



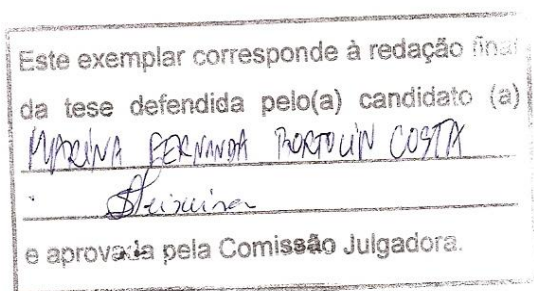
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARINA FERNANDA BORTOLIN COSTA

**“INTERAÇÃO PÓLEN-PISTILO EM ESPÉCIES
NEOTROPICAIS DE *INDIGOFERA* L. (LEGUMINOSAE,
PAPILIONOIDEAE) SOB ENFOQUE MORFOLÓGICO”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
para a obtenção do Título de Mestre em Biologia
Vegetal.



ORIENTADORA: PROFA. DRA. SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL'EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C823i Costa, Marina Fernanda Bortolin, 1981-
Interação pólen-pistilo em espécies neotropicais de
Indigofera L. (Leguminosae, Papilionoideae) sob enfoque
morfológico / Marina Fernanda Bortolin Costa. –
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Simone de Pádua Teixeira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anatomia vegetal. 2. Estigma (Botânica). 3.
Grão de pólen. 4. Leguminosa. 5. Tubo polínico. I.
Teixeira, Simone de Pádua. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Pollen-pistil interaction in neotropicals species of *Indigofera* L.
(Leguminosae, Papilionoideae) under morphological approach

Palavras-chave em Inglês:

Plant anatomy
Stigma (Botany)
Legumes
Pollen grain
Pollen tube

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Simone de Pádua Teixeira [Orientador]

Daniela Guimarães Simão

Juliana Lischka Sampaio Mayer

Data da defesa: 29-07-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 29 de julho de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira (Orientadora)



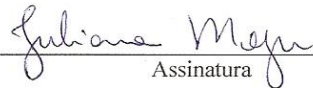
Assinatura

Profa. Dra. Daniela Guimarães Simão



Assinatura

Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer



Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi



Assinatura

Profa. Dra. Adriana Tiemi Nakamura



Assinatura

Dedicatória

A meus pais, Fátima e Fernando, pelo amor incondicional, aos meus irmãos, Milena e Lenon, pelos momentos de imensa alegria, aos amigos e à minha orientadora, pelo incentivo e carinho, e a Anderson, por conquistar meu coração todos os dias.

AGRADEÇO

A Deus, por presentear-me com saúde e por permitir o meu encontro com pessoas maravilhosas.

À Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira, pela orientação e confiança, pelo carinho, pela paciência e pelos momentos profissionais e pessoais compartilhados desde o ano de 2006.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, por possibilitar o desenvolvimento da minha dissertação e, em especial, à secretária do programa Maria Roseli de Melo, por todo auxílio e paciência.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo espaço físico concedido para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo 2002/11834-5) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ - processo no 475535/2007-3) pelo financiamento do trabalho.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa concedida.

As professoras Dra. Eliana Regina Forni Martins, Dra. Marília de Moraes Castro e Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro, pela avaliação e contribuição a este trabalho durante o período da Qualificação.

Aos professores Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória, Dra. Daniela Guimarães Simão e Dr. Nelson Sabino Bittencourt Jr., pela avaliação da prévia deste trabalho e por contribuir para a conclusão do mesmo.

Ao técnico do laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Mário Sadaiti Ogasawara, pelo auxílio com experimentos, pelo cuidado com as plantas, pela paciência e disponibilidade que sempre me dedicou

Ao técnico do laboratório de Botânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Edimárcio da Silva Campos, pelo auxílio com experimentos, pela amizade atenciosa e por todas as viagens, experiências e risadas que compartilhamos.

Ao técnico José Augusto Maulin, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo auxílio durante a observação de materiais nas microscopias eletrônicas de varredura e transmissão, pelo interesse em contribuir com este trabalho, pela paciência e pelo bom humor.

À técnica do laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Maria Dolores Seabra Ferreira, pelo auxílio técnico em microscopia eletrônica de transmissão e por seu interesse e colaboração com este trabalho, pelo carinho e apoio, pela amizade e por todas as risadas. Obrigada por ser minha Tutu.

À técnica do laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Maria Tereza Picinoto Maglia, pelo auxílio técnico e por todo o seu bom humor e carinho.

À técnica Vaní Maria Alves Corrêa, do laboratório de Histotecnologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelos ensinamentos valiosos e auxílio técnico em histologia, por despertar minha paixão pelo micrótomo, pelo carinho, amizade e respeito que sempre me dedicou. Obrigada por “levantar o meu astral” sempre e por incentivar os meus primeiros passos na pesquisa científica.

A Rodrigo Augusto Santinelo Pereira, pelo auxílio técnico em microscopia eletrônica de varredura

À técnica Iara de Fátima Ibressan, do laboratório de Biossistemática do Departamento de Biologia Vegetal, do Instituto de Biologia, da Unicamp, por seu auxílio técnico.

A Bruno Favaretto, pelas ilustrações das flores das espécies deste estudo.

A Ilzete e Ana Paula, Raquel e família, por proporcionarem a hospedagem durante a pré-banca. Obrigada pelos cuidados e pelo carinho.

Aos meus amigos de graduação, em especial, à Tína, Verusca, Marina, Vanessa e ao Paulinho, exemplos para mim, cada um à sua maneira (saudades).

Aos meus colegas do curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

Aos meus queridos amigos, que fizeram e fazem parte atualmente do Laboratório de Botânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Ana, Andréa, Camila, Cristina, Dani, Flavinha, Giseli, João, Juliana M., Juliana P., Líana, Lídiane, Lílana, Lígia, Luzia, Margareth, Nádia, Priscila, Raquel, Roberto, Rodrigo, Tatiana, Thaís, Vanessa, Viviane e Wellinton), pelo excelente convívio, por

uma constante troca de experiência e aprendizado, pelos almoços, cafés, reuniões comemorativas e infinitos aniversários. Tenho muito carinho por todos vocês.

À minha amiga Viviane Gonçalves Leite, pela parceria desde o início do nosso estágio em 2006. Obrigada por sua amizade e sinceridade.

À minha amiga Thaís, pelo carinho e pela confiança. Obrigada por me ajudar quando precisei e por permitir que compartilhássemos nossos sentimentos. Admiro-lhe cada vez mais.

Ao meu parceiro de mestrado João Paulo Basso Alves, obrigada pelo companheirismo e por todo auxílio diante das minhas dúvidas e questionamentos.

À Priscila Andressa Cortez, por sempre estar disposta a esclarecer minhas dúvidas sobre embriologia, em especial sobre grão de pólen, por suas sugestões e críticas e por sua amizade carinhosa e solícita. Obrigada pela hospedagem em Campinas durante a Qualificação

À Juliana Villela Paulino, pelo auxílio profissional e pela amizade. Obrigada por compartilharmos nossas experiências profissionais e pessoais, por direcionar-me para o caminho correto, por estar sempre disponível para ajudar-me durante o meu mestrado. Tenho a satisfação de dizer que espelho-me em você, Juzinha, minha amiga “Amborella”.

Aos tios Mara Sílvia Alexandre Costa e Álvaro da Silva Costa, pelo incentivo, pelas conversas e, principalmente, por lembrarem de mim quando surgiu a oportunidade. Devo minha entrada no mundo acadêmico ao carinho e reconhecimento que ambos demonstram por mim.

Aos meus avós, Maurícia e Arlindo (in memoriam), Zinha e Paulo, agradeço o amor, os cuidados e todas as melhores lembranças da minha infância.

Aos meus tios, primos, cunhados, sobrinhos, pelo apoio, carinho, e pelos momentos felizes que só vocês são capazes de proporcionar.

À Lourdes, pelo carinho e pela preocupação com o meu futuro pessoal e profissional. Tenho profunda admiração por sua força de vontade e sua coragem. Obrigada por acreditar em mim.

Ao meu pai, Fernando, pelo amor e carinho, pelas boas experiências e pela valiosa contribuição para a minha educação. O grande contato com a natureza durante a minha infância contribuiu para minhas escolhas profissionais. Obrigada.

Aos meus irmãos, Milena e Lenon, sempre presentes em minha vida, agradeço pelo amor e pela alegria que determinam nossa relação. Vocês são presentes de Deus, meus amores.

À minha mãe e amiga, Fátima, agradeço por tudo. Se cheguei onde estou hoje, foi por inspirar-me em você, mulher guerreira, inteligente e amorosa. Minha formação, meu caráter, meus princípios, são frutos de uma sábia maneira de ser mãe, que só você poderia proporcionar.

Ao meu querido, Anderson Tadeu Frangiotti, por sua compreensão e seu apoio quando mais precisei. Obrigada por seu amor, sua alegria, paciência e amizade. Agradeço a Deus por permitir que nossos caminhos se cruzassem. Amo você, Nenê.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO.....	3
Objetivo	9
MATERIAIS E MÉTODOS	10
1. Espécies estudadas.....	10
2. Grão de pólen: forma, status cito-fisiológico e presença de “pollenkitt”	11
3. Polinizações induzidas.....	11
3.1. Autopolinização espontânea	12
3.2. Autopolinização induzida e polinização cruzada manual.....	12
4. Exame de superfície.....	13
5. Exames anatômico e ultra-estrutural	13
6. Terminologia para grão de pólen	14
RESULTADOS.....	15
Morfologia do pistilo	15
Morfologia do grão de pólen e do tubo polínico	17
Interação pólen-pistilo.....	18
DISCUSSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMO

Indigofera L., terceiro maior gênero de Leguminosae, possui cerca de 700 espécies, tropicais e subtropicais, descritas como melitófilas, com hábitos variados, e ampla ocorrência em áreas degradadas e de Cerrado. Estudos prévios mostraram que o estigma de *I. lespedezioides* e *I. suffruticosa* é secretor e cuticularizado e que suas flores não produzem frutos por autopolinização espontânea. Assim, este trabalho avaliou a morfologia da interação pólen-pistilo em quatro espécies relacionadas e neotropicais de *Indigofera*: *I. hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*. Pretendeu-se compreender o comportamento do grão de pólen e do tubo polínico no pistilo, em especial no estigma destas espécies, caracterizado como semi-seco. Grão de pólen, estigma, estilete e ovário de botões florais e flores foram observados em microscopias eletrônica e de luz. Testes para a detecção de substâncias foram realizados em grão de pólen e estigma. Polinizações induzidas foram realizadas visando à compreensão do sistema reprodutivo das espécies. O grão de pólen é harmomegático, tricolporado, prolato, com exina perfurada e pouco “pollenkitt”. O estigma é revestido por cutícula sem poros, constituído por células secretoras e parcialmente delimitado por tricomas tectores. A secreção, hidrofílica e lipofílica, fica retida nos espaços intercelular e subcuticular. Após autopolinização e polinização cruzada, indivíduos das quatro espécies apresentaram grãos de pólen germinando no estigma e tubos polínicos crescendo pelo estilete até o ovário. *Indigofera hirsuta* foi a única espécie que produziu frutos por autopolinização espontânea. Nas quatro espécies, o grão de pólen adere-se ao estigma receptivo, reidrata-se e germina emitindo o tubo polínico que percorre os espaços intercelulares do tecido transmissor, cresce pelo espaço central ou pela margem do canal estilar, penetrando o óvulo pela micrópila, 6 a 24h após a polinização. A escassez de “pollenkitt”, a secreção estigmática abundante e as visitas frequentes de abelhas sugerem que, nas espécies que não produzem frutos por autopolinização espontânea, a germinação polínica depende do polinizador para romper a cutícula do estigma possibilitando o contato do pólen com a secreção. Em *I. hirsuta*, a ruptura da cutícula deve ocorrer devido à pressão exercida pela secreção estigmática ou pelo contato com as anteras. Este trabalho confirma a presença de estigma semi-seco em *Indigofera* e sugere que *I. hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* são espécies autocompatíveis, além de fornecer dados reprodutivos para este gênero e para a tribo Indigoferae, grupos pouco estudados sob este enfoque.

Palavras-chave: anatomia, estigma, grão de pólen, *Indigofera*, Leguminosae, tubo polínico.

ABSTRACT

Indigofera is the third largest genus of Leguminosae with tropical and subtropical distribution, is considered melittophilous, with varied habits and wide occurrence in degraded areas and Cerrado ecosystems of Brazil. Previous research demonstrated that *I. lespedezioides* and *I. suffruticosa* have secretory stigma covered by cuticle and fruit are not produced by spontaneous self-pollination. Thus, this work evaluated the morphology of pollen-pistil interaction of four related and neotropical species of *Indigofera*: *I. hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* and *I. truxillensis*. Pollen grain, stigma, style and ovary of flower buds and flowers were examined under electron and light microscopy. Tests to detect substances were made with pollen grain and stigma. Controlled pollinations were realized aiming at helping to understand the reproductive systems of these species. The pollen grain is harmomegathic, tricolporate, prolate, with perforated exine and a small quantity of pollenkit. The stigma, considered semi-dry, is covered by a cuticle, partially covered by trichomes and has secretory cells. The hydrophilic and lipophilic secretion is retained in intercellular and subcuticular spaces. Pores were not found at the stigmatic cuticle. After self-pollination and cross-pollination experiments, individuals of four species had germinating pollen grains on stigma and pollen tubes growing by style toward ovary. *Indigofera hirsuta* was the only species that produced fruit after spontaneous self-pollination. The pollen grain adheres to the receptive stigma, rehydrates and germinates, emitting the pollen tube through the stigmatic cells spaces. The pollen tube passes through the intercellular spaces of the transmitting tissue and it grows through the central space of the style or around the edge of the style channel. The pollen tube penetrates the micropyle about 6 to 24h after pollination. The scarcity of “pollenkit”, the abundant stigmatic secretion, and the frequent visits of stingless bees suggest that, in the species that do not have spontaneous self-pollination, the pollen germination depends on the pollinator to break the stigmatic cuticle allowing the contact between pollen and stigmatic secretion. In *I. hirsuta*, the cuticle rupture may occur due to stigmatic secretion pressure. This study confirms the presence of a semi-dry stigma in *Indigofera* and suggests that *I. hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* and *I. truxillensis* are self-compatible, providing reproductive data for these genera and for the tribe Indigoferae, groups that are poorly studied under this approach.

Key words: anatomy, *Indigofera*, Leguminosae, pollen grain, pollen tube, stigma.

INTRODUÇÃO

Nas plantas com sementes, a eficiência da reprodução sexual depende de processos fisiológicos e mecânicos que ocorrem no pólen e no pistilo. Assim, o estudo da interação pólen-pistilo é melhor compreendido se dividido em etapas. Na primeira etapa, conhecida como polinização, o grão de pólen é transferido da antera até o estigma por agentes abiótico (ar, água) ou bióticos (animais). A segunda etapa, ou acoplamento, inicia-se após a deposição do grão de pólen sobre o estigma receptivo compatível. Nesta etapa, a célula vegetativa do grão de pólen produz o tubo polínico que conduz os gametas pelo estigma e estilete até o saco embrionário. O contato entre o tubo polínico e o aparelho fibrilar de uma das sinérgides provoca uma reação de reconhecimento a qual deverá ser compatível para permitir a liberação das células espermáticas, caracterizando a terceira etapa, a cópula. A última etapa, ou singamia, compreende a fusão de um dos gametas masculinos com a oosfera e do outro gameta masculino com a célula média, concluindo a dupla fertilização (Cocucci & Mariath 2004).

O grão de pólen, ao ser liberado da antera, entra em contato com o ar e pode sofrer mudanças drásticas, denominadas harmomegáticas, como redução de volume e mudanças na forma. Os processos harmomegáticos são influenciados pela umidade relativa e temperatura, sendo suportados pela parede do grão de pólen, pela membrana plasmática e pelo protoplasto das células vegetativa e generativa (Pacini 1990, Bassani *et al.* 1994, Lisci *et al.* 1994).

Grãos de pólen com baixo conteúdo de água (< 30%) no momento de sua apresentação e dispersão, denominados parcialmente desidratados, são mais longevos, pois encontram-se em estado quiescente, mais aptos a suportar as alterações harmomegáticas (Pacini 1990, 2000, 2010, Pacini & Hesse 2004). O outro tipo, denominado parcialmente hidratado (> 30% de água), exibe rápida emissão de tubo polínico logo que o grão de pólen é depositado no estigma, já que a necessidade de reidratação é pequena ou desnecessária. Este tipo de pólen é mais vulnerável e precisa atingir o estigma rapidamente, pois não tem mecanismos para evitar a dessecação durante os períodos de apresentação e

dispersão (Pacini 1990, 2000, 2010, Nepi *et al.* 2001, Franchi *et al.* 2002, Pacini & Hesse 2004). Por analogia às sementes, os grãos de pólen parcialmente desidratados e parcialmente hidratados são chamados, respectivamente, de ortodoxos e recalcitrantes (Pacini *et al.* 2006, Pacini 2010).

Durante o desenvolvimento do grão de pólen, substâncias derivadas do tapete são depositadas na exina e exercem um papel fundamental na dispersão e na viabilidade polínica (Pacini 2000), assim como nas reações de compatibilidade envolvidas na interface pólen-estigma (Ma 2005, Blackmore *et al.* 2007). Após a formação da exina, a degeneração do tapete pode produzir substâncias como trífina, pollenkitt e elastoviscina, cujas funções relatadas são manter os grãos de pólen na antera até o momento da dispersão, mantê-los unidos e auxiliar a adesão do grão de pólen ao polinizador (Pacini 2000). Além disso, o pollenkitt pode também aumentar a resistência do grão de pólen à desidratação, o que prolonga sua viabilidade (Ma 2005).

A polinização pode ser realizada por agentes abióticos, como vento e água, ou bióticos, como insetos, pássaros e morcegos (Cocucci e Mariath 2004), podendo haver uma relação entre o tipo de polinização e a morfologia polínica (Knox 1984, Basso-Alves *et al.* 2011). Por exemplo, plantas anemófilas e hidrófilas geralmente apresentam grão de pólen pequeno, esférico ou alongado, com exina fina, lisa, revestida por pouca ou nenhuma substância adesiva, enquanto plantas polinizadas por animais frequentemente possuem grão de pólen grande, com exina espessa, ornamentada e viscosa, devido à presença de pollenkitt. Observa-se, portanto, a importância do formato do grão de pólen, assim como da ornamentação e da ocorrência de substâncias viscosas na exina, características que, dependendo do tipo de polinização, permitem que o grão de pólen seja transportado até um estigma receptivo e compatível, auxiliando no sucesso reprodutivo das espécies (Knox 1984).

Após a polinização, ao alcançar um estigma receptivo compatível, o grão de pólen adere-se, reidrata-se e germina, emitindo um tubo polínico que percorre o estigma e o tecido transmissor do estilete em direção ao óvulo (Maheshwari 1950, Johri *et al.* 1992, Lord & Russel 2002, Cocucci & Mariath 2004, Lersten 2004).

Nos processos de adesão, reidratação e germinação do grão de pólen, deve-se considerar as características exibidas pelo estigma, como a forma, a composição de células, a presença e a natureza do exsudato e a presença de barreiras físicas como a cutícula (Heslop-Harrison & Shivanna 1977, Edlund *et al.* 2004). Assim, os estigmas têm sido classificados em úmido e seco, de acordo com sua anatomia e fisiologia (Heslop-Harrison & Shivanna 1977). Ambos podem apresentar epiderme papilosa ou lisa, sendo secretora no estigma úmido, com liberação do exsudato para o exterior por lise celular; com pouco ou nenhum exsudato no estigma seco, que é revestido por cutícula e/ou película protéica (Heslop-Harrison & Shivanna 1977, Edlund *et al.* 2004).

O metabolismo do pólen é reativado no decorrer de sua reidratação no estigma, fenômeno que depende de substâncias produzidas durante o desenvolvimento polínico, como o pollenkit, em especial nas espécies com estigma seco (Piffanelli *et al.* 1998, Pacini & Hesse 2005), e/ou de substâncias liberadas pelas células secretoras do estigma úmido (Heslop-Harrison 2000). O período de receptividade de algumas flores inicia-se após o rompimento da camada (cutícula e/ou película protica) que reveste o estigma e/ou a liberação do exsudato, o que pode promover a polinização cruzada e, frequentemente, está associado a um mecanismo fisiológico de auto-incompatibilidade (Lord & Heslop-Harrison 1984).

Estabelecido o primeiro contato entre pólen e estigma compatíveis, inicia-se a reidratação do grão de pólen. Íons, lipídios e proteínas estão envolvidos na ativação dos mecanismos de emissão e crescimento do tubo polínico (Lord & Russel 2002, Malhó 2006), os quais ocorrem por atuação da célula vegetativa (Maheshwari 1950, Johri *et al.* 1992). Além disso, substâncias proteicas presentes na intina, podem auxiliar no processo de reconhecimento pólen-estigma e na digestão da cutícula estigmática para que ocorra a emissão do tubo polínico. Assim, a intina, constituída por celulose e calose, torna-se hidratada e projeta-se pela abertura da exina formando o tubo polínico (Lersten 2004, Malhó 2006). Durante este momento inicial, o crescimento do tubo polínico é considerado autotrófico, pois contém reservas, constituídas por polissacarídeos, substâncias lipofílicas e proteínas, sendo

independente de possíveis reservas presentes no exsudato estigmático (Herrero & Dickinson 1981, Herrero 1992, Stephenson *et al.* 2003).

