

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Nelson Sabino Bittencourt Júnior

*Auto-Incompatibilidade de Ação Tardia e Outros Sistemas
Reprodutivos em Bignoniaceae*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. João Semir

2003

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

B548a

Bittencourt Júnior, Nelson Sabino

Auto-incompatibilidade de ação tardia e outros sistemas reprodutivos em
Bignoniaceae / Nelson Sabino Bittencourt Júnior.--
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: João Semir

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

1. Polinização. 2. Bignoniaceae. 3. Reprodução. I. Semir, João.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 13 de agosto de 2003.

Banca examinadora:

Prof. Dr. João Semir

Prof. Dr. Peter Gibbs

Prof. Dr. Marco Antônio de Assis

Prof. Dr. George John Shepherd

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro

Profa. Dra. Julie Henriette Antoniette Dutilh

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. João Semir, pela orientação e o apoio constante à realização deste trabalho.

À Dra. Julie H. A. Dutilh, pela amizade e pelas inúmeras formas de ajuda em diversos momentos durante a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Peter E. Gibbs (Universidade de St Andrews), pela leitura crítica das primeiras versões de um dos manuscritos derivados da presente tese, pelo esclarecimento de dúvidas sobre algumas das metodologias utilizadas e pelas inúmeras discussões que tanto contribuíram para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Sandra Carmello-Guerreiro, responsável pelo Laboratório de Anatomia Vegetal, e à Profa. Dra. Marlies Sazima, responsável pelo Laboratório de Biossistemática (UNICAMP), pela permissão para utilização das dependências e equipamentos dos respectivos laboratórios.

Aos amigos do Ermo, pela permissão para realização dos trabalhos de campo com a espécie *Jacaranda racemosa* em sua propriedade particular, bem como pelo apoio logístico sem o qual esta etapa do trabalho não teria sido realizada.

Ao IBAMA e ao Sr. Albino B. Gomes, pela concessão de licença e alojamento para realização parcial dos trabalhos de campo com as espécies *Zeyheria montana* e *Tabebuia vellosi* no Parque Nacional da Serra do Cipó.

Ao Prof. Dr. Eugênio Goulart (UFMG) e ao Prof. Dr. George Shepherd (UNICAMP) pelos auxílios às análises estatísticas.

Aos técnicos Sebastião, Iara, João e Ana (Laboratórios de Anatomia, Biossistemática, Taxonomia e Ecologia, respectivamente; Depto. de Botânica, UNICAMP), pelos auxílios nos trabalhos laboratoriais.

À Profa. Dra. Isabel Alves dos Santos (UNESC), pela amizade e pela identificação das abelhas.

Aos Professores Dra. Marlies Sazima e Dr. Ivan Sazima (UNICAMP), pela ajuda na identificação de alguns pássaros.

Ao Prof. Dr. Geraldo W. A. Fernandes (UFMG), pela identificação do Cecidomyiidae.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da UNICAMP, pelo financiamento parcial deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de Doutorado.

Ao Departamento de Botânica e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP.

À minha família, pelo apoio e pela compreensão da minha "ausência".

Índice

Resumo	viii
Abstract	x
1. Introdução	1
Sistemas de Incompatibilidade em Angiospermas	7
Sistema homomórfico gametofítico (GSI)	9
Sistema homomórfico esporofítico (SSI)	11
Sistema heteromórfico (HetSI)	12
Crescimento do tubo polínico e sítios de reações de incompatibilidade	15
Mecanismos moleculares dos sistemas de incompatibilidade	19
O modelo de Brassicaceae	20
O modelo de Solanaceae e Rosaceae	21
O modelo de Papaveraceae	22
Relações evolutivas entre os genes <i>S</i>	23
Auto-incompatibilidade de ação tardia (LSI), ou auto-incompatibilidade ovariana (OSI)	23
Inibição ovariana precedente à penetração dos óvulos	24
Inibição ovariana posterior à penetração dos óvulos, mas anterior à fusão dos gametas	25
Rejeição pós-zigótica	26
O controle genético da LSI	27
LSI ou depressão endogâmica?	28
2. Objetivo	34
3. Biologia Reprodutiva de <i>Jacaranda racemosa</i> Chamisso (Bignoniaceae)	34
3.1. Resumo	34
3.2. Introdução	35
3.3. Material e Métodos	36
3.4. Resultados	42
Biologia floral	44
Sistema reprodutivo	48
Produção de sementes por frutificação natural	56
3.2. Discussão	56
Sistema reprodutivo	58
Sobre a formação de frutos e a eficácia da polinização	59
3.6. Literatura citada	61
4. Biologia Reprodutiva de <i>Zeyheria montana</i> Martius (Bignoniaceae): Polinização, Sistema Reprodutivo e Origem do Néctar	64
4.1. Resumo	64
4.2. Introdução	65
4.3. Material e Métodos	66
Descrição da espécie	67
Procedimentos	69
4.4. Resultados	73
Eventos florais	73
Visitantes	75
Galhas	77
Análise histológica da câmara nectarífera	79
Sistema reprodutivo	83
4.5. Discussão	88
Biologia floral e origem do néctar	88

Galhas	91
Sistema reprodutivo	92
4.6. Literatura citada	94
5. Biologia Reprodutiva e Estudo Histológico dos Eventos Posteriores à Polinização em <i>Spathodea campanulata</i> Beauv. (Bignoniaceae), uma Espécie com Auto-Incompatibilidade de Ação Tardia	101
5.1. Resumo	101
5.2. Introdução	102
5.3. Material e Métodos	104
Descrição da espécie	104
Procedimentos	105
5.4 Resultados	111
Eventos florais	111
Visitantes	112
Viabilidade polínica e eficácia de deposição de grãos de pólen no estigma	113
Sistema reprodutivo	114
Eventos posteriores à polinização na porção ovariana do tecido transmissor	115
Penetração dos óvulos	118
Histologia do saco embrionário	119
Penetração e fecundação do gametófito feminino em pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada	122
Desenvolvimento do endosperma	123
Formação do tubo proembriônico	127
Óvulos não-funcionais	128
Produção de sementes por fruto	130
5.5. Discussão	131
Biologia da polinização	131
Viabilidade polínica e eficácia da produção de sementes por fruto	133
Embriologia	134
Sistema reprodutivo	137
Desenvolvimento posterior à penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada	137
5.6. Literatura citada	140
6. Sistema Reprodutivo e Aspectos da Biologia Floral de <i>Cybistax antisiphilitica</i> (Martius) Martius (Bignoniaceae)	148
6.1. Resumo	148
6.2. Introdução	149
6.3. Material e Métodos	149
Descrição da espécie	149
Procedimentos	150
6.4. Resultados	154
Fenologia de floração	154
Eventos florais	154
Visitantes	156
Sistema reprodutivo	158
Crescimento dos tubos polínicos no estilete	161
Penetração dos óvulos	161
Produção e viabilidade das sementes	164
6.5. Discussão	166

Biologia floral	166
Sistema reprodutivo	169
6.6. Literatura citada	172
7. Variação do Sistema Reprodutivo e Aspectos da Biologia Floral no Gênero <i>Tabebuia</i> Gomes (Bignoniaceae)	175
7.1. Resumo	175
7.2. Introdução	176
7.3. Material e Métodos	179
Áreas de estudo	179
Descrição das espécies	180
Fenologia de floração, eventos e visitantes florais	186
Sistemas reprodutivos	186
7.4. Resultados	189
Fenologia de floração	189
Eventos florais	189
Visitantes	194
Sistemas reprodutivos	200
<i>Tabebuia chrysotricha</i>	200
<i>Tabebuia heptaphylla</i>	202
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	203
<i>Tabebuia umbellata</i>	207
<i>Tabebuia vellosi</i>	208
Eventos posteriores à polinização em <i>Tabebuia impetiginosa</i>	210
Penetração dos óvulos	213
Desenvolvimento do endosperma	216
Formação do tubo proembriônico	226
Óvulos imaturos e óvulos não-funcionais	227
Polinizações interespecíficas	227
7.5. Discussão	229
Biologia floral	229
Sistemas reprodutivos	233
<i>Tabebuia chrysotricha</i>	233
<i>Tabebuia heptaphylla</i>	238
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	238
<i>Tabebuia umbellata</i>	243
<i>Tabebuia vellosi</i>	243
Compatibilidade interespecífica em <i>Tabebuia</i>	245
7.6. Literatura citada	246
8. Sistemas Reprodutivos em Bignoniaceae	255
Auto-incompatibilidade de ação tardia em Bignoniaceae	258
9. Literatura citada nos capítulos 1 e 8	260

Resumo - Estudos sobre sistemas reprodutivos foram realizados em somente 29 das cerca de 800 espécies de Bignoniaceae. A auto-incompatibilidade foi constatada em 25 espécies, sendo que em 18 destas espécies foram encontradas evidências da ocorrência de auto-incompatibilidade tardia (LSI). Embora a distinção entre a LSI e a depressão endogâmica seja conceitualmente simples, sua verificação experimental pode ser bastante difícil e vários tipos de análises têm sido sugeridas para a verificação da LSI, dentre eles a quantificação dos óvulos penetrados e a análise histológica dos eventos posteriores à autopolinização vs. polinização cruzada. No presente trabalho, foram investigados os sistemas reprodutivos e aspectos da biologia floral de 9 espécies de Bignoniaceae. A determinação dos sistemas reprodutivos foi feita através de experimentos de polinizações controladas associados a outras análises, incluindo testes de germinação das sementes. Observações do desenvolvimento *in situ* dos tubos polínicos em pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada, por microscopia de fluorescência, foram realizadas em *Cybistax antisiphilitica*, *Spathodea campanulata*, *Tabebuia vellosi* e *Zeyheria montana*. Análises histológicas quantitativas dos eventos posteriores à autopolinização vs. polinização cruzada foram feitas em *Jacaranda racemosa*, *S. campanulata* e *T. impetiginosa*. A polinização por beija-flores e a secreção do néctar por tricomas glandulares da parede da câmara nectarífera foram constatadas em *Z. montana*. Em sua área de estudos, *S. campanulata* foi polinizada por *Mimus saturninus*. As demais espécies foram polinizadas principalmente por abelhas de médio e grande porte. Uma nova função é sugerida para o estaminódio de *Jacaranda*, e a conspícua produção de néctar, a morfologia e o modo de apresentação das flores de *C. antisiphilitica* são discutidos no contexto de uma sofisticada estratégia de atração dos polinizadores. A formação de frutos por autopolinização, em proporções comparáveis à frutificação por polinização cruzada, ocorreu em *T. chrysotricha* e *T. heptaphylla*; porém nem todos os indivíduos formaram frutos por autopolinização, o que sugere a quebra da auto-incompatibilidade nestas espécies. A ocorrência de poliembrião somente em *T. chrysotricha* e em sementes resultantes de cruzamentos entre esta espécie e *T. ochracea* demonstra que a auto-compatibilidade em Bignoniaceae não está, necessariamente, associada à

poliembrionia. Para as demais espécies investigadas, os resultados indicaram auto-incompatibilidade completa ou quase completa. Em todas as espécies nas quais o número de óvulos penetrados pôde ser quantificado, a incidência de óvulos penetrados em pistilos autopolinizados foi significativamente menor que em pistilos submetidos à polinização cruzada, durante os primeiros intervalos após a polinização. Porém em intervalos subseqüentes a maioria dos óvulos em pistilos autopolinizados foi penetrada pelos tubos polínicos, sendo que em alguns casos o número de óvulos penetrados praticamente se igualou entre os dois tratamentos. Tais resultados indicam a ocorrência de LSI. Em todas as espécies nas quais a análise histológica dos eventos posteriores à polinização foi realizada, a incidência de óvulos fecundados e o progresso de desenvolvimento inicial do endosperma em óvulos de pistilos autopolinizados foi sempre significativamente menor do que em pistilos submetidos à polinização cruzada, sendo que em *T. impetiginosa* verificou-se também uma desaceleração do desenvolvimento endospermico precedendo a abscisão dos pistilos autopolinizados. A formação de um tubo proembriônico a partir do zigoto é citada pela primeira vez para a família Bignoniaceae. O desenvolvimento inicial do tubo proembriônico em *T. impetiginosa* foi verificado tanto em autopolinizações como em polinizações cruzadas, ao passo que em *S. campanulata* o aborto dos pistilos autopolinizados precedeu a iniciação do tubo proembriônico. Os pistilos autopolinizados foram abortados uniformemente em um intervalo relativamente curto após a polinização, com uma diferença altamente significativa entre o estágio de desenvolvimento alcançado pelos endospermas em pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada. Salvo o atraso no desenvolvimento dos óvulos, nenhum outro sinal de mal-funcionamento em pistilos autopolinizados foi detectado. Portanto, não foram encontradas evidências de que a auto-esterilidade nas espécies estudadas seja decorrente dos efeitos da depressão endogâmica. O significado desta menor eficácia dos tubos polínicos em penetrar os óvulos e desencadear o desenvolvimento subseqüente em pistilos autopolinizados é discutido no contexto de um crescimento inferior, mas não inteiramente suprimido dos tubos polínicos, relatado por outros autores em algumas espécies com auto-incompatibilidade homomórfica convencional.

Abstract - Breeding system studies were performed in only 29 from around 800 species of the Bignoniaceae. Twenty-five species were self-incompatible, and evidences of some kind of late-acting self-incompatibility were found in 18 from these species. Although discrimination between LSI and early-acting inbreeding depression is conceptually simple, experimental verification of this difference may be very difficult, and several kinds of analysis have been proposed to identify true cases of LSI, e.g. quantification of ovule penetration and histological analysis of post-pollination events in selfed vs. crossed pistils. In this study, breeding systems and aspects of floral biology in 9 species of Bignoniaceae are presented. Handled pollination experiments and seed germinability tests were performed with all of these species. *In situ* pollen tube growth observations by fluorescence microscopy, in self- vs. cross-pollinated pistils, were made with *Cybistax antisiphilitica*, *Spathodea campanulata*, *Tabebuia vellosi* and *Zeyheria montana*. Quantitative histological analyses of post-pollination events in selfed vs. crossed pistils were performed in *Jacaranda racemosa*, *S. campanulata* and *T. impetiginosa*. In the study area, the native perching bird *Mimus saturninus* substituted natural pollinators of *S. campanulata*. Hummingbird pollination and secretion of nectar by the nectar chamber wall secretory trichomes were verified in *Z. montana*. Mostly large and medium sized bees pollinated the remaining species. A new function is suggested for the *Jacaranda* staminodium, and the conspicuous nectar secretion, flower morphology and floral display of *C. antisiphilitica* are discussed within the context of an improved strategy of pollinator attraction. In *T. chrysotricha* and *T. heptaphylla*, fruit-set by self-pollination was similar to that obtained by cross-pollination, though self-pollinated flowers did not set fruits in some trees. Therefore, breakdown of self-incompatibility is suggested in these species. Polyembryony was observed in *T. chrysotricha*, and also in seeds resulted from crossings between this species and *T. ochracea*, but not in the other species. This indicates that self-compatibility in Bignoniaceae is not necessarily related to polyembryony. The remaining species are completely or almost completely self-incompatible. In all the species in which ovule penetration was counted, incidence of penetrated ovules was significantly higher in crossed, relative to selfed

pistils, during the initial time intervals after pollination. However, most of the ovules in selfed pistils were penetrated in subsequent intervals, and in some cases the incidence of penetrated ovules in this pistils levelled out with cross-pollinated pistils. These results indicate the occurrence of LSI. All the species in which histological analysis of post-pollination events were made presented a significantly slower rate of ovule fertilization and progress of the initial endosperm development in self-pollinated pistils, and a clear developmental endosperm slowdown in selfed ovules were observed in *T. impetiginosa* before pistil abscission. The formation of a proembryonal tube starting from the zygote was observed in both cross- and self-pollinated pistils in *T. impetiginosa*, but only in crossed pistils in *S. campanulata* - abscission of selfed pistils in the later occurred before proembryonal tube initiation. This is the first citation of a proembryonal tube in Bignoniaceae. Self-pollinated pistils were uniformly aborted in a few days after pollination, with a highly significant difference between ovules of selfed vs. crossed pistils relative to the stage of development reached by the endosperm. No signs of ovule malfunction (other than slower development in selfed pistils) were observed. Therefore, no evidences of self-pollinated pistil abortion due to the effects of inbreeding depression were found. The possible role of such slow self pollen tube effectiveness as a recognition event is discussed within the context of slow but not entirely suppressed self pollen tube grow reported for some species with conventional homomorphic self-incompatibility.

Palavras-chave: Auto incompatibilidade de ação tardia (late-acting self-incompatibility), sistemas reprodutivos (breeding systems), Bignoniaceae, *Cybistax*, *Jacaranda*, *Spathodea*, *Tabebuia*, *Zeyheria*, tubo polínico (pollen tube), embriologia (embryology), biologia floral (floral biology), polinização (pollination), origem do néctar (nectar origin), tubo proembriônico (proembryonal tube), desenvolvimento endospermico (endosperm development), poliembrionia (polyembryony), auto-compatibilidade (self-compatibility), apomixia (apomixis), compatibilidade interespecífica (interspecific compatibility).

Introdução

A família Bignoniaceae é composta de cerca de 112 gêneros e 800 espécies de distribuição predominantemente neotropical (Spangler & Olmstead 1999). Especialmente prevalente em florestas secas, tem sido considerada a segunda família mais diversificada em plantas lenhosas (após Leguminosae) nestes ambientes (Gentry 1988). A maioria das espécies de Bignoniaceae é constituída de lianas e, de fato, do ponto de vista ecológico, esta é a mais importante família de lianas neotropicais (Gentry 1989). A maior parte das espécies arbóreas concentra-se na tribo Tecomeae, constituída de 19 gêneros e 203 espécies nos neotrópicos. No Brasil são conhecidos 11 gêneros desta Tribo (*Cybistax*, *Digomphia*, *Godmania*, *Jacaranda*, *Paratecoma*, *Perianthomega*, *Sparattosperma*, *Spirotecoma*, *Tabebuia*, *Tecoma* e *Zeyheria*), além de três gêneros monoespecíficos introduzidos (*Campsis*, *Podranea* e *Spathodea*).

Embora o número de trabalhos sobre a biologia reprodutiva de plantas brasileiras venha aumentando rapidamente nos últimos anos, muito pouco foi até então produzido se levarmos em consideração a enorme diversidade de espécies e de estratégias reprodutivas entre as angiospermas da flora nacional. Muitos dos trabalhos existentes referem-se a aspectos relacionados com a biologia reprodutiva de Bignoniaceae, porém não abordando este tema como assunto principal (Tabela 1). Raramente tais estudos referem-se a espécies nativas do Brasil.

Somente em 29 espécies de Bignoniaceae a determinação dos sistemas reprodutivos foi executada de modo conclusivo (Tabela 2), 19 destas espécies pertencentes à tribo Tecomeae. Em todas as espécies investigadas quanto aos sítios de reações de incompatibilidade (18 espécies; Tabela 2), a rejeição dos pistilos autopolinizados ocorreu após a maior parte dos óvulos ter sido penetrada pelos tubos polínicos, o que indica a ocorrência de algum tipo de auto-incompatibilidade de ação tardia (LSI), ou auto-incompatibilidade ovariana (OSI) nestas espécies (Gibbs & Bianchi 1999)

Tabela 1: Trabalhos sobre biologia floral e temas correlatos, realizados com espécies de Bignoniaceae.

Espécies	Assunto	Autor(es) e ano da publicação
Algumas espécies dos gêneros <i>Arrabidaea</i> , <i>Bignonia</i> , <i>Campsis</i> , <i>Catalpa</i> , <i>Chilopsis</i> , <i>Colea</i> , <i>Crescentia</i> , <i>Eccremocarpus</i> , <i>Heterophragma</i> , <i>Jacaranda</i> , <i>Kigelia</i> , <i>Macfadyena</i> , <i>Parmentiera</i> , <i>Schlegelia</i> , <i>Spathodea</i> , <i>Stereospermum</i> , <i>Tabebuia</i> , <i>Tecoma</i> e <i>Tecomaria</i> .	Revisão sobre Bignoniaceae, referência a alguns aspectos da biologia floral e polinização por abelhas.	Knuth 1905
<i>Catalpa bignonioides</i> , <i>Campsis radicans</i> e <i>Spathodea campanulata</i> .	Estigmas sensíveis e seu significado adaptativo como estratégia para evitar a autopolinização.	Newcombe 1922, 1924
<i>Crescentia cujete</i>	Polinização por morcegos.	Porsch 1931
<i>Arrabidaea magnifica</i>	Comportamento de pilhagem do néctar floral por <i>Xylocopa</i>	van der Pijl 1954
<i>Crescentia</i>	Polinização por morcegos.	Jaeger 1954
<i>Kigelia aethiopica</i>	Polinização por morcegos.	Vogel 1958
<i>Amphitecna</i> , <i>Crescentia cujete</i> , <i>Kigelia aethiopica</i> , <i>K. africana</i> , <i>K. pinnata</i> , <i>Markhamia (Dolichandrone) stipulata</i> , <i>Oroxylon indicum</i> , <i>Parmentiera alata</i> .	Visitas de morcegos (incluindo citações de outros autores).	Baker & Harris 1957
<i>Crescentia cujete</i>	Polinização por morcegos.	Carvalho 1960
<i>Tabebuia guayacan</i> , <i>T. rosea</i> e <i>T. chrysantha</i>	Sincronização sazonal da reprodução sexual; vantagens adaptativas da floração e frutificação durante a estação seca	Janzen 1967
<i>Parmentiera cereifera</i>	Polinização por morcegos.	Vogel 1969
<i>Cydistia</i> , <i>Bignonia</i> e <i>Amphilophium</i>	O papel de abelhas Euglossini na polinização à longas distâncias em plantas tropicais.	Janzen 1971
<i>Tabebuia chrysantha</i>	Visitantes florais (aves e insetos) e suas inter-relações com esta espécie.	Borrero 1972

Tabela 1 (continuação).

