvolver também não pôde ser relacionada a sua posição no fruto (tab. 7), sendo que o aborto, em relação à posição, estaria ocorrendo ao acaso. Assim, a hipótese da vantagem temporal (Jaranowsky 1962) não se aplica a esta espécie, pois os óvulos mais próximos à posição estilar (apical) não originaram significativamente mais sementes que os demais, embora tivessem maiores chances de serem fertilizados primeiro. Soma-se a isso a viabilidade do saco embrionário ser alta e a permanência da flor na planta ser de cerca de dois dias (capítulo 3). Além de terem sido encontrados altos índices meióticos em *D. pentaphylla*, (capítulo 2), não há diferenças nos tempos de crescimento dos tubos polínicos provenientes de grãos de pólen por autopolinização e polinização cruzada (capítulo 3) e observou-se a produção de frutos por

autopolinização espontânea (obs. pes.). Conclui-se, então, que a hipótese da vantagem parental também não pode ser aplicada a esta espécie, pois segundo tal hipótese, a habilidade competitiva do pólen levaria a um aumento na velocidade da fertilização e à formação de embriões mais vigorosos, sendo importantes a proveniência e a quantidade dos grãos depositados no estigma (Janzen 1977, Niesenbaum 1999).

As sementes encontradas nas posições pedunculares (basais) em *D. pentaphylla* apresentaram as mesmas probabilidades de se desenvolverem que as demais (tab. 7), diferindo dos resultados encontrados por Horovitz et al. (1976) para espécies de *Lupinus* e *Medicago*. Segundo estes autores, sementes encontradas nas posições pedunculares estariam mais próximas aos nutrientes disponíveis através da região vascular do fruto e, portanto, teriam mais chances de completarem seu desenvolvimento. Assim, a hipótese de limitação dos recursos maternos por Seleção de Parentesco parece a melhor explicação para o alto número de abortos de óvulos e de sementes ocorrendo ao acaso em *D. pentaphylla*. Se o desenvolvimento de cada embrião for levado em conta individualmente, como sugerido por Queller (1983), a «planta-mãe» estaria sendo selecionada para controlar a distribuição de recursos aos diversos embriões existentes num mesmo fruto e não só em frutos diferentes numa planta. Tecidos embriogênicos e maternos e embriões de um fruto compartilham gens em proporções diferentes (Queller 1983), ocorrendo conflitos de interesses entre eles de acordo com a Teoria de Seleção de Parentesco («kin selection») (Westoby & Rice 1982, Queller 1983).

Em *D. pentaphylla*, 91% dos óvulos analisados apresentaram sinais de degeneração devido ao acúmulo de calose e 56% das sementes estavam abortadas logo no início do desenvolvimento do fruto. Além disso, nos indivíduos estudados, todos os frutos produzidos em dois anos foram abortados (tab. 1) e não foram observadas plântulas crescendo próximas à «planta-mãe». Tais resultados são muito semelhantes aos encontrados para espécies cujas populações estão em declínio, consideradas em risco de extinção (Wiens et al. 1989, Yu et al. 2000). Segundo Wiens et al. (1989) a alta taxa de aborto de óvulos e as anormalidades encontradas no desenvolvimento e na germinação das sementes de *Dedeckera eurekaensis* (Polygonaceae) seriam causadas pela carga segregacional de gens letais na espécie. A teoria da presença de gens letais ocasionando aborto pressupõe que os abortos ocorram ao acaso no ovário ou no fruto e que os embriões abortados sejam intrinsicamente inviáveis, ou seja, não retomem seu desenvolvimento se o embrião com crescimento dominante no fruto for retirado experimentalmente. Pressupõe ainda a

existência de depressão endogâmica e, portanto, de altos níveis de autopolinização em espécies obrigatoriamente xenógamas (Bawa et al. 1989).

Apesar da alta taxa de aborto em *D. pentaphylla*, não foram encontradas anormalidades em determinado estágio da embriogênese (capítulo 3), como em *Dedeckera eurekaensis* (Wiens et al. 1989) e, portanto, não há indícios histológicos de que esteja ocorrendo depressão endogâmica. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que gens letais não estejam acarretando aborto nesta espécie, embora tal hipótese seja bastante controversa e discutida por vários autores (Bawa et al. 1989, Charlesworth 1989, Wiens et al. 1989). Estudos genéticos e de embriologia experimental são necessários para avaliar se tais gens estariam atuando juntamente com a possibilidade de limitação de recursos maternos em *D. pentaphylla*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARISTA M., ORTIZ P. L. & TALAVERA S. 1999. Apical pattern of fruit production in the racemes of *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Caesalpinioideae): role of pollinators. *Am. J. Bot.* **86**: 1708-1716.
- BAWA K. S. & BUCKLEY D. P. 1989. Seed: ovule ratios, selective seed abortion, and mating systems in Leguminosae. *Monogr. Syst. Bot.* **29**: 243-262.
- BAWA K. S., HEDGE S. H., GANESHAIAH K. N. & SHAANKER R. U. 1989. Embryo and seed abortion in plants. *Nature* **342**: 625.
- BAWA K. S. & WEBB C. J. 1984. Flower, fruit, and seed abortion in tropical forest trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *Am. J. Bot.* **71**(5): 736-751.
- CHARLESWORTH D. 1989. Embryo and seed abortion in plants. *Nature* **342**: 625-626.
- GIBBS P. & SASSAKI R. 1998. Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* (Leguminosae - Papilionoideae) in SE Brazil: the effects of pistillate sorting on fruit-set. *Ann. Bot.* **81**: 735-740.
- HEERING J. H. 1994. The reproductive biology of three perennial *Sesbania* species (Leguminosae). *Euphytica* **74**: 143-148.
- HERR J. M. JR. 1971. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in Angiosperms. *Am. J. Bot.* **58**: 785-790.
- HERRERA J. 1999. Fecundity above the species level: ovule number and broad size in the Genisteae (Fabaceae: Papilionoideae). *Int. J. Plant Sci.* **160**: 887-896.

- HOROVITZ A., MEIRI L. & BEILES A. 1976. Effects of ovule positions in fabaceous flowers on set and outcrossing rates. *Bot. Gaz.* **137**: 250-254.
- HOSMER D.W. & LEMESHOW S. 1989. Applied logistic regression. A Wiley-interscience publication, New York.
- HOSSAERT M. & VALÉRO M. 1988. Effect of ovule position in the pod on patterns of seed formation in two species of *Lathyrus* (Leguminosae, Papilionoideae). *Am. J. Bot.* **75**(11): 1714-1731.
- JANZEN D. H. 1977. A note on optimal mate selection by plants. *Am. Nat.* **11**: 365-371.
- JARANOWSKY J. 1962. Fertilization and embryo development in cases of autogamy. *Genet. Pol.* **3**: 209-242.
- LLOYD D. G. 1980. Sexual strategies in plants. 1. An hypothesis of sexual adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytol.* **86**: 69-79.
- MARTIN M. E. & LEE T. D. 1993. Self pollination and resource availability affect ovule abortion in *Cassia fasciculata* (Caesalpinaceae). *Oecologia* **94**: 503-509.
- MOGENSEN H. L. 1975. Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* **62**(2): 160-165.
- NAKAMURA R. R. 1986. Maternal investment and fruit abortion in *Phaseolus vulgaris*. *Am. J. Bot.* **73**(7): 1049-1057.
- NIESENBAUM R. A. 1999. The effects of pollen load size and donor diversity on pollen performance, selective abortion, and progeny vigor in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). *Am. J. Bot.* **86**: 261-268.
- QUELLER D. C. 1983. Kin selection and conflict in seed maturation. *J. theor. Biol.* **100**: 153-172.
- SEDGLEY M. 1980. Anatomical investigation of abscissed avocado flowers and fruitlets. *Ann Bot.* **46**(6): 771-777.
- STEPHENSON A. G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **12**: 253-279.
- VISHNYAKOVA M. A. 1991. Callose as an indicator of sterile ovules. *Phytomorphology* **41** (3&4): 245-252.
- WEINS D., NICKRENT N. L., DAVERN C. L., CALVIN C. & VIVRETTE N. J. 1989. Embryo and seed abortion in plants. *Nature* **342**: 626.
- WESTOBY M. & RICE B. 1982. Evolution of the seed plants and inclusive fitness of plant tissues. *Evolution* **36**: 713-724.

- Yu P., Prakash N. & Whalley R. D. B. 2000. Comparative reproductive biology of the vulnerable and common grasses in *Bothriochloa* and *Dichantium*. In Grasses: Systematics and Evolution. S. W. I. Jacobs & J. Everett (eds). CSIRO, Melbourne.
- ZAR J.H. 1996. Biostatistical analysis, 3rd ed. Prentice Hall.

CAPÍTULO V: “BIOSSISTEMÁTICA DAS ESPÉCIES DE *DAHLSTEDTIA* MALME (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE, MILLETTIEAE)”

RESUMO

O gênero *Dahlstedtia* foi considerado monotípico por vários autores. Para se compreender melhor a delimitação taxonômica e o processo reprodutivo de suas duas espécies (*D. pinnata* e *D. pentaphylla*), estudou-se a distribuição geográfica, o período de floração e frutificação e a possibilidade de fertilização interespecífica. Foram realizadas, então, observações no campo, visitas a herbários e polinizações interespecíficas. A germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico foram observados em microscopia de fluorescência e os eventos da fertilização em microscopia fotônica, por meio de seções seriadas. As espécies ocorrem exclusivamente no Brasil, na Floresta Atlântica. *D. pinnata* é encontrada nos Estados do RJ e de SP e *D. pentaphylla* nos de SP, PR e SC, não tendo sido observada sobreposição geográfica das espécies. Em SP as espécies estão separadas por três limites geográficos principais: Planalto de Campos do Jordão e Morros Cristalinos do Médio Vale do Paraíba, Serra de Natividade-Quebra-Cangalha e Planalto do Juqueriquerê. 50% dos representantes de *D. pentaphylla* encontram-se acima de 300m, enquanto que os de *D. pinnata* encontram-se entre 0 a 200m. *D. pentaphylla* e Diferenças climáticas entre os estados, nas altitudes dos locais de ocorrência e a presença de acidentes geográficos podem estar associados à disjunção na distribuição geográfica das espécies. Os acidentes geográficos do Planalto Atlântico e a altitude teriam imposto um isolamento geográfico para as duas espécies no Estado de SP. A floração ocorre ao longo de todo ano e a frutificação entre setembro e dezembro. A dispersão das espécies é provavelmente afetada pelo aborto de frutos e sementes em larga escala. A germinação dos grãos de pólen ocorreu normalmente nos cruzamentos. Crescimento irregular do tubo polínico foi observado nos cruzamentos em que *D. pentaphylla* foi a doadora de pólen. A fertilização em *D. pinnata* foi evitada pela presença de uma secreção densa e em grande quantidade na micrópila, impedindo a penetração do tubo polínico. As espécies, provavelmente, não trocam pólen na natureza e se trocassem não haveria formação de sementes. Apesar das semelhanças entre *D. pinnata* e *D. pentaphylla* em vários aspectos da morfologia externa e interna, da ontogenia e dos mecanismos de polinização, apresentando, inclusive, o mesmo número cromossômico, confirma-se, a posição taxonômica adotada por Burkart, na qual o gênero *Dahlstedtia* é constituído por *D. pinnata* e *D. pentaphylla*.