O crescimento do tubo polínico no estilete em direção ao óvulo está associado ao tecido transmissor. No estilete sólido, o tubo polínico percorre espaços intercelulares ou penetra a parede celular mucilagínosa das células especializadas do tecido transmissor, enquanto em estiletos ocos, o tubo polínico percorre o exsudato mucilagínoso que preenche o canal estilar. No ovário, um ou mais óvulos estão ligados à placenta, que, em algumas espécies, forma uma estrutura especializada – o obturador – responsável pela condução do tubo polínico até a micrópila. Ao penetrar o óvulo, o tubo polínico descarrega os gametas que vão participar da dupla fertilização (Maheshwari 1950, Cocucci & Mariath 2004, Lersten 2004).

Na interação pólen-pistilo, reações de incompatibilidade podem ocorrer: no estigma, durante hidratação e germinação do grão de pólen; no estilete, durante o crescimento do tubo polínico; no ovário ou no óvulo, prevenindo a auto-fertilização. Estas reações de auto-incompatibilidade podem ser de origem esporofítica, quando determinadas pelo genótipo diplóide da planta parental, ou gametofítica, quando determinadas pelo genótipo haplóide do gametofito masculino (grão de pólen) (Heslop-Harrison & Shivanna 1977, Dixit & Nasrallah 2001, Wheeler *et al.* 2001, Lersten 2004).

Geralmente, a presença de estigma seco e grão de pólen triclular está associada à auto-incompatibilidade esporofítica e a inibição ocorre na interface pólen-estigma, como descrito principalmente para Brassicaceae e Asteraceae (Heslop-Harrison & Shivanna 1977). Já o sistema de auto-incompatibilidade gametofítico é encontrado frequentemente em espécies com estigma úmido e grão de pólen biclular, com a inibição do crescimento do tubo polínico no estilete ou no ovário. Representantes de Solanaceae, Leguminosae, Liliaceae, Rosaceae e Onagraceae são exemplos dessa relação (Heslop-Harrison & Shivanna 1977).

O comportamento do tubo polínico durante seu crescimento pelo pistilo apresenta variações em diferentes grupos. Ele pode penetrar a cutícula de um estigma seco, crescer pela parede da célula

papilosa até alcançar o tecido transmissor e, então, crescer pelos espaços intercelulares, como em *Brassica oleracea* (Elleman *et al.* 1988, Elleman & Dickinson 1990, 1999) e *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) (Elleman *et al.* 1992) e *Cichorium intybus* (Asteraceae) (Erbar 2003). O tubo polínico também pode crescer em meio mucilaginoso produzido pelas células de um estigma úmido e pelas células do tecido transmissor do canal estilar, como em *Grevillea banksii* (Proteaceae) (Herscovitch & Martin 1990), *Campanula rotundifolia* (Campanulaceae) (Erbar 2003) e *Polygala vayredae* (Polygalaceae) (Castro *et al.* 2009).

O papel do estilete na interação pólen-pistilo é bastante relevante. O estilete aumenta a distância entre o polinizador e o ovário, evitando danos aos óvulos. É uma região de possível interrupção do crescimento de tubos polínicos incompatíveis que conduz os tubos polínicos até os óvulos pelo tecido transmissor, e além disso, provê um meio de seleção dos tubos polínicos mais aptos (Lersten 2004). O estilete e o ovário possuem uma arquitetura própria para conduzir os tubos polínicos até os óvulos, além de fornecer moléculas adesivas que mantêm o tubo polínico no caminho correto (Johnson & Lord 2006). Além disso, a função quimiotrópica do estilete e do ovário em relação ao tubo polínico também tem sido investigada em espécies modelo como *Arabidopsis thaliana* (Palanivelu *et al.* 2003, Johnson & Lord 2006) e *Lilium longiflorum* (Kim *et al.* 2003).

Em geral, são reconhecidas quatro regiões em um tubo polínico: uma região apical, contendo pequenas vesículas com precursores para a formação da parede celular; uma região subapical, rica em mitocôndrias, dictiossomos, retículo endoplasmático e citoesqueleto; uma região que carrega o núcleo da célula vegetativa e as células espermáticas; e uma região vacuolada. Com o crescimento do tubo polínico, ocorre também a formação de “plugs” de calose que separam a extremidade citoplasmática do restante do tubo (Cresti *et al.* 1977, Malhó 2006).

Muitos estudos têm esclarecido os eventos genéticos da interação pólen-pistilo em espécies consideradas modelo das famílias Brassicaceae (Elleman *et al.* 1988, Elleman & Dickinson 1990, 1999, Luu *et al.* 1999, Dickinson *et al.* 2000, Doughty *et al.* 2000) e Solanaceae (Nasrallah *et al.* 1994,

Hülkamp *et al.* 1995, Kandasamy *et al.* 1999, Lennon *et al.* 1998, Edlund *et al.* 2004). Os aspectos morfológicos da interação pólen-pistilo, no entanto, têm recebido pouca atenção.

Embora Leguminosae inclua cerca de 19 mil espécies (Lewis *et al.* 2005), aspectos morfológicos da interação pólen-pistilo foram descritos apenas para 14 espécies: *Acacia retinodes* (Knox *et al.* 1989), *A. senegal* (Tandon & Shivanna 2001), *Pseudopiptadenia leptostachya* e *P. contorta* (Pires & Freitas 2008) pertencentes à Mimosoideae; *Copaifera langsdorffii* (Freitas & Oliveira 2002) e *Senna sylvestris* (Carvalho & Oliveira 2003) em Caesalpinoideae; *Crotalaria micans* (Etcheverry *et al.* 2003), *Glycine max* (Tilton *et al.* 1984), *Medicago sativa* (Martin 1914), *Trifolium pratense*, *T. hybridum*, *T. repens* (Martin 1914, Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1983), *Vicia americana* (Martin 1914) e *Vicia faba* (Lord & Heslop-Harrison 1984) dentro de Papilionoideae.

Leguminosae é uma família interessante a ser considerada no aspecto da interação pólen-pistilo, devido a sua riqueza de espécies (Lewis *et al.* 2005), ao número elevado de espécies auto-incompatíveis (Arroyo 1981) e ao relato na literatura de um tipo intermediário de estigma (Lersten 2004). Este tipo de estigma é caracterizado pela presença de células secretoras, exsudato abundante e revestimento constituído por cutícula e/ou película protéica, que pode ser rompida pela pressão exercida pelo exsudato estigmático ou pelo atrito com um polinizador. Por possuir características de ambos os tipos de estigma, seco e úmido, Lersten (2004) considerou-o como um tipo intermediário, com base nos trabalhos em *Trifolium pratense* (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1983), *Vicia faba* (Lord & Heslop-Harrison 1984) e *Glycine max* (Tilton *et al.* 1984).

Um estigma semelhante, com características entre seco e úmido também foi descrito por Paulino (2008) em um estudo sobre o desenvolvimento floral em três espécies neotropicais de *Indigofera* (*I. lespedezioides* Kunth., *I. spicata* Forsslk. e *I. suffruticosa* Mill.). Este gênero pertencente à subfamília Papilionoideae, apresenta representantes herbáceos e arbustivos e é considerado o terceiro maior em número de espécies de Leguminosae, com cerca de 750 representantes (Polhill 1981). É o único gênero da tribo Indigofereae encontrado no Brasil (Polhill 1981, Schrire 2005), sendo relatadas

13 espécies brasileiras (Miotto & Iganci 2010). Seus representantes produzem muitos frutos e sementes, sendo amplamente distribuídos em margens de estradas e campos gramíneos (Allen & Allen 1981), em áreas de borda de Cerrado e em terrenos baldios (Moreira & Tozzi 1997). A maioria das espécies é descrita como melitófila (Polhill 1981, Eardley 2004, Albuquerque *et al.* 2007, Gemmill-Herren 2007), com registros de visitas por abelhas dos gêneros *Trigona* e *Nomia* em *I. endecaphylla* (Heard 1999), *Centris* em *I. lespedezioides* (Boff 2008) e *Megachile* em *I. suffruticosa* (Kato *et al.* 2008). Registro antigo de cleistogamia em *I. spicata* (Hutton 1960) merece ser destacado.

Paulino (2008) considerou o estigma encontrado em *I. lespedezioides*, *I. spicata* e *I. suffruticosa* como semi-seco e observou que a ausência de frutos derivados de testes controlados de autopolinização espontânea sugere que, embora a disposição de anteras e estigma permitisse a deposição de grãos de pólen no estigma de uma mesma flor, estes não germinam devido à barreira cuticular do estigma ou à existência de mecanismos de auto-incompatibilidade nas espécies.

Diante de resultados tão interessantes sobre este gênero, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a morfologia (estrutural e ultra-estrutural) da interação pólen-pistilo em quatro espécies de *Indigofera* filogeneticamente próximas (Schrire *et al.* 2009) e neotropicais (Bentham 1859): *I. hirsuta* L., *I. lespedezioides* Kunth., *I. suffruticosa* Mill. e *I. truxillensis* Kunth. Pretende-se comparar o comportamento do grão de pólen e do tubo polínico no pistilo, após testes de autopolinização e polinização cruzada induzidas, em especial no estigma caracterizado como semi-seco. Além disto, os resultados sobre os experimentos de autopolinização espontânea em *I. lespedezioides* e *I. suffruticosa*, encontrados previamente por Paulino (2008), serão checados e ampliados.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Espécies estudadas

Foram utilizados quatro indivíduos por espécie, cultivados no viveiro de plantas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP). Materiais testemunha foram depositados no herbário da Universidade de São Paulo (SPFR), sob os seguintes registros: S. P. Teixeira s/n (SPFR 7920); M. S. Ogasawara s/n (SPFR 9926); S. P. Teixeira s/n (SPFR 7921); S. P. Teixeira s/n (SPFR 7922), referentes a *Indigofera hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*, respectivamente.

Seguem abaixo as descrições e distribuições geográficas de *I. hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* (Eisinger 1987, Moreira & Tozzi 1997 e Tropicos 2011).

Entre as quatro espécies estudadas, *I. hirsuta* é a única herbácea e distingui-se por seu indumento densamente composto por tricomas bifurcados, retos e eretos e por apresentar inflorescências com o comprimento maior do que o comprimento de suas folhas. *Indigofera lespedezioides* destaca-se entre as arbustivas por apresentar folhas contendo a partir de três folíolos e inflorescências com o comprimento equivalente ao comprimento de suas folhas. Quanto a *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*, consideradas anteriormente como sinônimos (White 1980), apresentam diferenças, principalmente, quanto ao formato do fruto, curvo em *I. suffruticosa* e reto em *I. truxillensis*, e quanto à presença de tricomas em ambas as faces nos folíolos de *I. truxillensis*. Se comparadas às demais, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* distinguem-se por apresentarem inflorescências com o comprimento menor do que o comprimento de suas folhas.

As espécies de *Indigofera* estudadas ocorrem predominantemente em Cerrado, campos limpo e sujo e terrenos baldios. São encontradas nas Américas Central e Sul e, no caso de *I. hirsuta* e *I. suffruticosa*, ocorrem ainda na África, Ásia e Austrália. No Brasil, ocorrem principalmente nas regiões

Centro-Oeste e Sudeste, havendo registros de *I. lespedezioides* e *I. suffruticosa* também nas regiões Nordeste e Sul e, de *I. suffruticosa* na região Norte.

2. Grão de pólen: forma, status cito-fisiológico e presença de “pollenkitt”

Para caracterizar a forma do pólen no momento de sua apresentação, avaliar o status cito-fisiológico e detectar a presença de “pollenkitt”, grãos de pólen removidos de anteras deiscentes foram submetidos, imediatamente após a coleta, a testes em óleo de imersão, água, e Sudan III e montados entre lâmina e lamínula para observação em microscópio de luz (Dafni *et al.* 2005, Pacini *et al.* 2006). Para confirmar a presença de “pollenkitt”, grãos de pólen de anteras deiscentes foram coletados e espalhados em uma lâmina limpa com clorofórmio. Em seguida, foram removidos da lâmina por meio de leves assopros e as lâminas foram observadas em microscópio de luz (Pacini & Hesse 2005).

Para discutir a relação da longevidade do pólen (ortodoxo – mais longo ou recalcitrante – menos longo) com a longevidade floral, cinco inflorescências de cada indivíduo (quatro indivíduos por espécie, totalizando 20 inflorescências) foram selecionadas. Em cada uma delas, um botão em pré-antese foi marcado e observado diariamente, no início da manhã, ao meio-dia e ao final da tarde, até a senescência floral, com queda de todas as pétalas.

3. Polinizações induzidas

Experimentos controlados de polinizações foram realizados a fim de fornecer materiais para análise da germinação do pólen e do crescimento do tubo polínico em microscopias de luz transmitida (anatomia e localização de substâncias) e eletrônicas de varredura (exame de superfície) e transmissão (ultra-estrutura). Três tipos de testes foram realizados: autopolinização espontânea (APE), autopolinização induzida (AP - mesma flor e mesmo indivíduo) e polinização cruzada intra-específica (PC - entre indivíduos da mesma espécie).

3.1. Autopolinização espontânea: Em cada indivíduo (total de quatro indivíduos por espécie), cinco inflorescências inteiras, contendo apenas botões florais em um estágio final da pré-antese (indicado pelas pétalas róseas), foram isoladas com sacos de exclusão de malha fina e observadas diariamente com o objetivo de monitorar o momento da antese e a formação de frutos. Para checar a deposição de pólen no estigma de flores submetidas ao teste de autopolinização espontânea, estigmas foram removidos de algumas flores previamente ensacadas, montados entre lâmina e lamínula utilizando-se Carmin Acético 1% (Medina & Conagin 1964) e observados em microscópio de luz.

3.2. Autopolinização induzida e polinização cruzada manual: Devido à dificuldade de manipulação das flores, os experimentos de polinização para a visualização do crescimento do tubo polínico foram realizados em meio de cultura. Botões em pré-antese foram coletados na fase em que o estigma ainda não estava receptivo (cutícula estigmática intacta e exsudato estigmático não liberado) e as anteras estavam próximas do momento da deiscência, colocados em placas de Petri com ágar 20% e mantidos em temperatura ambiente. Após 24h, as flores em início de antese foram polinizadas com seus próprios grãos de pólen e mantidas nas mesmas condições. A fim de prevenir a limitação da fecundação devido à quantidade de pólen depositada, a superfície estigmática foi totalmente coberta com pólen. Os pistilos foram removidos das flores 6, 12, 24, 48 e 60h após a polinização e, então, fixados em FAA 50 (Johansen 1940) ou em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965).

O mesmo procedimento foi adotado nas autopolinizações realizadas com grãos de pólen de outras flores do mesmo indivíduo e polinizações cruzadas, exceto pela remoção das anteras (emasculação) antes da polinização para garantir a ausência de pólen da mesma flor na superfície estigmática. Os pistilos polinizados foram removidos e igualmente fixados.

Os testes de autopolinização e polinização cruzada foram realizados uma vez por indivíduo (5 flores por tratamento, 3 tipos de tratamento, total de 15 flores por indivíduo).

Para confirmar a emissão do tubo polínico, a penetração do tubo polínico no óvulo e o tempo gasto pelo tubo polínico para atingir o óvulo, pistilos de flores polinizadas foram amolecidos e

clareados em hidróxido de sódio (20%) à temperatura de 60°C, por um período de 20 a 40 minutos, lavados em água destilada, montados entre lâmina e lamínula em Azul de Anilina (0,1%) em tampão K_3PO_4 (0,1M) (Martin 1959) e observados em microscópio de luz incidente (epifluorescência) Leica DM 5000 B, com filtro A (360 a 470 nm).

4. Exame de superfície

Para a descrição da morfologia externa de estigma, grão de pólen e tubo polínico, botões em um estágio final da pré-antese e flores não polinizadas, autopolinizadas e submetidas à polinização cruzada foram dissecados em estereomicroscópio, sendo pistilos e anteras fixados em FNT (Formalina Neutra Tamponada) por 24 a 48 h (Lillie 1954). Posteriormente, o material foi desidratado em série etanólica, submetido ao ponto crítico em um aparelho Bal-Tec CPD 030, montado em suporte metálico sobre fita adesiva de carbono e metalizado com ouro no aparelho Bal-Tec SCD 050. As observações foram realizadas nos microscópios eletrônicos de varredura Jeol JSM 5200 (câmera Jeol MP) e Shimadzu SS-550 (câmera digital), localizados, respectivamente, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

5. Exames anatômico e ultra-estrutural

A fim de avaliar a morfologia interna do estigma, do grão de pólen depositado no estigma e após germinação, do tubo polínico no estilete e no ápice do ovário, botões em um estágio final da pré-antese (pétalas róseas) e flores não polinizadas, autopolinizadas e submetidas à polinização cruzada foram dissecados em estereomicroscópio, sendo pistilos e anteras fixados em solução de Karnovsky em tampão fosfato 0,075 M (pH 7,2-7,4) por 24 h, lavados em tampão fosfato 0,075 M (pH 7,2-7,4) (Karnovsky 1965), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,075 M (pH 7,2-7,4) por 1 h, desidratados gradativamente em solução de acetona e incluídos em Araldite 6005.

Seções semifinas (0,5 µm) foram obtidas em ultramicrotomo Leica Reichert e coradas com Azul de Toluidina 0,05% (O'Brien *et al.* 1964). A fim de caracterizar o exsudato estigmático e o tipo de reserva polínica, foram utilizados os corantes Aniline Blue Black (Fisher 1968), Sudan Black B (Jensen 1962) e a Reação de PAS (O'Brien & McCully 1981) para detectar proteína, óleo e polissacarídeos totais, respectivamente. Fotomicrografias foram obtidas em um Fotomicroscópio Leica DM 4500 B com escalas nas mesmas condições ópticas.

Seções ultrafinas (60 nm) foram obtidas em ultramicrotomo Leica Reichert, contrastadas com solução de Acetato de Uranila 2% por 15 minutos (Watson 1958) e Citrato de Chumbo por 15 minutos (Reynolds 1963), observadas e documentadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips EM 208, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

6. Terminologia para grão de pólen

A terminologia adotada para descrever a estratificação da exina seguiu Hesse *et al.* (2009). Quanto à classificação do grão de pólen com relação ao seu status hídrico, denomina-se ortodoxo o grão de pólen com um conteúdo hídrico inferior a 30% e, recalcitrante, o grão de pólen com um conteúdo hídrico superior a 30% (Pacini *et al.* 2006 e Pacini 2010)

RESULTADOS

Indigofera lespedezioides, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* são perenes e arbustivas, enquanto *I. hirsuta* é herbácea (trepador/prostrado) com ciclo de vida curto (poucos meses a um ano) (Tab. 1). As flores estão organizadas em racemos, são papilionáceas, zigomorfas, pentâmeras, completas, perfeitas, possuem cerca de 5,0 a 8,0 mm de comprimento e apresentam guia de néctar no estandarte. A coloração do guia de néctar varia entre as espécies (Tab. 1). A longevidade floral é menor em *I. suffruticosa* comparada à das demais espécies (Tab. 1).

O androceu é diadelfo com filetes longos e curtos alternados, com filetes unidos formando um tubo ao redor do pistilo (Fig. 1). As anteras são livres, elípticas, amareladas, com conectivo apendiculado e deiscência longitudinal. São posicionadas ao redor do estigma, na mesma altura, no caso de *I. hirsuta* (Fig. 1 A), ou logo abaixo, como ocorre em *I. lespedezioides* (Fig. 1 B), *I. suffruticosa* (Fig. 1 C) e *I. truxillensis* (Fig. 1 D).

Morfologia do pistilo

Indigofera hirsuta, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* apresentaram resultados semelhantes para características morfológicas e anatômicas do pistilo.

O estigma de botões em pré-antese apresenta células secretoras revestidas por cutícula fina (Figs. 2 A, C; 3 A, C; 4 A, C; 5 A, C; 6). Tricomas tectores unicelulares circundam o estigma em sua porção basal e, durante a antese, após o rompimento da cutícula e consequente liberação do exsudato, a extremidade apical destes tricomas volta-se para o interior do estigma, aparentemente auxiliando a permanência do exsudato e dos grãos de pólen na superfície estigmática (Figs. 2 A, B; 3 A, B; 4 A, B; 5 A, B). O exsudato estigmático é abundante, de natureza mista, com resultados positivos para substâncias hidrofílicas e lipofílicas, apresentando gotas electrón-densas dispersas num material floculado (Fig. 6). Este exsudato acumula-se nos espaços intercelular e subcuticular (Figs. 2 C, 3 C, 4

C, 5 C) até o rompimento da cutícula. As células estigmáticas secretoras apresentam núcleo conspícuo, amiloplastos, mitocôndrias e vacúolos (Fig. 7), sendo o processo de secreção holócrino (Figs. 2 C, D; 3 C, D; 4 C, D; 5 C, D). A cutícula, por sua vez, não contém poros, é contínua e retém o exsudato (Fig. 6).