Espécies	Assunto	Autor(es) e ano da publicação
Bignoniaceae em geral	Morfologia floral, padrões coevolutivos, síndromes de polinização, fenologia	Gentry 1973, 1974a, b, 1976, 1978
<i>Campsis radicans</i>	Morfologia e anatomia de nectários florais e extraflorais, e seu papel biológico.	Elias & Gelband 1976
<i>Pachyptera hymenaea</i>	Visitantes florais; polinização por beija-flores e abelhas coletoras de néctar.	Barrows 1977
<i>Catalpa speciosa</i>	Polinização por abelhas e mariposas (polinização diurna e noturna).	Stephenson & Thomas 1977
<i>Chilopsis linearis</i>	Interações co-evolutivas entre <i>Bombus sonorus</i> e esta espécie.	Whitham 1977
<i>Spathodea campanulata</i>	Visitantes florais (insetos e pássaros) em árvores cultivadas na Colômbia.	Borrero <i>et al.</i> 1979
<i>Adenocalymma bracteatum</i>	Aspectos co-adaptativos da interação flor-abelha.	Brantjes 1979
<i>Tecoma stans</i>	Aspectos da melitofilia.	Yanagizawa 1980
<i>Jacaranda macrantha</i>	Aspectos da biologia reprodutiva.	Bittencourt 1981
<i>Zeyheria montana</i>	Polinização por beija-flores.	Yanagizawa <i>et al.</i> 1982
<i>Tabebuia neochrysantha</i>	Padrões fenológicos e influência do estresse hídrico sobre a floração e o rebrotamento.	Reich & Borchert 1982
<i>Campsis radicans</i>	Biologia floral, polinização por beija-flores e abelhas, e frutificação.	Bertin 1982
Várias espécies de <i>Jacaranda</i>	Morfologia, ecologia, biologia, corologia e especiação; alguns aspectos da biologia floral neste gênero.	Morawetz 1982
<i>Chilopsis linearis</i>	Efeito da disponibilidade do recursos e da eficácia de polinização sobre a frutificação.	Petersen <i>et al.</i> 1982

Tabela 1 (continuação).

Espécies	Assunto	Autor(es) e ano da publicação
<i>Arrabidaea brachypoda</i> , <i>A. samydoides</i> , <i>A. triplinervia</i> , <i>Jacaranda oxyphylla</i> e <i>J. decurrens</i> .	Aspectos da biologia floral.	Yanagizawa 1983
<i>Distictella elongata</i>	Competição por polinizadores entre esta espécie e <i>Crotalaria anagyroides</i> (Leguminosae).	Yanagizawa & Gottsberger 1983
Bignoniaceae em geral	Pilhagem de néctar por <i>Oxaea flavescens</i> .	Camargo <i>et al.</i> 1983
<i>Kigelia pinnata</i>	Ontogenia, secreção e a composição do néctar de nectários floral e extraflorais, e seus papéis biológicos na polinização e na proteção contra herbívoros.	Subramanian & Inamdar 1985
<i>Bignonia illicium</i>	Ontogenia e secreção do néctar de nectários floral e extraflorais, e seus papéis biológicos na polinização e proteção contra herbivoria.	Subramanian & Inamdar 1986
<i>Deplanchea tetraphylla</i>	Polinização por pássaros que empoleiram.	Weber & Vogel 1986
<i>Tecomaria capensis</i>	Estrutura, secreção, composição do néctar e papéis biológicos dos nectários floral e extraflorais.	Subramanian & Inandar 1989
<i>Pyrostegia venusta</i>	Influência de fatores climáticos (luz, temperatura, umidade relativa e precipitação) na floração e reprodução em populações cultivadas.	Sampaio 1991
<i>Arrabidaea brachypoda</i> , <i>A. septrum</i> , <i>Anemopaegma glaucum</i> , <i>A. arvense</i> , <i>Cybistax antisiphilitica</i> , <i>Jacaranda caroba</i> , <i>J. ulei</i> , <i>J. rufa</i> , <i>J. simplicifolia</i> , <i>Memora pedunculata</i> , <i>Spathodea campanulata</i> , <i>Tabebuia aurea</i> , <i>T. ochracea</i> , <i>T. serratifolia</i> , <i>T. impetiginosa</i> , <i>T. rosea</i> , <i>T. roseo-alba</i> e <i>Zeyheria montana</i> .	Fenologia, dinâmica de floração e produtividade de frutos e sementes.	Stevens 1991
<i>Spathodea campanulata</i>	Visitantes florais em árvores cultivadas em Rio Claro, SP.	Oliveira <i>et al.</i> 1991
<i>Jacaranda caroba</i>	Biologia reprodutiva, incluindo polinização.	Vieira <i>et al.</i> 1992
<i>Tabebuia serratifolia</i>	Composição do néctar e estrutura dos nectários floral e extraflorais, bem como seus papéis biológicos.	Thomas & Dave 1992

Tabela 1 (continuação).

Espécies	Assunto	Autor(es) e ano da publicação
<i>Adenocalymma bracteatum</i> , <i>A. marginatum</i> , <i>Amphilophium vauthieri</i> , <i>Anemopaegma chamberlaynii</i> , <i>Arrabidaea samydoides</i> , <i>A. selloi</i> , <i>A. triplinervia</i> , <i>Lundia obliqua</i> , <i>Pithecoctenium crucigerum</i> e <i>Stizophyllum perforatum</i> .	Aspectos da ecologia floral.	Amaral 1992
<i>Pyrostegia venusta</i>	Padrão de secreção, composição, efeito da remoção e de mudanças na concentração e volume do néctar floral.	Galetto <i>et al.</i> 1994
<i>Tabebuia chrysotricha</i>	Aspectos da biologia floral, com ênfase na entomofauna visitante das flores.	Vitali & Machado 1995
<i>Adenocalymma marginatum</i> , <i>Amphilophium paniculatum</i> , <i>Arrabidaea chica</i> , <i>A. truncata</i> , <i>Campsis radicans</i> , <i>Dolichandra cynanchoides</i> , <i>Jacaranda mimosifolia</i> , <i>Macfadyena dentata</i> , <i>M. unguis-cati</i> , <i>Pithecoctenium cynanchoides</i> , <i>Podranea ricasoliana</i> , <i>Pyrostegia venusta</i> , <i>Tabebuia heptaphylla</i> , <i>Tecoma garrocha</i> e <i>T. stans</i> .	Estrutura do nectário e composição química do néctar; aspectos da biologia floral.	Galetto 1995
<i>Zeyheria montana</i>	Ultraestrutura dos tricomas secretores do gineceu.	Machado <i>et al.</i> 1995
<i>Tabebuia rosea</i>	Fenologia.	Figueiroa & Fournier 1996
<i>Tecoma stans</i>	Receptividade do estigma e esterilidade sazonal em plantas cultivadas na Índia.	Singh & Chauhan 1996
<i>Tabebuia aurea</i> e <i>T. ochracea</i>	Ecologia da polinização.	Barros 2001
<i>Tecoma stans</i>	Biologia floral.	Dutra & Machado 2001
<i>Lundia cordata</i>	Polinização e origem do néctar.	Lopes <i>et al.</i> 2002

Tabela 2: Sistemas reprodutivos em Bignoniaceae (em ordem cronológica de determinação).

Espécie	Sistema Reprodutivo	LSI	Autores/Data
1. <i>Tabebuia rosea</i>	auto-incompatível		Bawa 1974, Bawa & Webb 1984
2. <i>Tabebuia palmeri</i>	auto-incompatível		Bawa 1974
3. <i>Tabebuia neochrysantha</i>	auto-incompatível	sim	Bawa 1974; Seavery & Bawa 1986
4. <i>Godmania aesculifolia</i>	auto-incompatível		Bawa 1974
5. <i>Catalpa speciosa</i>	auto-incompatível		Stephenson & Thomas 1977
6. <i>Chilopsis linearis</i>	auto-incompatível		Petersen <i>et al.</i> 1982
7. <i>Astianthus viminalis</i>	auto-compatível		Bullock 1985
8. <i>Tabebuia donnell-smithii</i>	auto-incompatível		Bullock 1985
9. <i>Tabebuia chrysantha</i>	auto-incompatível		Bullock 1985
10. <i>Tabebuia impetiginosa</i>	auto-incompatível		Bullock 1985
11. <i>Campsis radicans</i>	auto-incompatível	sim	Bertin & Sullivan 1988
12. <i>Pyrostegia venusta</i>	auto-compatível	-	Gobatto-Rodrigues & Stort 1992
13. <i>Jacaranda caroba</i>	auto-incompatível	sim	Vieira <i>et al.</i> 1992
14. <i>Adenocalyma bracteatum</i>	auto-incompatível	sim	Amaral 1992
15. <i>Ademocalyma marginatum</i>	auto-incompatível	sim	Amaral 1992
16. <i>Anemopaegma chamberlaynii</i>	auto-incompatível	sim	Amaral 1992
17. <i>Arrabidaea samydoides</i>	auto-incompatível	sim	Amaral 1992
18. <i>Arrabidaea selloi</i>	auto-incompatível	sim	Amaral 1992
19. <i>Arrabidaea triplinervia</i>	auto-incompatível	sim	Amaral 1992
20. <i>Amphilophium vauthieri</i>	auto-incompatível	sim	Amaral 1992
21. <i>Stizophyllum perforatum</i>	auto-incompatível	sim	Amaral 1992
22. <i>Tabebuia aurea</i>	auto-incompatível	sim	Gibbs & Bianchi 1993
23. <i>Tabebuia ochracea</i>	auto-incompatível	sim	Gibbs & Bianchi 1993
24. <i>Pandorea beileyana</i>	auto-incompatível	sim	James & Knox 1993
25. <i>Pandorea jasminioides</i>	auto-incompatível	sim	James & Knox 1993
26. <i>Pandorea pandorana</i>	auto-incompatível	sim	James & Knox 1993
27. <i>Dolichandra cynanchoides</i>	auto-incompatível	sim	Gibbs & Bianchi 1999
28. <i>Tabebuia nodosa</i>	auto-incompatível	sim	Gibbs & Bianchi 1999
29. <i>Tecoma stans</i>	auto-compatível	-	Dutra & Machado 2001

O presente trabalho foi desenvolvido com plantas nativas, em seus ambientes naturais, e com plantas cultivadas, todas pertencentes à Tribo Tecomeae. A seleção das espécies estudadas foi realizada levando-se em consideração critérios como a ausência total ou parcial de informações na literatura especializada sobre a biologia reprodutiva das mesmas, bem como a viabilidade de realização do

trabalho. Foram estudadas 6 espécies cultivadas na UNICAMP: *Tabebuia chrysotricha*, *T. umbellata*, *T. impetiginosa*, *T. heptaphylla*, *Cybistax antisiphilitica* e *Spathodea campanulata*.

A principal área de estudo das plantas em ambiente natural foi a Serra do Cipó e proximidades, no município de Santana do Riacho, Minas Gerais. A escolha desta área se justificou pela facilidade de acesso à mesma por parte do autor. Na Serra do Cipó existem 24 espécies de Bignoniaceae, distribuídas em 12 gêneros (Lohmann & Pirani 1998). Parte da Cadeia do Espinhaço, sua vegetação é constituída principalmente por campos rupestres, apresentando também matas ciliares, capões e manchas de cerrado. Semir (1991) salientou que a Cadeia do Espinhaço apresenta solos predominantemente quartizíticos e de topografia acidentada, cuja vegetação caracteriza-se por ser um complexo vegetacional formado por um mosaico de fisionomias diferentes, propondo para o mesmo a denominação “complexo vegetacional de quartizito”. A família Bignoniaceae é representada em todos os tipos vegetacionais que compõem este complexo. Não há registros de estudos sobre a biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae na Serra do Cipó. As espécies da Serra do Cipó presentemente investigadas foram *Tabebuia vellosi*, *Jacaranda racemosa* e *Zeyheria montana*. Para a espécie *Z. montana*, parte das observações de campo foram também realizadas na Serra da Canastra (município de São Roque de Minas), no município de Lagoa Santa e na Área de Preservação do Zoológico de Belo Horizonte, Minas Gerais. Estudos de campo com a espécie *T. chrysotricha* foram também realizados em uma população natural localizada na Serra da Mantiqueira, próximo aos municípios de Santa Rita de Jacutinga e de Bom Jardim de Minas, Minas Gerais.

Sistemas de Incompatibilidade em Angiospermas

A auto-incompatibilidade (SI) é uma sistema genético que previne a auto-fertilidade (i.e. a produção de sementes decorrentes de autopolinização) em espermatófitas. É um dos principais mecanismos que favorece a geração de variabilidade genética numa população. Este fenômeno foi pela primeira vez verificado por Kölreuter (1764, *apud* Nettancourt 1999) em *Verbascum phoeniceum*

(Scrophulariaceae), mas a observação do mesmo fenômeno em várias espécies de diferentes famílias ganhou impulso com o trabalho de Darwin (1877) sobre heterostilia. A auto-incompatibilidade é um dos principais mecanismos que evoluíram nas plantas com flores de modo a encorajar a xenogamia e evitar os efeitos deletérios da autogamia sobre a aptidão da progênie de uma espécie. Estudos realizados em cinco diferentes tipos de florestas neotropicais indicam uma percentagem de espécies auto-incompatíveis variando entre 76 a 86%, salvo em uma floresta de altitude na qual a frequência de espécies com SI foi de 42% (Gibbs 1990). A auto-incompatibilidade é particularmente importante para as plantas homóicas (i.e. com flores simultaneamente pistiladas e estaminadas), as quais constituem cerca de 72% das espécies de angiospermas (Cruden & Lloyd 1995). A homoicia provavelmente foi favorecida na evolução das angiospermas, uma vez que, em cada visita a uma flor completa, o polinizador executa tanto a deposição do pólen no estigma quanto a retirada do pólen das anteras, ao passo que, em plantas monóicas ou dióicas, apenas a deposição do pólen no estigma, ou a retirada do pólen das anteras, são executados à cada flor visitada. Não obstante, a homoicia teria favorecido a autogamia se sua evolução não tivesse sido acompanhada por mecanismos estruturais e/ou fisiológicos que evitam a autopolinização, dos quais os mecanismos de auto-incompatibilidade são seguramente os mais sofisticados.

Em casos extremos, plantas fortemente auto-incompatíveis não formam frutos e sementes a partir de flores autopolinizadas. Porém na maioria dos casos a auto-incompatibilidade se expressa por uma baixa produtividade de frutos e sementes em autopolinizações, quando comparado ao número de sementes e frutos formados por polinizações cruzadas. Todavia, nem sempre as diferenças verificadas entre o número de frutos e sementes formados por autopolinizações e polinizações cruzadas são decorrentes de um sistema de auto-incompatibilidade (e.g. a depressão endogâmica, um fenômeno sem

relação direta¹ com os sistemas de incompatibilidade, freqüentemente se expressa pela baixa produção de sementes viáveis resultantes de autopolinização, quando comparada à polinização cruzada).

O controle genético nos sistemas de auto-incompatibilidade é geralmente exercido por um único *locus* principal, (o gene *S*), com muitas formas alélicas alternativas, os quais podem estar associados a outros genes que não contribuem para a especificidade da SI, mas parecem participar de sua expressão (Nettancourt 1997). Em alguns casos, não obstante, o controle genético é polifatorial, ou seja, dois ou mais *loci* principais podem estar envolvidos. Existem diferentes maneiras de classificar os sistemas de incompatibilidade, as quais são definidas pelo tipo de controle genético, pelos locais no pistilo onde se processam as reações de reconhecimento e rejeição do gametófito masculino quando este é proveniente do mesmo esporófito, e conforme as flores da espécie em questão sejam homomórficas ou heteromórficas. Entretanto, o conhecimento derivado de estudos genéticos sobre os sistemas de incompatibilidade permitiu, até então, o reconhecimento de apenas três tipos fundamentais de SI nos quais os modos de controle genético foram razoavelmente bem estabelecidos: o sistema homomórfico gametofítico (GSI), o sistema homomórfico esporofítico (SSI) e o sistema heteromórfico (HetSI).

Sistema Homomórfico Gametofítico (GSI)

Embora relativamente poucas taxa tenham sido até então submetidas a estudos genéticos detalhados, o sistema de incompatibilidade homomórfico gametofítico é considerado o mais distribuído nas angiospermas, sendo encontrado nas famílias Solanaceae, Rosaceae, Papaveraceae, Liliaceae, Onagraceae Leguminosae, Commelinaceae e Amaryllidaceae (Gibbs 1986). De acordo com o modelo genético estabelecido, apenas um *locus S*, multialélico, atua na especificidade deste sistema (como já citado, genes adicionais podem participar no processo de expressão do *locus S*, mas não especificam a reação de incompatibilidade). Os alelos atuam independentemente, e a reação de incompatibilidade

¹ Entretanto a depressão endogâmica gera pressões seletivas responsáveis pela emergência de fatores que promovem a xenogamia, inclusive dos mecanismos fisiológicos dos sistemas de SI.

ocorre quando o produto do alelo s do gametófito masculino (grão de pólen ou tubo polínico) encontra o produto de um alelo s idêntico no tecido transmissor do estigma/estilete. Em outras palavras, a reação de incompatibilidade é determinada pelo alelo s portado pelo gametófito masculino - daí o termo *gametofítico* referente ao nome deste sistema -, contrariamente aos sistemas de incompatibilidade esporofíticos, nos quais ambos os alelos s presentes no esporófito doador de pólen (parental paterno) determinam a reação de incompatibilidade (ver adiante). Admite-se geralmente que o produto do gene S em plantas com GSI é depositado na intina do grão de pólen. O termo *homomórfico* refere-se às flores das espécies que apresentam tal sistema de SI, as quais são morfológicamente homogêneas, ou seja, não variam quanto a altura das anteras e do estigma.

Ao sofrer meiose, uma angiosperma diplóide com a constituição alélica s_1s_2 para o *locus S* produz quantidades equivalentes de grãos de pólen portadores dos alelos s_1 e s_2 . Conforme já mencionado, o pólen s_1 é incapaz de transportar os seus gametas até a oosfera em uma planta também portadora do alelo s_1 . Da mesma forma, o pólen s_2 é incompatível com plantas portadoras do alelo s_2 . Assim os cruzamentos $s_1s_2 \times s_1s_2$, $s_1s_3 \times s_1s_2$ e $s_3s_4 \times s_1s_2$ resultarão em 0%, 50% e 100% de compatibilidade, respectivamente. É importante salientar que a reação de incompatibilidade surge não só nas autopolinizações, mas também em polinizações cruzadas nas quais o esporófito receptor do pólen circunstancialmente apresenta o alelo s presente no grão de pólen. Portanto o sistema de SI também impõe restrições aos cruzamentos entre indivíduos geneticamente aparentados. Porém, quando o número de alelos em uma população é igual ou maior que 10, cruzamentos aleatórios entre indivíduos desta população são pouco afetados pelo sistema de incompatibilidade (Mayo & Hayman 1973). Quarenta ou mais alelos foram verificados em populações de algumas espécies que apresentam auto-incompatibilidade gametofítica (Gibbs 1986). Porém, em outras espécies o número de alelos pode chegar às centenas.

Embora a presença de um único *locus S* multialélico caracterize a maioria das angiospermas com GSI, em alguns casos o controle genético em plantas deste grupo é polifatorial, i.e. regido por 2 ou

mais *loci*. Um sistema com dois *loci*, denominados *S* e *Z*, foi estabelecido em *Secale cereale* e *Festuca pratensis* (Lundqvist 1955, 1956), ambas pertencentes à família Poaceae. Os *loci S* e *Z* atuam independentemente, de modo que somente os encontros entre pólen e estigma com alelos idênticos em ambos os *loci*, tal como em autopolinizações, são 100% incompatíveis. Em outras palavras, somente quando ambos os alelos *s* e *z* do grão de pólen encontram alelos idênticos no estigma, a reação de incompatibilidade é desencadeada. Assim o cruzamento $s_{1.2} z_{1.2} \times s_{1.2} z_{1.2}$ é 100% incompatível, mas a despeito da existência de três alelos em comum no sistema, o cruzamento $s_{1.2} z_{1.2} \times s_{1.2} z_{1.3}$ é 50% compatível, devido aos grãos de pólen $s_1 z_3$ e $s_2 z_3$. Portanto os sistemas polifatoriais apresentam uma maior flexibilidade nos cruzamentos xenogâmicos, mesmo com poucos alelos em cada *locus*. Além do controle bifatorial de Poaceae, controles exercidos por três a quatro *loci* de segregação independente foram propostos para *Ranunculus acris* (Ranunculaceae), *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae; Lundqvist *et al.* 1973; Østerbye 1975), *Eruca* (Verma *et al.* 1977) e *Lillium* (Lundqvist 1991).