PALAVRAS-CHAVE: Leguminosae, *Dahlstedtia*, Biossistemática, Distribuição geográfica, Fluxo gênico.

INTRODUÇÃO

O gênero *Dahlstedtia* Malme está subordinado à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Millettieae (Geesink 1984), sendo constituído por duas espécies: *D. pinnata* (Benth.) Malme, espécie-tipo, e *D. pentaphylla* (Taub.) Burkart. As descrições das espécies são confusas quanto à morfologia floral e ao material examinado (ver Malme 1905 e Burkart 1957). Como as espécies de *Dahlstedtia* apresentam baixa produção de frutos e sementes, tais materiais raramente eram coletados e, portanto, não observados nas exsicatas. Por este motivo, o gênero só pôde ser estabelecido em 1905, quando o fruto foi encontrado em exsicatas do Museu Heichs de História Natural de Estocolmo (Malme 1905), embora Bentham, em 1862, já apresentasse dúvidas quanto à espécie *D. pinnata*, tratando-na como *?Camptosema ?pinnatum*. Da mesma forma, *D. pentaphylla*, apesar de descrita em 1889 (Taubert 1889) como *Camptosema ?pentaphyllum*, apenas foi incluída em *Dahlstedtia* em 1957 (Burkart 1957), ocasião em que Burkart pôde verificar a morfologia do fruto. Apesar de terem sido encontradas características distintivas entre as espécies de *Camptosema* e as atualmente incluídas em *Dahlstedtia*, o fruto indeiscente destas últimas foi uma característica essencial na delimitação dos gêneros (Malme 1905). Mais recentemente, Hutchinson (1964) e Geesink (1981), em trabalhos de revisão de literatura, ainda trataram *Dahlstedtia* como um gênero monotípico, citando apenas a espécie *D. pinnata*.

As espécies são arbustivo-arbóreas e apresentam flores papilionadas, longo-tubulosas e vistosas. A corola em *D. pinnata* é “pink” e em *D. pentaphylla* vermelha e lenticelas conspicuas ocorrem nos ramos florais de *D. pentaphylla* (Teixeira & Gabrielli 2000).

Teixeira & Gabrielli (1996, 2000) estudaram a anatomia do eixo vegetativo e da folha de ambas as espécies a fim de levantar características que pudessem auxiliar a delimitação dos táxons. A maioria das características distintivas encontradas no eixo vegetativo é quantitativa e, portanto, deve ser usada com cautela (Teixeira & Gabrielli 2000). A presença de cavidades secretoras na folha de *D. pentaphylla* e a sua ausência em *D. pinnata* e a diferença no local de origem destas cavidades no ápice caulinar das duas espécies constituíram-se bons caracteres na distinção das espécies. Entretanto, desde o seu estabelecimento por Malme em 1905, nenhuma revisão para *Dahlstedtia* foi encontrada,

apesar do gênero ter sido transferido para *Tephrosieae* (Geesink 1981) e, após, para *Millettieae* (Geesink 1984).

A ocorrência de ambas as espécies foi registrada apenas para o Brasil, em regiões de Floresta Atlântica, sem serem levantadas as localidades. Dados iniciais de fitossociologia coletados na Floresta Atlântica em Picinguaba e Ubatuba, no Estado de São Paulo, revelaram baixa densidade de indivíduos de *D. pinnata*, sugerindo uma tendência à raridade para a espécie (Takahasi 1997, comunicação pessoal).

O presente trabalho tem por objetivos levantar a distribuição geográfica das espécies de *Dahlstedtia*, os períodos de floração e frutificação e verificar a possibilidade de fertilização interespecífica, a fim de relacionar seus efeitos no processo reprodutivo das espécies e, juntamente aos resultados de morfologia externa e interna, esclarecer melhor a delimitação entre elas. Assim, foram elaboradas as seguintes questões: As espécies ocorrem nas mesmas localidades? Se não, há algum (s) fator (es) favorecendo a disjunção? Há sobreposição na floração e frutificação? As espécies poderiam trocar pólen em populações naturais? Os grãos de pólen são capazes de germinar no estigma e fertilizar os óvulos?

MATERIAIS E MÉTODOS

O material de *Dahlstedtia pinnata* foi coletado de dois indivíduos cultivados no Complexo Botânico Monjolinho, IAC, Campinas, SP e de sete que ocorrem naturalmente no Parque Estadual da Serra do Mar em Picinguaba, Ubatuba e Caraguatatuba, SP. O material de *Dahlstedtia pentaphylla* foi coletado de quatro indivíduos cultivados no CATI, Campinas, SP e de cinco que ocorrem naturalmente em Intervalles, SP e na Serra da Graciosa, Curitiba, PR. O material testemunha utilizado no laboratório está depositado no herbário UEC (Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP) sob os números 300, 17936, 28637, 28746, 109265, 109266, 109267, 109535, 109536.

A distribuição das espécies foi registrada a partir da visita aos principais herbários das regiões sudeste e sul: UEC (Herbário da Universidade Estadual de Campinas), RB (Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro), R (Herbário do Museu Nacional do Rio de Janeiro), HB (Herbarium Bradeanum), MBM (Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba), UPCB (Herbário da Universidade Federal do Paraná), SP (Instituto de Botânica de São Paulo), SPSF (Instituto Florestal de São Paulo). Dados de etiqueta foram anotados.

As coordenadas geográficas das localidades de ocorrência das espécies foram levantadas para a elaboração de um mapa de distribuição geográfica no programa VersaMap 2.07. As altitudes destas localidades foram representadas em box-plot, para cada espécie, no programa Systat 5.

As informações encontradas nas etiquetas de exsiccatas dos herbários também foram utilizadas para o registro dos períodos de floração e de frutificação das espécies.

A germinação do grão de pólen no estigma, o crescimento do tubo polínico e os eventos de fertilização foram estudados através de polinizações controladas interespecíficas. Os cruzamentos foram efetuados com as flores em antese, apoiadas em Agar (as flores não permanecem na planta após serem manuseadas). O número de flores por tratamento seguiu as recomendações de Radford et al. (1974). Os pistilos foram fixados em FAA 50 (Johansen 1940) e em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144h após os cruzamentos. Para observação em microscopia de fluorescência, os pistilos foram clarificados em NaOH e corados com Azul de Anilina (Martin 1959). Para observação em microscopia fotônica, lâminas permanentes foram obtidas após desidratação gradual do material em álcool butílico terciário, inclusão em paraplast (Prakash 1986), seccionamento seriado longitudinal (5 a 8µm), coloração com Safranina e Fast Green e montagem em resina sintética Epoxi (Gerlach 1969).

A relação da ocorrência das espécies com suas variáveis geográficas (latitude, longitude e altitude) foi analisada por regressão logística (Hosmer & Lemeshow 1989), no programa Systat 9, utilizando como observação cada localidade de ocorrência. Como não houve sobreposição das espécies em uma mesma localidade, os dados de presença e ausência para estas são complementares, fornecendo a mesma informação. Desta forma, a regressão logística foi realizada com os dados de presença e ausência de uma das espécies (variável dependente), escolhida de forma arbitrária, *D. pentaphylla*, contra os dados geográficos (variáveis independentes).

RESULTADOS

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA -

As espécies, segundo observações de campo, informações das etiquetas de exsiccatas dos herbários e da literatura, ocorrem exclusivamente no Brasil, em áreas de Floresta Atlântica do Planalto Atlântico e da Planície Costeira. *Dahlistedtia pinnata* pode ser encontrada nos

Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo e *D. pentaphylla* nos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, não tendo sido observada sobreposição geográfica das espécies (fig. 1). Apenas no Estado de São Paulo há registros de ocorrência das duas espécies (fig. 2), sendo encontrados três limites para a disjunção:

1. entre as cidades de Queluz (*D. pinnata*) e Monteiro Lobato (*D. pentaphylla*): separadas pelo Planalto de Campos do Jordão e pelos Morros Cristalinos do Médio Vale do Paraíba;
2. entre as cidades de Caraguatatuba (*D. pinnata*) e Salesópolis (*D. pentaphylla*): separadas pela Serra de Natividade-Quebra-Cangalha, do Planalto do Paraítinga;
3. entre as cidades de Boiçucanga (*D. pinnata*) e Santos (*D. pentaphylla*): separadas pelo Planalto do Juqueriquerê.

Os indivíduos de *D. pinnata* ocorrem em altitudes que variam de 2,32m (município do Rio de Janeiro, RJ) a 871,78m (Teresópolis, RJ). Os indivíduos de *D. pentaphylla* ocorrem em altitudes que variam de 1,64m (Itajaí, SC) a 1053m (Rio Branco do Sul, PR) (fig. 3). *Dahlstedtia pentaphylla* apresenta representantes em altitudes maiores que os de *D. pinnata*, sendo que 50% encontram-se acima de 300m, enquanto que os de *D. pinnata* encontram-se entre 0 a 200m. A mediana de *D. pentaphylla* é maior. O intervalo de confiança da mediana das duas espécies não se sobrepõe (fig. 3).

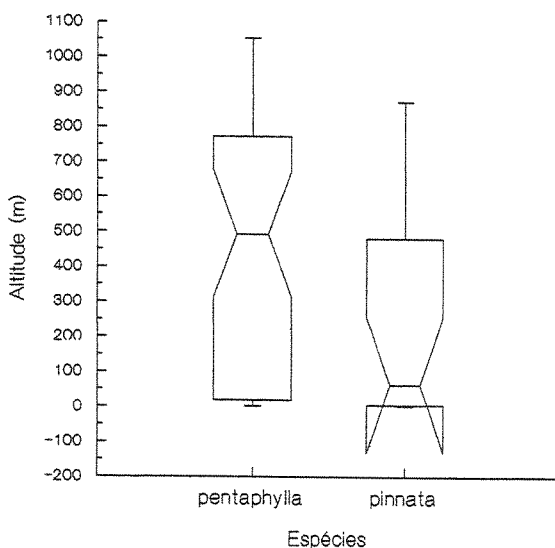


Figura 3. Distribuição das duas espécies de *Dahlstedtia* por altitude (para *D. pinnata* N=15 e para *D. pentaphylla* N=43). O retângulo delimita 50% do número de observações e o traço central representa a mediana. As barras indicam a amplitude total da distribuição. O estreitamento nos retângulos representa o intervalo de confiança da mediana ao nível de 95%.