O estilete é curvo, em sua porção apical, e oco, com canal de diâmetro menor na porção apical, aumentando gradativamente em direção à porção basal (Fig. 8). Apresenta epiderme uni-estratificada, composta por células cúbicas, alongadas no sentido longitudinal (Figs. 9 A, B) e, em sua maioria, com conteúdo fenólico (Fig. 9 B). O córtex é composto por células parênquimáticas alongadas, porém, mais estreitas e vacuoladas que as células epidérmicas e que não apresentam conteúdo fenólico (Fig. 9 C). A porção inicial do tecido transmissor, logo abaixo ao estigma, é sólida (Figs. 8, 9 A), sendo que os espaços entre as células do tecido transmissor aumentam gradativamente resultando em um canal na porção oca do estilete (Figs. 9 C, D). O canal estilar é revestido por células do tecido transmissor, que apresentam citoplasma denso além de núcleo central e grande em relação ao das demais células do estilete (Figs. 9 E, F).

O ovário é súpero e unilocular (Fig. 8), contendo de 4 a 10 óvulos (Fig. 10 F) com placentação submarginal. A epiderme externa do ovário apresenta de um a dois estratos, compostos por células cúbicas, a maioria com conteúdo fenólico. O mesofilo ovariano é constituído por células parenquimáticas com vacúolos grandes e citoplasma parietal (Fig. 10 A, C). A epiderme interna do ovário compreende um estrato composto por dois tipos celulares. Na região dorsal do ovário, as células são semelhantes às que constituem o mesofilo, enquanto na região ventral, onde os óvulos estão inseridos, as células da placenta são secretoras. Estas células podem variar quanto ao formato (Tab. 1), de papilado a isodiamétrico em *I. hirsuta*, e de alongado a isodiamétrico em *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*, possuindo núcleo conspícuo, muitos vacúolos pequenos e citoplasma denso (Fig. 10 A, C, E). Após a liberação do conteúdo, estas células apresentam um grande vacúolo central, sendo citoplasma e núcleo periféricos (Fig. 10 B, D).

Morfologia do grão de pólen e do tubo polínico

Resultados semelhantes foram encontrados em *Indigofera hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*. O grão de pólen das quatro espécies é liberado da antera em mônades. Possui formato prolato (alongado no eixo polar), âmbito subtriangular a triangular, três cólporos (com colpos longos), coloração amarelada, pouco “pollenkitt” e exina perfurada (Fig. 11). Uma característica diferente foi observada em *Indigofera lespedezioides* na qual a ornamentação da exina na área polar (apocolpo) apresenta menos perfurações, sendo considerada psilada nessa região (Fig. 11 B). Em todas as espécies é possível visualizar a estratificação da exina em endexina, camada elétron-densa mais interna, e ectexina, camada mais externa composta por “foot layer”, columelas, teto e elementos supratectais (Fig. 12). Apenas em *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* foi identificada uma estratificação na endexina não observada nas demais espécies. (Fig. 12 C, D). Pollenkitt foi observado nos espaços intercolumelares nos grãos de pólen de todas as espécies estudadas (Fig. 12).

O grão de pólen é harmomegático, classificado como parcialmente desidratado ou ortodoxo. No momento de sua apresentação, o eixo polar é maior do que o eixo equatorial, havendo um aumento em seu diâmetro equatorial após a reidratação.

Quanto ao tipo de reserva, polissacarídeos, proteínas e substâncias lipídicas foram detectados no citoplasma da célula vegetativa. A principal diferença na reserva polínica está relacionada à fase do desenvolvimento polínico. No momento anterior a sua liberação da antera, o grão de pólen apresenta grãos de amido (Fig. 13). Durante a antese, apresenta polissacarídeos hidrolisados no citoplasma da célula vegetativa, além de proteínas e grande quantidade de substâncias lipídicas, frequentemente associadas à retículo endoplasmático (Fig. 14).

O tubo polínico no estigma exhibe parede constituída por uma projeção da íntina (Fig. 15), que se torna mais espessa durante o seu trajeto pelo estilete. Nesta região, é possível distinguir dois estratos constituindo a parede do tubo polínico: o externo, composto por substâncias pecto-celulósicas e o

interno, por calose (Fig. 16). Em algumas porções do tubo polínico, há uma deposição maior de calose formando os plugs ou tampões de calose (Fig. 17), que isola o conteúdo citoplasmático na extremidade do tubo onde se encontram o núcleo vegetativo e as células espermáticas. Os tampões de calose foram encontrados por toda a extensão do tubo polínico, desde seu trajeto pelo estigma (Fig. 17 A, B) e, principalmente, na região do estilete (Fig. 17 A, C, D).

Na região mais próxima da extremidade do tubo o citoplasma é granuloso, com mitocôndrias, dictiossomos, retículo endoplasmático e vesículas (Fig 18). Quanto mais distante da extremidade do tubo, menos denso é o citoplasma, que apresenta poucas organelas. Há um aumento na quantidade de vacúolos até que o espaço central, antes ocupado pelo citoplasma, seja preenchido por um grande vacúolo; o citoplasma, contendo poucas mitocôndrias e vesículas, é periférico (Fig. 19).

Interação pólen-pistilo

Os resultados dos testes para autopolinização espontânea foram negativos para *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* (Tab. 1), ou seja, as flores contidas nas inflorescências ensacadas não produziram frutos, mesmo havendo deposição de grãos de pólen na superfície estigmática. Em *I. hirsuta*, 90% das inflorescências ensacadas produziram frutos (Tab. 1).

Grãos de pólen provenientes de autopolinização e polinização cruzada germinaram no estigma em todas as espécies (Figs. 2 B; 3 D; 4 B, D; 5 D; 15), sendo que, cerca de 24h após a polinização, tubos polínicos foram observados penetrando a micrópila (Fig. 20). Além disso, não foram observadas diferenças morfológicas na germinação do grão de pólen e no crescimento do tubo polínico até o óvulo após autopolinização e polinização cruzada.

O grão de pólen é depositado no estigma sobre a cutícula, que impede o contato do pólen com o exsudato produzido pelas células estigmáticas. Após o rompimento da cutícula e o contato com o exsudato estigmático, o grão de pólen se reidrata e germina (Figs. 2 B; 3 D; 4 B; 5 D; 15). O tubo polínico cresce pelo exsudato estigmático, por entre os espaços das células secretoras estigmáticas

(Figs. 2 D; 3 D; 4 D; 5 D), as quais se encontram em processo de degradação, uma vez que a liberação do exsudato é do tipo holócrina (Figs. 2 C, D; 3 C, D; 4 C, D; 5 C, D).

Após percorrer o estigma, o tubo polínico cresce pelos espaços intercelulares das células do tecido transmissor (Figs. 4 D; 9 F), o qual tem início na primeira porção do estilete, considerada sólida (Fig. 4 D; 8; 9 A, 9 F). Após transpor a porção sólida do estilete, o tubo polínico continua percorrendo os espaços entre as células do tecido transmissor (Fig. 9 B) até alcançar o canal estilar (Fig. 9 C, D, E), formado pelo aumento gradativo destes espaços, podendo crescer pelo espaço central (Fig. 9 E) ou pela superfície interna do canal (Fig. 9 D; 17 C, D).

Ao atingir o ovário, o tubo polínico cresce adjacente às células da placenta e penetra a micrópila em direção ao saco embrionário (Fig. 20).

Tabela 1. Principais diferenças encontradas para as espécies estudadas de *Indigofera*.

Espécies	<i>I. hirsuta</i>	<i>I. lespedezioides</i>	<i>I. suffruticosa</i>	<i>I. truxillensis</i>
Ciclo de vida	Curto	Longo	Longo	Longo
Hábito	Herbáceo/trepador, prostrado	Arbustivo, ereto	Arbustivo, ereto	Arbustivo, ereto
Longevidade floral - média, desvio padrão e intervalo de variação (n=5 flores por indivíduo, 20 flores por espécie)	63,6 ± 45,3 12-144 h	111,6 ± 38,8 36-168h	20,4 ± 11,2 4-36 h	49,2 ± 33,2 12-120 h
Coloração do guia de néctar no estandarte	Esbranquiçado	Esbranquiçado	Esverdeado	Esverdeado
% de inflorescências com frutos formados após o teste de autopolinização espontânea (n=5 inflorescências, 4 indivíduos por espécie)	90%	0%	0%	0%
Formato das células secretoras da placenta	Papiloso a isodiamétrico	Alongado a isodiamétrico	Alongado a isodiamétrico	Alongado a isodiamétrico
Estratificação da endexina	Ausente	Ausente	Presente	Presente
Posição das anteras com relação ao estigma	Mesmo nível ou acima	Abaixo	Abaixo	Abaixo

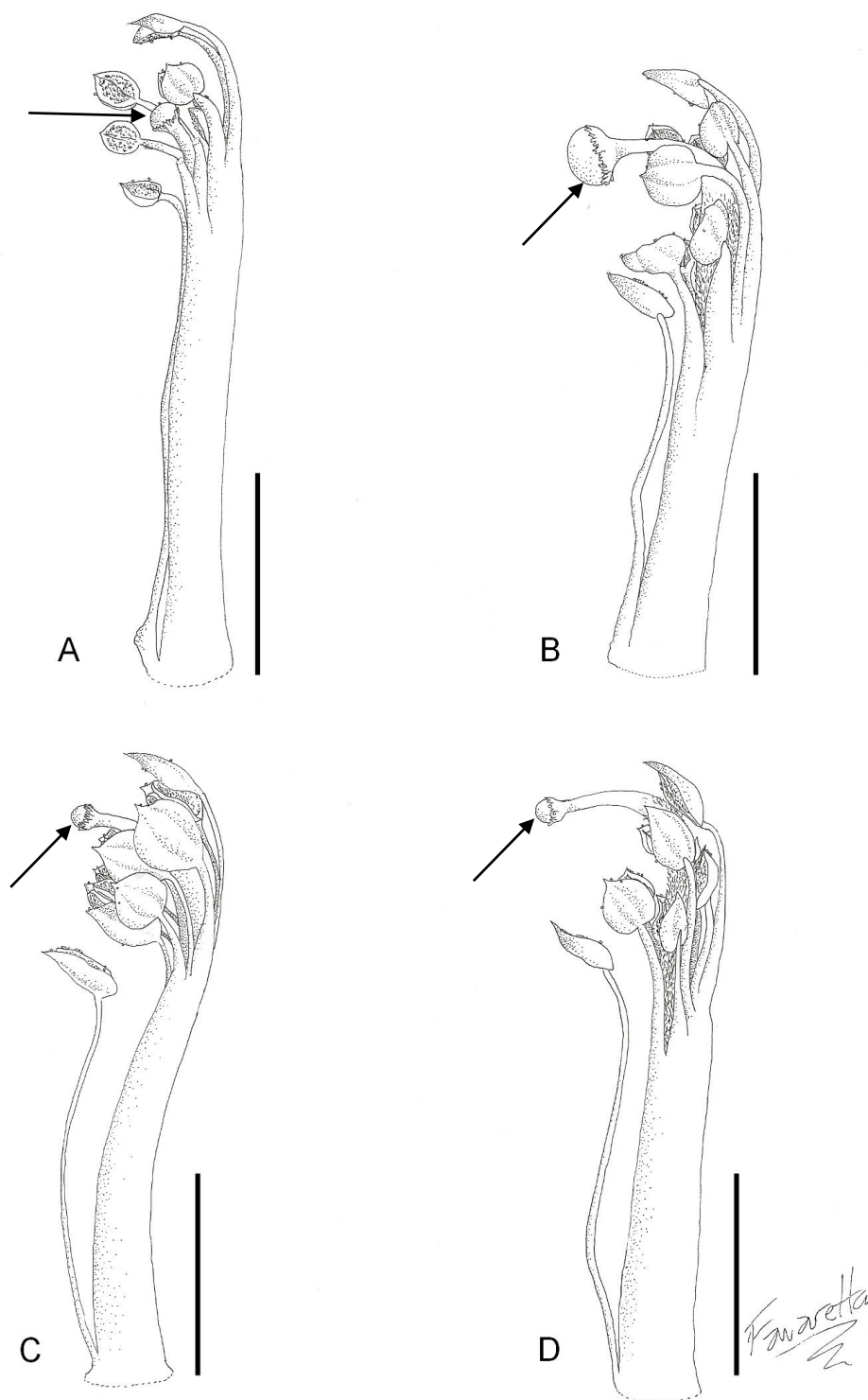


Figura 1. Disposição do androceu em relação ao gineceu em flores de *Indigofera*. **A.** *I. hirsuta*; **B.** *I. lespedezioides*; **C.** *I. truxillensis*; **D.** *I. suffruticosa*. Note a posição do estigma (setas), na altura das anteras deiscuentes em *I. hirsuta* (A), e acima das anteras nas outras espécies (B, C, D). Peças do cálice e da corola removidas. Escalas: 1,5 mm.

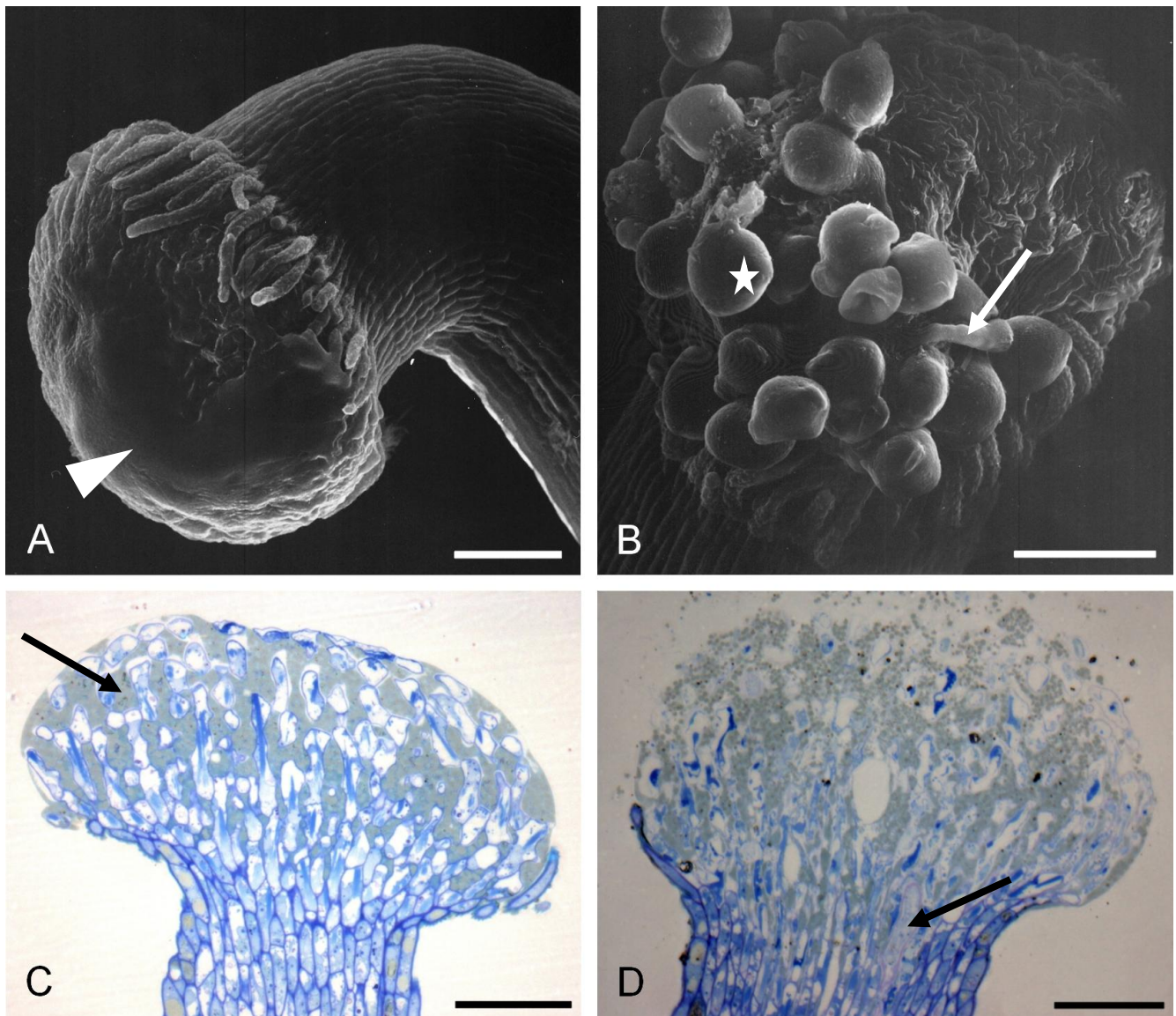


Figura 2. Estigma de botões em pré-antese (A, C) e flores (B, D) de *Indigofera hirsuta* (MEV e ML). **A:** observe a cutícula (cabeça de seta) que reveste o estigma. **B:** note os grãos de pólen (estrela) emitindo o tubo polínico (seta). **C:** observe o exsudato estigmático retido nos espaços intercelulares e subcuticular. **D:** note o tubo polínico (seta branca) entre as células em degradação no estigma e as células do estilete. Escalas: 50 μ m.

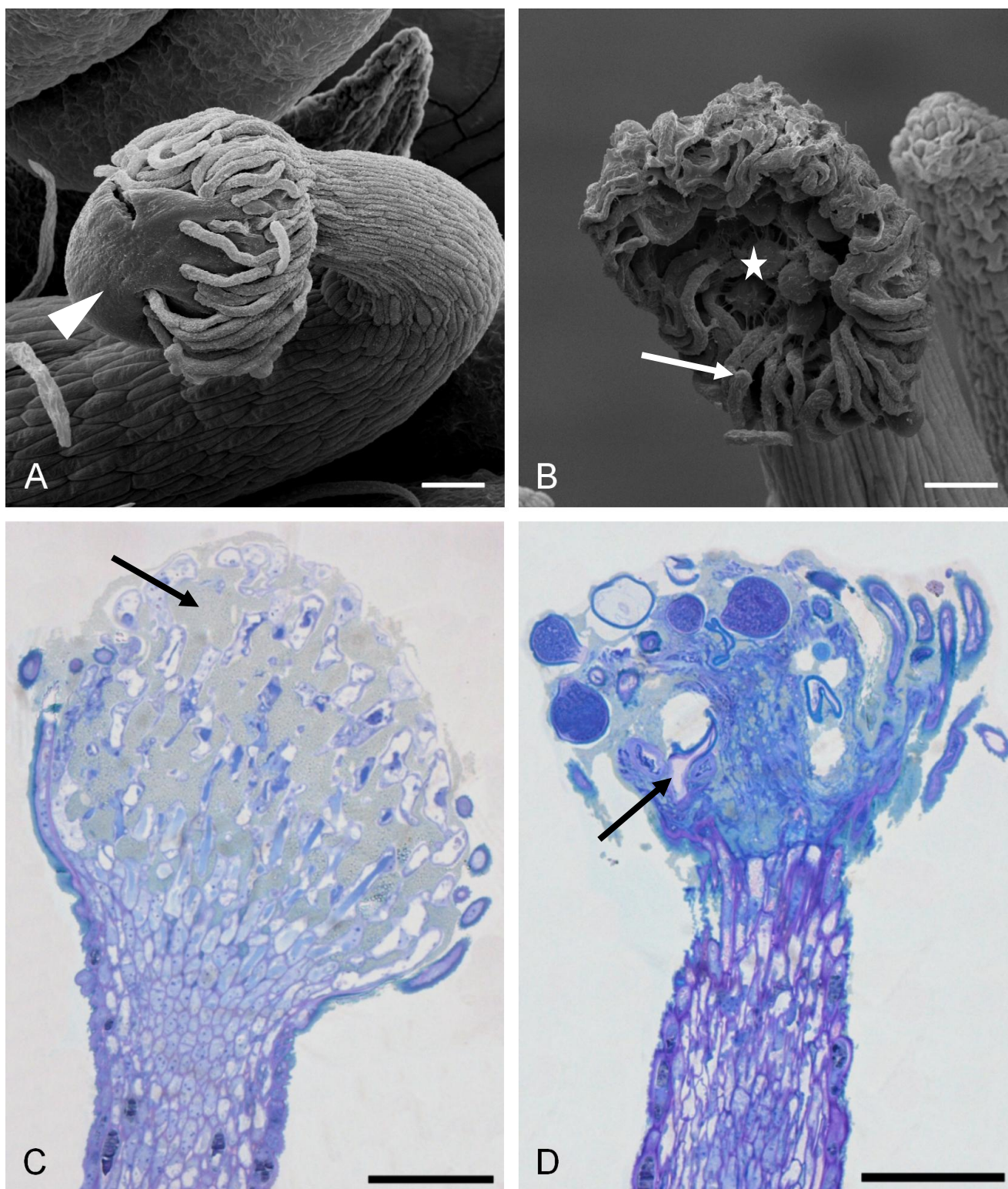


Figura 3. Estigma de botões em pré-antese (A, C) e flores (B, D) de *Indigofera lespedezioides* (MEV e ML). **A:** observe a cutícula (cabeça de seta) que reveste o estigma. **B:** note os grãos de pólen (estrela) retidos pelos tricomas (seta). **C:** observe o exsudato estigmático retido nos espaços intercelulares e subcuticular. **D:** observe o tubo polínico (seta) entre as células em degeneração no estigma. Escalas: A = 20 μm , B = 40 μm ; C, D = 50 μm .