Sistema Homomórfico Esporofítico (SSI)

Tal como no sistema homomórfico gametofítico, o controle genético da incompatibilidade em plantas com auto-incompatibilidade esporofítica (SSI) é exercido por apenas um *locus S*, contendo vários alelos em uma população. Porém, como já salientado, no sistema SSI ambos os alelos que constituem a planta doadora de pólen (o esporófito diplóide) determinam a reação de incompatibilidade. Admite-se que o produto do gene *S* em plantas com SSI é uma substância derivada das células tapetais, depositada na exina dos grãos de pólen como componente do trifino, durante o processo de gametogênese masculina (Nettancourt 1999). Porém, Pandey (1958) sugeriu que a diferença em comportamento entre o pólen de plantas com GSI e SSI é devida a uma mudança temporal da ação do gene *S*, sendo que no sistema esporofítico o gene é ativado antes da meiose, enquanto no sistema gametofítico o gene é ativado após a meiose. Ambos os modelos para a localização do produto do gene *S* nos grãos de pólen parecem ainda ser aceitos na atualidade

(Nettancourt 1999). Assim, embora uma planta s_1s_2 produza quantidades equivalentes de grãos de pólen dos haplótipos s_1 e s_2 , ambos os tipos de pólen são incompatíveis com o estigma de plantas que apresentem os alelos s_1 ou s_2 . Em outras palavras, cada grão de pólen (haplóide), embora possua apenas um alelo s em seus núcleos, é potencialmente capaz de desencadear a reação de incompatibilidade para ambos os alelos presentes no esporófito no qual o pólen foi formado. Portanto, os cruzamentos $s_1s_2 \times s_1s_2$, $s_1s_2 \times s_1s_3$ e $s_1s_2 \times s_2s_3$ serão 100% incompatíveis, enquanto que o cruzamento $s_1s_2 \times s_3s_4$ será 100% compatível. Isto porém só ocorre quando não há relações de dominância entre os alelos. Este sistema de incompatibilidade parece ser bastante raro nas angiospermas, tendo emergido várias vezes em grupos taxonômicos filogeneticamente não-relacionados. Os casos melhor conhecidos são os de espécies das famílias Brassicaceae e Asteraceae, especialmente em cultivares. A auto-incompatibilidade esporofítica foi também proposta para *Ipomoea leucantha* (Convolvulaceae; Koyama *et al.* 1980), *Corylus avellana* (Betulaceae; Thompson 1979a, b) e *Cerastium arvense* (Caryophyllaceae; Lundqvist 1979).

Sistema Heteromórfico (HetSI)

Este sistema de incompatibilidade está, freqüentemente, embora nem sempre, associado com a distília (i.e. quando os indivíduos de uma população estão divididos em dois grupos, conforme apresentem flores com estilete longo ou curto) e tristília (i.e. quando os indivíduos de uma população são enquadrados em três diferentes grupos, uma vez que suas flores podem apresentar três diferentes comprimentos do estilete). Daí o termo *heteromórfico* como referência à heterostília, a qual também caracteriza-se pelas flores diferenciarem-se quanto ao comprimento dos estames. Devido a tal associação entre heterostília e a HetSI, este sistema é mais facilmente reconhecido na natureza. De acordo com Ganders (1979), 24 famílias e mais de 164 gêneros de angiospermas (de um total de 400 famílias investigadas) apresentaram HetSI. As famílias que apresentam o maior número de gêneros e espécies heteromórficos são Primulaceae, Oxalidaceae, Plumbaginaceae, Connaraceae e, acima de

tudo, Rubiaceae. Porém é comum encontrarmos famílias com apenas um ou dois gêneros heteromórficos, tal como em Loganiaceae, Saxifragaceae, Pontederiaceae e Polygonaceae, ou mesmo algumas espécies heterostílicas em gêneros predominantemente homomórficos, tais como *Anchusa* e *Plumonaria* (Boraginaceae), e *Bauhinia* (Leguminosae). Portanto a ampla distribuição da HetSI indica a evolução independente deste sistema em muitos grupos taxonômicos, filogeneticamente não-relacionados, e a HetSI parece ter emergido mais frequentemente do que os sistemas homomórficos (Talavera *et al.* 2001).

A auto-incompatibilidade heteromórfica também é conhecida como dialélica, pois apenas dois alelos estão envolvidos na especificação da incompatibilidade. Também envolve um mecanismo "esporofítico", no sentido de que a rejeição do pólen é determinada pelo esporófito que o produziu. No modelo clássico proposto para espécies do gênero *Primula* (Dowrick 1956, Mather 1950), a forma longistila ("pin") é considerada um homozigoto recessivo para o *locus S* (*ss*), enquanto que a forma brevistila ("thrum") é um heterozigoto (*Ss*). Se o sistema fosse gametofítico, no cruzamento *ss* x *Ss* metade do pólen produzido pela planta brevistila (haplótipo *s*) deveria ser incompatível com o estigma de uma planta longistila (*ss*) e somente poderíamos encontrar na progênie deste cruzamento indivíduos com flores brevistilas (*Ss*). Isto não acontece, pois todo o pólen produzido por uma planta brevistila (*Ss*) expressa a reação de incompatibilidade do alelo dominante *S*, independentemente do haplótipo *s* concernente à metade dos grãos de pólen produzidos pela mesma planta, tal como esperado em um sistema de controle esporofítico. Assim, grãos de pólen portadores do alelo *s* no seu genoma, derivados de uma planta com flores brevistilas (*Ss*), são compatíveis em uma planta com flores longistilas. Como as plantas com flores brevistilas (*Ss*) apresentam estames longos e as plantas com flores longistilas (*ss*) apresentam estames curtos, somente os cruzamentos inter-individuais legítimos, i.e. entre o pólen de estames longos (planta *Ss*) e o estigma de estiletos longos (planta *ss*), ou entre o pólen de estames curtos (planta *ss*) e o estigma de estiletos curtos (planta *Ss*), são compatíveis.

Além do comprimento dos estiletes e da altura (posição) das anteras, outras diferenças morfológicas normalmente acompanham as diferentes formas florais (e conseqüentemente os genótipos *Ss* e *ss*) da heterostilia, e.g. o tamanho do pólen, a morfologia da exina, o tamanho das papilas estigmáticas, etc. No exemplo clássico de Primulaceae, estas características morfológicas estão associadas às formas *brevistila* e *longistila* da seguinte forma:

<i>flores brevistilas</i> ("thrum")	<i>flores longistilas</i> ("pin")
estames longos	estames curtos
grão de pólen maior	grão de pólen menor
papilas estigmáticas curtas	papilas estigmáticas alongadas
retículo da exina com lúmens maiores	retículo da exina com lúmens menores

Outras combinações de características morfológicas do pólen e das papilas estigmáticas são possíveis em outras famílias com flores heterostílicas e HetSI, e vários estudos indicam que as características morfológicas do pólen e das papilas estigmáticas que acompanham as formas florais podem favorecer a aderência e, conseqüentemente, o potencial germinativo dos grãos de pólen na superfície estigmática. De fato, a associação entre tais caracteres está relacionada com a própria organização estrutural do *locus S* em plantas com HetSI, pois verificou-se que os genes que governam a expressão de tais características morfológicas estão unidos por *linkage* ao *locus S*, formando um supergene heteroalélico (Vuilleumier 1967, Ganders 1979, Wyatt 1983). Assim, embora existam diferenças nas combinações morfológicas dos sistemas heteromórficos de diferentes taxa, provavelmente houve um conjunto de pressões seletivas determinando a emergência de um *pool* de características morfológicas associados ao sucesso do sistema reprodutivo. As mesmas pressões seletivas que determinaram a emergência das características morfológicas e do controle genético da auto-incompatibilidade a elas associado, determinaram também a aproximação dos genes envolvidos até que os mesmos passaram a constituir um supergene. Não obstante, se o sistema de incompatibilidade dialélico evoluiu antes ou depois da

emergência das características morfológicas à ele associadas é uma questão discutível (Talavera *et al.* 2001).

Crescimento dos tubos polínicos e sítios de reações de incompatibilidade

Numa flor em início de antese, o jovem gametófito masculino, o grão de pólen, tem uma série de funções especializadas a desempenhar. As funções principais são produzir dois gametas masculinos, as células espermáticas, e transportá-los dentro do tubo polínico e através de tecidos especializados do gineceu até o óvulo, onde o gametófito masculino encontra o saco embrionário (gametófito feminino) e promove a dupla fecundação. Quando o grão de pólen é liberado na antera deiscente, ele existe como um organismo livre, o qual será transportado pelo vento, por animais ou por outros agentes até o estigma do pistilo de uma flor. A partir de então, o gametófito masculino inicia uma nova fase da sua vida. Se o pistilo é compatível, o grão de pólen germina dando origem a uma estrutura tubular, o tubo polínico, dentro do qual as células espermáticas são transportadas até o saco embrionário. Durante esta fase, denominada acoplamento, existe uma intrincada interação entre o tubo polínico - que essencialmente é a célula vegetativa do gametófito masculino contendo as células espermáticas - e as células de tecidos do pistilo. Para entendermos o que acontece no processo que retém o desenvolvimento de um gametófito masculino num pistilo incompatível, i.e. a reação de incompatibilidade, é necessário primeiro compreendermos como se processa o crescimento do tubo polínico.

A natureza do crescimento do tubo polínico é diferente do crescimento da maioria das outras células vegetais, pois nestas o crescimento se processa usualmente em toda a sua superfície. Já o crescimento do tubo polínico restringe-se à sua região apical (Mascarenhas 1993). A parede do tubo polínico é formada por duas, em alguns casos três camadas, cuja constituição química é variável. Porém, na maioria das espécies já estudadas, a camada externa é de natureza fibrilar, tendo a pectina como principal componente polissacarídico. A camada interna é constituída especialmente de calose, é

depositada secundariamente sobre a superfície interna da camada externa e está ausente da zona apical de crescimento. Ambas as camadas normalmente estão impregnadas com outras substâncias, incluindo glicoproteínas. O citoplasma do tubo polínico posterior à zona apical contém mitocôndrias, dictiossomas, retículo endoplasmático e vesículas em abundância. Já a zona de crescimento apical contém uma grande concentração de vesículas e é destituída de outras organelas. Estas vesículas, derivadas dos dictiossomas, contêm precursores de parede celular (especialmente pectina), os quais são depositados do lado de fora da membrana plasmática por exocitose. Esta contínua atividade de extrusão de componentes de parede celular é que promove o crescimento unipolar do tubo polínico.

Uma vez que o volume protoplasmático da célula vegetativa é limitado, à medida em que o tubo polínico cresce, a região amplamente vacuolada da parte posterior da célula vegetativa deve se separar da região "esvaziada" que é deixada para trás. Isto acontece pela formação de um tampão de calose, o qual separa, da região que contém a célula vegetativa, a parte velha e "esvaziada" do tubo. Assim, à medida em que o tubo polínico cresce em comprimento, tampões de calose vão sendo seqüencialmente formados à determinados intervalos e deixados para trás, os quais são de extrema importância como marcadores do tubo polínico, utilizados na identificação do mesmo em preparações para análise de seu desenvolvimento (Martin 1959) e na verificação de certos tipos de reações de incompatibilidade, em pistilos polinizados manualmente (ver adiante).

O tecido transmissor é um tecido de natureza secretora que se estende do estigma até o interior do ovário, atravessando todo o estilete (Tilton & Horner 1980). Caracteriza-se por apresentar células cilíndricas e alongadas, com exuberante matriz extracelular e, não raro, espaços intercelulares relativamente amplos. É através destes espaços intercelulares e sobre a matriz extracelular deste tecido que crescem os tubos polínicos. Sanders & Lord (1989) fizeram a intrigante proposta segundo a qual o desenvolvimento do tubo polínico é, na verdade, um caso especial de migração celular em plantas. Eles consideraram a porção apical do tubo polínico como "análoga a uma célula migratória, a qual deixa para trás uma cauda de parede celular" (Sanders *et al.* 1991). Em experimentos realizados por estes

autores, microesferas de látex com diâmetro similar ao do tubo polínico, quando colocadas sobre o estigma ou numa extremidade cortada do mesmo, foram translocadas pelo tecido transmissor até o ovário numa velocidade similar à do crescimento dos tubos polínicos. Com base no conhecimento sobre a função da matriz extracelular e sobre o papel de moléculas de adesão em substratos no movimento de células animais, Sanders & Lord (1989) propuseram que a matriz extracelular do tecido transmissor de fato facilita ativamente a extensão dos tubos polínicos, guiando-os até as vizinhanças dos óvulos.

Estudos clássicos sobre a reação de incompatibilidade em espécies com GSI descrevem os tubos polínicos incompatíveis cessando o seu desenvolvimento no tecido transmissor do estilete. Entretanto, em algumas espécies a reação de incompatibilidade pode manifestar-se no estigma, enquanto que em outras espécies ela tem lugar no ovário. A reação de incompatibilidade estigmática usualmente está associada a estigmas secos, enquanto os outros tipos de reações de incompatibilidade estão associados a estigmas úmidos, embora existam exceções (Nettancourt 1997, 1999). Na extremidade do tubo polínico, onde no tubo sadio não há uma camada interna de parede de calose, ocorre a deposição deste componente, podendo toda a extremidade do tubo inflar-se como um balão ou até romper-se. É importante salientar, não obstante, que a deposição de calose na extremidade do tubo polínico pode ser um evento secundário e não a causa primária do bloqueio de desenvolvimento do tubo polínico incompatível. A reação de incompatibilidade muitas vezes manifesta-se também como deposição de tampões de calose anormais (i.e. ora curtos, ora muito longos) à intervalos irregulares, ou ainda como uma taxa de crescimento significativamente menor nos tubos incompatíveis, comparada à dos tubos compatíveis. Estudos recentes (e.g. Certal *et al.* 2002) têm demonstrado, por imunocitoquímica e outras técnicas, que o produto de ambos os alelos do *locus S* do pistilo, em plantas com GSI, estão presentes não só na matriz extracelular do tecido transmissor, mas também na secreção que preenche os espaços intercelulares deste tecido, podendo assim interagir diretamente com os tubos polínicos e atuar no reconhecimento dos tubos incompatíveis.

Já a reação de incompatibilidade no sistema SSI usualmente ocorre entre o grão de pólen incompatível e a papila estigmática na qual este grão de pólen foi depositado, de modo que o grão de pólen não consegue se re-hidratar e germinar. Ou, quando a germinação chega a acontecer, ocorre rapidamente uma reação entre a extremidade do tubo polínico emergente e a superfície da papila estigmática. Esta reação caracteriza-se pela deposição de calose tanto na face interna da região apical da parede do tubo, como na face interna da parede da papila, de modo que o crescimento do tubo é interrompido antes da penetração do estigma. Em alguns casos (e.g. *Raphanus*; Dickinson & Lewis 1973), o tubo polínico incompatível pode penetrar e crescer entre a cutícula e a parede celular até alcançar a base da papila, antes que a reação ocorra. Em *Brassica* vários estudos (e.g. Nishio & Hinata 1982) indicam que o sistema SSI se torna competente na medida em que a flor se desenvolve, pois a glicoproteína resultante da expressão do *locus S*, ou seja, o fator que desencadeia a reação de incompatibilidade, acumula-se gradativamente no estigma ao longo do desenvolvimento da flor, estando em concentrações ainda muito baixas no botão floral próximo à antese. Deste modo, em *Brassica*, a auto-incompatibilidade pode ser quebrada pela indução da autopolinização em botões florais em pré-antese. Semelhantes resultados foram também constatados em *Papaver rhoeas* (Franklin *et al.* 1995), uma espécie com GSI, porém destituída de estilete.

No sistema HetSI, os sítios de reações de incompatibilidades, tal como no sistema GSI, podem variar de espécie para espécie. No exemplo clássico de *Linum grandiflorum* (Lewis 1943), nas autopolinizações em plantas longistilas ("pin") e nos cruzamentos entre indivíduos de flores longistilas (cruzamentos intramorfos), o pólen é incapaz de se re-hidratar e germinar. Já nas autopolinizações em plantas brevistilas ("thrum") e nos cruzamentos entre indivíduos de flores brevistilas (cruzamentos intramorfos) o pólen germina, penetra o estigma e a reação de incompatibilidade só ocorre na parte superior do estilete, onde a extremidade do tubo polínico se dilata e sofre ruptura. Estudos realizados em outras plantas heterostílicas, e.g. em espécies de *Primula*, revelaram padrões similares de reações de incompatibilidade (Heslop-Harrison *et al.* 1981; Shivanna *et al.* 1981,1983). A deposição de calose

nas papilas estigmáticas de flores brevistilas em cruzamentos intramorfos foi verificada por Richards & Ibrahim (1982) em *Primula veris*.

Porém em espécies de vários gêneros de Rubiaceae, nas autopolinizações e nos cruzamentos intramorfos de indivíduos com flores brevistilas, a maioria dos grãos de pólen não consegue penetrar o estigma, enquanto nas polinizações incompatíveis (autopolinizações e cruzamentos intramorfos) em indivíduos com flores longistilas, os tubos polínicos crescem prolificamente e em alguns casos podem alcançar a base do estilete. Em várias outras espécies distílicas ou tristílicas de diferentes famílias, em todas as polinizações cruzadas ilegítimas e em autopolinizações, os tubos polínicos penetraram o estigma e a inibição do desenvolvimento dos tubos ocorreu ainda no estigma ou na parte superior do estilete (Brown & Crowden 1984; Gibbs 1986). Em *Anchusa officinalis* (Boraginaceae), não foram verificadas diferenças no crescimento dos tubos polínicos entre polinizações incompatíveis (autopolinizações e polinizações cruzadas ilegítimas) e as polinizações cruzadas legítimas e, embora em se tratando de uma planta auto-incompatível, muitos tubos polínicos resultantes de autopolinizações alcançaram os óvulos (Schou & Phillip 1983).

Mecanismos moleculares dos sistemas de incompatibilidade

No reino vegetal, os sistemas de incompatibilidade correspondem a um sofisticado mecanismo de discriminação entre o que é próprio e o que não é próprio de um organismo, análogo aos mecanismos de reconhecimento de um sistema imune. No contexto da SI, *próprio* e *não-próprio* significam, respectivamente, identidade genética e ausência de identidade genética no *locus S* (ou nos *loci S*) entre pólen e pistilo. O propósito da discriminação nos sistemas de incompatibilidade é oposto ao propósito da resposta imune, pois nas plantas o *próprio* (i.e. a autopolinização) é uma condição que não é tolerada e elicitava uma resposta de inibição, ao contrário do que acontece com o sistema imunológico, onde o *próprio* é tolerado e não elicitava uma resposta imune.

Entretanto, nas angiospermas não só o pólen próprio, ou o pólen com identidade no *locus* (ou *loci*) *S* são reprimidos, mas frequentemente o pólen que é excessivamente diferente, ou seja, o pólen pertencente a uma outra espécie, distantemente relacionada, também é reprimido. Evidências indicam que esta função também está ligada ao *locus* (ou *loci*) *S* e aos sistemas de incompatibilidade (Hiscock & Dickinson 1993; Nettancourt 1997), e faz parte de uma outra vertente dos estudos de incompatibilidade, qual seja, a dos mecanismos de incompatibilidade interespecíficas.

Os diferentes sítios de reações de incompatibilidade mencionados acima refletem dramáticas diferenças também existentes nos mecanismos moleculares que atuam nos processos de reconhecimento e rejeição do pólen próprio em diferentes sistemas de incompatibilidade.