A análise de regressão logística mostrou que a presença de *D. pentaphylla* (ou ausência de *D. pinnata*) está diretamente relacionada à latitude e altitude de ocorrência (tab. 1). A longitude de ocorrência, quando adicionada ao modelo, resultou na imprecisão dos coeficientes parciais da regressão logística (aumento do erro padrão), provavelmente devido a sua alta correlação à latitude ($r=0,842$) (Zar 1996). Assim, quando incluída, em conjunto ou como única variável independente, sua contribuição e as das demais variáveis não foram significativas no modelo.

A altitude de ocorrência das espécies não foi significativa quando analisada como única variável independente; porém, o modelo incluindo a altitude e latitude ajustou-se melhor que o modelo incluindo apenas a latitude ($G = 24,026$; $p < 0,0001$; g.l. (χ^2) = 2) (Hosmer & Lemeshow 1989). Tais resultados apontam que latitude e altitude, em conjunto, foram importantes para explicar a distribuição das espécies de *Dahlstedtia*, apesar da contribuição parcial da altitude ter sido baixa ("odds ratio" = 1,006; tab. 1).

Tabela 1. Regressão logística de presença de *D. pentaphylla* (ou ausência de *D. pinnata*) (variável resposta) e de latitude e altitude de ocorrência (variáveis independentes). N = 57 localidades.

Parâmetro	Valor estimado	Erro padrão	t	p	«Odds ratio» e intervalo de confiança (95%)		
					«ratio»	inferior	superior
Constante	-115,568	37,325	-3,096	0,002			
Latitude	4,861	1,570	3,096	0,002	129,177	5,953	2803,288
Altitude	0,006	0,002	2,571	0,010	1,006	1,001	1,011

*Log Likelihood = -10,565; G = 44,573; p = 0,000; g.l. = 2

*McFadden's Rho-quadrado = 0,678

*Decis de risco:

Hosmer-Lemeshow = 5,347; p = 0,618; g.l. = 7

Pearson = 35,542; p = 0,975; g.l. = 54

Deviance = 21,129; p = 1,000; g.l. = 54

Os indivíduos das duas espécies estão presentes em ambientes bastante úmidos, sombreados, em interior de mata ou próximo aos costões rochosos. A informação de que provavelmente são espécies raras deve-se a problemas de esforço de coleta e diâmetro a altura do peito (DAP) pequeno em relação ao estimado para estudos fitossociológicos.

OBSERVAÇÕES DE FLORAÇÃO E FRUTIFICAÇÃO -

A floração das espécies ocorre durante o ano todo, embora os indivíduos não floresçam todos ao mesmo tempo e, assim, segundo Gentry (1974), poderia ser classificada como "cornucópia". Já plantas em frutificação foram raramente encontradas num período de seis anos de observações (1993-1995 e 1996-2000), o que estaria indicando que a frutificação é supra-anual.

As espécies de *Dahlstedtia* apresentam grande capacidade de rebrota e florescem com cerca de 2m de altura, ocasião em que perdem parte das folhas. Os indivíduos encontrados no interior da mata apresentam período de floração mais curto em relação aos de borda de mata ou próximos aos costões. Informações de floração e frutificação levantadas nas etiquetas de exsicatas dos herbários estão representadas na tab. 2.

Tabela 2. Dados mensais de floração e frutificação das espécies de *Dahlstedtia* em seus locais de ocorrência: Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina.

Mês	Floração		Frutificação	
	<i>D. pinnata</i>	<i>D. pentaphylla</i>	<i>D. pinnata</i>	<i>D. pentaphylla</i>
Jan	RJ	SP-PR		PR
Fev	RJ-SP	SP-PR	SP	
Mar	RJ-SP	RJ-SP-SC	RJ	
Abr	RJ-SP	SP-PR		
Mai		SP-PR		SP-PR
Jun	RJ	SP-SC		
Jul		SP-PR		
Ago	SP	SP-PR-SC		PR
Set		SP-PR-SC	SP	SP-PR-SC
Out	RJ-SP	SP-PR-SC		SP
Nov	RJ-SP	SP-PR	RJ	
Dez	RJ-SP	SP-PR-SC	SP	PR

GERMINAÇÃO DO GRÃO DE PÓLEN E CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO -

D. pentaphylla x *D. pinnata* (doadora de pólen): os grãos de pólen germinam no estigma e no estilete após 6h; os tubos polínicos atingem a placenta após 24h, mas não

fecundam os óvulos; não há formação de “plugs” dilatados e nem a espessura dos tubos é irregular; após 48h os tubos foram observados na micrópila do primeiro e do terceiro óvulos (figs. 4A-D).

D. pinnata x *D. pentaphylla* (doadora de pólen): os grãos de pólen germinam após 12h; após 24h são vistos tubos polínicos com “plugs” dilatados no estilete e chegando à placenta; os tubos apresentam crescimento regular e irregular, variando quanto à espessura; após 48h alguns tubos atingem as micrópilas dos óvulos. Muitos tubos não conseguem penetrar o óvulo, realizando um trajeto errático entre eles e, após 72h, os óvulos já estão degenerados (figs. 5A-D).

EVENTOS DE FERTILIZAÇÃO -

O tubo polínico penetra no óvulo pela micrópila, atinge o cone do tegumento interno e, logo após, o saco embrionário.

Apenas um óvulo em cada ovário foi fertilizado. A fertilização foi observada 48h após a polinização, pela presença de núcleos do endosperma em divisão. A ausência de fertilização pode ser deduzida pela presença das duas sinérgides e organização do saco embrionário. A maioria dos óvulos apresenta sinais de degeneração após 48h, caracterizados principalmente pelo espessamento das paredes periclinais externas das células nucelares e pela compressão do tegumento interno. O saco embrionário (não fecundado) colapsa 96h após a polinização.

No cruzamento em que *D. pinnata* recebeu pólen de *D. pentaphylla*, uma célula mãe do embrião foi observada em local atípico na região micropilar do saco embrionário, após 96h de tratamento. Em todos os óvulos analisados deste tratamento observou-se que uma secreção densa, aparentemente mucilagínosa e em grande quantidade ocupava todo o canal micropilar (fig. 6).

A listagem do material de herbário consultado está apresentada a seguir.

Dahlstedtia pinnata (Benth.) Malme

Brasil: São Paulo – Biritiba Mirim, Estação Biológica de Boracéia, 23°28'-23°49' S, 45°52'-45°53' W, 03/II/1984, A. Custódio Fo. 2240, flor rosa (SP 197403); Biritiba Mirim, Estação Biológica de Boracéia, 23°38'-23°39' S, 45°52'-45°53' W, 29/IX/1983, A. Custódio Fo. 1583, fruto (SP 194773); Biritiba Mirim, Estação Biológica de Boracéia, 23°38'-23°39' S, 45°52'-45°53' W, 30/III/1983, A. Custódio Fo. 2128, flor rosa (SP 195525); Biritiba Mirim, Estação Biológica de Boracéia, 23°38'-23°39' S, 45°52'-45°53' W, 28/XII/1983, A. Custódio Fo. & T. M. Cerati 1258, flores maravilha (SP 192401); Campinas, s/ data, J. Santoro, flor e fruto (SP 69587); Caraguatatuba, condomínio “Park Imperial”, 05/II/1993, S. Buzato & M. Sazima (28007), flor rosa (UEC 59622); Guarulhos, Pesqueiro Ponte Preta, interior da mata, 26/XII/1996,

J. A. Pastore & L. Marino 732, fruto verde (SPSF 21095); Iguapé, Morro das Pedras, XII/21, A. C. Brade 8204, flor (R 22539); Queluz, beira do rio das Cruzes, 22°27'20"S, 44°46'54", 07/IV/1995, J. L. A. Moreira 42 & R. Belinello, flor rosa (UEC 73684, 88231); São Paulo, Horto Florestal, XII/1955, M. Koscinski 203, flor (SP 31253); São José do Barreiro, 30/XI/1999, L. Freitas 786, flor (UEC 109537); São Sebastião, 27/XII/1972, J. Mattos 15665 & N. Mattos, flor (SP 129974); São Sebastião, Boiçucanga, Serra do Mar, 23/VIII/1983, J. R. Pirani & O Yano 749, flor (SP 192309); São Sebastião, estrada para o lado oriental de Ilha Bela, 10/XI/1990, L. P. Queiroz *et al.* 2767, flor rosa-coral (MBM 158668); São Sebastião, estrada Rio-Santos a 15 km da cidade no sentido Bertioga, 06/X/1979, G. Shepherd, L. K. Gouvea, J. Y. Tamashiro & A. F. Silva 10450, flor lilás (UEC 7884); Serra da Bocaina, Fazenda do Bonito, I/25, A. Lutz & B. Lutz 1731, flor (R 1506); Ubatuba, 11/X/1937, R. D. Gonçalves (SP 38756); Ubatuba, em frente à Praia Dura, a 1 km do rio Escuro, 07/XI/1961, J. Fontella 103 & C. Moura, flor vermelha (SP 65363); Ubatuba, Estação Experimental do Instituto Agrônomo, beira da mata, 09/XI/1976, P. E. Gibbs, H. F. Leitão Fo., L. S. Kinoshita & J. B. de Andrade (3490), flor rosada (UEC 7888); Ubatuba, Fazenda Capricórnica, 5km N BR 101, 27/XIII/93, B. B. Klitgaard *et al.*, flor pink (RB 306298); Ubatuba, Reserva Biológica do Instituto Florestal, 25/X/1979, W. Mantovani 167, flor lilás (SP 162741); Ubatuba, trilha do Corisco, 23°20'S, 44°49'W, 10/XI/1993, M. T. Z. Toniato *et al.* (30151), flor rosa (UEC 68346).