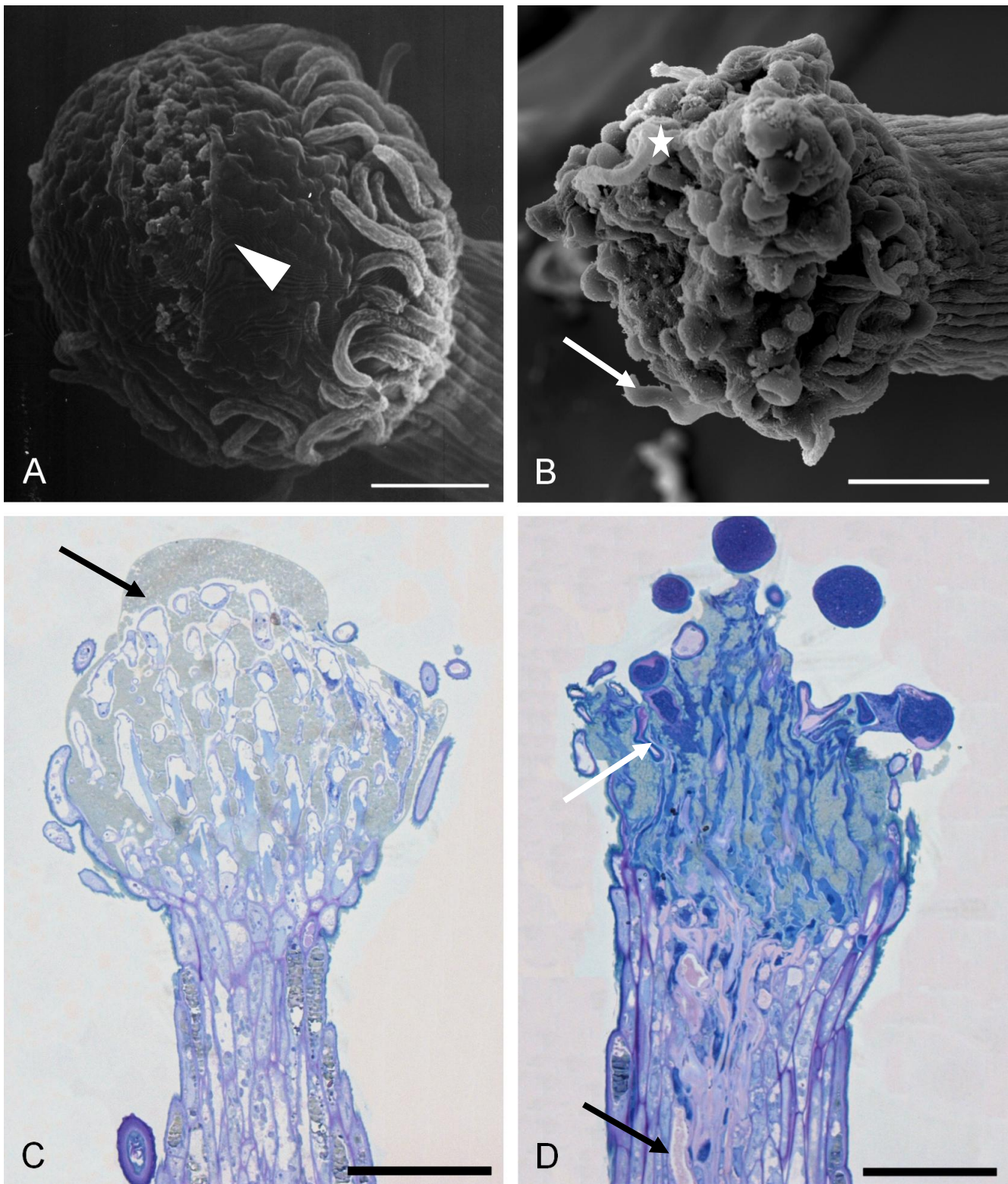
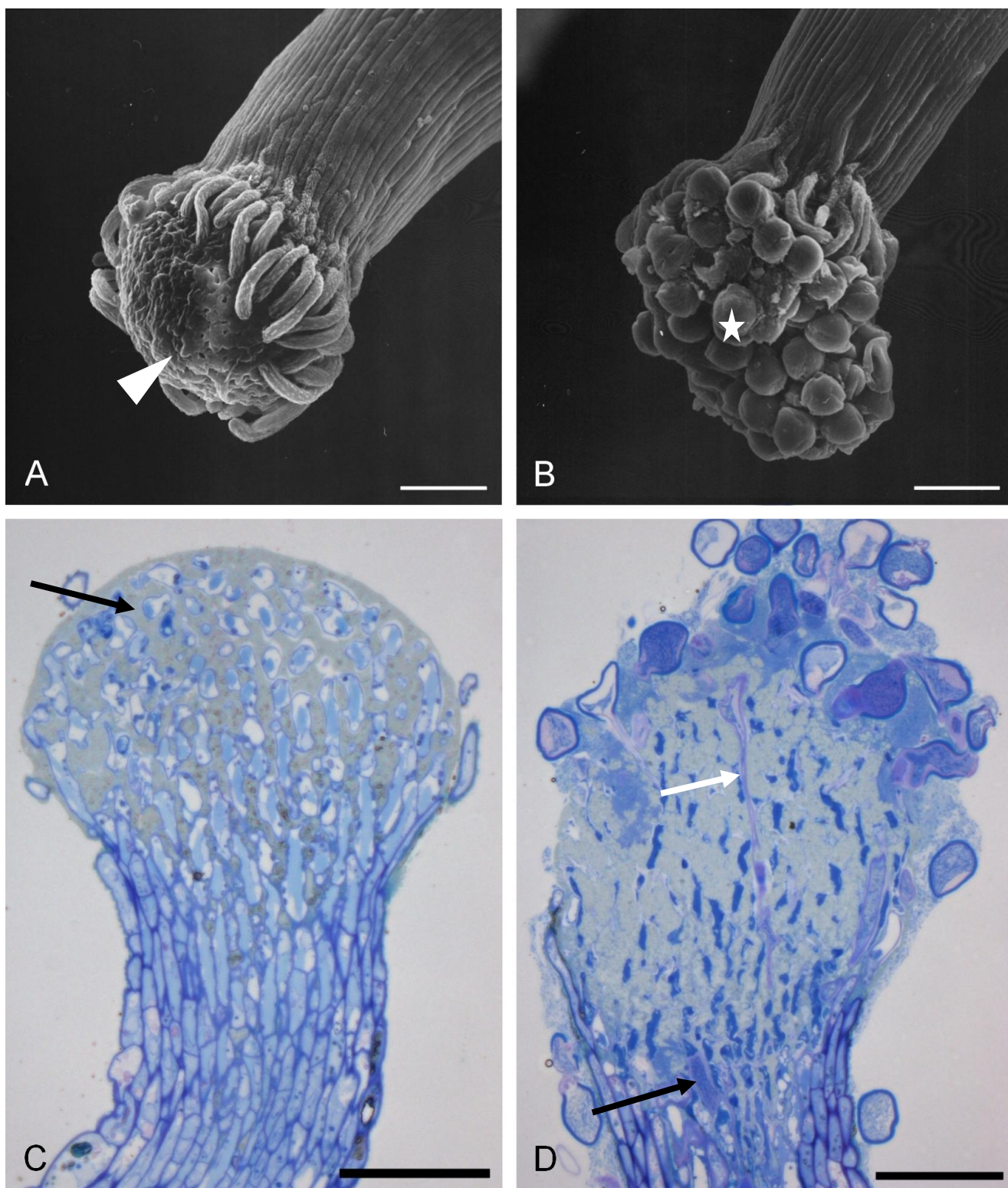


Figura 4. Estigma de botões em pré-antese (A, C) e flores (B, D) de *Indigofera suffruticosa* (MEV e ML). **A:** observe a cutícula (cabeça de seta) que reveste o estigma. **B:** note o grão de pólen (estrela) emitindo o tubo polínico (seta). **C:** observe o exsudato estigmático (seta) retido nos espaços intercelulares e subcuticular. **D:** observe o tubo polínico entre as células em degeneração no estigma (seta branca) e as células do estilete (seta preta). Escalas: 50 μ m.



Figuras 5. Estigma de botões em pré-antese (A, C) e flores (B, D) de *Indigofera truxillensis* (MEV e ML). **A:** observe a cutícula (cabeça de seta) que reveste o estigma. **B:** note o grão de pólen (estrela) aderido ao estigma. **C:** observe o exsudato estigmático retido nos espaços intercelulares e subcuticular. **D:** observe o tubo polínico entre as células em degeneração no estigma (seta branca) e as células do estilete (seta preta). Escalas: 50 μ m.

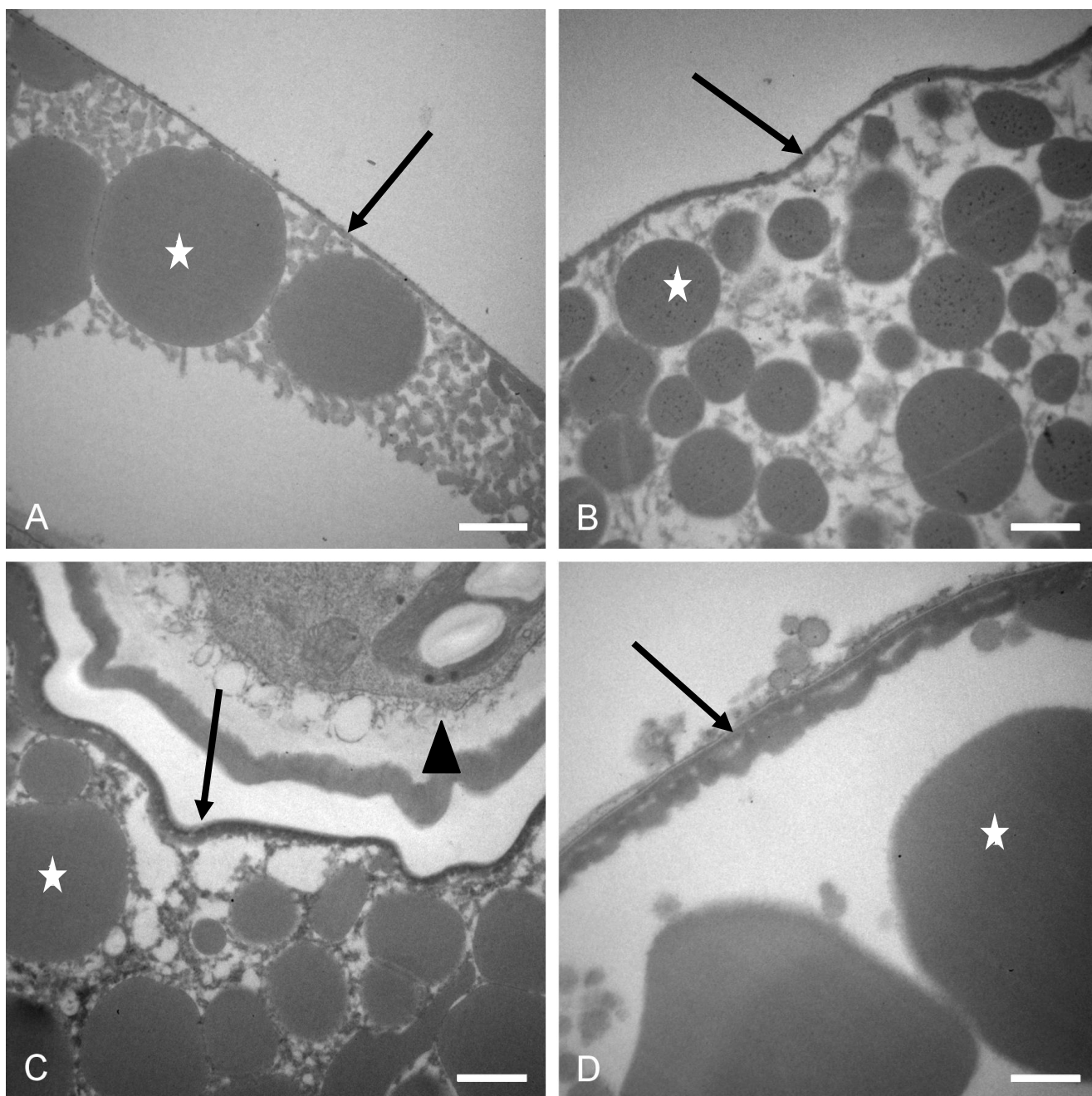


Figura 6. Estigma de botões em pré-antese de *Indigofera* (MET). **A.** *I. hirsuta*; **B.** *I. lespedezioides*; **C.** *I. suffruticosa*; **D.** *I. truxillensis*. Seções longitudinais do estigma evidenciando o exsudato estigmático de natureza mista, com gotas elétron-densas (estrelas) entre material floculado e a cutícula fina e contínua (setas). Note que a pressão exercida pelo exsudato moldou a cutícula (seta) em contato com a parede do tricoma (cabeça de seta). Escalas: 1 μ m.

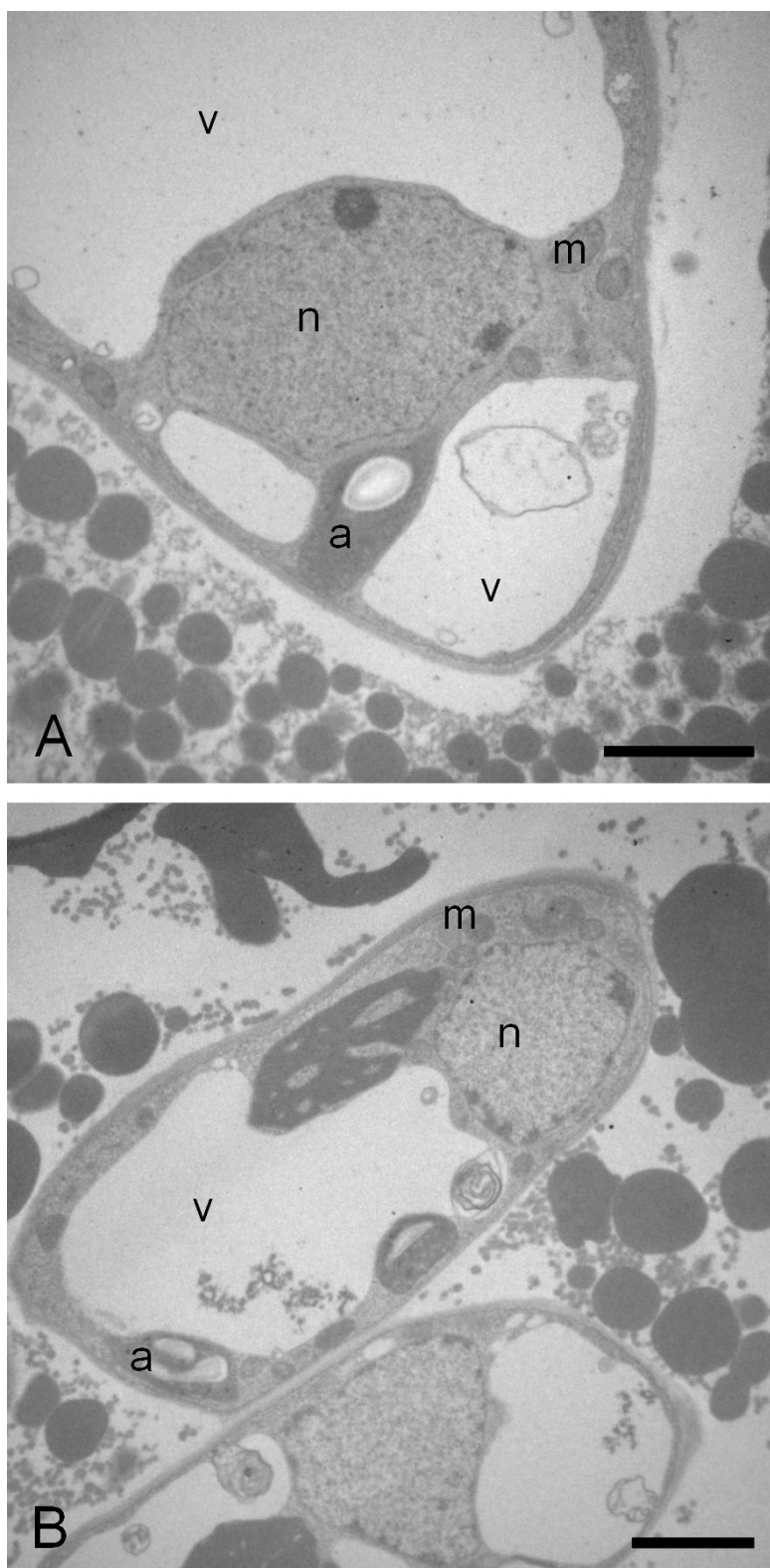


Figura 7. Estigma de botões em pré-antese de *Indigofera* (MET). **A.** *I. lespedezioides*; **B.** *I. truxillensis*. Detalhe da célula secretora estigmática apresentando núcleo conspicuo (n), mitocôndrias (m), amiloplastos (a) e vacúolos (v). Escalas: 3µm.

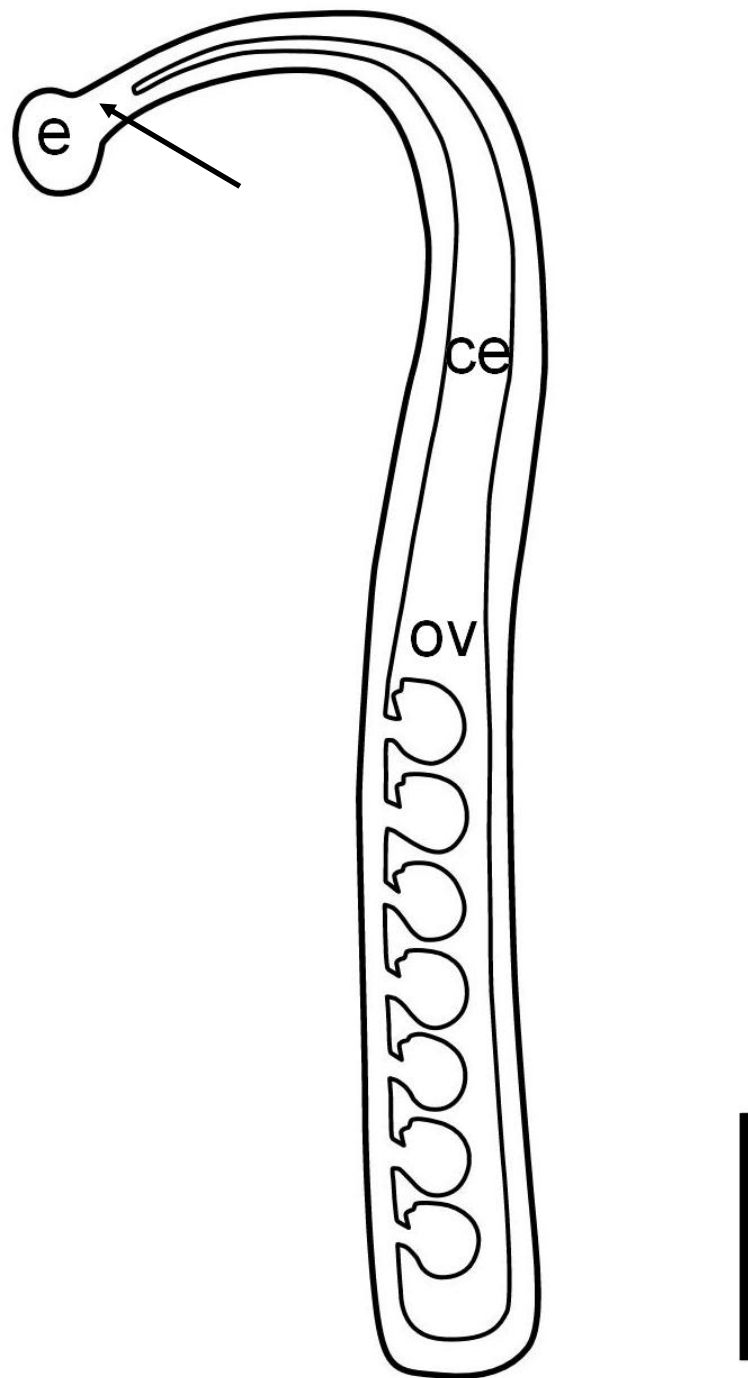


Figura 8. Desenho esquemático do pistilo da flor das espécies estudadas de *Indigofera*. Detalhe do canal estilar (ce) contínuo que liga o estigma (e) ao ovário (ov). Note que a porção inicial do estilete (seta) é sólida e que o canal estilar aumenta gradativamente em diâmetro em direção à porção basal (próxima ao ovário). Escala: 500 μm .