O modelo de Brassicaceae

O sistema de incompatibilidade mais intensivamente estudado é o que opera em Brassicaceae, o qual, como já citado, é do tipo esporofítico. O *locus S* em Brassicaceae é altamente polimórfico, com mais de 100 formas alélicas alternativas em algumas espécies. Embora o *locus S* em Brassicaceae se expresse mendelianamente como apenas um gene, ele na verdade é formado por dois genes unidos por *linkage*. O produto de um destes genes funciona como receptor de membrana, e o do outro gene como um fator de ligação, os quais determinam a especificidade das papilas estigmáticas e dos grãos de pólen, respectivamente. No estigma, o fator que especifica a SI é um receptor transmembrana derivado do *locus S*, que atua também como uma enzima de fosforilação denominada quinase ("*S-locus* receptor kinase" ou SRK). No grão de pólen, a especificidade da SI é determinada por um fator de ligação, uma proteína rica em cisteínas, derivada do *locus S* ("*cysteine-rich S-locus* protein" ou SCR; Nasrallah 2002). No momento da antese, as papilas estigmáticas estão carregadas de moléculas SRK derivadas de ambos os alelos do *locus S*. Por sua parte os grãos de pólen carregam suas moléculas SCR, também derivadas de ambos os alelos do *locus S*. Após a polinização, as moléculas SCR liberadas pelos grãos de pólen podem interagir com os receptores de membrana SRK das papilas estigmáticas, mas esta

interação só ocorre entre o receptor e o fator de ligação codificados pelo mesmo haplótipo do *locus S*. Assim, em uma autopolinização, as proteínas SCR se encaixam nos sítios de ligação dos receptores SRK, provocando a ativação destes receptores de membrana, a qual inicia uma rota de transdução de sinais no citoplasma da papila estigmática que culmina com a inibição da germinação do pólen, ou do desenvolvimento do tubo polínico. Nas polinizações cruzadas, desde que nenhum dos haplótipos do *locus S* do pólen seja idêntico a um dos haplótipos do pistilo, as proteínas SCR não se ligam aos receptores SRK, a rota de transdução de sinais não é ativada nas papilas estigmáticas e o desenvolvimento dos tubos polínicos não é impedido. A rota de transdução de sinais ainda é pouco compreendida, mas sabe-se que envolve a fosforilação de substratos específicos; mas a causa imediata da inibição dos grãos de pólen incompatíveis permanece desconhecida (Nasrallah 2002).

O modelo de Solanaceae e Rosaceae

Vários estudos indicaram que o produto do *locus S* em pistilos de algumas espécies de Solanaceae e Rosaceae (GSI) é uma glicoproteína com função enzimática de RNase. A partir de então várias hipóteses foram levantadas sobre o modo de ação destas *S*-RNases (i.e. RNases derivadas do *locus S*; Newbigin *et al.* 1993, Franklin *et al.* 1995). Uma destas hipóteses postula que a *S*-RNase penetra nos tubos polínicos incompatíveis na medida em que eles crescem na matriz extracelular do tecido transmissor. Uma vez dentro do tubo polínico, a RNase degrada todo o RNA sintetizado pela célula vegetativa, resultando na morte do tubo polínico. Uma vez que os genes do rRNA não são transcritos no tubo polínico (Mascarenhas 1993), este deve ser um mecanismo muito eficiente de provocar a morte do tubo polínico². A especificidade da interação provavelmente é controlada ou por uma proteína de membrana que realiza o transporte das moléculas de RNase para dentro do tubo polínico incompatível, ou pela presença de um inibidor alelo-específico que previne a degradação do

RNA nos tubos polínicos compatíveis (neste último caso propõe-se que o produto do gene *S* do pólen é um inibidor de *S*-RNases, porém é incapaz de inibir a *S*-RNase associada ao seu próprio alelo).

O principal problema de tais modelos é que a natureza do componente do grão de pólen que controla a especificidade da SI nos sistemas gametofíticos permanece desconhecida (Nettancourt 1999). Sassa (1997) verificou que a completa deleção do gene da *S*-RNase em *Pyrus serotina* leva ao não funcionamento dos alelos *S* no pistilo, mas não afeta o fenótipo *S* dos tubos polínicos. Os autores concluem que a região do *locus S* em Rosaceae pode conter vários genes unidos por *linkage*, incluindo o gene da *S*-RNase e um gene não identificado que atuaria no pólen. Tais conclusões consolidam uma antiga hipótese (Linskens 1965), segundo a qual os produtos do *locus S* no tubo polínico e no estilete são codificados por diferentes sub-partes deste mesmo *locus S*.

O modelo de Papaveraceae

Uma vez que as *S*-glicoproteínas do sistema de incompatibilidade de Solanaceae são ribonucleases, e uma vez que *Papaver rhoeas* (Papaveraceae) também apresenta GSI, seria de se esperar que as proteínas derivadas do *locus S* em *P. rhoeas* também fossem RNases. Surpreendentemente, o produto do *locus S* em *Papaver* não é uma RNase. Não foi encontrada atividade detectável de RNase correlacionada à presença do produto do *locus S* no estigma, e verificou-se que o pólen de *P. rhoeas* é insensível à atividade de RNases (Franklin-Tong *et al.* 1991). Alelos do gene *S* de *Papaver* não apresentaram homologia com o *locus S* em *Nicotiana* ou em outras espécies de Solanaceae, bem como com o *locus S* em *Brassica*. Estes resultados indicam ser o gene *S* de Papaveraceae diferente dos genes *S* de todos os demais grupos já investigados (Foote *et al.* 1994).

Franklin-Tong *et al.* (1993) verificaram que a resposta de tubos polínicos incompatíveis em *P. rhoeas* é mediada pelo Ca^{2+} . Com base nesta evidência foi elaborado um modelo para o mecanismo

² Estudos mais recentes em *Nicotiana alata*, entretanto, sugerem que a degradação do rRNA nos tubos polínicos incompatíveis não é irreversível, ou que os tubos polínicos nesta espécie são capazes de sintetizar rRNA (Lush & Clarke

molecular da auto-incompatibilidade em *P. rhoeas*. Segundo este modelo, o reconhecimento específico de proteínas derivadas do *locus S*, secretadas pelo estigma, é realizado por um receptor transmembrana do pólen/tubo polínico. A interação entre as proteínas derivadas do *locus S* do estigma e os receptores de membrana do pólen/tubo polínico desencadeia uma rota de transdução de sinais, mediada pelo Ca^{2+} , a qual resultaria na inibição do pólen/tubo polínico incompatível (Dickinson 1994; Franklin *et al.* 1995).

Relações evolutivas entre os genes S

O fato de existirem muitos diferentes mecanismos de SI tem importantes implicações em nossas interpretações sobre as relações evolutivas entre diferentes sistemas incompatibilidade, pois está claro que vários genes *S* não-relacionados foram identificados até então. Isto sugere fortemente que a auto-incompatibilidade emergiu independentemente várias vezes na evolução das angiospermas. Uma estimativa aproximada de quantas vezes isto pode ter ocorrido não se tornará clara nos próximos anos, pois uma ampla gama de espécies pertencentes às mais diversas famílias precisam ser ainda investigadas.

Auto-Incompatibilidade de Ação Tardia (LSI), ou Auto-Incompatibilidade Ovariana (OSI)³

Evidências de que um mecanismo de auto-incompatibilidade com base genética, em certas espécies, opera dentro do ovário existem há mais de 40 anos, desde a publicação dos trabalhos pioneiros de Cope (1962a, b) em *Theobroma cacao* (Sterculiaceae). A enorme discrepância existente entre o que se conhece atualmente sobre a LSI e outros sistemas de auto-incompatibilidade se deve em grande parte a auto-incompatibilidade tardia ter sido por muito tempo considerada um fenômeno raro na natureza (Nettancourt 1977). Não obstante, Seavey & Bawa (1986), numa primeira revisão sobre

1997).

trabalhos que indicavam barreiras do sistema de incompatibilidade operando no ovário, salientaram ser a LSI um fenômeno bastante comum nas angiospermas, e discriminaram quatro diferentes tipos de LSI: (1) quando a inibição dos tubos polínicos incompatíveis se processa no ovário, porém antes dos mesmos alcançarem os óvulos; (2) quando a inibição dos tubos incompatíveis tem lugar após a penetração dos óvulos, mas sem que ocorra a singamia; (3) quando a rejeição dos tubos polínicos incompatíveis se processa após a formação do zigoto; (4) quando se sabe que a reação de incompatibilidade é ovariana, mas se desconhece os detalhes histológicos do processo de rejeição.

Inibição ovariana precedente à penetração dos óvulos

No primeiro tipo de OSI, a reação de incompatibilidade se processa no tecido transmissor do ovário, ou na epiderme das placentas. Foi verificado em *Lilium candidum* e *L. szovitsianum* (Liliaceae; Brock 1954), *Hemerocallis thunbergii* (Stout & Chandler, 1933; Brewbaker & Gorrez 1967) e *H. citrina* (Liliaceae; Stout & Chandler, 1933) e em *Medicago sativa* (Leguminosae; Brink & Cooper 1938; Cooper & Brink 1940; Sayers & Murphy 1966). Em todos estes casos, não obstante, uma pequena parcela dos tubos polínicos resultantes de autopolinização alcançaram e penetraram os óvulos. *Geranium caespitosum* (Geraniaceae), uma espécie definida como auto-compatível, mas que produz menos sementes por autopolinizações do que por polinizações cruzadas (SI críptica), apresentou algum tipo de inibição do tubo polínico resultante de autopolinização no obturador, embora o tubo polínico não seja impedido de penetrar o óvulo (Hessing 1989). Seavey & Bawa (1986) consideraram a inibição ovariana precedente à penetração dos óvulos não mais que uma auto-incompatibilidade gametofítica na qual ocorre uma demora na reação de incompatibilidade, até que os tubos incompatíveis alcancem o ovário. Porém, estes mesmos autores salientaram que as espécies onde a inibição dos tubos polínicos

³ As expressões "auto-incompatibilidade de ação tardia" e "auto-incompatibilidade ovariana" são empregadas no presente trabalho como sinônimos.

incompatíveis se processa após a penetração dos óvulos não se enquadram nos sistemas de incompatibilidade tradicionais, i.e. GSI, SSI ou HetSI.

Inibição ovariana posterior à penetração dos óvulos, mas anterior à fusão dos gametas

No segundo tipo de OSI discutido por Seavey & Bawa (1986), o saco embrionário pode ser penetrado pelo tubo polínico incompatível, mas a fusão do núcleo de uma das células espermáticas com o núcleo da oosfera não acontece, tal como observado em *Theobroma cacao* (Cope 1962a) e em *Castanea mollissima* (Fagaceae; McKay 1942). Em *Acacia retinoides* (Leguminosae), a inibição do tubo polínico incompatível se processa no nucelo (Kenrick *et al.* 1986). Em *Thryptomene calycina* (Myrtaceae), a inibição do tubo incompatível ocorre na micrópila (Beardsell 1991, *apud* Sage *et al.* 1994), e indicações de que a reação de incompatibilidade pode envolver interações entre o tubo polínico e o tegumento foram fornecidas por Sears (1937) no estudo da SI em *Gasteria verrucosa* (Liliaceae).

Recentemente, evidências sobre um mecanismo pré-zigótico de LSI foram verificadas em *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae; Sage *et al.* 1999), uma planta heteromórfica (tristílica), a qual, não obstante, não se enquadra no sistema HetSI, pois cruzamentos intra- e intermorfos são igualmente férteis, além de sua tristilia não ser acompanhada pelos usuais polimorfismos do pólen e das papilas estigmáticas. Nesta espécie, as flores em antese de primeiro dia apresentaram óvulos contendo sacos embrionários em diversos estádios de desenvolvimento, desde o ginósporo funcional até o ginófito maduro, segundo demonstrado pelas análises histológicas. Embora não tenham sido encontradas diferenças entre autopolinizações e polinizações cruzadas quanto às taxas de crescimento dos tubos polínicos, um número significativamente superior de sacos embrionários deixaram de se desenvolver nos pistilos autopolinizados, comparados aos submetidos à polinização cruzada, e o número de óvulos fecundados também foi significativamente inferior nos pistilos autopolinizados. Estes resultados sugerem que, em *Narcissus triandrus*, o fracasso do desenvolvimento dos óvulos autopolinizados se

deve à falta do estímulo presumivelmente desencadeado pelo desenvolvimento dos tubos polínicos resultantes de polinização cruzada. Não foram verificados sinais de mal-formações no desenvolvimento dos embriões de sementes resultantes de autopolinização, o que é incongruente com a possibilidade da depressão endogâmica ser a causa da auto-esterilidade em *N. triadrus*.

Rejeição pós-zigótica

Em *Gasteria verrucosa* (Sears 1937), *Chorisia speciosa* (Bombacaceae), *Tabebuia ochracea*, *T. aurea* (Bignoniaceae; Gibbs & Bianchi 1993), *Rhododendron* spp. (Ericaceae; Williams *et al.* 1984) e em *Asclepias exaltata* (Asclepiadaceae; Sage & Williams 1991) não foi observada nenhuma diferença entre a velocidade do crescimento dos tubos polínicos compatíveis e incompatíveis, desde o estigma até a penetração dos óvulos. Nestas espécies, as células espermáticas são liberadas no saco embrionário e a fusão tripla parece ocorrer, já que se observa o desenvolvimento inicial do endosperma. A singamia aparentemente também ocorre, mas em todos os casos mencionados o presumível zigoto nunca entra em mitose pós-zigótica, pois os pistilos nos quais estes óvulos se desenvolvem sofrem abscisão antes de ter início o desenvolvimento embrionário. A fusão do núcleo da oosfera com o núcleo da célula espermática ainda não foi confirmada, devido a falta de estudos de ultraestrutura e de análises citológicas quantitativas do DNA. Embora nestes casos a reação de incompatibilidade seja interpretada como pós-zigótica, existe uma hipótese alternativa: a de que as reações de reconhecimento do SI ocorram no tecido transmissor do ovário, sobre a epiderme da placenta, sobre o obturador (quando presente), em contato com os tegumentos, ou mesmo no nucelo (quando presente), mas as conseqüências destas reações não se expressem até que os tubos polínicos incompatíveis tenham penetrado o saco embrionário e, presumivelmente, realizado a dupla fecundação (Sage *et al.* 1994).

Os estudos realizados por Gibbs & Bianchi (1999) em *Dolichandra cynanchoides* e *Tabebuia nodosa* (Bignoniaceae) indicaram resultados semelhantes aos mencionados no parágrafo anterior, porém também revelaram uma menor taxa de penetração de óvulos em pistilos autopolinizados do que

em pistilos submetidos à polinização cruzada. Isto indica a existência de algum "mecanismo" de reconhecimento dos tubos polínicos resultantes das autopolinizações.

Alguns casos em que a rejeição pós-zigótica das autopolinizações é acompanhada de desenvolvimento parcial do embrião já foram interpretados também como fenômenos decorrentes de LSI, como em *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae), *Epilobium obcordatum* (Onagraceae), *Dalbergia retusa*, *Dipteryx panamensis* e *Myrospermum frutescens* (todas pertencentes à família Leguminosae; Seavey & Bawa 1986). Entretanto, o aborto de óvulos autopolinizados contendo embriões em desenvolvimento pode ser decorrente da expressão de genes letais em homozigose por estes embriões, sendo portanto difícil discriminar entre a atuação de um presumível sistema de incompatibilidade de ação tardia e os efeitos da depressão endogâmica (Sage et al 1994).

O controle genético da LSI

O controle genético da LSI permanece virtualmente desconhecido. Em *Lotus corniculatus*, muitos *loci* com vários alelos em cada *locus* aparentemente são responsáveis pelo reconhecimento de tubos polínicos incompatíveis (Miri & Budar 1966), embora alguns estudos apontem para a auto-incompatibilidade ovariana (Dobrofsky & Grant 1979) e outros sugiram a depressão endogâmica (Wojciechowska 1963) para esta espécie. Knox & Kenrick (1983) propuseram o controle gametofítico para o sistema de auto-incompatibilidade de *Acacia retinoides*, uma espécie onde subseqüentemente se verificou o envolvimento do nucelo na inibição dos tubos polínicos incompatíveis (Kenrick *et al.* 1986). Cope (1962a, b), no estudo de *Theobroma cacao*, sugeriu um sistema envolvendo vários *loci* com relações de dominância hierárquica entre si, e de controle interativo entre componentes esporofíticos e gametofíticos. O controle genético em *Gasteria verrucosa* não é claro (Brewbaker & Gorrez 1967; Brandham & Owes 1978). Entretanto, Lipow & Wyatt (2000) demonstraram o controle genético por um único *locus S* multialélico em *Asclepias exaltata*, operando esporofiticamente, ou

talvez gametofiticamente, e esta parece ser a primeira demonstração rigorosa, em uma espécie com LSI, do controle da SI por um único *locus S* multialélico.

LSI ou depressão endogâmica?

Até o presente, para muitos pesquisadores que desenvolvem estudos nesta área, a SI é um fenômeno pré-singâmico (e.g. Nettancourt 1977, Klekowski 1988, Nettancourt 1997, 1999, 2001). Entretanto, como foi dito acima, tem sido sugerido que sistemas de auto-incompatibilidade de ação tardia podem existir, nos quais o desenvolvimento do zigoto/embrião/endosperma é inibido após a dupla fecundação (Charlesworth 1985; Seavey & Bawa 1986), mas provas inequívocas da existência desta auto-incompatibilidade ovariana pós-zigótica não foram até então encontradas. Charlesworth (1985) salientou que embora seja conceitualmente simples discriminar entre uma ação tardia da SI e uma ação precoce da depressão endogâmica, sua verificação experimental pode ser bastante difícil. Vários critérios têm sido definidos de modo a avaliar se o aborto do zigoto ou do embrião é resultado de uma SI de ação tardia ou de uma depressão endogâmica determinada pelo genótipo do zigoto (Charlesworth 1985; Seavey & Bawa 1986; Sage *et al.* 1994). Estes critérios incluem: (1) a avaliação do tempo no qual o aborto dos zigotos/embriões/endospermas ocorre; o aborto uniforme em um único estágio, ou numa estreita faixa de estádios de desenvolvimento, é um indicador de SI, enquanto uma variação contínua do tempo em que os abortos ocorrem, ao longo dos ciclos de vida destas novas gerações, deve ser esperada quando mecanismos endogâmicos são a causa primária destes abortos; (2) a verificação da ocorrência de malformações nos embriões/endospermas, através de estudos histológicos; a ausência de malformações na maior parte dos embriões/endospermas resultantes de autofecundação é um indicativo de LSI, enquanto a presença destas malformações sugere um mecanismo de depressão endogâmica; (3) o espectro de variação na produção de sementes entre os indivíduos de uma população; uma variabilidade na produção de sementes resultantes de autopolinizações entre indivíduos deve ser esperada se mecanismos endogâmicos são operantes,

enquanto a produção nula ou quase nula de sementes por autopolinização pela maioria dos indivíduos em uma população geneticamente variável deve indicar que um mecanismo de SI está envolvido (porém genótipos com uma carga genética elevada de genes letais atuando nos embriões podem resultar na mesma auto-fertilidade nula ou quase nula); (4) a dependência dos abortos relativamente ao genótipo dos parentais vs. o genótipo da progênie; evidências de incompatibilidade nos cruzamentos entre irmãos, ou nos cruzamentos entre os parentais e a prole, com um número limitado de grupos onde os tais cruzamentos são compatíveis, indicando assim a segregação de alelos *S*, sugerem LSI com base genética, independente do genótipo da progênie; (5) a resposta dos embriões após a sua transferência para um meio apropriado de cultura de tecidos; embriões que carregam genes letais em homozigose não sobreviveriam, enquanto aqueles que abortariam como resultado de um sistema de incompatibilidade podem ter uma chance de sobreviver, se a expressão da incompatibilidade no sistema esporófito materno/embrião não afetou a fisiologia autônoma do embrião. Não obstante, um fator que potencialmente interfere com as interpretações deste último critério é o fato de que a expressão gênica não é independente do ambiente, e assim é possível que os genes letais no ovário não sejam letais nas condições *in vitro* (Sage *et al.* 1994).

Klekovski (1988) contestou dois destes critérios argumentando que o modelo da depressão endogâmica é consistente tanto com a presença como com a ausência de nítidas taxas de segregação na progênie após autopolinização, e que os mecanismos da auto-esterilidade não são conhecidos o bastante para se fazer predições quanto ao tempo de rejeição dos embriões resultantes de autopolinização. Este autor também propôs um critério adicional: (6) que mutações induzidas em sistemas de auto-incompatibilidade ovariana favoreceriam uma mudança da auto-esterilidade para a auto-fertilidade, comparada à crescente auto-esterilidade decorrente de mutações (uma vez que a grande maioria das mutações são deletérias), se o mecanismo envolvido é o de depressão endogâmica.

Vários estudos recentes envolvendo espécies com auto-esterilidade ovariana têm procurado distinguir entre LSI pós-zigótica e depressão endogâmica. Alguns pesquisadores parecem considerar

que toda auto-esterilidade pós-zigótica é evidência de depressão endogâmica (Krebs & Hancock 1991), uma visão que deve ser rejeitada a menos que uma explicação satisfatória em termos de LSI possa ser descartada. Muitos autores têm baseado suas conclusões em relação à depressão endogâmica principalmente na ocorrência de auto-rejeição em um *continuum* de estádios embrionários (Wiens *et al.* 1987; Bertin *et al.* 1989; Manasse & Pinney 1991). A caracterização do tempo no qual ocorreram os abortos implicados na auto-esterilidade pós-zigótica foi feita utilizando-se material seccionado e também material clarificado em *Epilobium angustifolium* (Wiens *et al.* 1987), ou apenas material seccionado em *Liquidambar styraciflua* (Schmitt & Perry 1964) e em *Lotus corniculatus* (Wojciechowska 1963). Os abortos pós-zigóticos em *L. styraciflua* ocorreram em uma fase de desenvolvimento muito restrita, quando os embriões apresentavam 4-6 células. Não obstante, em *E. angustifolium* e em *L. corniculatus*, os abortos ocorreram numa ampla variedade de estádios. Conclui-se portanto que os abortos embrionários em *L. styraciflua* provavelmente se deveram à LSI, enquanto em *E. angustifolium* e *L. corniculatus* é mais provável que os abortos foram decorrentes de depressão endogâmica (Sage *et al.* 1994). Alternativamente, os abortos em *L. styraciflua* poderiam dever-se a um sistema de depressão endogâmica que mimetiza a LSI em virtude do envolvimento de um número suficientemente grande alelos letais de ação precoce (Sage *et al.* 1994).