Rio de Janeiro – Barra Mansa, SP 64, estrada Nova Barra Mansa – Bananal, s/ data, O. Yano 1320, flor e fruto (SP 155093); Campo Grande, Serra da Mendanha, 13/II/50, L. E. Mello Fo. 1011, flor (R 50580); Campo Grande, Serra da Mendanha, 04/IV/78, G. Martinelli 4173, fruto (RB 196662); Ibiapús, XI/21, G. Setsit, flor (RB 233); Magé, Centro de Primatologia, margens do Rio Paraíso, 06/XII/1984, G. martinelli 10589, S. pessoa, A. Santos & D. Costa, flor rósea (MBM 106645); Magé, Serra da Estrela, 04/IV/89, L. C. Giordano 614 *et al.*, flor (RB 280465); Petrópolis, II/17, C. Diogo 901, flor (R 64707); Petrópolis, Independência, 15/XII/32, E. Viana, flor (RB 610033); Rio Bonito, Braçanã, Fazenda das Cachoeiras, 27/XI/72, P. Laclette 205, flor (R 137826); Rio Bonito, Braçanã, Fazenda das Cachoeiras, 26/X/75, P. Laclette 265, flor (R 131989); Rio de Janeiro, Alto da Boa Vista, 25/II/67, D. Sucre 1946, flor (RB 137389); Rio de Janeiro, Alto da Boa Vista, 25/XI/67, D. Sucre 1946, flor (HB 49158); Rio de Janeiro, Bico do Papagaio, 16/III/72, J. Almeida & R. Laroche 1371, flor (RB 156518); Rio de Janeiro, Estrada da Vista Chinesa, 23/II/68, D. Sucre 2142, flor (RB 138088); Rio de Janeiro, Estrada da Vista Chinesa, 03/II/60, H. F. Martins, flor (RB 170073); Rio de Janeiro, Jacarepaguá, Floresta de Covanco, 10/XI/46, J. N. Vieira, flor (RB 57826); Rio de Janeiro, Jardim Botânico, /1924, D. Castanheiro, fruto (RB 19113); Rio de Janeiro, Parque Nacional do Itatiaia, caminho para o pico da Tijuca, 06/II/46, Altamiro *et al.* 25, flor (RB 55784); Rio de Janeiro, Parque Nacional do Itatiaia, lote Hansen, 10/VIII/40, W. D. de Barros 16, flor (RB 45682); Rio de Janeiro, Tijuca, floresta da Tijuca, 19/XII/1868, A. Burkart, flor (R 8633); Rio de Janeiro, Tijuca, I/1917, F. C. Hoehne 119, flor (SP 24818); Rio de Janeiro, Tijuca, 26/II/26, pessoal do Horto Florestal, flor (RB 61034); Rio de Janeiro, Tijuca, Parque nacional da Tijuca, Camorim, 19/XII/33, Freire *et al.* flor (R 67599); Rio de Janeiro, Serra Carioca, Reserva Florestal do Instituto de Conservação da Natureza, caminho para a gruta Geonoma, 05/II/71, M. C. Valente *et al.*, flor (RB 146675); Rio de Janeiro, Serra do Anadaraí, 19/XII/46, L. E. de Mello Fo. 533, flor (R 47631); Rio de Janeiro, Serra da Estrela, 24/III/17, C. Diogo, flor (R 64706); Rio de Janeiro, Serra da Estrela, 25/X/88, R. Marquete 157 *et al.*, flor (RB 278007); Rio de Janeiro, Serra do Itatiaia, 04/VI/1913, F. Tamandaré & A. C. Brade 6405, flor rósea (SP 7068); Rio de Janeiro, Serra do Itatiaia, Monte Serrat, 21/II/29, C. Porto 1881, flor (RB 674); Rio de Janeiro, Serra dos Órgãos, entre o Garrafão e o Ventania, 13/II/1883, s/col., flor (R 69092); Rio de Janeiro, Serra dos Órgãos, 12/XII/1891, E. Ule 2378, flor (R 60416); Teresópolis, estrada Teresópolis-Friburgo, Sítio Sumaré II, 01/III/69, P. I. S. Braga 1536, fruto (RB 163629).

D. pentaphylla (Taub.) Burkart

Brasil: São Paulo – Arujá, vertentes do Arujá, 12/VII/1981, A. Custódio Fo. 649, flor vermelha (SP 185037); Bom Sucesso, capoeira, 21/X/1966, J. Mattos 14075, flor avermelhada (SP 102557); Campinas, Centro Experimental Campinas, Monjolinho, 20/VIII/1985, E. R. F. Martins (17936), flor arroxeadada (UEC 45300); Campinas, Fazenda Santa Elisa, Monjolinho, 01/V/1993, S. P. Teixeira (28637), material estéril (UEC 89076); Campinas, Fazenda Santa Elisa, Monjolinho, 08/XI/1983, M. Del' Arco (15089), flor vermelha (UEC 33741); Cananéia, Ilha da Casca, 15/III/1976, M. C. Marino, flor vermelha (SP 137781); Cananéia, Ilha da Casca, próximo ao ancoradouro, face sul da ilha, IX/1976, M. Sakane 564, flor

vermelho clara (SP 165490); Cananéia, Ilha do Cardoso, 09/X/1980, F. Barros 494, flor corola vermelha e cálice verde avermelhado (UEC 32232); Cananéia, Ilha do Cardoso, Centro de pesquisas, 10/XI/1977, D. A. De Grande & E. A. Lopes 17, flor vermelho vivo (UEC 7883); Cubatão, Serra do Moji, beira de um riacho, área atingida pelos poluentes, 13/XII/1988, M. Kirizawa & E. A. Lopes 2125, flor pink (SP 226942); Eldorado, Parque Estadual de Jacupiranga, arredores da Caverna do Diabo, trilha para a cachoeira da Tapagem, beira do rio, 17/V/1994, I. Cordeiro & M. A. B. Barros 1406, fruto imaturo verde (UEC 85232); Eldorado, Parque Estadual de Jacupiranga, Núcleo da Caverna do Diabo, trilha do rolado, interior da mata, 14/V/1996, J. A. Pastore & F. A. R. D. P. Arzolla 710, botão floral vermelho (SPSF 20405); Eldorado, Parque Estadual Jacupiranga, Caverna do Diabo, 09/II/1995, L. Sakai *et al.* (32707), flor vermelha (UEC 72518); Igaratá, Fazenda do sr. Barbosa, madeira 107, 03/VIII/1949, M. Kuhlmann 1945, flor (SP 66052); Iguape, Estação Ecológica da Juréia, margem esquerda do Rio Verde, 12/II/1985, N. S. Figueiredo & U. S. Dias 16758, (UEC 45474); Iguape, Estação Ecológica da Juréia, no meio da cachoeira, 17/XI/1982, N. S. Figueiredo & R. R. Rodrigues 14713, flor vermelha (UEC 31537), Arujá, vertentes do Arujá, 12/VII/1981, A. Custódio Fo. 629, flor vermelha (SP 185027); Ilha do Cardoso 14/XII/1984, H. F. Leitão Fo. *et al.* 10804, flor vermelha (UEC 7891); Ilha do Cardoso, mata, 11/II/1977, G. J. Shepherd & D. M. Vital 11218, flor vermelha (UEC 24743); Ilha do Cardoso, próximo à Ilha de Cananéia, mata próxima à base científica, 05/VIII/1977, P. E. Gibbs & H. F. Leitão Fo. 5631, flor vermelho vivo (UEC 7887); Iporanga, Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira, Núcleo Santana, trilha do camping, 15/V/1996, G. A. D. C. Franco & F. A. R. D. P. Arzolla 1412, botão vermelho (SPSF 20357); Itapevi, Km 36 da Rodovia Castelo Branco, 14/IV/1977, M. Sakane 532, flor vermelho clara (MBM 56734); Joanópolis, estrada Cachoeira dos Pretos-S. Francisco Xavier, 16/VIII/1994, J. Y Tamashiro 503 *et al.*, flor vermelha (UEC 67315); Joanópolis, estrada Cachoeira dos Pretos-S. Francisco Xavier, 16/VIII/1994, J. Y Tamashiro 503 *et al.*, flor vermelha (SPSF 18478); Miracatu, Sítio Irapuã, BR116, km 343,5, s/ data, P. Martuscelli 164, flor com cálice verde e corola vermelha, estilete amarelo (SP 205350); Mogi das Cruzes, 18/IV/1921, A. Gerht, flor vermelha (SP 5503); Mogi das Cruzes, Fazenda do Paratai, 17/II/1941, N. V. Guaximbú 5181, flor rósea (SP 44963); Monteiro Lobato, km 119 da estrada S. José-Monteiro Lobato, 22/X/1988, flor vermelha (SP 254800); Monteiro Lobato, km 121 da estrada Monteiro Lobato-Campos do Jordão, 29/IX/1976, P. H. Davis *et al.* 2934, flor vermelha (UEC 7885); Paiol do Meio, 13/X/1940, F. C. Hoehne, flor vermelha (SP 44422); Paiol do Meio, 15/X/1940, A. Gerht 44422, flor vermelha e fruto (SP 303999); Paranapiacaba, Serra de Paranapiacaba, cachoeira atrás do pouso, 21/VI/1991, S. Ferreira, flor vermelha (SP 256572); Piracicaba, Parque Esalq/USP, 01/VII/1993, K. D. Barreto *et al.*, flor vermelha (UEC 89470); Piracicaba, Parque Esalq/USP, 17/V/1994, N. M. Ivanauskas 83, flor vermelha e alaranjada e fruto verde, (UEC 89491); Piracicaba, Parque Esalq/USP, 20/IX/1991, planta nº114, área 09, R. B. Martins, flor (UEC 89593); Ribeirão Grande, Fazenda Intervalles, margem da estrada entre a base S. Pedro e Limão, 04/VIII/1994, flor rosa forte (UEC 79285); Rodovia Juquiá-Piedade, 29/IX/1977, P. E. Gibbs *et al.* 6664, flor carmim (MBM 56730); Rodovia Juquiá-Piedade, beira da estrada, campo brejoso, 29/IX/1977, P. E. Gibbs, N. D. da Cruz, G. M. Felipe & W. M. Ferreira (6664), flor e fruto (UEC 7882); Rodovia Juquiá-Piedade, beira da estrada, campo brejoso, 29/IX/1977, P. E. Gibbs *et al.* 6664, flor carmim e fruto (SP 153076); Santo André, Reserva Biológica de Paranapiacaba, 16/XII/91, S. J. G. Silva *et al.* 282, flor rósea (RB 315842); São José dos Campos, perto de Monteiro Lobato, rodovia S. J. dos Campos-Campos do Jordão, 25/VIII/1967, J. Mattos 15057 & N. Mattos, flor vermelha (SP 156037); S. José dos Campos, perto de Monteiro Lobato, rodovia S. J. dos Campos-Campos do Jordão, 25/VIII/1967, J. Mattos 15057 & N. Mattos, flor vermelha (SP 101858); Salesópolis, Boracéia, 28/II/1949, E. Kuehn & M. Kuhlmann 1766, flor (SP 58270); Santa Branca, Fazenda Gomeitinga, mata, 30/VII/1988, s/ coletor, flor vermelha (SP 254805); Santa Isabel, 14/VIII/1936, M. Kuhlmann, flor (SP 35811); São Paulo, cultivada, 14/XI/1933, V. Carneiro, flor (SP 31185); São Paulo, Horto Florestal, s/ data, M. E. Koscinski 353, flor e fruto (SP 44414); São Vicente, morro do Japuí, 30/VIII/1991, F. S. Santos, material estéril (UEC 68729).