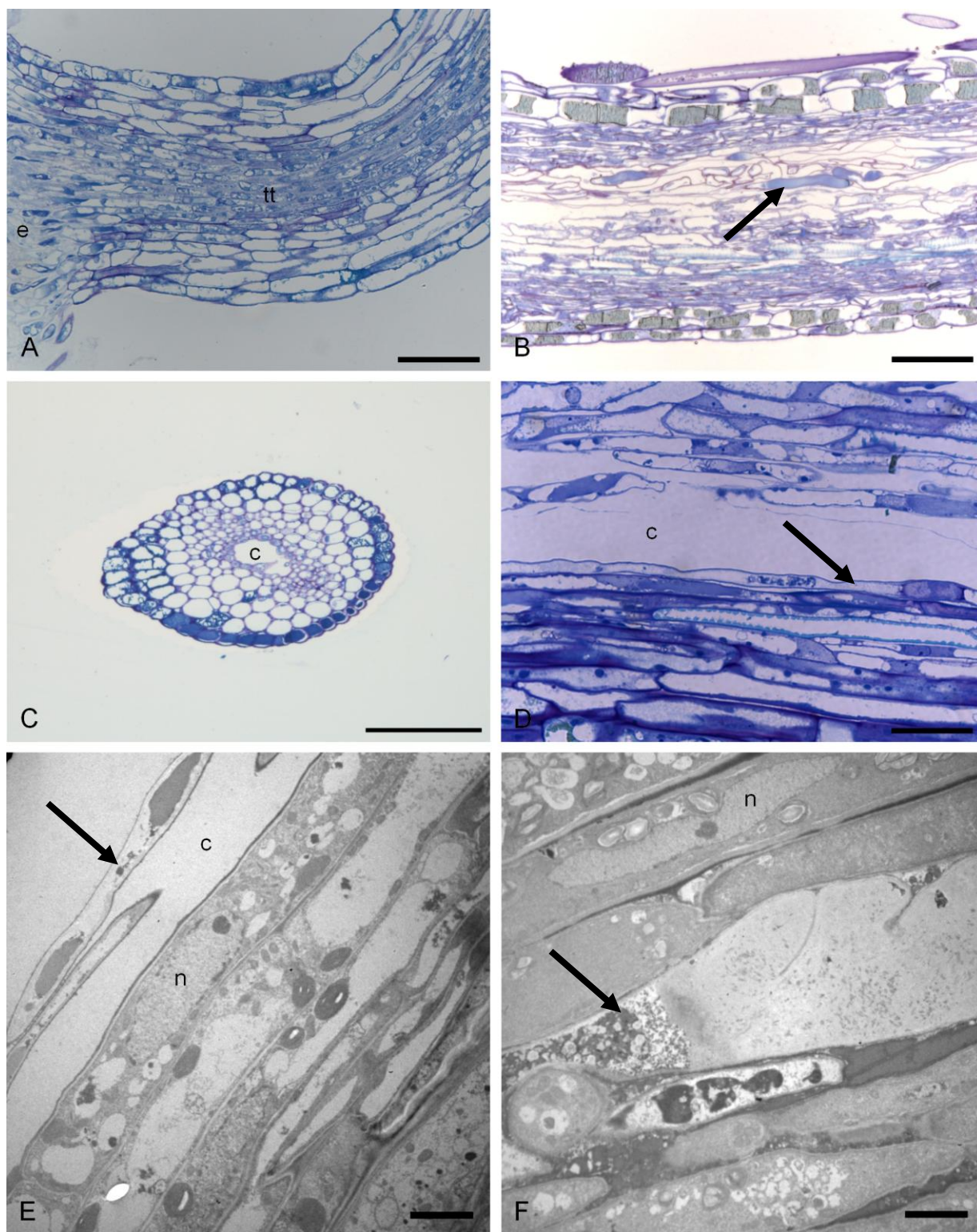


Figura 9. Estilete de flores polinizadas de *Indigofera* (ML e MET). **A.** *I. hirsuta*; **B.** *I. lespedezioides*; **C, E.** *I. suffruticosa*; **D, F.** *I. truxillensis*. Observe o tecido transmissor (tt) abaixo ao estigma (e), na porção sólida do estilete (A) e, delimitando o canal estilar (c), na porção oca do estilete (C). Note o crescimento dos tubos polínicos (setas) pelos espaços intercelulares (B, F) e pela superfície do canal estilar (c) (D, E). Observe as células secretoras do tecido transmissor com núcleo conspicuo e central (n), citoplasma denso com amiloplastos, mitocôndrias e vacúolos (E, F). Escalas: A, B = 50 μ m; C = 100 μ m; D = 20 μ m; E = 5 μ m; F = 3 μ m.

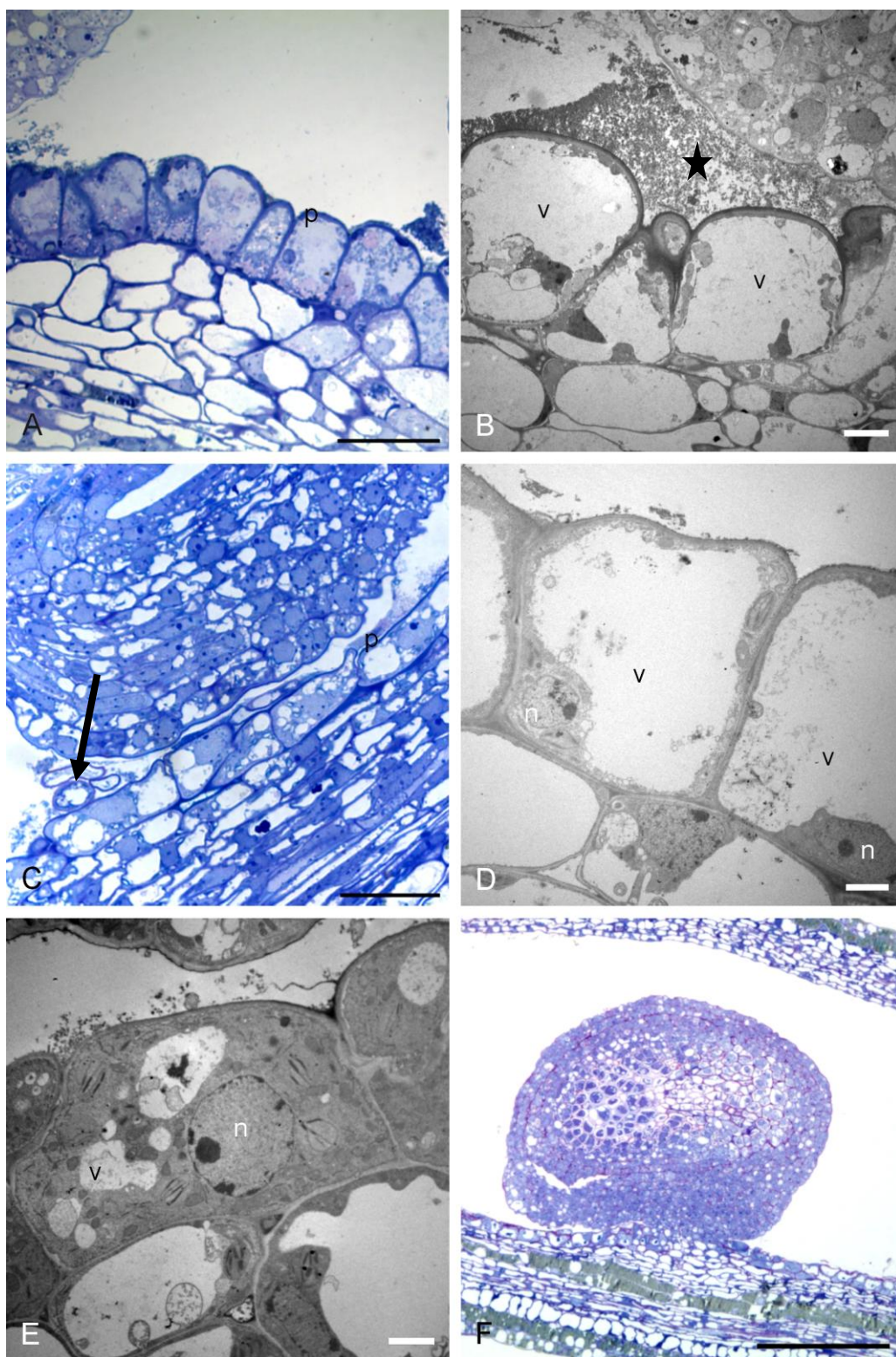


Figura 10. Ovário de flores de *Indigofera* (ML e MET). **A, B.** *I. hirsuta*; **C, D.** *I. lespedezioides*; **E.** *I. suffruticosa*; **F.** *I. truxillensis*. Observe as células secretoras da placenta (p) com o núcleo conspícuo (n), vacúolos (v) e citoplasma denso (A, C, E). Após a secreção, note o vacúolo central (v) e núcleo (n) e citoplasma periféricos (B, D); observe o exsudato (B-estrela). Note os diferentes formatos: papiloso (A, B), alongado (C, E) e cúbico (D). Observe tubos polínicos (seta) próximos à placenta (C) e o óvulo (F). Escalas: A, C = 20 µm; B, D = 3 µm; E = 6 µm; F = 100 µm.

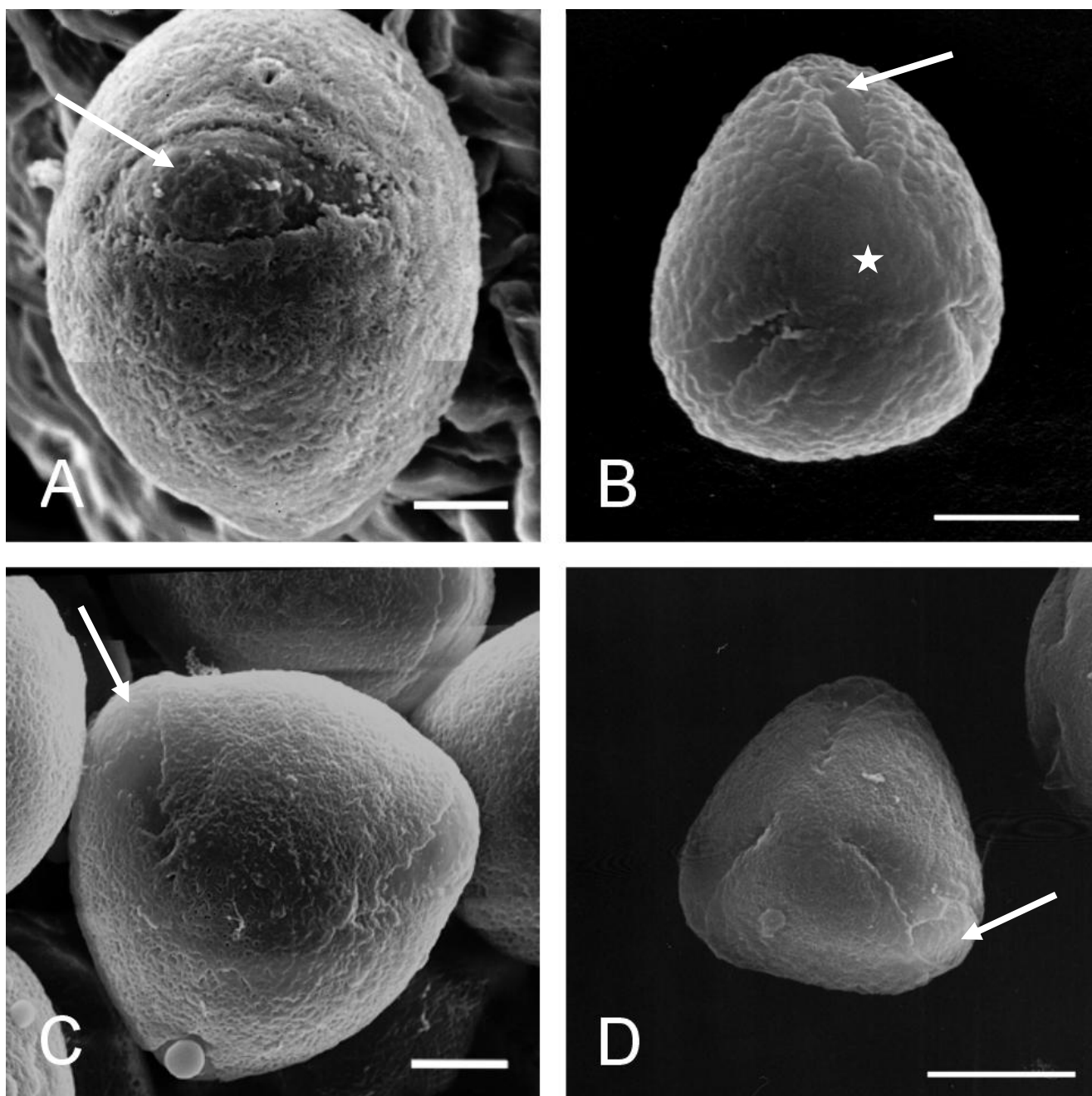


Figura 11. Grão de pólen de flores de *Indigofera* (MEV). **A.** *I. hirsuta*; **B.** *I. lespedezioides*; **C.** *I. suffruticosa*; **D.** *I. truxillensis*. Observe a abertura tipo cólporo (setas) e a ornamentação perfurada da exina. Note a exina mais psilada na região polar (estrela) (B). Escalas: A, C = 5 µm; B, D = 10 µm.

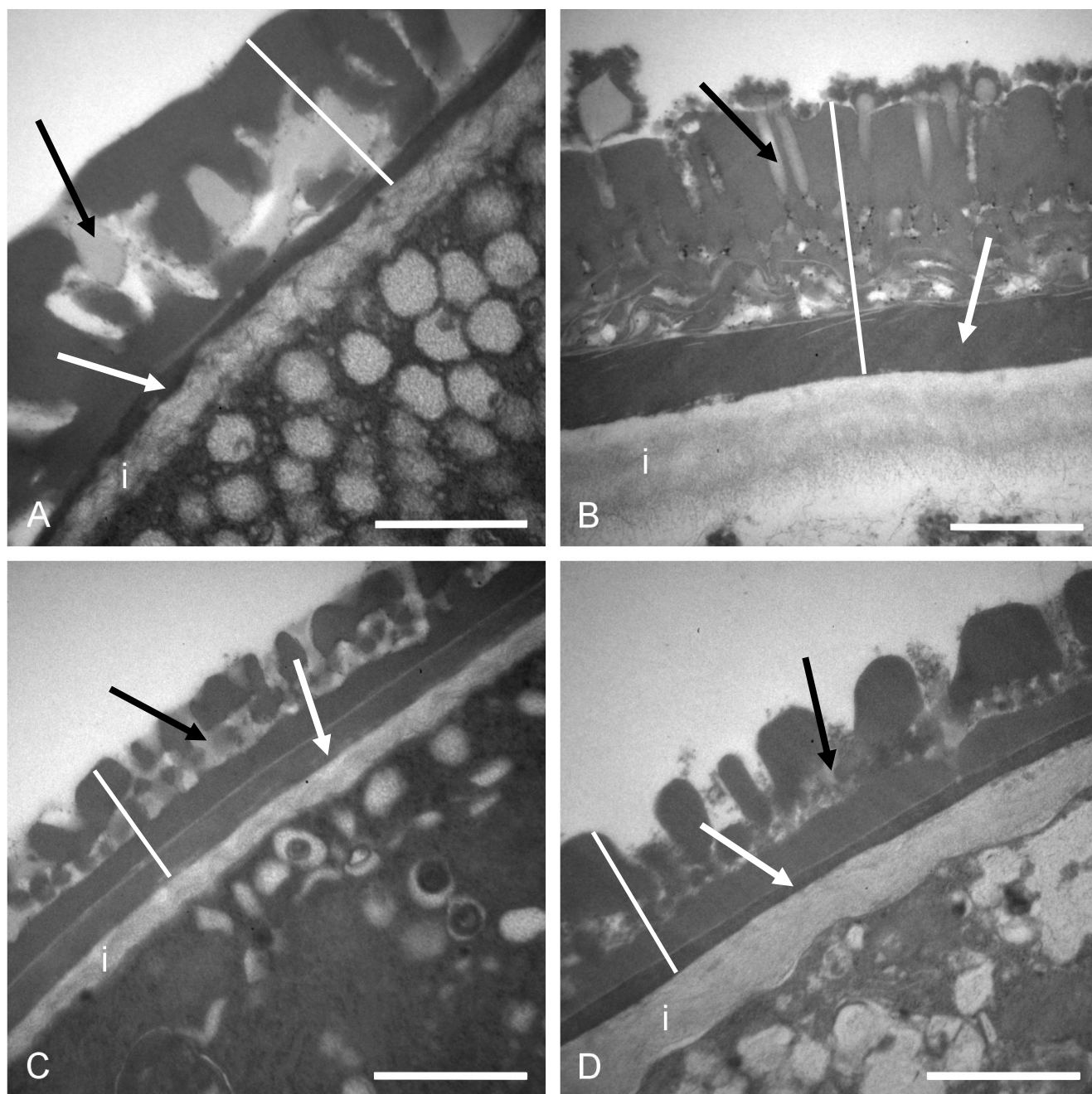


Figura 12. Grão de pólen de flores de *Indigofera* (MET). **A.** *I. hirsuta*; **B.** *I. lespedezioides*; **C.** *I. suffruticosa*; **D.** *I. truxillensis*. Observe o envoltório polínico dividido em intina (i) e exina (barra branca) e o acúmulo de pollenkit nos espaços intercolumnelares (seta preta). Note a estratificação da exina: a endexina (seta branca) é a camada mais interna e a ectexina compreende as camadas acima. Escalas: 1 μ m.

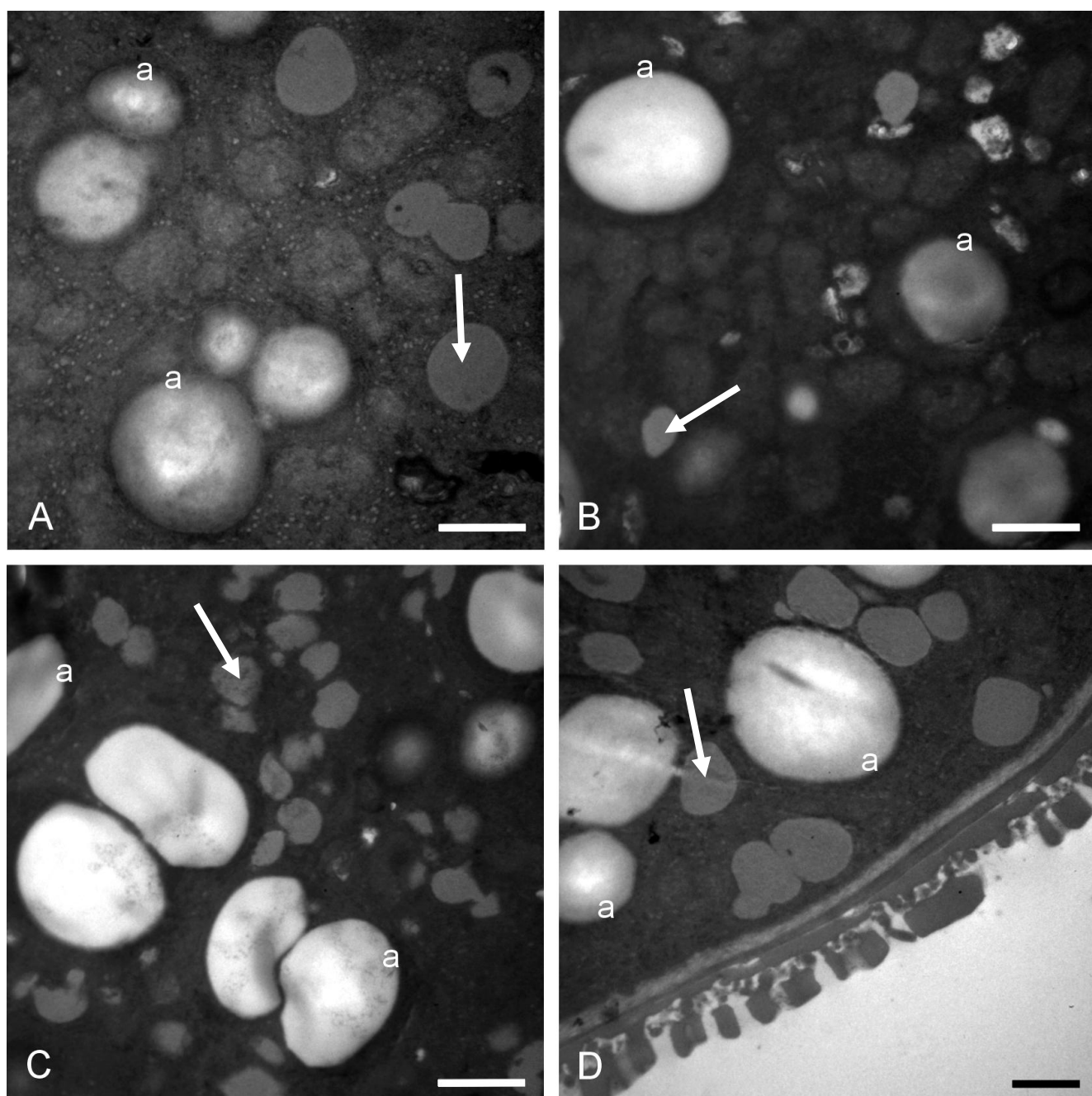


Figura 13. Grão de pólen de botões em pré-antese de *Indigofera* (MET). **A.** *I. hirsuta*; **B.** *I. lespedezioides*; **C.** *I. suffruticosa*; **D.** *I. truxillensis*. Observe o citoplasma da célula vegetativa com amiloplastos (a) e gotas lipídicas (seta branca). Escalas: 1 μ m.