Um dos argumentos fundamentais contra a depressão endogâmica em espécies que apresentam auto-esterilidade completa ou quase completa é o número improvavelmente elevado de genes letais necessários para se produzir abortos precoces quase uniformes (Seavey & Bawa 1986; Waser & Price 1991). Para o número de embriões mortos ser grande o suficiente a ponto de mimetizar a SI, o número de equivalentes letais presumivelmente deve ser da ordem de 10-15 (Sage *et al.* 1994). De fato, as estimativas divulgadas do número médio de equivalentes letais em angiospermas variam entre menos de 1 até 12 (Levin 1984; Klekowski 1998). Uma carga de genes letais de 11-12 foi estimada para *L. styraciflua* (Klekowski 1988) e *Epilobium obcordatum* (Seavey & Carter 1994), indicando que um número suficientemente elevado de genes letais que se expressam durante a embriogênese pode estar

presente nestas espécies para que a depressão endogâmica realmente mimetize algumas das características da auto-incompatibilidade ovariana pós-zigótica (Sage *et al.* 1994).

Sage *et al.* (1994) salientaram também que ao avaliar a possibilidade da depressão endogâmica, fatores adicionais devem ser considerados. Primeiro, o número divulgado de equivalentes letais pode ser errôneo em espécies que nunca amadurecem mais do que uma certa fração dos seus óvulos. Tal como salientado por Klekowski (1988), a proporção do número de sementes para o de óvulos em tais espécies pode ser o resultado de seleção modulada pelo investimento materno ("developmental selection"), e pode ser inapropriado assumir inviabilidade para todos os zigotos fertilizados mas que abortam após autopolinização. O número de equivalentes letais conseqüentemente será subestimado, especialmente quando a carga genética for baixa. Em *Phlox drummondii*, por exemplo, a incorporação de uma leve seleção no modelo altera o número estimado de equivalentes letais de 0,79 para 3,23 (Levin 1984; Klekowski 1988). Uma segunda consideração é que os números de embriônicos letais são conhecidos para muito poucas angiospermas, e estes podem ou não ser representativos das angiospermas em geral. Plantas perenes, de longa vida e xenogâmicas podem apresentar cargas genéticas maiores que espécies de vida curta e autogâmicas. As autogâmicas tenderão a expor seus genes recessivos letais à seleção mais freqüentemente, o que pode reduzir o seu número. Indivíduos de espécies longevas acumulam carga genética com a idade (Klekowski & Godfrey 1989), e por isto podem conter mais letais recessivos do que indivíduos de espécies de vida curta. Curiosamente, as duas espécies lenhosas (presumivelmente longevas) para as quais dados foram divulgados mostram duas das mais altas estimativas de carga genética; 11-12 em *Liquidambar styraciflua* (Schmitt & Perry 1964; Klekowski 1988) e pelo menos 9,6 em *Vaccinium corymbosum* (Krebs & Hancock 1991). Estes números de equivalentes letais podem contar para auto-esterilidades de mais de 90%.

Uma terceira consideração é quanto a maneira na qual o sucesso das autopolinizações é calculado. Segundo Sage *et al.* 1994, a produção bem sucedida de uma semente após autopolinização é determinada por dois fatores inter-relacionados: a habilidade do embrião e do endosperma

sobreviverem dentro do ovário, e a habilidade do ovário sobreviver até a maturidade. É perfeitamente possível que um dado embrião possa ter a capacidade de sobreviver até a maturidade, e no entanto isto não aconteça porque o ovário/fruto que o contém aborte. O aborto do ovário/fruto pode acontecer, por exemplo, porque apenas um pequeno número de embriões viáveis estejam presentes. Assim, a proporção entre o total de sementes resultantes de autopolinização para o número total de óvulos em todas as flores autopolinizadas (incluindo aquelas que falham em produzir frutos maduros) subestima o número de embriões resultantes de autopolinização livres de genes letais, e a proporção de sementes saudáveis, relativamente ao número de óvulos nos ovários que se tornam frutos maduros, deve ser uma estimativa melhor da percentagem de embriões livres de genes letais do desenvolvimento (Sage *et al.* 1994).

Ainda segundo Sage *et al.* (1994), uma dificuldade final na interpretação diz respeito ao efeito potencial dos óvulos em desenvolvimento sobre os óvulos vizinhos dentro de um mesmo ovário. Já está bem estabelecido que as polinizações mistas (pólen da própria planta + pólen de outro indivíduo) algumas vezes produzem resultados diferentes dos obtidos quando autopolinizações e polinizações cruzadas são realizadas em flores separadas. Quando plantas produzem sementes por autopolinização, mas nas polinizações mistas as sementes resultantes de autofecundação são produzidas em menor quantidade ou mesmo não são produzidas, se diz que tais plantas apresentam SI críptica (Bateman 1956; Bowman 1987; Hessing 1989). Alternativamente, se as autopolinizações são ineficazes, mas sementes viáveis resultantes de autofecundação são produzidas nas polinizações mistas, se diz que tais plantas apresentam auto-fertilidade críptica (Bertin & Sullivan 1988). Sabe-se que a auto-fertilidade críptica ocorre pelo menos em *Pyrus communis* e em *Campsis radicans* (Visser & Marcucci 1984; Bertin & Sullivan 1988). Não se sabe se a diferença entre autopolinizações e polinizações mistas reflete um efeito estimulatório dos tubos polínicos e/ou zigotos resultantes de polinização cruzada sobre os tubos polínicos e/ou os zigotos resultantes de autopolinização, ou se trata-se de algum outro fenômeno (porém ver Seavey *et al.* 2000). A ocorrência de tal efeito estimulatório pode viabilizar vários graus de

desenvolvimento de sementes resultantes de autofecundação, algumas das quais podem sobreviver até a maturidade. Tal padrão de interrupção do desenvolvimento em vários estágios pode produzir um resultado parecido com o da auto-esterilidade decorrente de depressão endogâmica. De fato, entretanto, os zigotos resultantes de autofecundação podem individualmente ter o seu desenvolvimento inibido por uma barreira de SI, mas continuarem a se desenvolver somente porque recebem um estímulo hormonal, proveniente dos óvulos vizinhos, os quais são mais vigorosos por conter zigotos resultantes de fertilização cruzada. Com base neste exemplo, Sage *et al.* 1994 salientam a profunda dificuldade em se confirmar a existência da LSI pós-zigótica, pois não se conhece os padrões interativos ou a natureza molecular destas interações.

Por todas estas considerações, Sage *et al.* (1994) admitem que nem a depressão endogâmica, nem a LSI podem teoricamente ser rejeitadas como possíveis explicações para a auto-esterilidade pós-zigótica. A situação em cada espécie deve ser considerada separadamente, com base em observações empíricas do seu comportamento em cruzamentos e de sua biologia celular. Mesmo com tais dados em mãos, a discriminação (entre uma auto-incompatibilidade de ação tardia e uma depressão endogâmica de ação precoce) provavelmente é difícil. Por exemplo, a observação de diferenças protéicas entre ovários autopolinizados e submetidos à polinização cruzada em *Lotus corniculatus* levou Dobrofsky & Grant (1979) a sugerir que tal espécie apresenta auto-incompatibilidade ovariana, uma conclusão aparentemente em contradição com a observação de que a singamia ocorre após a autopolinização e os embriões resultantes de tais autopolinizações abortam num *continuum* de estádios de desenvolvimento. Significativamente, entretanto, uma parte dos tubos polínicos resultantes de autopolinização abortam dentro do ovário, antes de penetrar os óvulos. Assim, o fracasso da autopolinização nesta espécie ocorre antes e depois da singamia, e uma clara escolha entre LSI e depressão endogâmica não é possível. Com toda probabilidade, a auto-esterilidade em *L. corniculatus* deve se basear na ação conjunta de uma LSI gametofítica e da depressão endogâmica.

2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo investigar os sistemas de reprodução e aspectos da biologia floral nas espécies de Bignoniaceae já citadas. O estudo dos sistemas reprodutivos envolveu a realização de experimentos de polinizações manuais controladas e determinação dos sítios de reações de incompatibilidade. Em algumas das espécies cujos resultados indicaram reações de incompatibilidade operando no ovário, foram feitas análises histológicas comparativas entre os pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada, em vários intervalos após a polinização, com o objetivo de verificar o número de óvulos penetrados e possíveis discrepâncias no desenvolvimento do saco embrionário/embrião/endosperma entre os dois tratamentos, bem como constatar em que etapa(s) ocorre o aborto do processo sexual ou do desenvolvimento pós-zigótico em pistilos autopolinizados.

3. Biologia Reprodutiva de *Jacaranda racemosa* Chamisso (Bignoniaceae)

3.1 Resumo - *Jacaranda racemosa* é um arbusto xilopodífero, endêmico dos campos rupestre da Cadeia do Espinhaço. Seu sistema reprodutivo foi investigado através de experimentos de polinizações controladas e da análise histológica quantitativa dos eventos posteriores à autopolinização e à polinização cruzada. Aspectos da biologia floral foram também estudados pela observação dos eventos e dos visitantes florais. A antese durou 1-3 dias, embora as flores só estejam receptivas durante o 1º dia. A flor produz pequena quantidade de néctar sendo polinizada principalmente por abelhas de médio porte. Uma vez que o estaminódio favorece a eventual polinização por abelhas de pequeno porte, e que frutos maduros resultantes de polinização natural e contendo apenas uma ou poucas sementes tenham sido encontrados, um possível papel do estaminódio em aumentar o espectro de polinizadores potenciais é sugerido. Os experimentos de polinizações manuais indicaram ser *J. racemosa* uma espécie auto-incompatível. A análise histológica dos eventos posteriores à polinização sugerem a atuação de um tipo de LSI no qual os pistilos autopolinizados sofrem um atraso no progresso de

desenvolvimento em diferentes fases após a polinização, desde a penetração dos óvulos até os estádios iniciais da endospermogênese. Não foram encontradas evidências de que a auto-esterilidade em *J. racemosa* seja decorrente de depressão endogâmica.

Palavras-chave: Auto-incompatibilidade de ação tardia, sistemas reprodutivos, *Jacaranda*, Bignoniaceae, polinização, biologia floral, estaminódio.

3.2. Introdução

O gênero neotropical *Jacaranda* Juss. compreende cerca de 49 espécies de árvores e arbustos que se distribuem desde a Guatemala e Antilhas até o norte da Argentina, sendo *Jacaranda racemosa* um arbusto xilopodífero endêmico dos campos rupestres da Serra do Espinhaço, ocorrendo somente em solos arenosos entre as altitudes de 1100-1300m (Gentry 1992). Escassos estudos já realizados sobre a biologia reprodutiva de *Jacaranda* têm demonstrado que as espécies deste gênero são melitófilas (Bittencourt 1981, Morawetz 1982, Yanagizawa 1983, Vieira *et al.* 1992), adaptadas à polinização por abelhas de médio porte e de língua longa (e.g. espécies de *Bombus*, *Centris* e *Euglossa*; Morawetz 1982). Laroca & Almeida (1985) descreveram a adaptação das peças bucais de *Niltonia virgillii* para a coleta de néctar em *J. puberula* Chamisso.

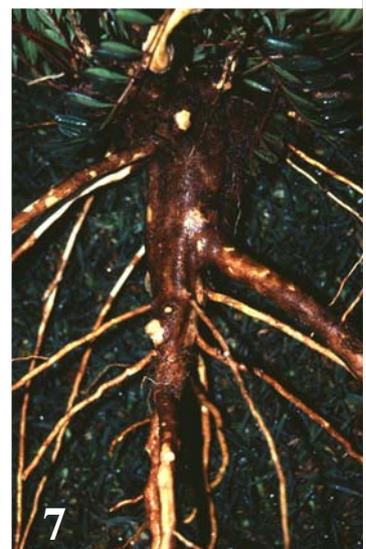
Yanagizawa (1983) admitiu ser *J. oxyphylla* Chamisso auto-compatível, embora Morawetz (1982) considere esta espécie muito relacionada com *J. caroba* (Vell.) DC., para a qual foi sugerida a auto-incompatibilidade tardia (Vieira *et al.* 1992). A auto-incompatibilidade foi verificada também em *J. macrantha* Chamisso (Bittencourt 1981) e *J. ulei* (Ribeiro *et al.* 2002). No presente trabalho foram feitos estudos sobre o sistema reprodutivo e aspectos da biologia da polinização de *J. racemosa*.

3.3. Material e Métodos

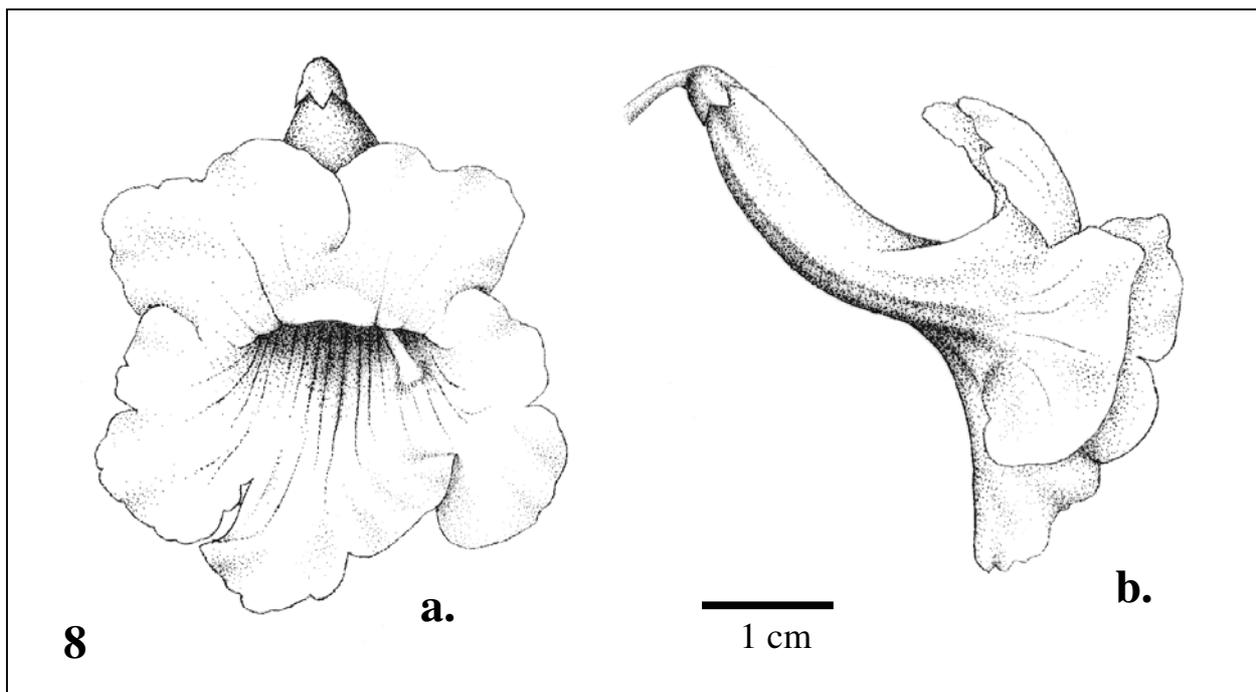
O local da realização do trabalho, uma área de preservação particular localizada na Serra do Breu (19°01'S, 43°42'W), apresenta praticamente as mesmas características climáticas e fisionômicas da Serra do Cipó (Giulietti & Pirani 1988). Esta área está compreendida entre o Córrego Fundo (a oeste) e o Rio das Pedras (ao norte/nordeste). *Jacaranda racemosa* é uma espécie extremamente abundante na região, porém somente onde a vegetação corresponde a um campo rupestre típico, ou seja, acima da zona de transição com o cerrado. É localmente conhecida como "carobinha-do-campo".

Os estudos de campo foram realizados entre os dias 2 e 27 de janeiro (realização dos experimentos de polinizações, observações sobre os eventos e visitantes florais, coleta de material botânico), e entre 24 e 27 de fevereiro (verificação dos resultados dos experimentos de polinizações, coletas de frutos e sementes maduras) do ano 2000. Visitas ocasionais ao local de realização do trabalho, em diferentes épocas do ano, foram feitas entre os anos de 1999 e 2003, para o registro de dados fenológicos.

Jacaranda racemosa é um arbusto com xilipódio (figuras 2 e 7), cuja parte aérea raramente ultrapassa 50 cm de altura. Os ramos aéreos são monopodiais, apresentando folhas pinadas, rosetadas, e inflorescências terminais (figuras 2-5). A flor possui cálice cupuliforme, glabro, 5-dentado, e corola tubular-infundibuliforme, 5-lobada, de cor roxa, magenta ou lilás, com o tubo estreitando-se na base, usualmente apresentando guias de néctar de cor escura na face interna do lado anterior (figuras 5, 8 e 9). Próximo à sua inserção no receptáculo, o tubo corolino apresenta uma ligeira dilatação, a qual corresponde à parede da câmara nectarífera. O androceu é didínamo, apresentando estames inclusos e um longo estaminódio posterior, subexerto ou exerto (figuras 3, 8 e 9), de cor branca e revestido por tricomas glandulares capitados (exceto na porção proximal). O ovário é arredondado, lateralmente achatado, envolvido na base por um disco nectarífero. O fruto é uma cápsula loculicida (figura 10), de



Figuras 1-7: *Jacaranda racemosa*. 1: Vista geral da área de estudos da população I. 2: Hábito (inflorescência, ramos aéreos, xilopódio e raízes). 3-5: Inflorescências. A seta na figura 4 indica ramo dicasial. 6: Escavação em um agregado, mostrando os xilopódios. 7: Xilopódio.



Figuras 8-10: *Jacaranda racemosa*. 8: Flor - a: vista frontal, b: vista lateral. 9: Flores. As setas indicam o estaminódio. 10: Frutos.

formato obovado, cujas valvas se curvam para o lado dorsal após a deiscência, afastando-se uma da outra e expondo assim as sementes. Estas apresentam ala hialino-membranácea e são dispersas pelo vento.

Foram investigadas duas populações geograficamente separadas pela crista de uma montanha, distando aproximadamente 3 km uma da outra. A população I (figura 1) encontrava-se na vertente do Córrego Fundo (19°02'47,3"S 43°42'34,5"W), recebendo maior influência da atividade pecuária extensiva local. A população II encontrava-se na margem sul/sudeste do Rio das Pedras (19°01'46,8"S 43°42'29,4"W), em área sob pouca ou nenhuma influência de atividades antrópicas. Nesta região a espécie caracteriza-se por uma distribuição em agregados de número variável de indivíduos, agregados estes distando apenas poucos metros uns dos outros. Indivíduos isolados (não-agregados) também foram encontrados. Estes agregados de indivíduos, por sua vez, normalmente formavam grandes agrupamentos com diferentes densidades, conforme o local. As populações investigadas pertenciam a agrupamentos excepcionalmente densos - isto é, contendo muitos agregados pouco distanciados uns dos outros. O material testemunho das populações investigadas encontra-se depositado no Herbário UEC (registros de números 106.326, 106.329, 106.333 e 103.334; n^{os}. coletor: 99/8, 99/11, 99/15 e 99/16).

É provável que a propagação vegetativa por segmentação do xilopódio seja freqüente nesta espécie, uma vez que certas características morfológicas de seus ramos aéreos, variáveis na população, são usualmente idênticas num mesmo agregado, a despeito destes ramos poderem estar separados uns dos outros no nível subterrâneo - cada um dos elementos num agregado como este poderia portanto ser interpretado como um indivíduo, do ponto de vista físico, porém todo os elementos deste mesmo agregado seriam um só indivíduo, do ponto de vista genético. Foram feitas escavações cuidadosas dos xilopódios de dois agregados para a verificação das citadas discontinuidades no xilopódio (figura 6), bem como observações em locais onde o substrato arenoso de tais agregados havia sofrido processo erosivo. Foi também constatado que, embora geralmente todos ou a maior parte dos ramos aéreos nos

agregados tenham as mesmas características morfológicas, algumas vezes foram encontrados, num mesmo agregado, um ou mais ramos aéreos com características morfológicas distintas (sobre a natureza de tais discrepâncias, ver Resultados). Portanto nem sempre estes agregados pareciam ser formados por clones de um mesmo indivíduo. A origem de tais agregados "mistos" poderia ser explicada pela germinação de sementes geneticamente distintas num mesmo local, ou muito próximas, ou ainda pelo crescimento e interpenetração de dois ou mais agregados próximos.