Paraná – Antonina, 14/XII/1871, Schwacke 2650, flor (RB 38064); Antonina, Bairro Alto, s/ col., 20/VII/1972, flor vermelha (MBM 23096); Antonina, Pinheirinho, G. Hatschbach, flor vermelha (MBM 88524); Antonina, Reserva Biológica de Sapitanduva, 07/XI/1986, A. C. Cervi 2398 *et al.*, flor vermelho-vivo (UPCB 23079); Antonina, Reserva Biológica de Sapitanduva, 14/IX/1987, A. C. Cervi 2458 *et al.*, flor vermelha (UPCB 22666); Antonina, Serrinha, 29/VIII/1972, G. Hatschbach 30276, fruto (MBM 24756); Bocaiúva do Sul, Sesmaria, Rio Capivari, 24/III/1970, G. Hatschbach 24043, flor vermelha (MBM 16180);

Campo Grande do Sul, Sítio do Belizário, 06/X/1967, G. Hatschbach 17344, flor vermelha (MBM 4546, UPCB 6792); Campo Grande do Sul, Sítio do Belizário, 07/IX/1996, J. M. Silva *et al.* 1717, fruto verde (MBM 203252); Cêro Azul, 17/VIII/1966, J. Lindeman & H. Haas 2358, flor (MBM 3236); Cêro Azul, Rio Ribeira, barra do Rio Canha, 08/XII/1994, G. Hatschbach 61466 & J. M. Silva, flor (MBM 179861); Guaraqueçaba, mata Guaraqueçaba, estrada para a cachoeira do Morato, 19/III/1989, M. L. Sekiama *et al.*, flor vermelha (UEC 52206); Guaraqueçaba, face NO e SO do morro do Rio das Pacas, 25°25' S e 48°15' W, 20/II/1993, J. Prado 440 *et al.*, flor vermelha e fruto imaturo (MBM 159793); Guaraqueçaba, Itaquí, 15/XI/1993, R. X. Lima 125, flor vermelha (UPCB 24587); Guaraqueçaba, Morro do Quitumbê ou do Costão, 25°17' S e 48°20' W, 28/X/1994, S. F. Athayde 122 *et al.*, flor vermelha (UPCB 28488); Guaraqueçaba, Rio do Cedro, 14/XII/1967, G. Hatschbach 18132, fruto verde (MBM 4547, 4159); Guaraqueçaba, Tagaçaba-de-Cima, 19/XI/1995, R. X. Lima 180, flor vermelha (UPCB 24620); Guaratuba, estrada Guaratuba-Guaruvá, 1 Km W de barra do Saí, 18/II/1986, A. Krapovickas & C. L. Cristóbal 40332, flor vermelha (MBM 110433); Guaratuba, morro na entrada da Baía, 07/XII/71, P. I. S. Braga 2311 & Marilene, flor (RB 160900); Guaratuba, Rio da Aberta, G. Hatschbach 29341 & O. Guimarães, flor vermelha (MBM 21871); Guaruvá, estrada para Guaratuba, 06/II/1957, G. Hatschbach 3600, flor vermelha (MBM 50512); Ilha de Currais (ilha maior), 04/II/1997, C. Jaster, flor vermelha (UPCB 29624); Ipiranga, floresta Ipiranga, 15/II/04, P. Dusén 3787, flor (R 68278); Ipiranga, Serra do Mar, II/04, P. Dusén 3787, flor e fruto (R 68281); Matinhos, Ilha do Farol, 01/II/1974, R. Kummrow 284, flor vermelha (MBM 31511); Matinhos, Ilha do Farol, 20/V/1985, M. T. Shirata 155 & J. A. Cunha, flor alaranjada (UPCB 19745); Matinhos, Ilha do Farol, 10/XII/1985, M. T. Shirata 253 *et al.*, flor laranja (UPCB 19792); Matinhos, Ilha do Farol, 12/IV/1986, S. M. Silva, flor vermelha (UPCB 19752); Morretes, Col. Floresta, 08/II/1986, R. Kummrow 2723 *et al.*, flor vermelha (MBM 107179); Morretes, Estação Marumbi, Rio Taquaral, 28/IV/1946, G. Hatschbach 298, flor vermelha (SP 84404, MBM 50511); Morretes, Parque Estação Marumbi, ca. 800m da estação ferroviária, 30/X/1984, F. C. da Silva, material estéril (UPCB 13091); Morretes, estrada da Graciosa, Curva Grande, 09/V/1986, Cervi & Acra 2362, flor rósea (UPCB 13498); Morretes, estrada da Graciosa, Grota Funda, 20/X/1977, G. Hatschbach 40005 & L. Landrum, flor vermelha (MBM 57753); Morretes, Prainhas, 04/II/1966, G. Hatschbach 13413 *et al.*, flor vermelha (MBM 8218); Morretes, Rio Bromado, 05/II/1983, G. Hatschbach 46102, H. C. Lima & S. Mayo, flor vermelha (MBM 82705, RB 229260); Morretes, Rio Bromado, 28/XII/1977, G. Hatschbach 40647 & R. Kummrow, flor vermelha (MBM 57754); Morretes, Rio dos Padres, 03/VIII/1995, J. M. Silva 1491 & E. P. Santos, fruto (MBM 182636); Morretes, Rio Sagrado de Cima, 08/VIII/1968, G. Hatschbach 19580, flor vermelha (MBM 8218); Morretes, Vêu de Noiva, 30/V/1985, P. I. Oliveira 916 & J. Cordeiro, flor vermelha (MBM 103574); Morretes, Zoador, 07/XII/1979, G. Hatschbach 42612, flor vermelha (MBM 79824); Paranaguá, Ilha das Cobras, 10/XI/1986, S. M. Silva 931 & W. S. Souza, flor vermelha (UPCB 19844); Paranaguá, Ilha do Mel, Morro do Joaquim, 10/III/1985, R. M. Britez & S. M. Silva, flor vermelha (UPCB 19841); Paranaguá, Ilha do Mel, 08/XI/1986, R. M. Britez 1089 & S. M. Silva 910, flor vermelha (UPCB 15054); Paranaguá, Ilha do Mel, 05/XII/1986, E. B. Schwarz 127 *et al.*, flor vermelha (UPCB 24988); Paranaguá, Ilha do Mel, R. M. Britez 1089 & S. M. Silva 910, flor vermelha (MBM 116564); Paranaguá, Rio Cambará, 28/V/1968, G. Hatschbach 19253, fruto (MBM 7184); Pinhão, Reserva Rio dos Touros, 25/X/1991, F. Bonato & H. R. S. Abrão 12, flor roxa (MBM 156091); Piraquara, Roça Nova, 04/XI/1982, R. Kummrow 2069, flor vermelha (MBM 78314); Piraquara, Roça Nova, 21/V/1974, G. Hatschbach 34439 & R. Kummrow, flor vermelha (MBM 31516); Porto Vitória, Prainha, 08/XII/1971, G. Hatschbach 28421, flor purpúrea (MBM 19941); Quatro Barras, Rio do Corvo, 12/IV/1988, J. M. Silva 488 & J. Cordeiro, flor (MBM 121132, SPSF 12492); Rio Branco do Sul, Ribeirinha, 07/V/1968, G. Hatschbach 19193, flor vermelha (MBM 7185); Serra da Graciosa, 17/IV/1996, S. F. B. Luz, flor vermelha (UPCB 28450); Serra da Graciosa, 30/XI/1982, A. C. Cervi 2095 & Javier Casas, flor (UPCB 12803).

Santa Catarina – Blumenau, Ponte do Salto, 14/IX/50, J. G. Kuhlmann, flor (RB 72795); Enseada de Brito, VIII/46, B. Carris, flor (RB 57454); Florianópolis, Morro do Rio Vermelho, 19/XII/1968, Klein & Bresolin 8058, flor vermelha (MBM 131530); Itajaí, Braço Joaquim, Luis Alves, 22/III/1956, Reitz & Klein 2878, flor (MBM 3030); Itajaí, Braço Joaquim, Luis Alves, 21/VI/1956, Reitz & Klein 3364, flor (HB 43886); Itapacá, 05/IX/1897, Schwacke, fruto (RB 38065); Itapiranga, 27°10'S – 53°45'W, 18/X/64, L. B. Smith & Pe. R. Reitz 12684, flor (R 161514).

DISCUSSÃO

O fato de *Dahlstedtia* ser um gênero exclusivamente brasileiro não é excepcional, se for considerada a representatividade da família Leguminosae na América do Sul. Apesar da família Leguminosae ser cosmopolita e com poucos gêneros endêmicos, estes ocorrem na América Latina, como por exemplo o grupo *Myroxylon* e os representantes da tribo Swartzieae (Raven & Polhill 1981). Segundo estes mesmos autores, a família está pobremente representada na Ásia, sugerindo que no Terciário, seus representantes teriam se desenvolvido na África, Madagascar e na América Latina, dispersando melhor nestas áreas. Entre a África e a Eurásia existiriam barreiras geográfica (água) no Paleoceno, ecológica no Eoceno e climática no Plioceno (Raven & Polhill 1981).

Dahlstedtia pentaphylla e *D. pinnata* enquadram-se no grupo das espécies com distribuição restrita a um tipo vegetacional, segundo a classificação de Good (1974), ocorrendo apenas nas regiões de Floresta Atlântica das costas sudeste e sul do Brasil. A Costa Atlântica Brasileira, pela proposta da Teoria dos Refúgios, foi considerada um refúgio, o que pôde ser confirmado pelo estudo da distribuição de 127 espécies nesta região (Mori *et al.* 1981) e do endemismo do gênero *Mouriri* (Prance 1982). O forte endemismo na região também foi observado por Gentry (1982), que citou 940 espécies endêmicas, de um total de 1288 listadas.