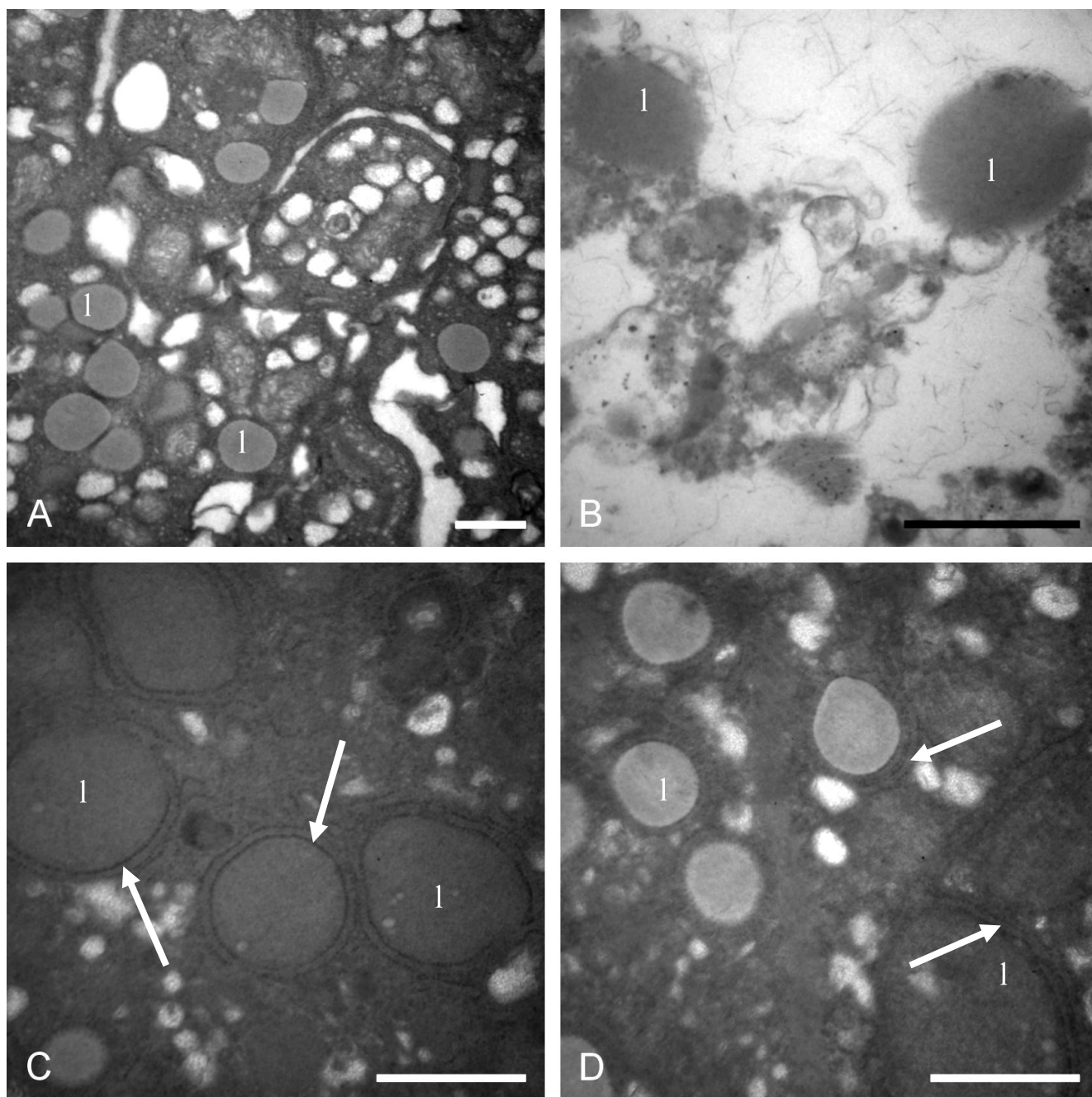


Figura 14. Grão de pólen de flores de *Indigofera* (MET). **A.** *I. hirsuta*; **B.** *I. lespedezioides*; **C.** *I. suffruticosa*; **D.** *I. truxillensis*. Durante a apresentação do grão de pólen, nota-se a ausência de amiloplastos e o predomínio de gotas lipídicas (l) no citoplasma da célula vegetativa. Frequentemente, as gotas lipídicas podem ser encontradas associadas a retículo endoplasmático rugoso (C-D, seta). Escalas: 1 μ m.

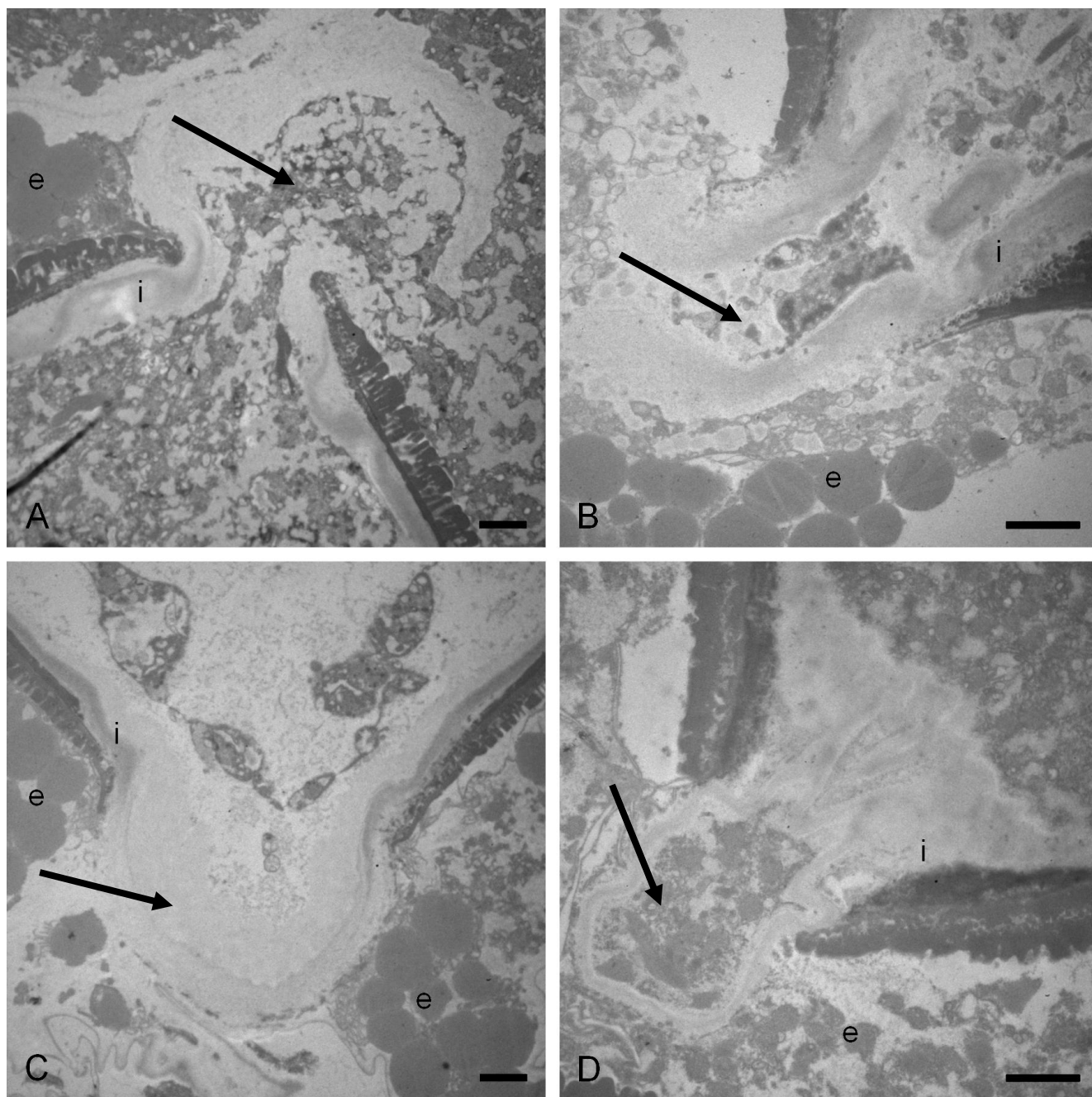


Figura 15. Grão de pólen no estigma de flores de *Indigofera* (MET). **A.** *I. hirsuta*; **B.** *I. lespedezioides*; **C.** *I. suffruticosa*; **D.** *I. truxillensis*. Detalhe da emissão do tubo polínico (setas) em meio ao exsudato estigmático (e). i = intina. Escalas: 2 μ m.

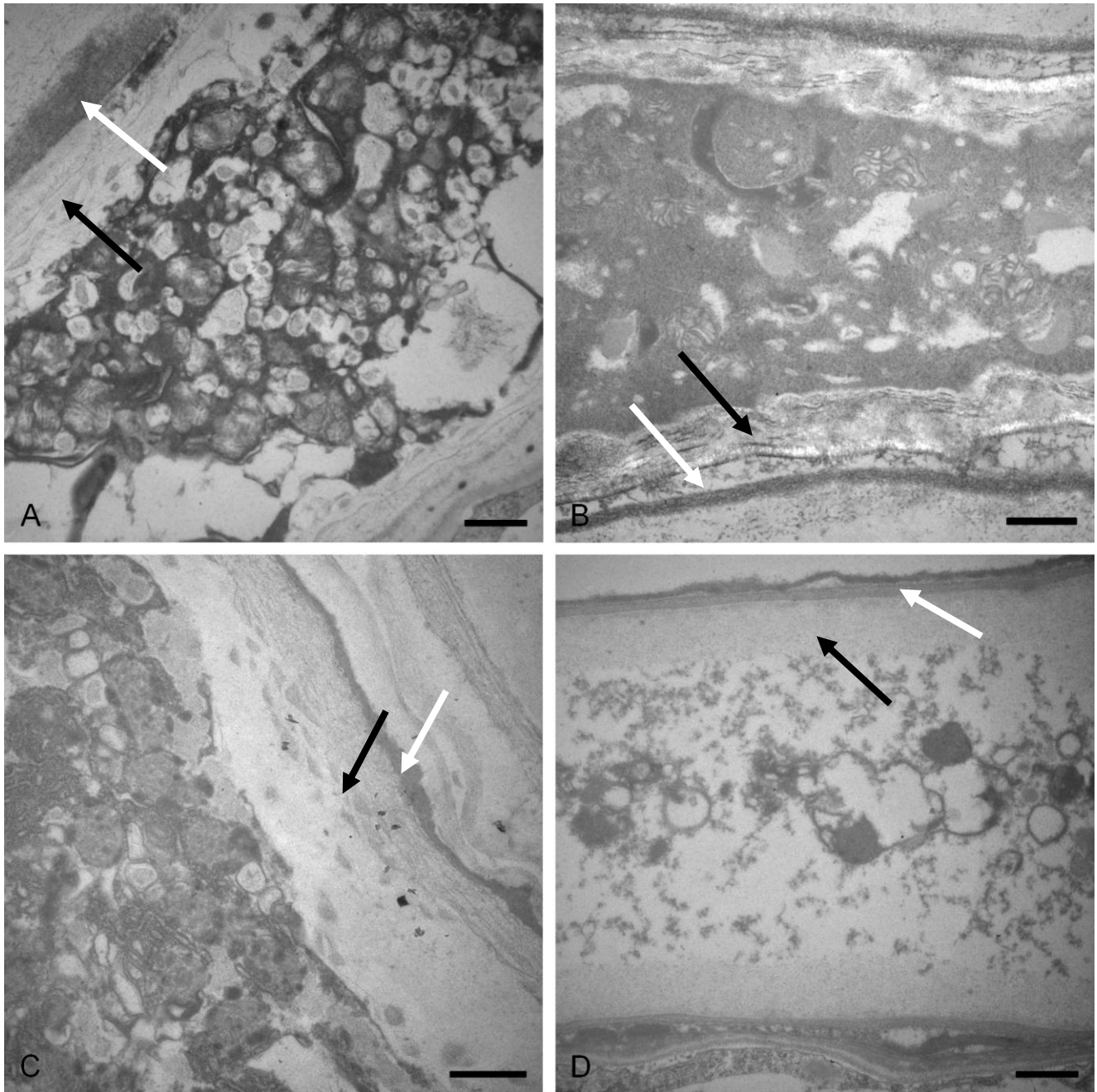


Figura 16. Tubo polínico no estilete de flores polinizadas de *Indigofera* (MET). **A.** *I. hirsuta*; **B.** *I. lespedezioides*; **C.** *I. suffruticosa*; **D.** *I. truxillensis*. Observe a parede do tubo polínico constituída por um extrato externo (seta branca), composto por substâncias pecto-celulósicas, e um extrato interno (seta preta), por calose. Escalas: 1 μ m.

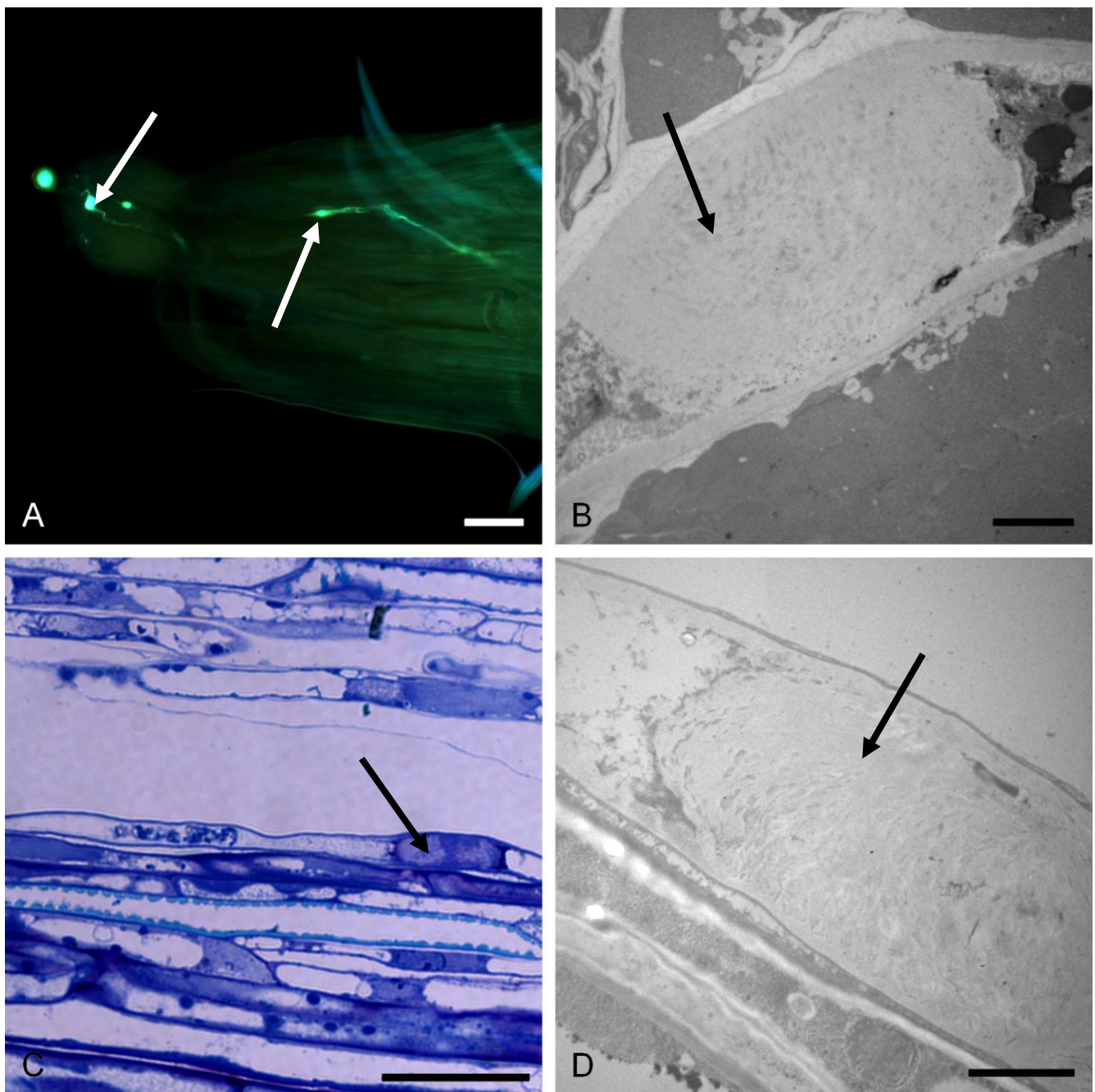


Figura 17. Tubo polínico no estigma (A, B) e no estilete (C, D) de *Indigofera* (ML e MET). **A.** *I. suffruticosa*; **B, C, D.** *I. truxillensis*. Observe os tampões de calose (setas) separando as regiões do tubo. Escalas: A = 50 μm ; B, D = 3 μm ; C = 20 μm .

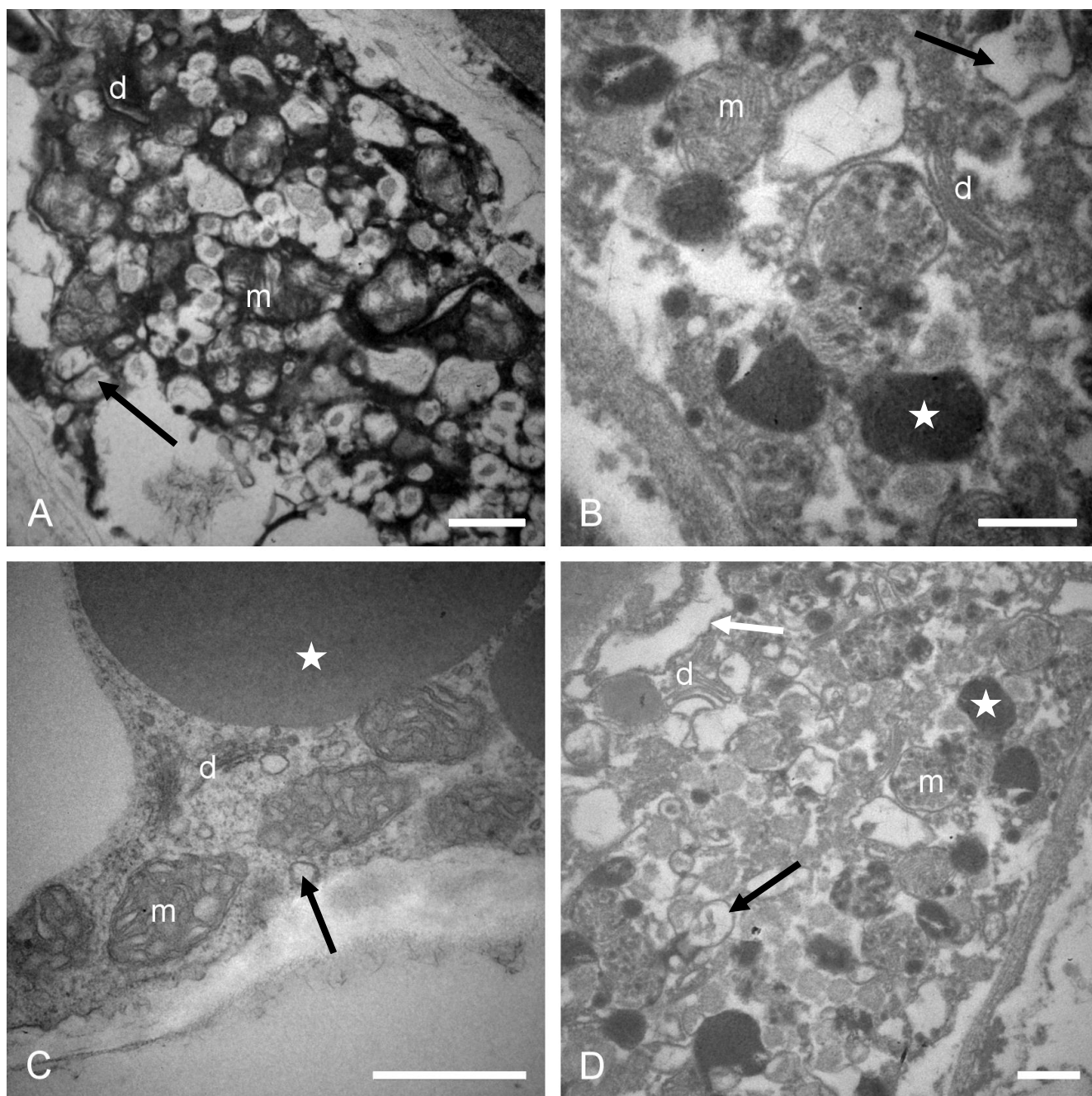


Figura 18. Tubo polínico no estilete de *Indigofera* (MET). **A.** *I. hirsuta*; **B.** *I. lespedezioides*; **C.** *I. suffruticosa*; **D.** *I. truxillensis*. Detalhe da região mais próxima à extremidade do tubo polínico com citoplasma rico em dictiossomos (d), mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (seta branca - A) e vesículas (setas pretas). Observe gotas lipídicas (estrelas) em B, C e D. Escalas: A, B, C = 1 μ m; D = 2 μ m.