Seis inflorescências em 5 agregados da população I, e mais 13 inflorescências em 5 agregados da população II foram marcadas para verificação da dinâmica de florescimento. Vinte e cinco unidades florais⁴ em 6 agregados da população I, e mais 25 unidades florais em 5 agregados da população II, todas em estádios de desenvolvimento anteriores à antese, foram marcadas para verificação dos eventos florais. As observações foram registradas em diferentes horários da manhã ou da tarde, sendo que cada unidade floral na população I foi observada pelo menos duas vezes ao dia. Testes organolépticos de peças florais isoladas (cálice, corola, estames férteis, estaminódio e pistilo) foram realizados pela concentração de odor em frasco de vidro (Dafni 1992). Medições do volume e da concentração do néctar foram realizadas em 3 agregados da população I e em 2 agregados da população II, utilizando-se seringa microvolumétrica e refratômetro de bolso. Observações dos visitantes foram feitas durante a realização dos experimentos de polinizações manuais e durante a verificação da dinâmica de florescimento e dos eventos florais, totalizando aproximadamente 220 horas de observação. Alguns dos visitantes foram capturados para montagem a seco, observação da deposição de grãos de pólen e identificação.

Para a determinação do sistema reprodutivo foram feitos testes de polinizações manuais e análise de secções histológicas em microscópio óptico de pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada. Inflorescências contendo somente botões florais (i.e. sem flores em antese) foram

⁴ A expressão "unidade floral" é presentemente utilizada para designar flores ou botões florais em qualquer estágio de desenvolvimento.

parcial ou totalmente ensacadas com redes de nylon (figura 1). Nos dias posteriores, as flores ensacadas em antese de primeiro dia foram polinizadas (1) utilizando-se pólen de outro agregado de indivíduos (teste de polinização cruzada induzida); (2) empregando-se pólen da mesma flor ou de outra flor do mesmo indivíduo (teste de autopolinização induzida); ou (3) não foram manipuladas (teste de autopolinização espontânea). Flores não ensacadas foram marcadas para a verificação da produção de frutos por polinizações naturais. As flores foram marcadas com linhas coloridas, uma cor para cada tratamento. As observações sobre o modo de distribuição dos indivíduos, mencionadas no parágrafo anterior, foram de vital importância para a determinação do sistema reprodutivo. Vinte e um agregados da população I, e mais 19 agregados da população II, foram utilizados nos experimentos de polinizações manuais. Para garantir que as polinizações cruzadas fossem realmente realizadas entre indivíduos geneticamente distintos, o pólen utilizado nas flores de um agregado foi sempre extraído das flores de um outro agregado, localizado a mais de dez metros de distância do primeiro. No teste de geitonogamia (i.e. flores polinizadas com o pólen de outras flores do mesmo indivíduo), para evitar que o pólen empregado pudesse pertencer a um indivíduo com genótipo diferente, localizado no mesmo agregado, foram feitas polinizações envolvendo diferentes flores da mesma inflorescência; só se utilizou pólen proveniente de uma inflorescência distinta da que estava sendo polinizada quando as duas inflorescências envolvidas emergiam de ramos do mesmo xilopódio.

Foram coletadas 3 cápsulas em cada um de 5 agregados de cada população (total = 30 frutos de 10 indivíduos) para a contagem de sementes formadas em frutos provenientes de polinizações naturais. As cápsulas apresentavam 1,7-4,5 cm de comprimento por 1,3-3,2 cm de largura, sendo que todas elas encontravam-se iniciando a deiscência.

As polinizações manuais realizadas para o estudo histológico foram feitas em 10 agregados da população I. Cada um dos tratamentos 1 e 2, citados no parágrafo anterior, foram realizados em pelo menos uma flor em antese de primeiro dia de cada um dos agregados. Os ovários foram fixados em FAA50 (formaldeído 4%, ácido acético glacial e etanol 50% nas proporções de 5:5:90%; Johansen

1940) nos intervalos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a polinização, de modo que cada agregado contribuiu com pelo menos 1 pistilo autopolinizado e 1 pistilo submetido à polinização cruzada. Três ovários resultantes de cada tratamento e de cada intervalo após a polinização foram selecionados aleatoriamente, infiltrados em parafina utilizando-se série butílica (Johansen 1940) e submetidos a secções transversais seriadas em micrótomo rotativo Micron HM 240, na espessura de 8 µm. As secções foram coradas com azul-de-astra e fucsina-básica (Roeser 1972) e analisadas em microscópio óptico Olympus BX40. Foram analisadas secções de óvulos ao longo de todo o comprimento de cada ovário. Nos intervalos de 24 a 72 horas após a polinização, quando um ovário não apresentou tubos polínicos no tecido transmissor, este ovário foi interpretado como derivado de polinização malsucedida, sendo substituído por outro, de tratamento e intervalo correspondente. O teste estatístico do qui-quadrado foi utilizado para comparar as incidências de óvulos penetrados e não-penetrados, bem como os eventos posteriores à penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada, em cada um dos intervalos de fixação, combinando os totais dos três pistilos de cada tratamento. Os testes estatísticos foram feitos empregando-se o software Epi Info 6.0. Efetivamente, foram observados 903 óvulos (428 derivados de autopolinização e 540 derivados de polinização cruzada) de um total de 30 ovários, pertencentes a aproximadamente 10 indivíduos.

3.4. Resultados

A floração de *Jacaranda racemosa* foi verificada entre os meses de setembro à março. Diferenças fenotípicas macromorfológicas foram verificadas entre indivíduos de ambas as populações. As principais variações são na tonalidade da corola, a qual abrange um espectro relativamente amplo, desde o magenta-escuro, ou o roxo, até o rosa-claro, com todas as gradações intermediárias. Flores com corolas apresentando tons muito claros de rosa, lavanda ou lilás foram raramente observadas. Em todas as flores, a porção interna do lado superior (posterior) do tubo corolino era branca (figura 3), contrastando assim com a cor das demais partes da corola. Este contraste obviamente é bem acentuado

nas flores mais escuras, resultando num efeito visual externo bem distinto do das flores de cores claras. As dimensões da flor também são variáveis - comprimento do cálice: $0,64 \pm 0,12$ cm; largura do cálice: $0,42 \pm 0,07$ cm; comprimento da corola: $5,23 \pm 0,38$ cm; largura da fauce: $1,85 \pm 0,23$ cm; envergadura dos lobos da corola: $3,67 \pm 0,33$ cm; comprimento do estaminódio: $3,54 \pm 0,20$ cm (média \pm desvio padrão, n = 11) (figura 8).

Diferenças no tamanho, no volume e na textura da superfície externa (rugosa ou lisa) do cálice foram observadas em diferentes agregados. Igualmente visíveis foram as diferenças de tonalidade da coloração externa das partes vegetativas resultantes de crescimento primário - caules aéreos, pedúnculos, pedicelos, prófilos, cálices, cápsulas, lado dorsal das folhas, etc. -, que variaram desde o verde oliva até o vinho escuro, com todos os matizes intermediários. Tal padrão de coloração certamente se deve à maior ou menor concentração de um pigmento vináceo característico desta espécie, possivelmente antocianina.

Algumas vezes foram encontrados indivíduos cuja(s) inflorescência(s) apresentavam algumas ou todas as flores contendo estaminódios com morfologia não-usual, por serem duplos, ou bífidos na extremidade distal, ou então, mais freqüentemente, por apresentarem expansões petalóides em sua haste, ou ainda por serem totalmente transformados em "pétalas". As mesmas expansões foram outras vezes encontradas nos filetes e no conectivo dos estames, ou então tanto no estaminódio quanto nos estames. Não raro estes estames "petalóides" apresentavam anteras estéreis (destituídas de pólen). As vezes estas peças do androceu transformadas em "pétalas" eram grandes o bastante para obstruir o espaço interno do tubo, de modo a impossibilitar a entrada de qualquer abelha de médio porte, do tipo que normalmente é reconhecida como polinizadora potencial em plantas com a morfologia floral de *Jacaranda*.

Biologia Floral

Esta espécie possui inflorescências racemosas ou tirsóides, cujas flores laterais resultam provavelmente da redução dos ramos ternados (dicásios), típicos das inflorescências de Bignoniaceae, a apenas uma flor cada. Evidência que corrobora tal interpretação é a presença, em inflorescências excepcionalmente longas, de ramos dicasiais na porção proximal ou mediana do eixo das mesmas (figura 4). O número de unidades florais por inflorescência foi bastante variável (5 a 28 unidades florais, média = 12,6, n = 27). Cada inflorescência apresentou 1 ou 2, raramente 3 ou mais flores em antese por dia. Inflorescências muito longas apresentaram 1 ou dois eixos menores partindo da base do eixo principal, cada um deles com a mesma disposição de unidades florais do eixo principal. Portanto tais inflorescências obviamente portavam um número muito maior de unidades florais do que o usual, não obstante tenham sido raramente verificadas. Inflorescências como estas não foram computadas no cálculo da média de unidades florais.

Já o número de inflorescências por planta não pôde ser estimado com precisão, devido aos já citados problemas em relação à determinação do que é um indivíduo. Apenas 2 em cada 10 agregados apresentaram duas ou mais inflorescências. Porém em um dos agregados utilizados para verificação de eventos florais, foram encontradas 10 inflorescências contendo unidades florais em estádios posteriores ao egresso floral, e mais três inflorescências em estádios iniciais do desenvolvimento, nas quais nenhum dos botões florais havia sofrido egresso. Todas as flores em antese nas dez primeiras inflorescências eram morfológicamente idênticas, apresentando corola magenta muito saturada, condição marginal nas populações investigadas. Os elementos deste agregado foram interpretados como compondo um mesmo indivíduo, do ponto de vista genotípico. Portanto, um mesmo indivíduo excepcionalmente pode apresentar até mais de 10 inflorescências.

Apenas em duas ocasiões se observou visitas legítimas de *Euglossa* sp. (Euglossini, Apidae) às flores de *J. racemosa*, uma abelha com dimensões corporais compatíveis com seu possível papel como polinizadora nesta espécie. A primeira observação ocorreu na parte da manhã, por volta das 11:00

horas. Ao se aproximar de uma inflorescência, a abelha pairou em frente à abertura de uma flor por um tempo relativamente longo (alguns segundos), pousando em seguida sobre o lobo anterior da corola, ou então voando para outra flor na qual repetia o mesmo comportamento. Após pousar a abelha adentrou a flor, caminhando sobre a superfície interna do lado anterior do tubo, em direção à base da corola, possivelmente orientando-se pelos guias de néctar. O tempo de permanência da abelha na flor não ultrapassou 10 segundos. Em seguida a abelha saiu da flor, levantou vôo pairando alguns segundos novamente à frente da flor antes de abandoná-la e em seguida voou para outra flor. A abelha visitou sucessivamente três flores de inflorescências próximas (descontando-se as flores à frente das quais a abelha apenas pairou, sem pousar), repetindo sempre a mesma seqüência de comportamentos. Após a última visita, a abelha alçou vôo afastando-se rapidamente do local e não foi mais observada. As três flores visitadas foram examinadas logo após o afastamento do abelha. Todas apresentavam estigmas fechados.

Alguns dias depois foi realizada uma segunda observação do visitante - uma abelha aparentemente da mesma espécie, talvez o mesmo indivíduo - em plantas da mesma população e localizadas a apenas alguns metros de distância das plantas da ocasião anterior. Verificou-se que o inseto se comportava da mesma forma que na primeira ocasião; porém observações mais detalhadas não foram feitas, pois foi necessário assegurar a coleta do exemplar para identificação. Após coletada, a abelha foi examinada com o auxílio de uma lupa manual, antes de ser introduzida na câmara mortuária. O exemplar apresentava pólen em seu dorso, o qual era da mesma cor do pólen de *J. racemosa*. Um exemplar de *Centris (Centris) cf. varia* foi observado voando próximo às inflorescências de *J. racemosa*; porém a abelha não foi vista visitando as flores.

Além destas, em três diferentes ocasiões foram observadas visitas de *Augochlora (Oxystoglossella) sp.* (Augochlorini, Halictidae) fêmea em flores da outra população investigada. Somente em uma destas ocasiões, porém em várias flores, foi verificado o comportamento da abelha dentro da flor. A abelha freqüentemente pousava sobre a extremidade distal do estaminódio,

caminhando sobre o mesmo até alcançar as anteras, nas quais dependurava-se executando movimentos para coleta de pólen. O contato da abelha com o estigma, durante seus movimentos dentro da flor, foi eventualmente verificado.

Em duas ocasiões, no final da tarde, foram verificadas visitas de pilhadores de néctar às flores de *J. racemosa*. As visitas forma feiras por *Xylocopa (Schonherria)* sp. A abelha pousava do lado de fora da corola, caminhando até a sua base e perfurando-a para ter acesso ao néctar. Em ambas as ocasiões, a abelha visitou várias flores, algumas vezes pousando também em botões florais em pré-antese. Somente na segunda ocasião o espécime foi coletado.

A antese ocorreu 7 a 9 dias depois do egresso floral, após o botão floral alcançar o estágio de pré-antese - fim da tarde do dia anterior ao da abertura -, com cerca de 3,2 cm de comprimento. Trinta das 50 unidades florais marcadas passaram pelo período de antese durante a coleta de dados. O início da abertura dos lobos da corola ocorreu ao amanhecer (por volta das 5:00 horas); porém a flor levou várias horas para estar totalmente aberta (foram observadas flores que só completaram a abertura dos lobos em torno das 10:00 horas). O tempo de duração da antese foi de um ou dois dias. Raramente a antese ultrapassou o segundo dia e, nestas flores que alcançavam o terceiro dia, a corola apresentou murchamento e manchas de necrose, soltando-se facilmente do receptáculo ao mais leve toque. A abscisão da corola parece ser influenciada pelas condições do tempo, uma vez que após chuva ou vento forte observou-se a queda da corola no segundo, ou mesmo no primeiro dia de antese.

A tonalidade da corola muda à medida que esta envelhece, de uma coloração maximamente saturada, do egresso floral ao estágio em que os lobos estão em abertura, até uma coloração mais clara e estável durante o primeiro dia da antese. Há um clareamento quase imperceptível da corola no(s) dia(s) subsequente(s). Flores intactas apresentaram odor muito suave, quase imperceptível ao olfato humano; porém os exames organolépticos revelaram a emissão de odor agradável tanto pela corola como pelo estaminódio, sendo que neste último o odor foi mais intenso. O odor foi mais perceptível em flores de primeiro dia.

A deiscência das anteras foi observada no dia anterior ao início da antese. As anteras usualmente posicionam-se junto ao "teto" do tubo, mas as tecas, com suas extremidades distais pontiagudas, não ficam perfeitamente paralelas ao eixo da flor. As valvas não permanecem abertas durante a antese, mas sim encobrendo o pólen e é necessária uma leve pressão da antera contra o "teto" do tubo para ocorrer a expulsão dos grãos polínicos. Tal pressão naturalmente deve ser exercida pelo dorso da abelha polinizadora, quando esta introduz-se no tubo floral à procura de néctar. Em relação a tal mecanismo é importante salientar a maior rigidez e espessura do lado posterior do tubo, relativamente ao lado anterior, bem como a superfície ventral (interna) bastante lisa do primeiro, a qual deve funcionar como anteparo para que a pressão exercida pelo dorso da abelha seja eficaz na expulsão do pólen de dentro das anteras.

As anteras também mudam de cor à medida que envelhecem. No primeiro dia elas são totalmente brancas. No dia seguinte o conectivo passa a apresentar uma coloração amarela-ocre, embora esta mudança de cor possa ter início já no final do primeiro dia. No final do segundo dia toda a antera torna-se ocre. Flores de segundo ou terceiro dias que apresentavam estigmas fechados, indicando que as mesmas haviam sido visitadas, não apresentavam pólen nas anteras. Quanto ao estaminódio, mudanças de coloração foram verificadas apenas em sua extremidade distal e nas cabeças dos tricomas glandulares que, no segundo dia de antese, passaram a apresentar colorações ocre e levemente amarelada, respectivamente.

A presença de néctar só foi detectada em flores em antese, embora tenham sido feitas apenas 5 observações em botões florais em pré-antese. Em 6 das 30 flores acompanhadas foi encontrado néctar em mais de uma ocasião, sendo que na maioria das flores foi feita apenas uma verificação da presença de néctar a cada dia. Numa das flores verificadas, 4 μ l de néctar foram extraídos na primeira verificação, realizada as 7:10 horas do dia em que a antese da mesma teve início. Às 18:00 horas do mesmo dia foram extraídos mais 2,5 μ l de néctar desta flor. No dia seguinte, uma terceira verificação

revelou a presença de 4,5 µl de néctar, um valor ligeiramente maior que o da quantidade de néctar presente no início da antese. A ausência da corola foi registrada no dia seguinte. O estigma aberto e sem pólen, bem como a ausência de perfurações na base da corola até o fim da antese, atestaram que esta flor não foi visitada durante este período. O volume e a concentração de açúcares no néctar (medição única) em flores previamente ensacadas, em antese de primeiro dia, foram $3,32 \pm 1,24$ µl e $23,8 \pm 3,1\%$, respectivamente (média \pm desvio padrão, n = 10). Não foi encontrado néctar no interior do cálice após a abscisão da corola.

O estigma também mudou de cor durante a antese, sendo inicialmente branco, passando a amarelado no segundo dia e finalmente tornando-se ocre no terceiro dia, quando a queda da corola geralmente já havia ocorrido. A murcha dos lobos do estigma acompanhou a mudança para a coloração ocre. Após a queda da corola, verificou-se que o estilete se tornava progressivamente curvo, sofrendo abscisão rente a sua inserção no topo do ovário, entre o terceiro e quarto dias após a abertura da flor.

Das 30 flores nas quais o período de antese foi acompanhado, somente em 11 o estigma foi encontrado fechado, na maioria das vezes quando da segunda verificação. Não foi possível verificar com precisão se tais estigmas fechados continham grãos de pólen, pois o estigma em *J. racemosa* é muito pequeno e da mesma cor que os grãos de pólen. Não obstante, o fechamento do estigma é um indicativo de que a flor foi visitada e polinizada, pois em flores polinizadas manualmente o estigma permaneceu fechado até o momento de abscisão do estilete.

Sistema Reprodutivo

Os resultados obtidos nos experimentos de polinizações manuais⁵ são mostrados na Tabela 3. Não ocorreu formação de frutos a partir das 135 flores empregadas no teste de autopolinização espontânea. Devido a este resultado, descartou-se a necessidade da realização dos tratamentos para

⁵ Não se observou diferenças entre as duas populações nos resultados dos testes para a determinação do sistema reprodutivo, de modo que os dados aqui apresentados referem-se às duas populações investigadas.

testar a formação de sementes por agamospermia, pois se tal fenômeno ocorresse nas populações investigadas, frutos contendo sementes agamospérmicas teriam que surgir de flores ensacadas e não-polinizadas⁶. Sessenta flores foram polinizadas com o seu próprio pólen e 61 foram utilizadas no tratamento para verificação da geitonogamia artificial. No total, portanto, foram 121 flores empregadas no teste da autopolinização, das quais apenas três flores (polinizadas com o seu próprio pólen) formaram frutos (2,48% do total flores autopolinizadas). Cento e cinco flores foram utilizadas no tratamento da polinização cruzada, das quais 65 (62%) resultaram na formação de frutos. Cento e trinta e sete flores foram marcadas como controle, das quais 45 (30,7%) resultaram em frutos.

Tabela 3: Produção de frutos por polinizações manuais e naturais em *Jacaranda racemosa*.

	Autopolinização espontânea	Autopolinização manual		Polinização cruzada manual	Polinização natural (controle)
		I	II		
N ^o de flores	135	60	61	105	137
N ^o de frutos	0	3*	0	65	42
% de frutos	0	2,48		62	30,7

I: com pólen da mesma flor; II: com pólen de outra flor da mesma planta. *Estes frutos continham apenas 2-5 sementes, ao passo que dezenas de sementes foram verificadas em frutos obtidos por polinização cruzada manual.

Não se observou crescimento dos ovários nas flores autopolinizadas antes que as mesmas abortassem - salvo nas três flores autopolinizadas que formaram frutos. Os frutos formados por autopolinização continham apenas 2-5 sementes, ao passo que dezenas de sementes foram verificadas em frutos obtidos por polinização cruzada manual. Os pistilos autopolinizados que não frutificaram sofreram abscisão entre o 4^o e o 6^o dias após a polinização

Os resultados da análise histológica de secções seriadas de óvulos em pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada são apresentados na Tabela 4 e nas figuras 11A-D e 12A-E. As

⁶ Salvo nos casos de pseudogamia.

placentas no ovário bilocular de *Jacaranda racemosa* apresentam-se como um par de cristas longitudinais em ambas as superfícies do septo, sobre as quais os óvulos estão dispostos. Os ovários apresentaram $30,1 \pm 11,7$ óvulos (média \pm desvio padrão, variando entre 8 e 59 óvulos, $n=30$). A porção ovariana do tecido transmissor corresponde à própria superfície das placentas (figuras 13 e 14), e os óvulos são anátropos, unitegmentados e tenuinucelados, portando saco embrionário do tipo *Polygonum* (figura 15). Apenas 12 horas após a polinização, vários tubos polínicos alcançaram a porção ovariana do tecido transmissor, iniciando a penetração dos óvulos tanto em autopolinizações como em polinizações cruzadas (Tabela 4, figuras 11A e 12B). Porém, já neste intervalo a incidência de óvulos penetrados foi significativamente maior em pistilos submetidos à polinização cruzada, relativamente aos pistilos autopolinizados ($\chi^2 = 25,9$, $df = 1$, $p < 0,001$). O número de óvulos penetrados nas polinizações cruzadas também foi significativamente superior ao das autopolinizações nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a polinização ($\chi^2 = 20,1$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 76,3$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 10,7$, $df = 1$, $p < 0,01$, respectivamente). Apesar da diferença significativa no número de óvulos penetrados, a maioria dos óvulos foi penetrada 72 horas após a polinização, tanto em pistilos submetidos à polinização cruzada como nos pistilos autopolinizados.