A semelhança na caracterização física da Costa Atlântica sudeste e sul (Bigarella *et al.* 1994) pode explicar a ocorrência das espécies de *Dahlstedtia* apenas nesta área do Brasil. Entretanto, foram encontradas algumas diferenças climáticas entre os estados. O Clima de SP e RJ são caracterizados como tipo Cw: quente com inverno seco, os do PR e SC como Cf: sem estação úmida. A temperatura média anual para o Estado do RJ é 25°C, para SP 20°C, para PR e SC 18°C. O trimestre mais chuvoso para o nordeste do Estado de SP e para o RJ é março-abril-maio; para o sudeste do Estado de SP e para o PR janeiro-fevereiro-março e para SC julho-agosto-setembro (Atlas Geográfico 1986). Tais diferenças poderiam ser associadas ao padrão diferenciado de distribuição das duas espécies, uma vez que há registros de *D. pentaphylla* para latitudes maiores que *D. pinnata*, como indicado pelos mapas de distribuição geográfica (fig. 1) e pela regressão logística (tab. 1). A distribuição altitudinal das espécies mostrou que ambas podem ser encontradas em altitudes altas e baixas; porém, o maior número de indivíduos de *D. pentaphylla* foi registrado para altitudes maiores. Assim, pela análise da fig. 3 e pela regressão logística

(tab. 1), pode-se inferir que a altitude também seja um fator envolvido no padrão diferenciado de distribuição das espécies. É necessário comentar que o estudo da distribuição das espécies segue as informações contidas em etiquetas de material de herbário e nem sempre puderam ser confirmadas com viagens de coleta. Estudos fisiológicos de germinação de sementes, estabelecimento das plântulas e fenologia proporcionariam considerações mais conclusivas a respeito.

A presença de acidentes geográficos do Planalto Atlântico, como os Planaltos de Campos do Jordão, de Paraitinga e o do Juqueriquerê teria imposto um isolamento geográfico para as espécies de *Dahlstedtia* no Estado de São Paulo. A disjunção das espécies poderia ser discutida quanto à adaptação das plantas aos diferentes aspectos geomorfológicos encontrados ao longo do litoral (Ab'Sáber 1956).

O litoral paulista foi dividido por muitos pesquisadores em compartimentos morfológicos distintos quanto aos processos de sedimentação quaternários, à presença de pontões do embasamento pré-cambriano, ao forte controle estrutural, entre outros (Mapa Geomorfológico do E.S.P. 1981). No litoral norte dominam as costas altas e jovens, onde os esporões da Serra do Mar e os pequenos maciços e morros litorâneos isolados atingem diretamente as águas oceânicas; no litoral sul, as planícies litorâneas, constituídas por extensas praias-barreirais, apresentam maior largura e maiores tratos de terrenos firmes, pouco ondulados (Ab'Sáber 1956).

O aborto ou o não desenvolvimento de frutos e sementes estariam afetando a distribuição das espécies de *Dahlstedtia*, atuando como um tipo fisiológico de barreira. A potencialidade de dispersão de frutos e sementes é considerada um fator essencial na distribuição e no sucesso reprodutivo das espécies. Há dispersões amplas e restritas e há barreiras para dispersão também. Estas barreiras podem ser conceituadas como áreas de determinado tipo ou extensão sobre a qual não há possibilidades de que a espécie ultrapasse. Pode ser terra ou água, ou locais onde atuem diferentes fatores ambientais ou bióticos, por exemplo o crescimento de outras plantas que competirão com a espécie (Good 1974).

Nos cruzamentos interespecíficos *D. pinnata* x *D. pentaphylla*, poucos tubos polínicos com crescimento normal atingiram o óvulo, sem que houvesse a formação de pró-embriões (ocorre degeneração dos óvulos entre 72 a 96h após a polinização), não ocorrendo o mesmo com *D. pentaphylla* x *D. pinnata*. A presença de uma célula embrionária numa região atípica do saco embrionário (cruzamento *D. pinnata* x *D. pentaphylla*) não pode ser considerada indício de apomixia em *D. pinnata*, por enquanto. Mesmo porque experimentos com

polinizações controladas realizados no campo não atestaram a formação de frutos na ausência de polinização (Teixeira et al. 2001).

A quantidade de secreção observada na micrópila dos óvulos após polinização interespecífica foi extremamente maior e mais viscosa que a observada em óvulos após polinização intra-específica, o que poderia representar uma barreira à entrada do tubo polínico. Tal observação e, ainda, o crescimento irregular dos tubos polínicos comparado ao de experimentos com polinização intra-específica (Teixeira et al. 2001) são indícios da existência de um mecanismo de prevenção do fluxo gênico entre as espécies.

Não há estudos da polinização para as duas espécies; apenas a inferência do tipo de polinização a partir da morfologia floral por Souza & Souza (1981) e a observação de visitas da fêmea do beija-flor *Ramphodon naevius* (Phaetorninae) em flores de *D. pinnata*, em Picinguaba (Buzato 1995). Os indivíduos desta espécie de beija-flor são territoriais, apresentam bico longo, ocorrem em mata fechada e pouco perturbada e suas visitas às flores ocorrem em intervalos constantes e suas rondas são de alta recompensa, ou seja, procuram maior concentração e menor volume de néctar (Araújo 1996). O comportamento agressivo apresentado pelos beija-flores na defesa de territórios, em geral pequenos, evidentemente limita a dispersão do pólen e, como consequência, a polinização ocorre entre indivíduos próximos (Proctor et al. 1996). Se *D. pinnata* e *D. pentaphylla* forem polinizadas preferencialmente por beija-flores territorialistas, como *Ramphodon naevius*, e os territórios defendidos por estes forem realmente pequenos, então, a troca de pólen entre as duas espécies geograficamente disjuntas seria dificultada. A compreensão dos mecanismos de polinização das duas espécies de *Dahlstedtia* auxiliaria em estudos de fluxo gênico e na solução de questões como «A distância e a diferença na altitude existentes entre as espécies são suficientes para manter as suas integridades gênicas?»

Nos cruzamentos interespecíficos, observou-se uma diferença no crescimento dos tubos polínicos, de acordo com a espécie que recebia o pólen. O crescimento dos tubos polínicos no estilete e na placenta foi regular quando *D. pentaphylla* foi a receptora do pólen de *D. pinnata*, e no caso inverso, os tubos apresentaram crescimento irregular, o que faria supor que *D. pinnata* teria desenvolvido características de especificidade no estilete. Assim, é provável que *D. pentaphylla* apresente caracteres mais semelhantes à espécie ancestral que *D. pinnata*, principalmente se for adicionada a informação encontrada em um trabalho de bioquímica, em que o ciclo de produção de rotenona em *D. pinnata* é plesiomórfico em relação ao de *D. pentaphylla* (Garcez et al. 1988).

As espécies não estão isoladas sazonalmente, mas geograficamente. Provavelmente, não trocam pólen na natureza e se trocassem não haveria formação de sementes. Apesar das semelhanças entre *D. pinnata* e *D. pentaphylla* em vários aspectos da morfologia externa e interna, da ontogenia (capítulos 1, 2 e 3) e dos mecanismos de polinização (obs. pes.), apresentando, inclusive, o mesmo número cromossômico ($n=11$) (capítulo 2), confirma-se, por este trabalho, a posição taxonômica adotada por Burkart (1957), na qual o gênero *Dahlistedtia* é constituído por duas espécies: *D. pinnata* e *D. pentaphylla*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SÁBER A. N. 1956. A terra paulista. Bol. Paul. Geogr., São Paulo, 23: 5-38.
- ARAÚJO A. C. 1996. Beija-flores e seus recursos florais numa área de Planície Costeira do litoral norte de São Paulo. Tese de Mestrado. Unicamp, Campinas, SP.
- ATLAS GEOGRÁFICO. 1986. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 3ª. ed. FAE, Rio de Janeiro.
- BENTHAM 1862. ?*Camptosema* ?*pinnatum* Benth. In Martius, Florae Brasiliensis 15(1): 325.
- BIGARELLA J. J., BECKER R. D. & SANTOS G. F. 1994. Estrutura e origem das paisagens tropicais e subtropicais. V. 1. Daufsc, Florianópolis.
- BURKART A. 1957. *Dahlistedtia pentaphylla* (Taub.) Burkart, nov. comb. Darwiniana 11: 269.
- BUZATO S. 1995. Estudo comparativo de flores polinizadas por beija-flores em três comunidades da Mata Atlântica no sudeste do Brasil. Tese de Doutorado. Unicamp, Campinas, SP.
- GARCEZ F. R., SCRAMIN S., NASCIMENTO M. C. & MORS W. B. 1988. Prenylated flavonoids as evolutionary indicators in the genus *Dahlistedtia*. Phytochemistry 27: 1079-1083.
- GEESINK R. 1981. Tephrosieae (Benth.) Huch. In R. M. Polhill & P. H. Raven (ed.). Advances in Legume Systematics, part 1, pp. 245-260. Royal Botanic Gardens, Kew.
- GEESINK, R. 1984. Scala Millettiearum. A survey of the genera of the tribe Millettieae (Leguminosae, Papilionoideae). E. J. Brill & Leiden University Press. (Leiden Botanical Series, 1).
- ENTRY A. H. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. Biotropica 6: 64-68.

- 1982. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the Andean orogeny? *Ann. Miss. Bot. Gard.* 69: 557-593.
- GERLACH D. 1969. *Botanische Mikrotechnik*. Georg. Thieme Verlag, Stuttgart.
- GOOD R. 1974. *The geography of the flowering plants*. 4th ed. Longman, London.
- HOSMER D. W. & LEMESHOW S. 1989. *Applied logistic regression*. A Wiley-interscience publication, New York.
- HUTCHINSON J. 1964. *The genera of flowering plants (Angiospermae) – Dicotyledons*, v. 1. Clarendon Press, Oxford.
- JOHANSEN D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company Inc., New York.
- JOHRI BM, AMBEGAOKAR KB & SRIVASTAVA PS. 1992. *Comparative Embryology of Angiosperms*, Berlin: Springer-Verlag, v.1.
- KARNOVSKY M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137A-138A.
- MALME G. 1905. *Dahlstedtia*, eine neue Leguminosen – Gattung. *Arkiv för Botanik* 4: 1-7.
- MAPA GEOMORFOLÓGICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. 1981. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S. A. - IPT. V. 1. Promocet, Pró Minério, São Paulo.
- MARTIN F. N. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125-128.
- MORI S. A., BOOM B. M. & PRANCE G. T. 1981. Distribution patterns and conservation of Eastern Brazilian Coastal Forest tree species. *Brittonia* 33: 233-245.
- PRAKASH N. 1986. *Methods in Plant Microtechnique*. 2nd ed. The University of New England, Armidale, NSW.
- PRANCE G. T. 1982. A review of the phytogeographic evidences for Pleistocene climate changes in the Neotropics. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 69: 594-624.
- PROCTOR M., YEO P. & LACK A. 1996. *The Natural History of Pollination*. London: Harper Collins Publishers.
- RADFORD, A. E.; DICKISON, W. C., MASSEY, J. R. & BELL, C. R. 1974. *Vascular Plant Systematics*. Harper & Row Publishers, Inc., New York.
- RAVEN P. H. & POLHILL R. M. 1981. Biogeography of the Leguminosae. *In* R. M. Polhill & P. H. Raven (ed.). *Advances in Legume Systematics*, part 1, pp. 27-34. Royal Botanic Gardens, Kew.