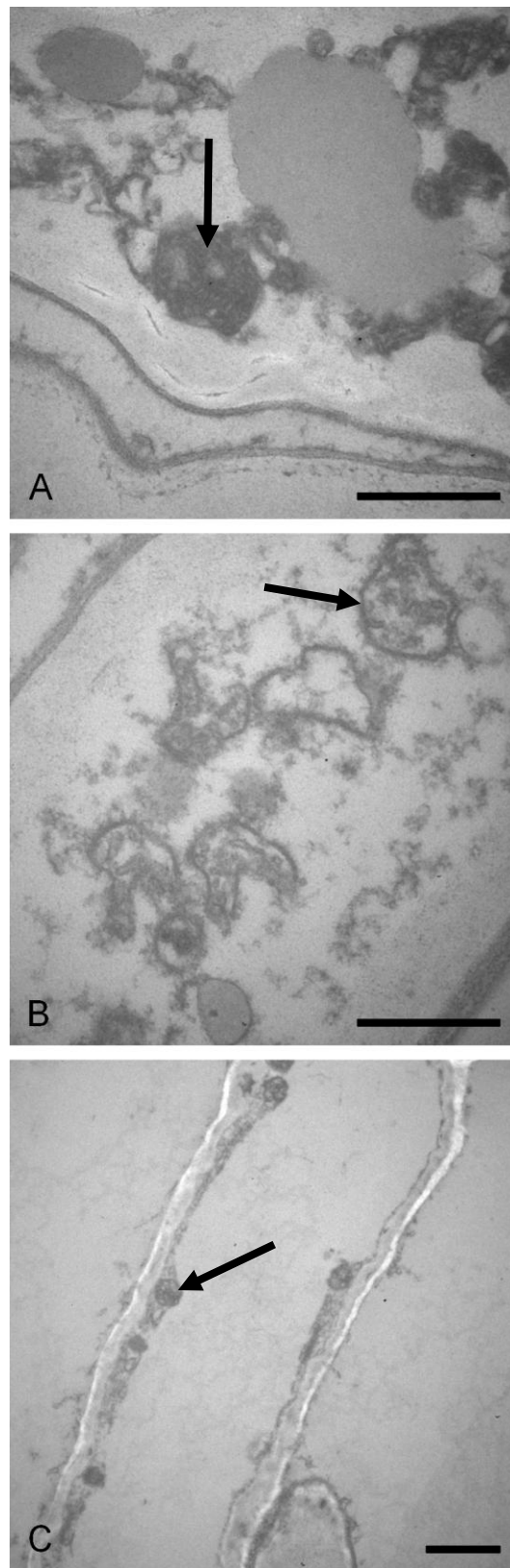


Figura 19. Tubo polínico no estilete de *Indigofera* (MET). **A.** *I. lespedezioides*; **B.** *I. suffruticosa*; **C.** *I. truxillensis*. Detalhe de regiões mais distantes da extremidade do tubo polínico. Observe o citoplasma com poucas mitocôndrias (seta) no centro (A, B) e na periferia (C) do tubo. Escalas: A, B = 1 μ m; C = 2 μ m.

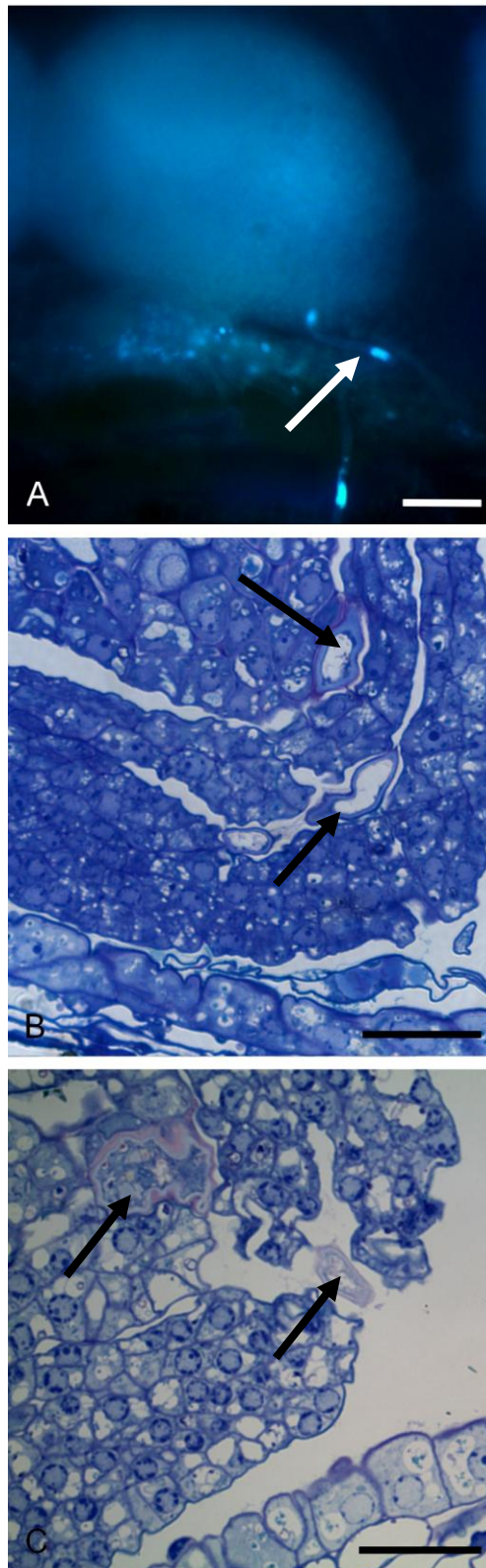


Figura 20. Óvulo de flores polinizadas de *Indigofera suffruticosa* (ML). Observe o tubo polínico (setas) penetrando o óvulo pela micrópila 24 horas após polinização manual controlada, demonstrando resultados semelhantes tanto para autopolinização (A, B) quanto para polinização cruzada (C). Escalas: A, C = 50 μ m; B = 20 μ m.

DISCUSSÃO

Apesar da observação de algumas diferenças referentes à morfologia, os resultados obtidos para as quatro espécies estudadas foram muito semelhantes quando relacionados à interação pólen pistilo.

O grão de pólen de *Indigofera hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*, no momento de sua apresentação e dispersão, é ortodoxo, segundo conceito revisado por Pacini (1990, 2010) e Pacini *et al.* (2006), ou seja, é parcialmente desidratado, sujeito a mudanças drásticas de redução de volume e mudanças extremas na forma. Grãos de pólen harmomegáticos são comumente encontrados em espécies da família Leguminosae (Banks & Rico 1999), como em *Spartium junceum* - Papilionoideae (Pacini *et al.* 1997) e *Duparquetia orchidacea* - Caesalpinioideae (Banks *et al.* 2006).

O grão de pólen ortodoxo encontra-se em estado quiescente, estando mais apto a suportar as mudanças de condições ambientais (Pacini & Hesse 2004). Além disto, por apresentar baixo conteúdo de água (< 30%) no momento de sua apresentação e dispersão, este pólen é considerado mais longo (Pacini 1990, 2000, 2010), e não emite o tubo polínico rapidamente, o que, juntamente com o longo período de antese das flores de *Indigofera*, sugere independência da disponibilidade imediata de polinizadores. Tal característica permite que os representantes de *Indigofera*, considerados invasores (Allen & Allen 1981, Kissmann & Groth 1999, Barbosa Neto *et al.* 2001), ocupem e se estabeleçam rapidamente em ambientes abertos, como terrenos baldios, e outros com baixa umidade relativa e variações extremas de temperatura, como os de borda de Cerrado (observações pessoais).

Por outro lado, a necessidade de reidratação de grãos de pólen ortodoxos, embora não seja imediata, é grande e necessária (Pacini 1990, 2010) e Pacini *et al.* (2006). Esta reidratação do pólen nas espécies estudadas de *Indigofera* depende principalmente do exsudato estigmático, visto que não apresentam “pollenkitt” abundante. Pode-se sugerir também que os tricomas tectores, encontrados ao redor do estigma, funcionem como uma barreira à desidratação, garantindo a longevidade do estigma e germinação do grão de pólen, além de reter os grãos de pólen ali depositados.

O presente trabalho confirma a caracterização realizada por Paulino (2008) com relação ao estigma. Em *Indigofera*, o estigma é classificado como semi-seco (Paulino 2008), pois apresenta cutícula, característica de estigma seco, e células com atividade secretora e exsudato abundante, características de estigma úmido (Heslop-Harrison & Shivanna 1977, Lord & Heslop-Harrison 1984, Tilton *et al.* 1984). Portanto, para que ocorra a germinação do grão de pólen no estigma de *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* é necessário o rompimento da cutícula. Considerando que a cutícula destas espécies não exhibe poros, o que reteria o exsudato e, ainda, que não há formação de frutos por autopolinização espontânea, mesmo havendo deposição de pólen no estigma, sugere-se que o rompimento da cutícula ocorra devido ao atrito com o polinizador.

A melitofilia, registrada para espécies de *Indigofera* (Matssura *et al.* 1974, Polhill 1981, Atmowidjojo & Adisoemarto 1986, Heard 1999, Eardley 2004, Albuquerque *et al.* 2007, Gemmill-Herren 2007, Boff 2008, Kato *et al.* 2008, Paulino 2008), pode ser confirmada em *I. hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* observando-se as seguintes características: flores pequenas (tamanho inferior a 1 cm), com pouco néctar, pétalas vistosas e muito coloridas, guia de néctar no estandarte, quilha e alas como plataforma de pouso, antese diurna e grãos de pólen ricos em óleo (Endress 1996, Raven *et al.* 1999 e Lersten 2004).

O tipo de mecanismo de apresentação do grão de pólen observado em *I. hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* é explosivo, como já relatado para membros da tribo Indigofereae (Arroyo 1981). O visitante floral, ao tocar as pétalas, principalmente as alas ou a quilha, aciona este mecanismo; desse modo, o gineceu e os estames são erguidos para fora da quilha e não retornam a sua posição inicial (Arroyo 1981, Endress 1996, Queiroz *et al.* 2010). O mecanismo explosivo de apresentação do pólen, associado aos relatos de Paulino (2008) sobre o comportamento de abelhas *Trigona fuscipennis* Friese em suas visitas frequentes às inflorescências de *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*, espécies onde o estigma encontra-se posicionado acima das anteras, indicam a importância do animal polinizador no rompimento da cutícula estigmática.

Já em *Indigofera hirsuta*, diferente das demais espécies estudadas, a ruptura da cutícula estigmática deve ocorrer devido ao aumento na pressão exercida pelo próprio exsudato na cutícula, visto que a cutícula também não apresenta poros e essa é a única espécie estudada a formar frutos após autopolinização espontânea. Processo similar ocorre em *Glycine max* (Papilionoideae, Leguminosae), na qual o mecanismo de liberação do exsudato ocorre por pressão exercida pelas paredes periclinais das células secretoras (Tilton *et al.* 1984). Outra causa para o rompimento da cutícula em *I. hirsuta* pode ser o atrito entre o estigma e as anteras que ocupam posições muito próximas na flor. Nesta espécie, em um estágio anterior à antese, o estigma encontra-se geralmente receptivo quando as anteras já estão deiscentes, permitindo o contato entre grãos de pólen e exsudato estigmático (observações pessoais). Tais resultados explicam o sucesso reprodutivo alcançado por esta espécie que, entre as outras estudadas, é a única a apresentar hábito herbáceo e ciclo de vida curto.

O rompimento da cutícula estigmática em Leguminosae, seja por pressão interna do exsudato ou por polinizadores, foi citado previamente em outras espécies de Papilionoideae como: *Trifolium pratense* (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1983), *Vicia faba* (Lord & Heslop-Harrison 1984), *Glycine max* (Tilton *et al.* 1984), *Cytisus striatus* e *Retama sphaerocarpa* (Rodríguez-Riaño *et al.* 1999), *Macroptilium bracteatum*, *Phaseolus augusti*, *P. vulgaris* e *Vigna adenantha* (Soverna *et al.* 2003), *Cytisus multiflorus* (Rodríguez-Riaño *et al.* 2004), *Vigna caracalla* (Etcheverry *et al.* 2008) e *Anagyris foetida* (Valtueña *et al.* 2008). O fato de a cutícula ser rompida por pressão mecânica de polinizadores evita a autopolinização por impedir a reidratação do pólen depositado espontaneamente sobre o estigma. Assim, a região receptiva do estigma se mantém intacta até a provável deposição de pólen proveniente de outras flores da mesma planta ou de outras plantas (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1983). Esta adaptação estrutural, associada a um sistema de auto-incompatibilidade, pode ajudar na promoção de reprodução cruzada (Lord & Heslop-Harrison 1984).

A cutícula estigmática de *Indigofera hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* assemelha-se à encontrada em estigmas úmidos: é fina, lisa, impermeável (não apresenta poros),

distribuída uniformemente por toda região estigmática e, aparentemente, composta por apenas um estrato. Neste tipo de estigma, a cutícula pode variar quanto à espessura, romper-se totalmente ou apenas por perfurações, durante ou após a liberação do exsudato (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1982). Já a cutícula que reveste estigmas secos é permeável e frequentemente depositada de forma descontínua, facilitando a reidratação do grão de pólen. Variações relacionadas à estrutura da cutícula estigmática são encontradas entre as espécies de Papilionoideae: *Trifolium pratense* (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1983) e *Medicago sativa* (Kreitner & Sorensen 1984) apresentam cutícula fina e contínua, porém estratificada; *Vicia faba* (Lord & Heslop-Harrison 1984) possui cutícula contínua, mas com diferentes espessuras de acordo com a região estigmática; já em *Cicer arietinum* (Baird *et al.* 1988) a cutícula é conspícua e rugosa sobre a maioria das papilas estigmáticas, exceto sobre algumas papilas da região central do estigma, as quais são revestidas por uma cutícula fina e lisa. Observa-se, portanto, que a estrutura da cutícula é constante entre os membros de Papilionoideae quanto à continuidade sobre a região estigmática, mas varia em espessura e estratificação mesmo em espécies nas quais os estigmas são muito semelhantes.

O exsudato estigmático das espécies estudadas de *Indigofera* é abundante, lipoproteico e derivado de células secretoras da superfície estigmática, sendo o processo de secreção holócrino. A origem do exsudato corresponde ao terceiro tipo descrito por Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1982). O estigma de botões em um estágio anterior à antese apresenta, em sua maioria, células que já secretaram o exsudato, o qual fica retido nos espaços intercelulares e subcuticular. Exsudato de natureza semelhante foi encontrado em outras Papilionoideae, como *Butea monosperma* (Tandon *et al.* 2003) e *Trifolium pratense* (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1983), e de natureza predominantemente lipofílica em *Vicia faba* (Lord & Heslop-Harrison 1984). Nestas espécies, os autores também observaram a degeneração das células estigmáticas para que ocorra a liberação do exsudato, como observado em *Indigofera*, o que sugere que esta característica deve ser compartilhada entre membros de Papilionoideae. Em espécies de Mimosoideae, como *Acacia retinodes*, *A. baileyana*,

A. diffusa e *A. subulata* (Leguminosae - Jobson et al. 1983), e espécies de outras famílias como Bromeliaceae, Liliaceae e Rosaceae (Heslop-Harrison & Shivanna 1977) também há liberação do exsudato estigmático por lise celular (secreção holócrina), diferente de espécies de *Petunia* (Solanaceae - Herrero & Dickinson 1979) e *Grevillea banksii* (Proteaceae - Herscovitch & Martin 1990), nas quais não ocorre lise celular.

A presença de um estilete misto, com porções sólidas e ocas, em *Indigofera hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*, promove comportamentos distintos para o crescimento dos tubos polínicos. Na porção inicial sólida do estilete, o tubo polínico cresce por entre as células do tecido transmissor e, após, percorre os espaços intercelulares, que aumentam gradativamente, até alcançar a porção oca do estilete. Nessa região, o tubo polínico pode crescer sobre as células do tecido transmissor que reveste o canal estilar ou pelo exsudato que preenche este canal. O crescimento do tubo polínico no estilete não provoca degeneração de células do tecido transmissor e não foi encontrado nenhum tipo de comunicação entre a parede do tubo e as células do estilete. Comportamento semelhante em estilete misto foi observado para outras espécies de Leguminosae como: *Glycine max* (Tilton et al. 1984), *Macroptilium bracteatum*, *Phaseolus augusti*, *P. vulgaris*, *Vigna adenantha* (Soverna et al. 2003) e *Butea monosperma* (Tandon et al. 2003), todas pertencentes à Papilionoideae.

A nutrição do tubo polínico nas espécies estudadas de *Indigofera* parece ser autotrófica na porção estigmática, considerando as reservas observadas no grão de pólen que, geralmente, fornecem a energia necessária para essa fase inicial de desenvolvimento do tubo polínico (Green 1984). Considerando-se que não ocorre lise das células do tecido transmissor com a passagem do tubo polínico pelo estilete e que o conteúdo citoplasmático do tubo polínico de *I. hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* é muito semelhante ao das descrições encontradas na literatura (Cresti et al. 1977, Malhó 2006), sugere-se que no estilete, a nutrição do tubo polínico deve depender também da absorção de substâncias presentes no exsudato estilar, derivadas das células do tecido transmissor,

como em *Glycine max* (Leguminosae - Tilton *et al.* 1984), além das reservas que já estavam presentes no grão de pólen (Green 1984).

O tubo polínico, na cavidade ovariana de *Indigofera hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*, cresce sobre a placenta e penetra o óvulo pela micrópila, processo mais comumente encontrado na natureza, segundo Maheshwari (1950). As células da placenta são secretoras, e na maioria das espécies estudadas, exibem formato alongado no sentido longitudinal, características que indicam que devem atuar no direcionamento e facilitar a penetração do tubo polínico na micrópila, como descrito para *Glycine max* (Tilton *et al.* 1984). A variação no formato das células da placenta (ver tabela 1) pode apresentar valor taxonômico para o gênero se os estudos forem estendidos para outras espécies deste grupo e confirmarem os dados aqui encontrados.

Considerações finais

Os dados aqui apresentados indicam que pelo menos três fatores poderiam permitir o rompimento da cutícula contínua presente no estigma de *Indigofera*: 1 - o atrito com o polinizador; 2 - a pressão exercida pelo exsudato estigmático e pelos tricomas presentes na periferia do estigma; e 3 - o atrito com as anteras (no caso de *I. hirsuta*). Uma possível participação indireta dos tricomas presentes ao redor do estigma no rompimento da cutícula estigmática poderia ser proposta, mas evidências de cutícula intacta nessa região sugere a não participação dos tricomas neste evento.

A morfologia e o comportamento dos tubos polínicos emitidos por grãos de pólen provenientes tanto de autopolinização quanto de polinização cruzada, no estigma, no estilete e no ovário, é similar, o que permite sugerir que *Indigofera hirsuta* é autocompatível, e que *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* exibem grandes chances de serem espécies autocompatíveis. Não há evidências morfológicas de auto-incompatibilidade no estigma, no estilete e no ovário, apesar da presença de cutícula estigmática que evita a autopolinização espontânea, aumentando assim o potencial para polinização cruzada nestas espécies. Tais informações corroboram relatos de Arroyo (1981), em que

espécies tropicais herbáceas de Leguminosae, em especial aquelas pertencentes à subfamília Papilionoideae, capazes de se estabelecer em ambientes instáveis como Cerrado e outras formações savânicas, são comumente autocompatíveis. Da mesma maneira, a relação entre a presença de estigma úmido e estilete oco e ocorrência de reação de auto-incompatibilidade no estilete e ovário (Heslop-Harrison & Shivanna 1977) pode ser apoiada pela possível ocorrência de um sistema de auto-incompatibilidade ovariano em *Indigofera*.

Não é possível, portanto, excluir a auto-incompatibilidade de ação tardia nas espécies estudadas de *Indigofera*, uma vez que Heslop-Harrison & Shivanna (1977) relataram a existência de uma relação entre o estigma do tipo úmido e a inibição do crescimento do tubo polínico no ovário. No entanto, indícios deste tipo de auto-incompatibilidade, como aborto de sementes (Seavey & Bawa 1986) e aborto de pistilos após a polinização (Gibbs & Bianchi 1993) não foram encontrados em *I. hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*. Pelo contrário, estas espécies são amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (Lewis *et al.* 2005) e produzem altas taxas de sementes viáveis (observações pessoais).

Deve-se considerar que outras espécies de Leguminosae exibem sistema de auto-incompatibilidade de ação tardia, como: *Acacia retinoides* (Kenrick *et al.* 1984) - Mimosoideae; *Lotus corniculatus* (Bubar 1959), *Medicago sativa* (Brink & Cooper 1983), *Dalbergia retusa*, *Dipteryx panamensis*, *Myrospermum frutescens* (Seavey & Bawa 1986), *Cytisus multiflorus* e *C. striatus* (Valtueña *et al.* 2010) - Papilionoideae. Segundo Seavey & Bawa (1986), este sistema de auto-incompatibilidade pode ser dividido em quatro tipos: (1) inibição ovariana do tubo polínico antes que este alcance o óvulo; (2) inibição pré-fertilização, na qual o tubo polínico penetra o saco embrionário mas não ocorre a fusão dos gametas; (3) rejeição pós-zigótica, nos primeiros estádios da embriogênese; (4) inibição ovariana com origens desconhecidas. A fim de confirmar a existência deste tipo de incompatibilidade em *Indigofera* seriam necessários estudos sobre os eventos posteriores à polinização,

como análises quantitativas da penetração dos óvulos, acompanhamento das transformações dos sacos embrionários fertilizados e germinação de sementes originadas a partir destes sacos embrionários.

Embora tenham sido apresentadas algumas diferenças entre as espécies de *Indigofera*, referentes à morfologia, biologia floral e reprodutiva, os aspectos morfológicos da interação pólen-pistilo são semelhantes em *I. hirsuta*, *I. lespedezioides*, *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*, tanto estrutural quanto ultra-estruturalmente.