Após a cópula, o tubo polínico descarrega seu denso conteúdo protoplasmático no interior da sinérgide degenerativa, obscurecendo os componentes internos desta célula (figuras 16 e 17). Não foi possível observar diretamente a transferência dos núcleos das células espermáticas para os protoplasmas da oosfera e da célula média. Por isto, os óvulos cuja sinérgide penetrada apresentavam conteúdo citoplasmático fortemente corado foram computados como óvulos fecundados. No intervalo de 12 horas após a polinização, alguns óvulos já haviam sido fecundados em pistilos submetidos à polinização cruzada, enquanto nenhum óvulo fecundado foi verificado em pistilos autopolinizados (Tabela 4, figuras 11A e 12B). O número de óvulos fecundados nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, nas polinizações cruzadas, foi significativamente maior que o número de óvulos fecundados nos mesmos

intervalos, nas autopolinizações ($\chi^2 = 9,4$, $df = 1$, $p < 0,01$; $\chi^2 = 16,7$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 76,9$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 10,6$, $df = 1$, $p < 0,01$, respectivamente) (Tabela 4, figuras 11B-D e 12C-E).

Tabela 4: Óvulos de *Jacaranda racemosa*, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a polinização (n=3 pistilos).

	6 h		12 h		24 h		48 h		72 h	
	auto	cruz	Auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz
np	68 (97,2%)	98 (99,0%)	115 (95,2%)	78 (69,0%)	63 (82,9%)	41 (50,6%)	63 (65,6%)	7 (7,3%)	21 (32,3%)	10 (11,6%)
Σ pen	0	0	2 (1,6%)	25 (22,0%)	11 (14,5%)	39 (48,1%)	23 (23,9%)	80 (83,3%)	40 (61,5%)	74 (86,0%)
Σ fec	0	0	0	8 (7,1%)	3 (3,9%)	23 (28,4%)	18 (18,7%)	76 (79,17%)	39 (60,0%)	73 (84,9%)
End 2c	0	0	0	0	0	0	0	9 (9,4%)	18 (27,7%)	17 (19,8%)
End 3c	0	0	0	0	0	0	0	3 (3,1%)	6 (9,2%)	28 (32,6%)
End 4c	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (1,5%)	23 (26,7%)
SSE	1 (1,4%)	1 (1,0%)	2 (1,6%)	4 (3,5%)	1 (1,3%)	1 (1,2%)	6 (6,2%)	4 (4,2%)	3 (4,6%)	0
SSE pen	0	0	0	0	0	0	1 (1,0%)	5 (5,2%)	1 (1,5%)	2 (2,3%)
SE anôm	1 (1,4%)	0	2 (1,6%)	6 (5,3%)	1 (1,3%)	0	3 (3,1%)	0	0	0
Total	70	99	121	113	76	81	96	96	65	86

np = óvulos não-penetrados; Σ pen = soma dos óvulos penetrados (i.e. penetrados + fecundados + com endosperma inicial); Σ fec = soma dos óvulos fecundados (i.e. fecundados + com endosperma inicial). End = óvulo contendo endosperma em iniciação: 2c, 3c e 4c = com duas três ou quatro células, respectivamente. SSE = óvulo sem saco embrionário. SSE pen = óvulo sem saco embrionário, porém penetrado. SE anôm = óvulo contendo saco embrionário anômalo. Total = total de óvulos (soma do número de óvulos nos três ovários analisados em cada tratamento e em cada intervalo após a polinização).

Embora a singamia não tenha sido diretamente observada, a fusão tripla foi freqüentemente verificada (figura 17). A endospermogênese é *ab initio* celular. A divisão da célula endospermica primária sempre foi transversal, ou seja, perpendicular ao eixo longitudinal do saco embrionário, resultando em uma câmara micropilar e uma câmara calazal (estádio bicelular da ontogenia do endosperma, figura 18). A segunda divisão celular da endospermogênese foi sempre longitudinal (i.e. perpendicular ao plano de divisão da célula endospermica primária) e geralmente ocorreu na câmara

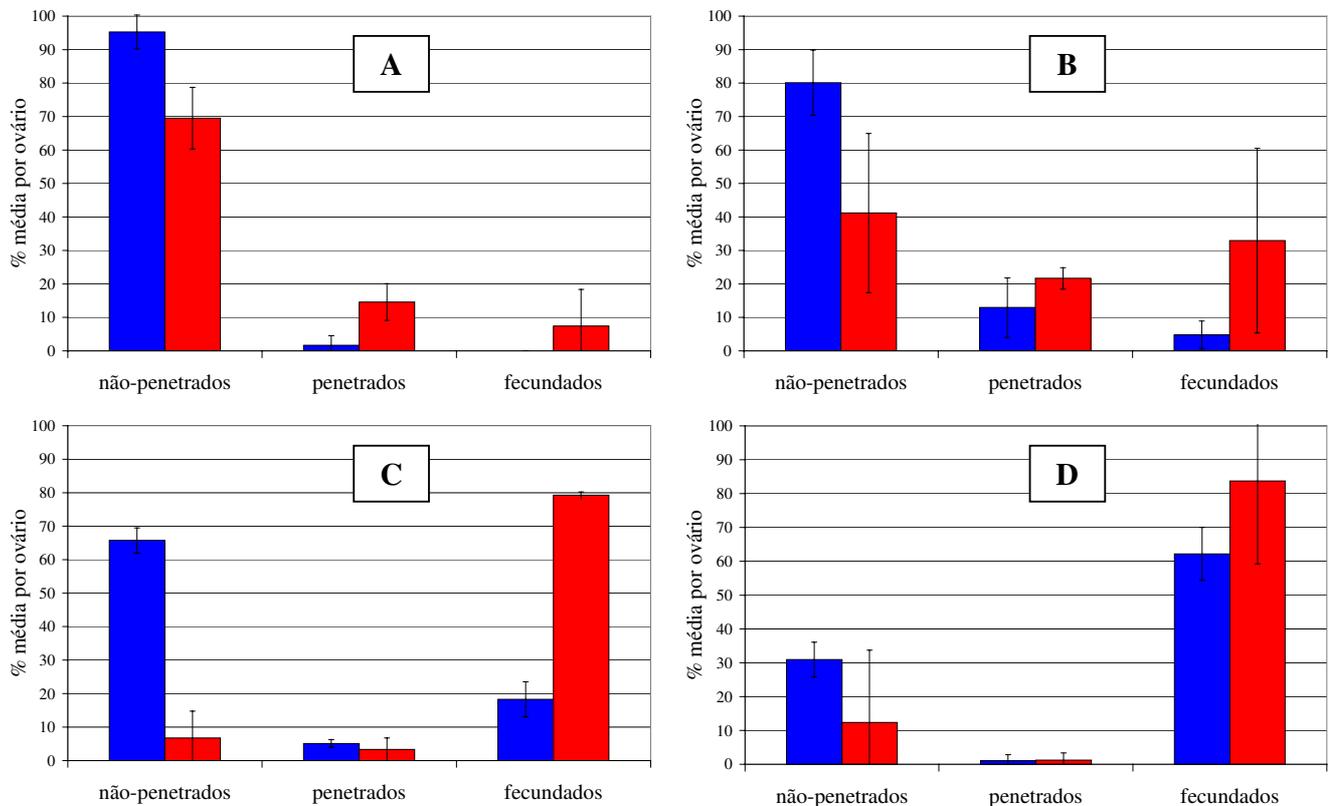


Figura 11: Incidência de óvulos penetrados e fecundados (excluindo óvulos não funcionais) em pistilos de *Jacaranda racemosa*, 12 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 (D) horas após a polinização. Barras verticais indicam desvios padrões; "penetrados" indica óvulos que foram penetrados, porém não haviam sido fecundados até então; "fecundados" indica a soma das categorias SE 7c fec, End 2c, End 3c e End 4c da figura 12; ■ autopolinização; ■ polinização cruzada.

micropilar, originando o estágio tricelular da ontogenia do endosperma. A terceira divisão da endospermogênese foi também longitudinal, ocorrendo na câmara calazal (estádio tetracelular da ontogenia do endosperma, figura 19). Os estádios subsequentes da endospermogênese não foram observados, e nenhuma divisão celular foi verificada no zigoto até o estágio de endosperma tetracelular.

Alguns endospermas bi- e tricelulares já estavam presentes em pistilos submetidos à polinização cruzada, 48 horas após a polinização, enquanto nenhum endosperma em iniciação foi observado neste intervalo em pistilos autopolinizados (Tabela 4, figura 12D).

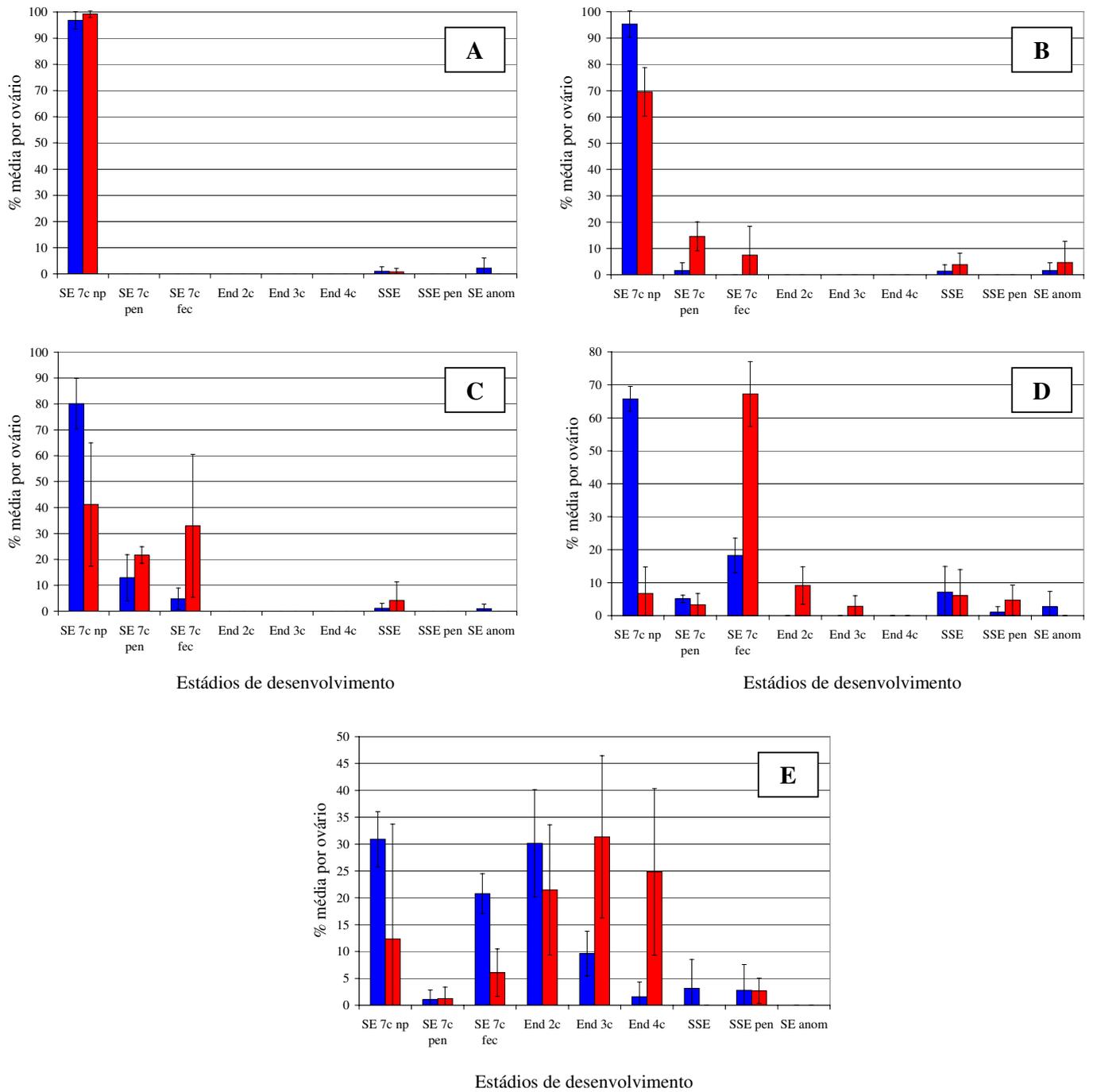
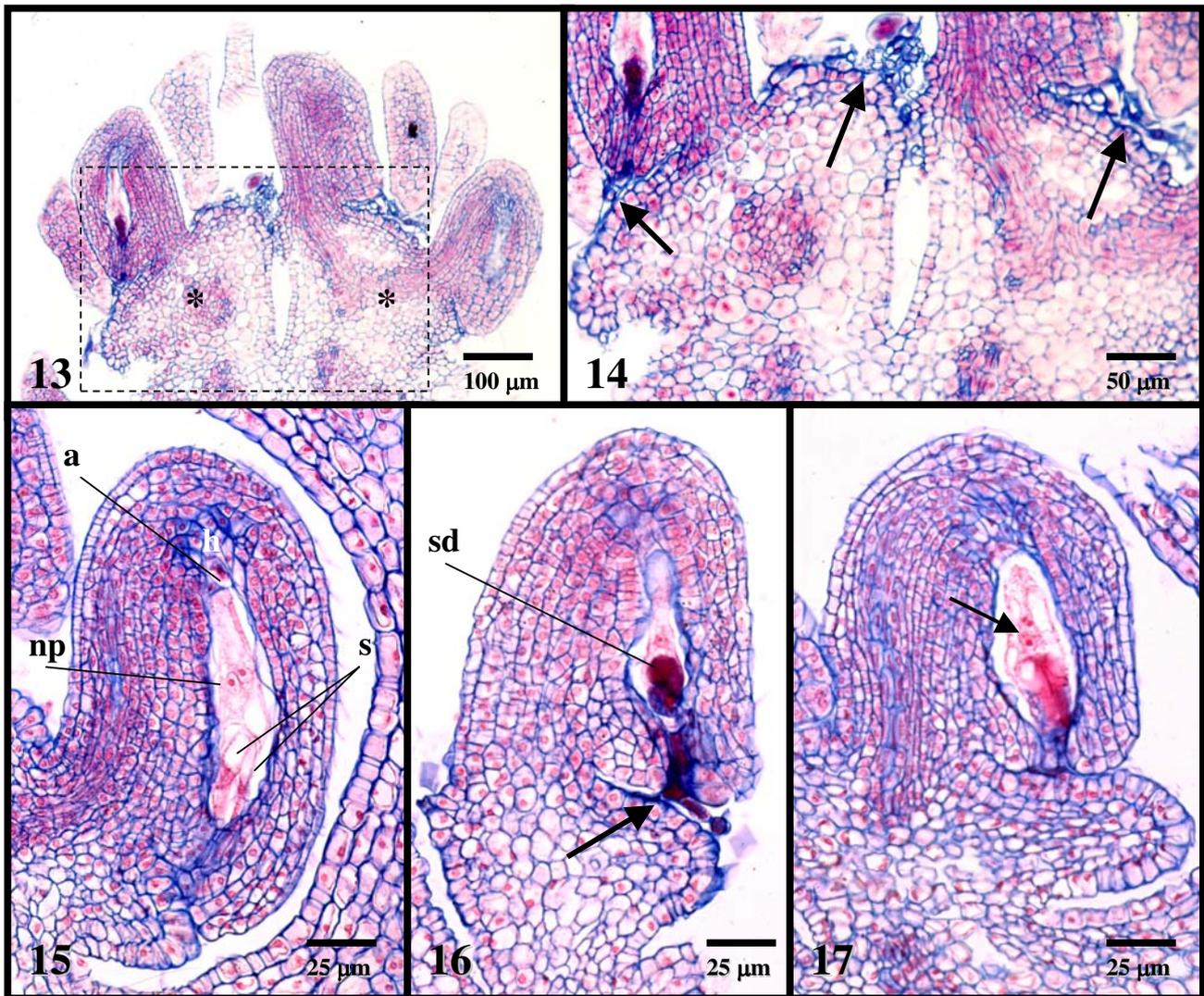
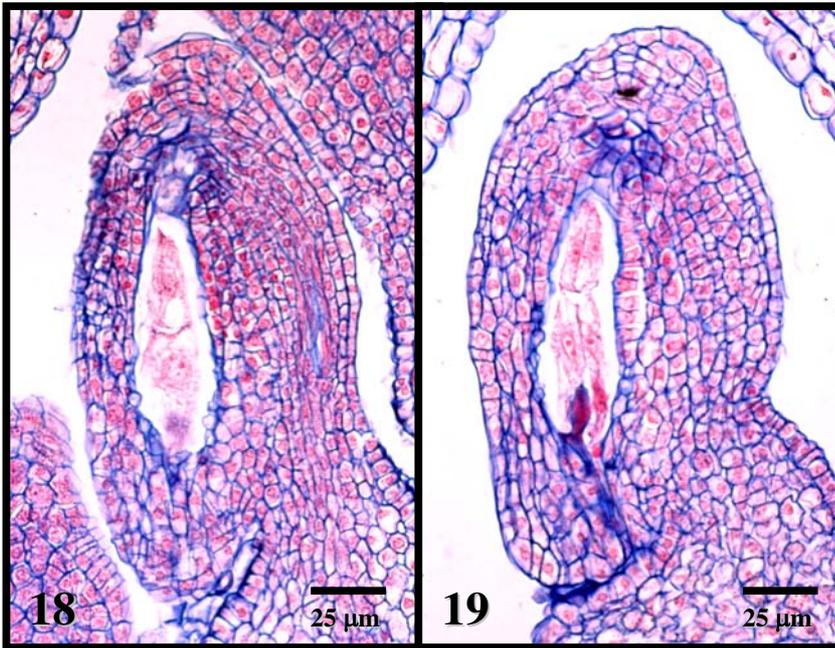


Figura 12: Óvulos de *Jacaranda racemosa*, 6 (A), 12 (B), 24 (C), 48 (D) e 72 (E) horas após a polinização. Barras verticais indicam desvios padrões; SE 7c = saco embrionário maduro (7-celular); np = não-penetrado; pen = penetrado, porém não-fecundado; fec = fecundado; End = endosperma; 2c = 2-celular; 3c = 3-celular; 4c = 4-celular; SSE = sem saco embrionário; SE anom = com saco embrionário anômalo; ■ autopolinização; ■ polinização cruzada.



Figuras 13: Secções transversais do ovário de *Jacaranda racemosa*. 13: Placentas (asteriscos) e óvulos em um dos lados do septo. 14: Inserção da figura anterior em maior aumento. Setas indicam tubos polínicos sobre a superfície externa da placenta. Figuras 15-17: Secções longitudinais de óvulos de *J. racemosa*. 15: Saco embrionário maduro, não-penetrado. 16: Saco embrionário maduro, penetrado e fecundado. A seta indica tubo polínico no canal micropilar. 17: Saco embrionário penetrado, no momento da fusão tripla. A seta indica núcleo de uma das células espermáticas fundido-se com os núcleos polares. a = antípodas; h = hipóstase; np = núcleos polares; s = sinérgides; sd = sinérgide degenerativa (penetrada).



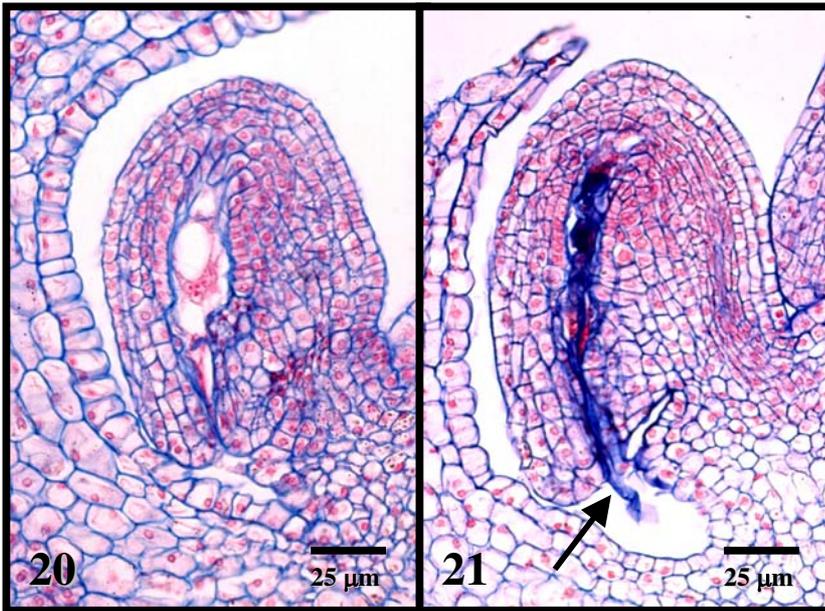
Figuras 18-19: Secções longitudinais de óvulos fecundados de *Jacaranda racemosa*, contendo endosperma inicial. 18: Endosperma 2-celular. 19: Endosperma 4-celular.