- TAUBERT. 1889. *Camptosema ?pentaphyllum* Taub. In Flora 47: 428.
- TEIXEIRA S. P. 1996. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Dahlstedtia* Malme (Leguminosae, Papilionoideae). Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, S.P.
- TEIXEIRA S. P. & GABRIELLI A. C. 2000. Anatomia do eixo vegetativo de *Dahlstedtia pinnata* (Benth.) Malme e *D. pentaphylla* (Taub.) Burkart (Leguminosae, Papilionoideae). *Revta brasil. Bot.* 23: 1-11.
- TEIXEIRA SP, PRAKASH N & RANGA NT. 2001. Ovule and early seed development related to seed abortion in *Dahlstedtia pinnata* and *D. pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytomorphology* 51: 61-70.
- ZAR J. H. 1996. Biostatistical analysis, 3rd ed. Prentice Hall.

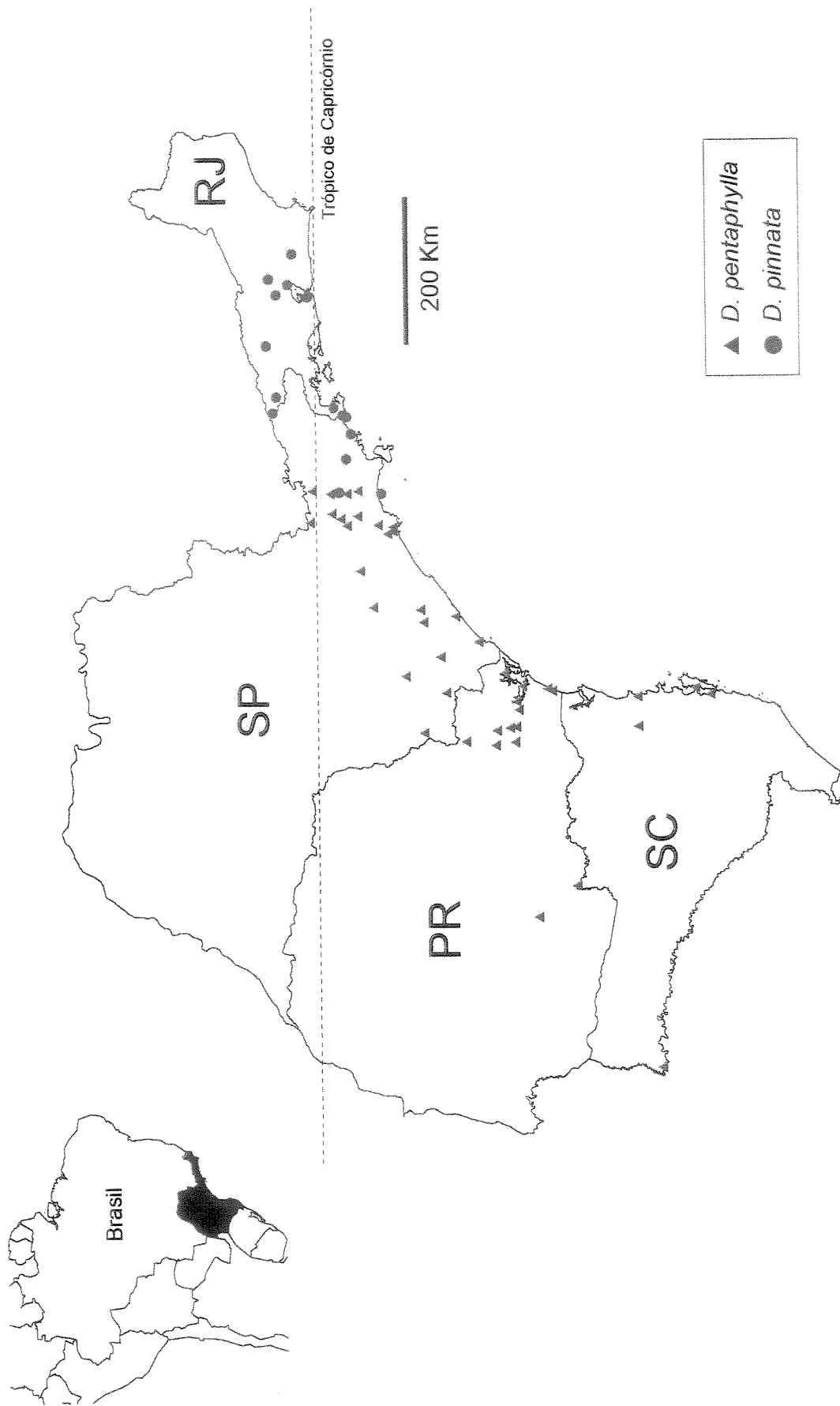


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica das espécies de *Dahlstedtia*.

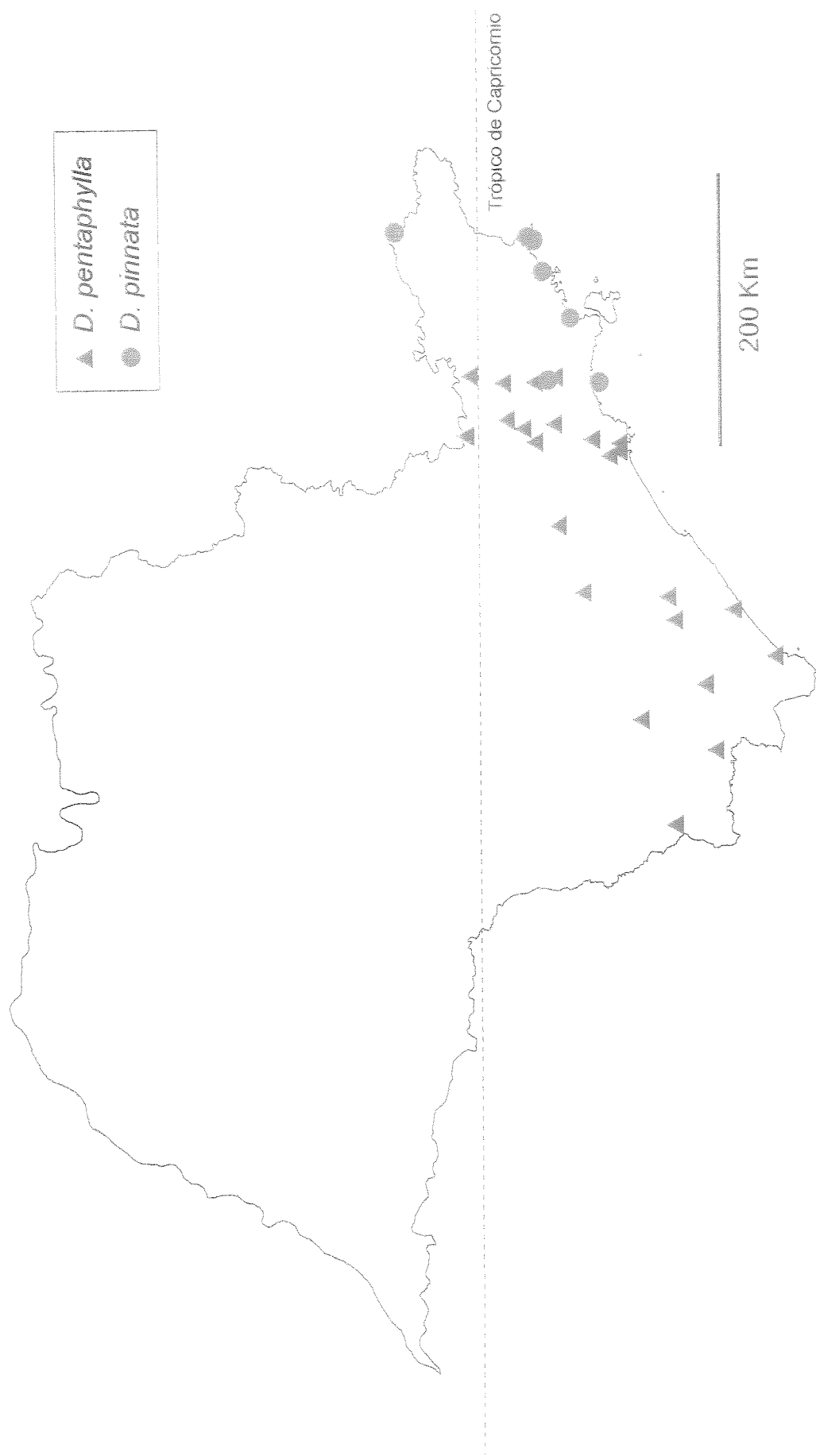


Figura 2. Mapa da distribuição geográfica das espécies de *Dahlstedtia* no Estado de São Paulo.

Figura 4. Germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em *Dahlistedtia pentaphylla* x *Dahlistedtia pinnata*. **A.** Grãos de pólen germinando no estigma. **B.** Tubos polínicos em crescimento no estilete. **C.** Tubo polínico na placenta, próximo ao óvulo. **D.** Tubo polínico no saco embrionário. Escalas = 70µm.



Figura 5. Crescimento do tubo polínico em *Dahlistedtia pinnata* x *Dahlistedtia pentaphylla*. **A.** Tubo polínico de espessura irregular no estilete. **B.** Crescimento irregular do tubo polínico. **C.** Tubo polínico na micrópila. **D.** Tubos polínicos ao redor do óvulo. Escalas=70µm.