Este trabalho complementa os estudos de biologia reprodutiva iniciados por Paulino (2008), confirmando seus resultados para *I. lespedezioides* e *I. suffruticosa* e ampliando-os para *I. hirsuta* e *I. truxillensis*, tanto em relação ao sistema reprodutivo quanto à presença de um tipo intermediário de estigma, com características de ambos, úmido e seco, sugerindo sua importância em evitar a autopolinização e favorecer a polinização cruzada nestas espécies, com exceção à *I. hirsuta*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE P. M. C., CAMARGO J. M. F. & MENDONÇA A. C. 2007. Bee community of a beach dune ecosystem on Maranhão Island, Brasil. *Brazilian Archives of Biology and Technology, an Internacional Journal* 50(6): 1005-1018.
- ALLEN O. N. & ALLEN E. K. 1981. *The Leguminosae: a source book of characteristics uses and notulation*. University of Wisconsin Press, Wisconsin, 812p.
- ARROYO M. T. K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: POLHILL R. M. & RAVEN P. H (eds.). *Advances in Legume Systematics*. Kew: Royal Botanic Gardens, vol. 2, p. 723-769.
- ATMOWIDJOJO A. H. & ADISOEMARTO S. 1986. Potential pollen-transferring insects of *Indigofera* spp. *Treubia* 29: 225-235.
- BAIRD L. M., TURANO M. J. & WEBSTER B. D. 1988. Ultrastructure and histochemical characteristics of stigma of *Cicer arietinum*. *American Journal of Botany* 75(4): 551-557.
- BANKS H. & RICO L. 1999. Pollen morphology and phylogenetic analysis of *Eperua* Aublet (Detarieae: Caesalpinioideae: Leguminosae). *Grana* 38: 261-276.
- BANKS H., FEIST-BURKHART S. & KLITGAARD B. 2006. The unique pollen morphology of *Duparquetia* (Leguminosae, Caesalpinioideae): developmental evidence of aperture orientation using confocal microscopy. *Annals of Botany* 98: 107-115.
- BARBOSA NETO J. D., OLIVEIRA C. M. C., PEIXOTO P. V., BARBOSA I. B. P., ÁVILA S. C. & TOKARNIA C. H. 2001. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 21(1): 18-22.
- BASSANI M., PACINI E. & FRANCHI G. G. 1994. Humidity stress responses in pollen of anemophilous and entomophilous species. *Grana* 33(3): 146-150.

- BASSO-ALVES J. P., AGOSTINI K. & TEIXEIRA S. P. 2011. Pollen and stigma morphology of some Phaseoleae species (Leguminosae) with different pollinators. *Plant biology* 13(4): 602-610.
- BENTHAM G. 1859. Leguminosae L. In: VON MARTIUS C. F., ENDLICHER S. & URBAN I. (eds.). *Flora Brasiliensis* Frid. Fleischer. Monachii, Lipsiae, Vol. XV, Part. I, Fasc. 24, Coluna 35-42.
- BLACKMORE S., WORTLEY A. H., SKARVALA J. J. & ROWLEY J. R. 2007. Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist* 174(3): 483-498.
- BOFF S. V. 2008. Flora de capões e hymenoptera (abelhas e vespas) visitantes de flores no pantanal do miranda-abobral. Dissertação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 97p.
- BRINK R. A. & COOPER D. C. 1983. Partial self-incompatibility in *Medicago sativa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 24(11) 497-499.
- BUBAR J. S. 1959. Differences between self-incompatibility and self-sterility. *Nature* 183:411-412.
- CARVALHO D. A. & OLIVEIRA P. E. 2003. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae) *Revista Brasileira de Botânica* 26(3): 319-328.
- CASTRO S., SILVA S., STANESCU I., SILVEIRA P., NAVARRO L. & SANTOS C. 2009. Pistil anatomy and pollen tube development in *Polygala vayredae* Costa (Polygalaceae). *Plant Biology* 11(3): 405-416.
- COCUCCI A. E. & MARIATH J. E. A. 2004. Gametogênese, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro. In: FERREIRA A. G. & BORGHETTI F. *Germinação. Do básico ao aplicado*. Artmed, Porto Alegre. p. 17-30.
- CRESTI M., PACINI E., CIAMPOLINI F. & SARFATTI G. 1977. Germination and early tube development in vitro of *Lycopersicum peruvianum* pollen: ultrastructural features. *Planta* 136: 239-247.

- DAFNI A., PACINI E. & NEPI M. 2005. Pollen and stigma biology. In: DAFNI A., KEVAN P. G. & HUSBAND B. C. *Practical Pollination Biology*. Cambridge: Enviroquest. p. 83-146.
- DICKINSON H. G., ELLEMAN C. J. & DOUGHTY J. 2000. Pollen coatings - chimaeric genetics and new functions. *Sexual Plant Reproduction* 12: 302–309.
- DIXIT R. & NASRALLAH J. B. 2001. Recognizing self in the self-incompatibility response. *Plant Physiology* 125: 105-108.
- DOUGHTY J., YANWONG H. & DICKINSON H. G. 2000. Cysteine-rich pollen coat proteins (PCPs) and their interactions with stigmatic S (Incompatibility) and S-related proteins in *Brassica*: Putative roles in SI and pollination. *Annals of Botany* 85 (Supplement A): 161-169.
- EARDLEY C. D. 2004. Taxonomic revision of the African stingless bees (Apoidea: Apidae: Apinae: Meliponini). *African Plant Protection* 10(2): 63-96.
- EDLUND A. F., SWANSON R. & PREUSS D. 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell* 16: S84-S97.
- EISINGER S. M. 1987. O gênero *Indigofera* L. (Leguminosae - Papilionoideae - Indigofereae) no Rio Grande do Sul - Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 1(2): 123-140.
- ELLEMAN C. J. & DICKINSON H. G. 1990. The role of the exine coating in pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea* L. *New Phytologist* 114: 511-518.
- ELLEMAN C. J. & DICKINSON H. G. 1999. Commonalities between pollen/stigma and host/pathogen interactions: calcium accumulation during stigmatic penetration by *Brassica oleracea* pollen tubes. *Sexual Plant Reproduction* 12: 194-202.
- ELLEMAN C. J., WILLSON C. E., SARKER R. H. & DICKINSON H. G. 1988. Interaction between the pollen tube and stigmatic cell wall following pollination in *Brassica oleracea*. *New Phytologist* 109: 111-117.

- ELLEMAN C. J., FRANKLIN-TONG V. & DICKINSON H. G. 1992. Pollination in species with dry stigmas: the nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. *New Phytologist* 121(3): 413-424.
- ENDRESS P. K. 1996. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge. Cambridge University Press. 511p.
- ERBAR C. 2003. Pollen tube transmitting tissue place of competition of male gametophytes. *International Journal of Plant Sciences*. 164(5 Suppl.): S265-S277.
- ETCHEVERRY A. V., PROTOMASTRO J. J. & WESTERKAMP C. 2003. Delayed autonomous self-pollination in the colonizer *Crotalaria micans* (Fabaceae: Papilionoideae): structural and functional aspects. *Plant Systematics and Evolution* 239: 15-28.
- ETCHEVERRY A. V., ALEMÁN M. M. & FLEMING T. F. 2008. Flower morphology, pollination biology and mating system of complex flower of *Vigna Caracalla* (Fabaceae: Papilionoideae). *Annals of Botany* 102: 305-316.
- FISHER D. B. 1968. Protein staining of ribboned epon section for light microscopy. *Histochemie* 16: 92-96.
- FRANCHI G. G., NEPI M., DAFNI A. & PACINI E. 2002. Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutionary significance. *Plant Systematics and Evolution* 243(1-4): 211-227.
- FREITAS C. V. & OLIVEIRA P. E. 2002. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25(3): 311-321.
- GEMMILL-HERREN B. 2007. *Indigofera* in Kenya. In: EARDLEY C., GEMMILL-HERREN B., GIKUNGU M., KAGOIYA R., KINUTHIA W., KWAPONG P., MARTINS D., NJOROGE G. & NJOROGE L. (eds.). *Crops, Browse and Pollinators in Africa: An Initial Stock-Taking*. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome. p. 43–45.

- GREEN J. R. 1984. Researches on the germination of the pollen grain and the nutrition of the pollen tube. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. B 185: 385-409.
- GIBBS P. E. & BIANCHI M. B. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. *Botanica Acta* 106: 64-71.
- HEARD T.A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology* 44: 183-206.
- HERRERO M. 1992. From pollination to fertilization in fruit trees. *Plant Growth Regulation* 11: 27-32.
- HERRERO M. & DICKINSON H. G. 1979. Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida*. Changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *Journal of Cell Science* 36: 1-18.
- HERRERO M. & DICKINSON H. G. 1981. Pollen tube development in *Petunia hybrid* following compatible and incompatible intraspecific matings. *Journal of Cell Science* 47:365-383.
- HERSCOVITCH J. C. & MARTIN A. R. H. 1990. Pollen-pistil interactions in *Grevillea banksii* II. Pollen tube ultrastructure and interactions, and results of field experiment. *Grana* 29: 5-17.
- HESLOP-HARRISON J. & HESLOP-HARRISON Y. 1982. The specialized cuticles of the receptive surfaces of angiosperm stigmas. In: CUTLER D. F., ALVIN K. L. & PRICE C. E. (eds.). *The plant cuticle*. Linnean Society Symposium Series n° 10. Academic Press, London. p. 99-119.
- HESLOP-HARRISON J. & HESLOP-HARRISON Y. 1983. Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: the organization of the stigma in *Trifolium pratense* L. *Annals of Botany* 51(5): 571-583.
- HESLOP-HARRISON Y. 2000. Control gates and micro-ecology: the pollen-stigma interaction in perspective. *Annals of Botany* 85: 5A-13A.

- HESLOP-HARRISON Y & SHIVANNA KR. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. *Annals of Botany* 41(6): 1233-1258.
- HESSE M., ZETTER R., HALBRITTER H., WEBER M., BUCHNER R., FROSCH-RADIVO A. & ULRICH S. 2009. *Pollen terminology - an illustrated handbook*. Springer Wien New York, New York. 264p.
- HÜLSKAMP M., SCHNEITZ K. & PRUITT R. E. 1995. Genetic evidence for a long-range activity that directs pollen tube guidance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 7: 57-64.
- HUTTON E. M. 1960. Flowering and pollination in *Indigofera spicata*, *Phaseolus lathyroides*, *Desmodium uncinatum* and some other tropical pasture legumes. *Journal of Experimental Agriculture*. 28(111): 235-243.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. W.H. Freeman, San Francisco. 408p.
- JOBSON S., KNOX R. B., KENRICK J. & DUMAS C. 1983. Plastid development and ferritin content of stigmas of the Legumes *Acacia*, *Lotus* and *Trifolium*. *Protoplasma* 116: 213-218.
- JOHANSEN D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw- Hill Book Company Inc., New York. 523p.
- JOHNSON M. A. & LORD E. 2006. Extracellular guidance cues and intracellular signaling pathways that direct pollen tube growth. In: MALHÓ R. *The Pollen Tube*. Plant Cell Monographs 3: 223-242.
- JOHRI B. M., AMBEGAOKAR K. B. & SRIVASTAVA P. S. 1992. *Comparative Embriology of Angiosperms*. Vol. 1 e 2. Sringer Verlag, Berlin.
- KANDASAMY M. K., McKINNEY E. C. & MEAGHER R. B. 1999 The late pollen-specific actins in angiosperms. *The Plant Journal* 18(6): 681-691.
- KARNOVSKY M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in eletron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: A137-A138.

- KATO M., KOSAKA Y., KAWAKITA A., OKUYAMA Y., KOBAYASHI C., PHIMMINITH T. & THONGPHAN D. 2008. Plant-pollinator interactions in tropical monsoon forests in southeast asia. *American Journal of Botany* 95(11): 1375-1394.
- KENRICK J., KAUL V. & KNOX R. B. 1984. Self incompatibility and the site of pollen tube arrest in Australian species of *Acacia*. *Incompatibility Newsletter* 16: 3-4.
- KIM S., MOLLET J.-C., DONG J., ZHANG K., PARK S.-Y. & LORD E. M. 2003. Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(26): 16125–16130.
- KISSMANN K. G. & GROTH D. 1999. Plantas infestantes e nocivas. Tomo II. 2ª ed. BASF, São Bernardo do Campo, SP. 978p.
- KNOX R. B. 1984. The Pollen Grain. In: JOHRI B. M. *Embriology of Angiosperms*. Springer Verlag, Berlin. p. 197-271.
- KNOX R. B., KENRICK J., JOBSON S. & DUMAS C. 1989. Reproductive function in the Mimosoid Legume *Acacia retinodes*: ultrastructural and cytochemical characteristics of stigma receptivity. *Australian Journal of Botany* 37: 103-24.
- KREITNER G. L. & SORENSEN E. L. 1984. Stigma development and stigmatic cuticle of Alfafa, *Medicago sativa* L. *Botanical Gazette* 145(4): 436-443.
- LENNON K. A., ROY S., HEPLER P. K. & LORD E. M. 1998. The structure of the transmitting tissue of *Arabidopsis thaliana* (L.) and the path of pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction* 11:49-59.
- LERSTEN N. R. 2004. *Flowering Plant Embryology*. Ames: Blackwell Publishing, 212p.
- LEWIS G., SCHRIRE B., MACKINDER B. & LOCK M. 2005. *Legumes of the World*. Kew, Royal Botanic Gardens. 592p.

- LILLIE R. D. 1954. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. McGraw- Hill Book Co, New York. 501p.
- LISCI M., TANDA C. & PACINI E. 1994. Pollination ecophysiology of *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae), an anemophilous species flowering all year round. *Annals of Botany* 74(2): 125-135.
- LORD E. M. & HESLOP-HARRISON Y. 1984. Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: stigma organization and the breeding system in *Vicia faba* L. *Annals of Botany*. 54(6): 827-836.
- LORD E. M. & RUSSELL S. D. 2002. The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18: 81-105.
- LUU D.-T., MARTY-MAZARS D., TRICK M., DUMAS C. & HEIZMANN P. 1999. Pollen-stigma adhesion in *Brassica* spp involves SLG and SLR1 Glycoproteins. *The Plant Cell* 11: 251-262.
- MA H. 2005. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 56: 393-434.
- MAHESHWARI P. 1950. *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*. New York: McGraw-Hill. 453p.
- MALHÓ R. 2006. *The Pollen Tube. A Cellular and Molecular Perspective*. Plant Cell Monographs. (3). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 295p.
- MARTIN J. N. 1914. Comparative morphology of some Leguminosae. *Botanical Gazette* 58(2): 154-167.
- MARTIN F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Biotechnic and Histochemistry* 34(3): 125-128.

- MATSUURA M., SAKAGAMI S. F. & FUKUDA H. 1974. A wild bee survey in Kibi (Wakayama Pref.), Southern Japan. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University* VI 19(2): 422-437.
- MEDINA D. M. & CONAGIN C. H. T. M. 1964. *Técnica citológica*. Publicação 2610, Instituto Agrônômico, Campinas. 180p.
- MIOTTO S. T. S. & IGANCI J. R. V. 2010. *Indigofera*. In: FORZZA R. C. *et al.* (Org.) *Catálogo de plantas e fungos do Brasil* Vol. 2. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. p. 1041-1042.
- MOREIRA J. L. D. & TOZZI A. M. G. A. 1997. *Indigofera* L. (Leguminosae, Papilionoideae) no estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 20(1): 97-117.
- NASRALLAH J. B., STEIN J. C., KANDASAMY M. K. & NASRALLAH M. E. 1994. Signaling the arrest of pollen tube development in self-incompatible. *Plant Science* 266: 1505-1508.
- NEPI M., FRANCHI G. G. & PACINI E. 2001. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma* 216(3-4): 171-180.
- O'BRIEN T. P. & MCCULLY M. E. 1981. *The study of plants structure. Principles and selected methods*. Thermarcaphy Ltd., Melbourne, Austrália. 352p.
- O'BRIEN T. P., FEDER N. & MCCULLY M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* 59(2): 368-373.
- PACINI E. 1990. Harmomegathic characters of Pteridophyta spores and Spermatophyta pollen. *Plant Systematics and Evolution* 5(Supp.): 53-69.
- PACINI E. 2000. From anther and pollen ripening to pollen presentation. *Plant Systematics and Evolution* 222(1-4): 19-43.
- PACINI E. 2010. Relationships between tapetum, loculus, and pollen during development. *International Journal of Plant Sciences* 171(1): 1-11.

- PACINI E. & HESSE M. 2004. Cytophysiology of pollen presentation and dispersal. *Flora* 199(4): 273-285.
- PACINI E. & HESSE M. 2005. Pollenkitt - its composition, forms and functions. *Flora* 200(5): 399-415.
- PACINI E., FRANCHI G. G., LISCI M. & NEPI M. 1997. Pollen viability related of type of pollination in six angiosperms species. *Annals of Botany* 80: 83-87.
- PACINI E., GUARNIERI M. & NEPI M. 2006. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. *Protoplasma* 228(1-3): 73-77.
- PALANIVELU R., BRASS L., EDLUND A. F. & PREUSS D. 2003. Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell* 114: 47-59.
- PAULINO J. V. 2008. Desenvolvimento da inflorescência e da flor de espécies brasileiras de *Indigofera*. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 90p.
- PIFFANELLI P., ROSS J. H. H. & MURPHY D. J. 1998. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sexual Plant Reproduction* 11: 65-80.
- PIRES J. P. A. & FREITAS L. 2008. Reproductive biology of two tree species of Leguminosae in a Montane Rain Forest in southeastern Brazil. *Flora* 203: 491-498.
- POLHILL R. M. 1981. Indigofereae. In: POLHILL R. M. & RAVEN P. H (eds.). *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew. Part. 1, p. 289-291.
- QUEIROZ L. P., LEWIS G. P. & WOJCIECHOWSKI M. F. 2010. *Tabaroa*, a new genus of Leguminosae tribe Brongniartieae from Brazil. *Kew Bulletin* 65: 189-203.

- RAVEN P. H., EVERT R. F. & EICHHORN S. E. 1999. *Biology of plants*. 6^a ed. Woth Publishers, New York. 944p.
- REYNOLDS E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17(1): 208-212.
- RODRÍGUEZ-RIANÓ T., ORTEGA-OLIVENCIA A. & DEVESA J. A. 1999. Reproductive biology in two Genisteae (Papilionoideae) endemic of the western Mediterranean region: *Cytisus striatus* and *Retama sphaerocarpa*. *Canadian Journal of Botany* 77: 809-820.
- RODRÍGUEZ-RIANÓ T., ORTEGA-OLIVENCIA A. & DEVESA J. A. 2004. Reproductive biology in *Cytisus multiflorus* (Fabaceae). *Annales Botanici Fennici* 41: 179-188.
- SCHRIRE B. D. 2005. Indigofereae. In: LEWIS G., SCHRIRE B. D., MACKINDER B. & LOCK M. *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 361-365.
- SCHRIRE B. D., LAVIN M., BARKER N. P. & FOREST F. 2009. Phylogeny of the tribe Indigofereae (Leguminosae-Papilionoideae): geographically structured more in succulent-rich and temperate settings than in grass-rich environments. *American Journal of Botany* 96(4): 816-852.
- SEAVEY S.R. & BAWA K.S. 1986. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *Botanical Review*. 52(2): 195-219.
- STEPHENSON A. G., TRAVERS S. E., MENA-ALI J. I. & WINSOR J. A. 2003 Pollen performance before and during the autotrophic-heterotrophic transition of pollen tube growth. *Philosophical Transactions of The Royal Society* 358: 1009-1018.
- SOVERNA A. F., GALATI B. & HOC P. 2003. Study of ovule and megagametophyte development in four species of subtribe Phaseolinae (Leguminosae). *Acta Biologica Cracoviensia* 45(2): 63-73.
- TANDON R. & SHIVANNA K. R. 2001. Pollination biology and breeding system of *Acacia Senegal*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 135: 251-262.

- TANDON R., SHIVANNA K. R. & MOHAN RAM H. Y. 2003. Reproductive biology of *Butea monosperma* (Fabaceae). *Annals of Botany* 92: 715-723.
- TILTON V. R., WILCOX, L. W., PALMER R. G. & ALBERTSEN M. C. 1984. Stigma, style, and obturator of Soybean, *Glycine Max* (L.) Merr. (Leguminosae) and their function in the reproductive process. *American Journal of Botany* 71(5): 676-686.
- TROPICOS. ORG. MISSOURI BOTANICAL GARDEM 2011. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em: 17 abril 2011.
- VALTUEÑA F. J., ORTEGA-OLIVENCIA A., RODRÍGUEZ-RIAÑO T. & LÓPEZ J. 2008. Reproductive biology in *Anagyris foetida* L. (Leguminosae), an autumn-winter flowering and ornithophilous Mediterranean shrub. *Botanical Journal of the Linnean Society* 157: 519-532.
- VALTUEÑA F. J., RODRÍGUEZ-RIAÑO T., ESPINOSA F. & ORTEGA-OLIVENCIA A. 2010. Self-sterility in two *Cytisus* species (Leguminosae, Papilionoideae) due to early-acting inbreeding depression. *American Journal of Botany* 97(1): 123-135.
- WATSON M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical, Biochemical and Cytology* 6: 475.
- WHEELER M. J., FRANKLIN-TONG V. E. & FRANKLIN F. C. H. 2001 The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytologist* 151: 565-584.
- WHITE P.S. 1980. *Indigofera*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 67: 706-714.