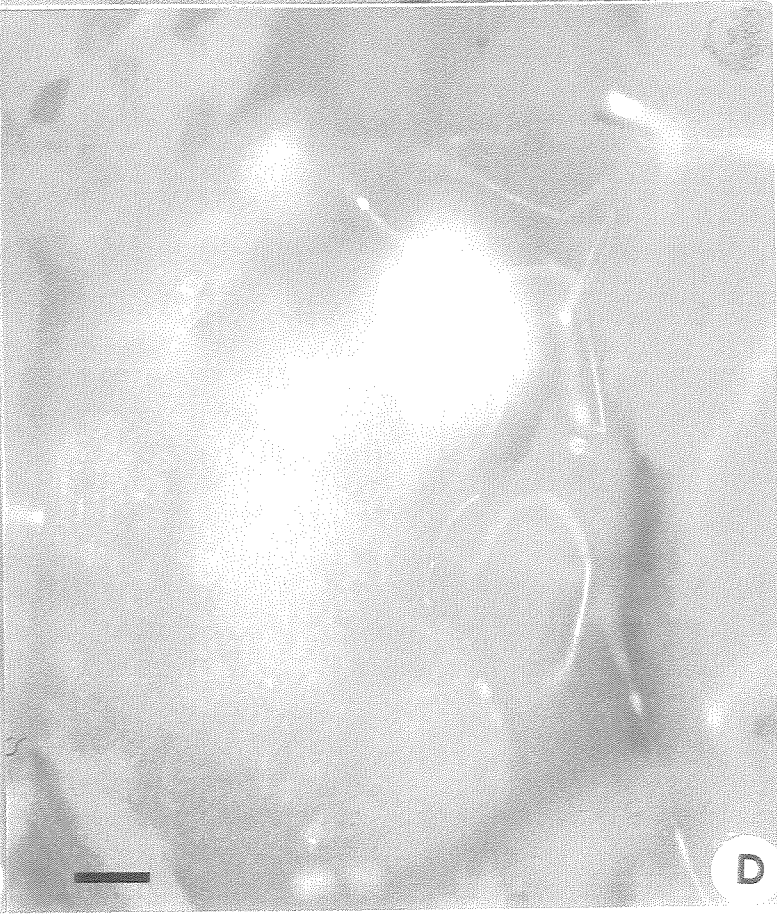
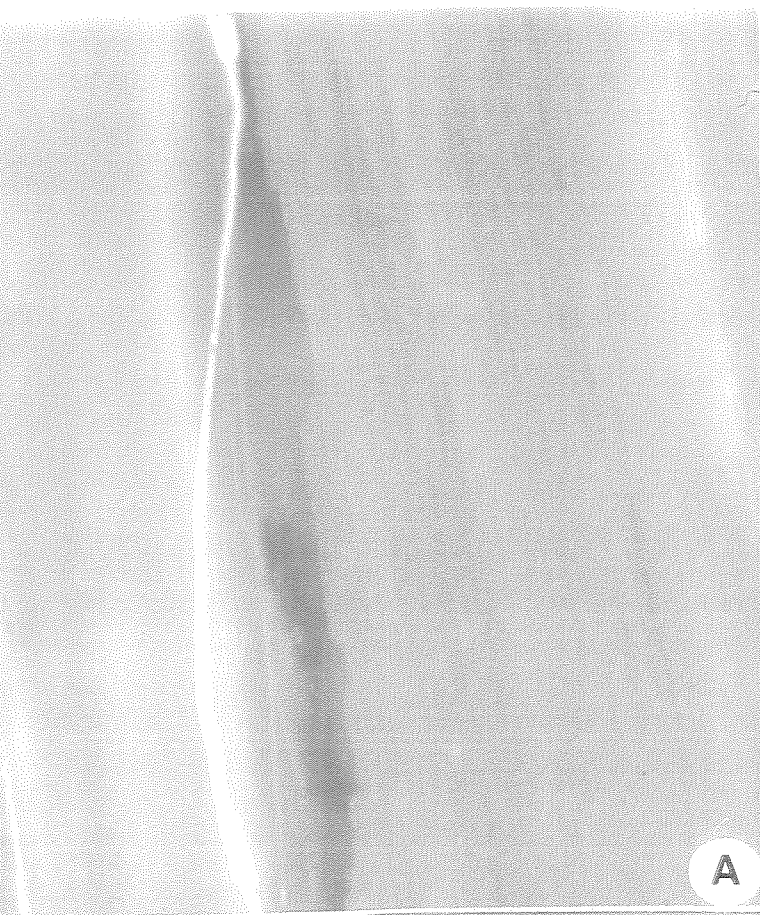
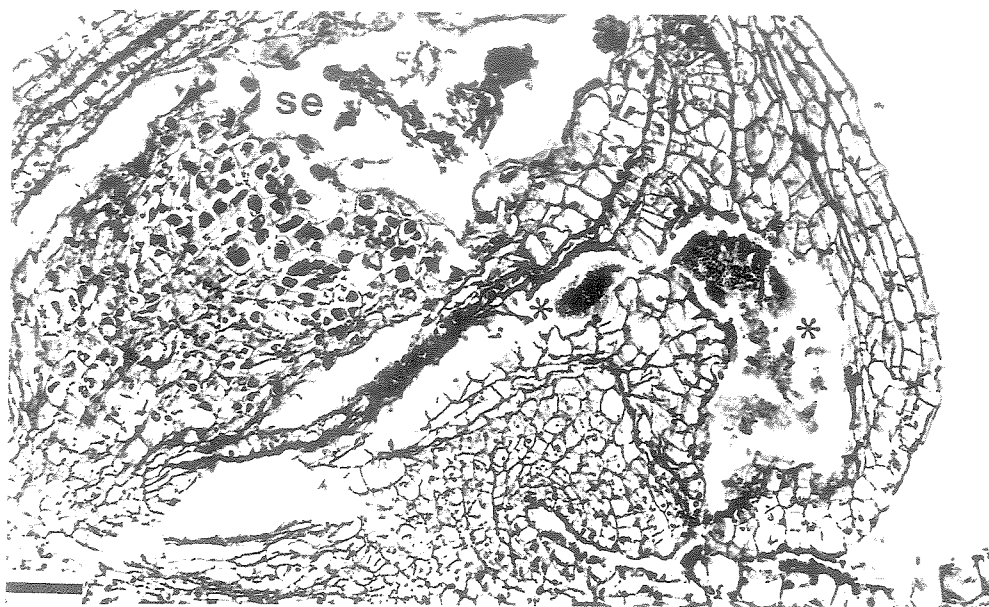


Figura 6. Corte longitudinal do óvulo de *D. pinnata* após 96h de fertilização por grãos de pólen de *D. pentaphylla*. Notar a presença de uma secreção densa (*) ocupando o canal micropilar e a região próxima ao saco embrionário. se – saco embrionário. Escala = 43µm.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. O trabalho apresentado é uma abordagem anatômica e embriológica dos aspectos reprodutivos de *Dahlstedtia pentaphylla* e *D. pinnata*, incluindo desde o estudo do desenvolvimento da flor até o da semente, detalhando os órgãos responsáveis pela produção dos gametas para, assim, contribuir com informações importantes em estudos que visem a conservação das espécies.

2. A posição taxonômica adotada por Burkart, na qual o gênero *Dahlstedtia* é constituído por duas espécies (*D. pinnata* e *D. pentaphylla*), é confirmada neste trabalho. Apesar da grande semelhança morfológica apresentada pelas espécies e do gênero ter sido considerado monotípico por vários autores, sua distribuição geográfica é disjunta e em experimentos com polinizações interespecíficas não se observou o desenvolvimento de embriões híbridos. Algumas características morfológicas que podem subsidiar a delimitação das espécies merecem ser destacadas: a inflorescência pêndula em *D. pentaphylla* e ereta em *D. pinnata*, a presença de lenticelas conspicuas nos ramos e de cavidades secretoras na folha de *D. pentaphylla* e a ausência em *D. pinnata*, e a distribuição diferenciada de cavidades secretoras nas peças florais das espécies. Nem todas estas características podem ser observadas em material herborizado, sendo que as cavidades secretoras devem ser confirmadas por seções histológicas. Entretanto, a presença de lenticelas conspicuas nos ramos pode ser facilmente visualizada em exsiccatas de herbário.

3. Os indivíduos de *D. pentaphylla* e *D. pinnata* apresentam baixa taxa de produção de frutos, sendo que poucos atingem o estágio final de maturação. Características expressando o aborto, como a deposição precoce de calose, espessamento e retração prematuros das paredes celulares, foram encontradas nos tecidos maternos dos óvulos e sementes em ambas as espécies. O grão de pólen também é um fator limitante da fertilização em *D. pinnata*, o que foi verificado pelo baixo índice meiótico apresentado por esta espécie.

4. Sistemas de auto-incompatibilidade encontrados para muitas espécies de Leguminosae e esperados para plantas com altas taxas de aborto de sementes não foram observados em *D. pentaphylla* e *D. pinnata*. Nos estudos anatômicos da fertilização não foram encontradas diferenças entre a autopolinização e a polinização cruzada, ocorrendo, inclusive, a formação de zigoto e de pró-embrião após estes experimentos. O aborto está mais relacionado à limitação dos recursos maternos, devido ao alto custo de formação dos

frutos e da maturação das sementes. Entretanto, a presença de gens letais que levam à formação de embriões intrinsicamente inviáveis e, conseqüentemente ao aborto ao acaso de frutos e de sementes dentro do fruto, não pode ser descartada.

5. Como o aborto de frutos e sementes em *Dahlstedtia* ocorre ao acaso, as duas hipóteses citadas no item anterior poderiam explicá-lo: a hipótese da limitação dos recursos maternos, baseada na Teoria da Seleção de Parentesco, e a da carga segregacional genética causada por depressão endogâmica. Tais hipóteses diferem principalmente quanto à viabilidade do embrião. De acordo com a primeira hipótese, devido ao alto custo de formação de frutos e maturação das sementes para a «planta-mãe», esta seria selecionada para limitar a distribuição de recursos nos primeiros estádios de desenvolvimento do fruto e a competição entre tecidos maternos e embriogênicos e entre embriões seria gerada pelas diferenças nos graus de parentesco; o embrião abortado não teria que ser necessariamente inviável. De acordo com a segunda hipótese, o embrião abortado seria geneticamente inviável e não sobreviveria mesmo se o embrião dominante fosse eliminado; a inviabilidade do embrião seria confirmada pela presença de anormalidades em algum estágio específico da embriogênese.

6. Não se pode concluir que as espécies apresentam risco de extinção e mesmo a citação de *D. pinnata* como espécie «rara» pode ser explicada devido a sua baixa representatividade em estudos florísticos e fitossociológicos realizados em Picinguaba. Muitos indivíduos desta espécie foram observados em áreas não perturbadas da Serra do Mar, provavelmente não catalogados devido a esforços de coleta e aos critérios utilizados na inclusão dos indivíduos naqueles estudos. Além disso, a frutificação parece ser supra-anual e todas os indivíduos observados em áreas naturais apresentaram rebrotas provenientes do sistema radicular, indicando que a propagação vegetativa deve ser mais importante para esta espécie.

7. Entretanto, a baixa produção de frutos e a ausência de plântulas observadas em áreas naturais para ambas espécies indicam que as populações destas áreas podem sofrer reduções no número de indivíduos. Por outro lado, a presença de muitos indivíduos jovens nas áreas estudadas (Picinguaba, Ubatuba e Intervalos) sugere a ocorrência de sucesso reprodutivo em anos anteriores e, neste caso, o aborto seria uma estratégia reprodutiva adotada pelas espécies.

8. As dificuldades na obtenção e germinação de sementes e a impossibilidade de manipulação de flores, resultando em sua queda, tornam inviáveis programas de seleção

para as espécies de *Dahlistedtia*, principalmente para *D. pinnata*, do que se pode concluir que a conservação das espécies depende invariavelmente da manutenção de seu habitat, reforçando, assim, a necessidade de preservação da Floresta Atlântica brasileira.