No intervalo de 72 horas após a polinização, a maioria dos óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada apresentou endospermas nos estádios tri- ou tetracelular, enquanto a maior parte dos óvulos em pistilos autopolinizados ainda encontrava-se no estágio bicelular do endosperma, ou em estágio anterior (Tabela 4, figura 12E). A

diferença entre os tratamentos de

autopolinização e polinização cruzada quanto ao número de óvulos contendo endospermas tri- e tetracelulares, 72 horas após a polinização, também foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 36,7$, $df = 1$, $p < 0,001$). Tanto em autopolinizações como em polinizações cruzadas, o zigoto permaneceu dormente até o último intervalo de fixação analisado e, salvo as menores taxas de desenvolvimento em pistilos autopolinizados, nenhum sinal de mal-funcionamento do endosperma foi detectado.

Até cerca de 9% dos óvulos observados em secções de ovários de ambos os tratamentos (Tabela 4, figura 12) foram óvulos não-funcionais, i.e. destituídos de saco embrionário (figura 21) ou apresentando um saco embrionário degenerado, ou ainda contendo um gametófito feminino de estrutura anômala (i.e. cenocítico e com núcleos aglomerados, figura 20). Em alguns casos, tais óvulos desprovidos de um saco embrionário normal foram penetrados, tendo o tubo polínico se enrolado no interior da cavidade do saco embrionário (figura 21).



Figuras 20-21: Secções longitudinais de óvulos não-funcionais de *Jacaranda racemosa*. 20: Saco embrionário anômalo contendo vários núcleos centralmente posicionados. 21: Sem saco embrionário, porém penetrado pelo tubo polínico (seta).

Produção de sementes por frutificação natural

Vários indivíduos contendo frutos maduros ou em desenvolvimento em suas inflorescências (figura 10) foram verificados em ambas as populações. Os frutos maduros apresentaram $20,2 \pm 12,96$ sementes (média \pm desvio padrão), variando entre 1 e 46 sementes por fruto ($n = 30$). O

tamanho do fruto foi proporcional ao número de sementes em seu interior - isto é, quanto maior o fruto, maior o número de sementes que ele continha.

3.5. Discussão

Vários atributos florais são indicadores da polinização por abelhas em *J. racemosa*, tais como a antese diurna, a acentuada zigomorfia, a coloração e o formato tubular/infundibuliforme da corola, a plataforma de pouso (lodo anterior da corola), a presença de néctar em uma câmara nectarífera localizada na base da corola e a presença de guias de néctar na superfície interna do lado anterior ("assoalho") do tubo corolino (Percival 1965, Proctor & Yeo 1975, Faegri & van der Pijl 1979). A flor de *J. racemosa* é do tipo *Anemopaegma* (*sensu* Gentry 1974), o qual está associado à polinização por abelhas de tamanhos médio e grande. Salvo no caso de pilhadores primários de néctar, tal como a espécie de *Xylocopa* observada, o estreitamento da base do tubo corolino restringe o acesso ao néctar às abelhas de língua longa (Percival 1965, Proctor & Yeo 1975, Faegri & van der Pijl 1979).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a função do estaminódio em *Jacaranda*. Morawetz (1982) sugeriu que o estaminódio poderia sinalizar o envelhecimento (e conseqüentemente da ausência de néctar) através da mudança de cor. Em *J. racemosa* a mudança de coloração do estaminódio durante a antese foi muito discreta, não sendo portanto congruente com a hipótese de Morawetz (1982). A apresentação secundária de pólen em *J. oxyphylla* e *J. decurrens* foi sugerida por Yanagizawa (1983). Em *J. racemosa*, muito poucas flores em antese contendo grãos de pólen aderidos aos tricomas do estaminódio foram verificadas, de modo que a hipótese de apresentação secundária de grãos de pólen não é suportada pelos presentes resultados. Vieira *et al.* (1992) sugeriram um papel triplo do estaminódio para a polinização em *J. caroba*, quais sejam, orientação visual (devido ao contraste entre a cor do estaminódio e a cor da corola), guia olfativo (devido à presumível liberação de odor pelos tricomas glandulares) e auxílio no contato do polinizador com as anteras e o estigma (pela diminuição do diâmetro útil da abertura da corola). Segundo Waddington (1983), as abelhas não só podem detectar odores florais com maior acuidade, como podem discriminar vários tipos e diferentes intensidades de fragrâncias que o olfato humano não é capaz de perceber. Portanto a detecção, através dos testes organolépticos presentemente realizados, de um odor mais intenso sendo produzido pelo estaminódio é um indicativo de que este órgão é o local de produção da maior parte da suave fragrância verificada na flor de *J. racemosa*, corroborando portanto a hipótese de que o estaminódio atuaria funcionalmente como órgão de atração olfativa. Porém os presentes resultados também sugerem que o estaminódio pode aumentar o espectro de polinizadores potenciais em *J. racemosa*, uma vez que abelhas de pequeno porte, tais como as Halictidae observadas, utilizam o estaminódio para guiar-se até as anteras, eventualmente contatando o estigma.

As medições do volume de néctar nas flores indicam que a produção de néctar se processa durante todo o período de antese, ou então a extração do mesmo durante este período estimula nova secreção. A concentração de solutos no néctar está dentro da faixa de 10 a 75%, a qual, segundo Kevan & Baker (1983), caracteriza as flores zigomorfas polinizadas por abelhas de língua longa.

Das flores monitoradas do momento da abertura dos lobos até a abscisão da corola, 36,7% apresentaram estigmas fechados no final da antese. Este resultado pode ser traduzido numa estimativa de aproximadamente 36% de flores em antese polinizadas, nas duas populações e no período investigado, uma vez que o fechamento permanente do estigma foi verificado em todas as flores submetidas à polinização manual. Este valor não está muito distante da percentagem de frutos formados por polinização natural, no controle dos testes para verificação do sistema reprodutivo.

Sistema reprodutivo

Os resultados dos experimentos de polinizações controladas indicam que *J. racemosa* é uma espécie auto-incompatível (apenas 3 frutos formados em 121 flores autopolinizadas em \cong 10 indivíduos); porém isto se deve a algum tipo de LSI, uma vez que a maioria dos óvulos em pistilos autopolinizados foi penetrada e fecundada 72 horas após a polinização.

Gibbs & Bianchi (1999) verificaram um atraso na incidência da penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados, comparado aos pistilos submetidos à polinização cruzada em *Tabebuia nodosa* e *Dolichandra cynanchoides*, duas espécies de Bignoniaceae com LSI, embora o número de óvulos penetrados em autopolinizações e polinizações cruzadas tenha se igualado no intervalo de 96 horas após a polinização. Entretanto, os autores não investigaram a histologia dos óvulos penetrados. Em *Jacaranda racemosa* um atraso similar na incidência de óvulos penetrados em autopolinizações vs. polinizações cruzadas foi observado nos intervalos de 12, 24, 48 e 72, sendo que nenhum óvulo penetrado foi observado em pistilos autopolinizados no intervalo de 12 horas, ao passo que cerca de 7% dos óvulos já haviam sido penetrados em pistilos submetidos à polinização cruzada no mesmo intervalo. No intervalo de 48 horas após a polinização, o número de óvulos fecundados foi 4 vezes maior em pistilos submetidos à polinização cruzada. Além disso, cerca de 12,5% dos óvulos apresentavam endospermas 2- ou 3-celulares em pistilos submetidos à polinização cruzada, ao passo que nenhum endosperma em iniciação foi verificado em pistilos autopolinizados, no mesmo intervalo

de fixação. No intervalo de 72 horas, além da quantidade de óvulos fecundados e apresentando endospermas nos estádios 3- e 4-celulares ter sido significativamente maior em pistilos submetidos à polinização cruzada, o número de óvulos contendo endosperma 4-celular nestes pistilos foi quase 18 vezes maior do que em pistilos autopolinizados.

Os presentes resultados indicam que os pistilos autopolinizados de *J. racemosa* apresentam um tipo de LSI no qual ocorre um atraso no progresso do desenvolvimento em diferentes fases após a polinização, desde a penetração dos óvulos até os estádios iniciais do desenvolvimento do endosperma, relativamente ao progresso do desenvolvimento em pistilos submetido à polinização cruzada. Uma vez que, em alguns casos, os efeitos da depressão endogâmica podem mimetizar a LSI, uma baixa taxa de frutificação por autopolinização, tal como a observada em *J. racemosa*, não é, necessariamente, evidência da atuação de um sistema de auto-incompatibilidade com base genética (Seavey & Bawa 1986, Sage *et al.* 1994). Entretanto, embora não tenham sido feitas análises de secções histológicas em intervalos posteriores à 72 horas, até este intervalo de fixação, apenas 38% dos óvulos apresentavam endosperma em iniciação em pistilos autopolinizados, ao passo que 80% dos óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada apresentavam um endosperma inicial. Além disso, os pistilos autopolinizados sofreram abscisão durante um período relativamente curto, i.e. entre os intervalos de 72 e 120 horas após a polinização, e nenhum sinal de malformação do endosperma foi verificado em pistilos autopolinizados. Portanto é pouco provável que a rejeição dos pistilos autopolinizados em *J. racemosa* seja decorrente dos efeitos da expressão de genes recessivos deletérios.

Sobre a formação de frutos e a eficácia da polinização

A despeito do baixo número de visitas observadas do mais provável polinizador nas populações investigadas de *J. racemosa*, a percentagem relativamente alta de frutos formados por polinização natural (controle), bem como a abundância de inflorescências contendo vários frutos, observadas em ambas as populações, parecem sugerir que, sendo esta espécie auto-incompatível, a eficácia da

polinização deve ser elevada. Não obstante, algumas características inerentes à distribuição dos indivíduos, bem como à formação de frutos, provavelmente contribuem para a eficiência da reprodução por sementes na espécie estudada.

Em primeiro lugar, o fato dos agregados de indivíduos não se encontrarem muito distanciados uns dos outros, bem como a possibilidade de pelo menos alguns destes agregados serem formados por elementos genotipicamente diversos, indicam que a polinização cruzada deve ser grandemente facilitada, já que não seria necessário o polinizador executar movimentos envolvendo longas distâncias para explorar os recursos de muitas flores em cada seqüência de visitas, tornando o fluxo de pólen entre flores geneticamente diferentes altamente provável. A pequena quantidade de néctar disponível em cada flor provavelmente também favorece o fluxo de pólen nas populações, uma vez que as distâncias de vôo das abelhas forrageadoras tendem a ser inversamente proporcionais à quantidade de néctar disponível nas flores forrageadas (Waddington 1983), e que o polinizador seria forçado a visitar várias flores para satisfazer suas necessidades energéticas (Heinrich & Raven 1972, Waser & Price 1983).

Em segundo lugar, a contagem do número de sementes em 30 frutos naturalmente formados em uma das populações revelou ser este número altamente variável. Embora parte desta variabilidade seja devida ao número também variável de óvulos por ovário (8 a 59), foram encontrados frutos contendo desde um número máximo de 46 sementes, até frutos com apenas uma semente, sendo que os menores frutos foram os que apresentaram menores números de sementes. Este quadro é bastante diferente do constatado, por exemplo, em *Tabebuia* (capítulo 7 da presente tese), onde não foram encontrados frutos contendo menos do que dezenas ou centenas de sementes - salvo quando os mesmos foram atacados por herbívoros ou parasitóides. Estudos realizados em *Catalpa speciosa* (Stephenson 1980) e *Campsis radicans* (Bertin 1982), ambas pertencentes à família Bignoniaceae, indicaram ocorrer o aborto seletivo de frutos resultantes de ovários nos quais poucos óvulos foram fecundados, o que sugere haver um número mínimo de sementes abaixo do qual o fruto é abortado. Este limiar entretanto pode variar, dependendo do número de frutos que já estejam em desenvolvimento no indivíduo, da energia

disponível para a frutificação, etc. (Stephenson 1980, 1981). O baixo número de sementes em alguns frutos de *J. racemosa* pode ser decorrente de um baixo percentual de óvulos fecundados em pistilos naturalmente polinizados, uma vez que a eficácia de deposição de pólen no estigma por alguns polinizadores deve ser muito pequena. Entretanto, estes frutos alcançam a maturidade, provavelmente devido à capacidade das plantas desta espécie compensarem a baixa eficácia de deposição do pólen no estigma com o investimento no desenvolvimento de frutos, mesmo quando estes são resultantes de ovários nos quais apenas um, ou alguns óvulos foram fecundados.

A observação de frutos resultantes de polinização natural contendo apenas uma ou poucas sementes é congruente com a hipótese de que abelhas de pequeno porte, tais como Halictidae, podem eventualmente atuar como polinizadoras em *J. racemosa*. Ainda que a quantidade de pólen depositada no estigma por estas abelhas seja pequena, seu comportamento de visita pode ser relevante para o sucesso reprodutivo da planta, pois mesmo com um número de óvulos fecundados severamente limitado pela polinização, as poucas sementes formadas alcançam a maturidade. Assim sendo, parece provável que o verdadeiro papel biológico do estaminódio em *J. racemosa* não seja o de um simples indicador de néctar.

3.6. Literatura Citada

- BERTIN, R. I. 1982. Floral biology, hummingbird pollination and fruit production of trumpet creeper (*Campsis radicans*, Bignoniaceae). **American Journal of Botany** **69**: 122-134.
- BITTENCOURT, J. A. R. 1981. **Alguns Aspectos da Fenologia e Polinização de *Jacaranda macrantha* Cham.** Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- DAFNI, A. 1992. **Pollination ecology**. Oxford: Oxford University Press.
- FAEGRI, K. & PIJL, L. van der 1979. **The Principles of Pollination Ecology**. 3th ed. Oxford: Pergamon Press.

- GENTRY, A. H. 1974. Coevolutionary patterns in Central American Bignoniaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **61**: 728-759.
- GENTRY, A. H. 1992. Bignoniaceae - Part II (Tribe Tecomeae). **Flora Neotropica: Monograph 25 (II)**. Organization for Flora Neotropica, New York.
- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1999. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany** **84**: 449-457.
- GIULIETTI, A. M. & PIRANI, J. R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. *In: Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (W. R. Heyer & P. E. Vanzolini, eds.). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. P. 39-69.
- HEINRICH, B. & RAVEN, P. H. 1972. Energetics and pollination ecology. **Science** **176**: 597-602.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill, New York.
- KEVAN, P. G. & BAKER, H. G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. **Annual Review of Entomology** **28**: 407-453.
- LAROCA, S. & ALMEIDA, M. C. 1985. Adaptação dos palpos labiais de *Niltonia virgillii* (Hymenoptera, Apoidea, Colletidae) para coleta de néctar em *Jacaranda puberula* (Bignoniaceae), com descrição do macho. **Revista Brasileira de Entomologia** **29**: 289-297.
- MORAWETZ, w. 1982. **Morphologisch-ökologische differenzierung biologie, systematic und evolution der neotropischen gattung *Jacaranda* (Bignoniaceae)**. Springer Verlag. Wien. 184p.
- PERCIVAL, M. S. 1965. **Floral Biology**. London: Pergamon Press.
- PROCTOR, M. & YEO, P. 1975. **The Pollination of Flowers**. London: Collins.
- RIBEIRO, M. F.; ABREU, L. C. R. & BARROS, M. G. 2002. Biologia reprodutiva e polinização de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum (Bignoniaceae). Brasília DF. *In* **53º Congresso Nacional de Botânica**. Recife, PE. Resumos, p. 281.

- ROESER, K. R. 1972. Die Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos 61**: 33-36.
- SAGE, T. L.; BERTIN, R. J. & WILLIAMS, E. G. 1994. Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. *In Genetic Control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants*. (E. G. Williams; A. E. Clarke & R. B. Knox, eds.). Kluwer Academic, Dordrecht, p.116-140.
- SEAVEY, S. R. & BAWA, K. S. 1986. Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. **The Botanical Review 52**:195-219.
- STEPHENSON, A. G. 1980. Fruit set, herbivory, fruit reduction, and the fruiting strategy of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae). **Ecology 61**: 57-64.
- STEPHENSON, A. G. 1981. Flower and fruit abortion: Proximate causes and ultimate functions. **Annual Review of Ecology and Systematics 12**: 253-279.
- VIEIRA, M. F.; MEIRA, R. M. S. A.; QUEIROZ, L. P. & MEIRA NETO, J. A. A. 1992. Polinização e reprodução de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. (Bignoniaceae) em área de Cerrado do Sudeste Brasileiro. **Anais do 8º Congresso da SBPC**, 13-19.
- WASER, N. M. & PRICE, M. V. 1983. Optimal and actual outcrossing in plants and nature of plant pollinator interaction. *In Handbook of Experimental Pollination Biology* (C. E. Jones, & R. J. Little, eds.). New York: Scientific and Academic Press. p. 341-359.
- WADDINGTON, K. D. 1983. Foraging behaviour of pollinators. *In Pollination Biology* (L. A. Real, ed.). Academic Press, New York, p. 213-239.
- YANAGIZAWA, Y. 1983. **Aspectos da Biologia Floral de Espécies de Arrabidaea e Jacaranda, no Município de Botucatu, SP**. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

4. Biologia Reprodutiva de *Zeyheria montana* Martius (Bignoniaceae): Polinização, Sistema Reprodutivo e Origem do Néctar

4.1. Resumo - *Zeyheria montana* é uma espécie com hábito arbustivo ou arbóreo, tipicamente encontrada nos cerrados brasileiros. Seu sistema reprodutivo foi investigado através de polinizações manuais controladas, verificação da incidência de óvulos penetrados por microscopia de fluorescência em autopolinizações vs. polinizações cruzadas, e análise histológica de secções seriadas do ovário. A biologia floral foi estudada por observação dos visitantes e dos eventos florais. A análise das áreas de secreção do néctar na câmara nectarífera foi feita por dissecação das flores e observações em estereomicroscópio, bem como pelo exame de secções seriadas da base da flor em microscópio óptico. A antese durou 6-8 dias; porém o fornecimento de pólen e a receptividade do estigma foram verificados somente até o final do primeiro e do segundo dias, respectivamente. A secreção do néctar foi conspícua. As presentes observações indicaram que *Z. montana* é polinizada por várias espécies de beija-flores, mas principalmente por *Colibri serrirostris*. A flor apresenta um disco rudimentar, não-funcional, e o néctar é secretado por tricomas glandulares localizados na superfície interna da parede da câmara nectarífera (epiderme ventral da base da corola). Nos experimentos de polinizações manuais, somente as polinizações cruzadas resultaram na formação de frutos, tendo sido verificada uma baixa taxa de frutificação natural. Flores autopolinizadas e não-polinizadas se secaram após o período de antese, sem apresentar expansão do ovário. Nenhuma discrepância significativa quanto ao número de óvulos penetrados foi verificada entre autopolinizações e polinizações cruzadas, embora um atraso na penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados tenha sido constatado. Tais resultados indicam a ocorrência da auto-incompatibilidade de ação tardia em *Z. montana*.

Palavras-chave: sistema reprodutivo, auto-incompatibilidade de ação tardia, polinização por beija-flor, ornitofilia, secreção do néctar, *Zeyheria*, Bignoniaceae.

4.2. Introdução

Zeyheria Martius (Bignoniaceae) é um gênero sulamericano constituído de apenas duas espécies, ocorrendo especialmente em ambientes secos da região compreendida entre o sul da floresta amazônica até o norte do Paraná e o oeste da Bolívia. *Zeyheria montana* Martius é uma espécie com ampla distribuição no território brasileiro, ocorrendo entre as altitudes de 300 a 1000 m, desde o Maranhão até o Paraná, embora seja mais freqüente nos cerrados do Planalto Central Brasileiro (Gentry 1992).

Os primeiros registros sobre a biologia floral de *Z. montana* foram fornecidos por Yanagizawa *et al.* (1982), segundo os quais a polinização é efetuada por beija-flores. Tal conclusão não parece estar de acordo com algumas características da flor, as quais não se ajustam muito bem à síndrome ornitófila, e.g. a cor amarela da corola e a ausência de um conspícuo disco nectarífero⁷. Embora Machado *et al.* (1995) tenham sugerido que a secreção do néctar na flor de *Z. digitalis* (= *Z. montana*) seja efetuada por tricomas glandulares peltados da superfície externa do gineceu, Yanagizawa *et al.* (1982) verificaram o acúmulo de gotículas de néctar na superfície interna da região proximal do tubo corolino (i.e. na superfície interna da câmara nectarífera). Portanto, os dados atualmente disponíveis sobre a origem do néctar da flor de *Z. montana* são discordantes.

Embora a família Bignoniaceae seja composta por aproximadamente 800 espécies distribuídas em 112 gêneros (Spangler & Olmstead 1999), estudos sobre sistemas reprodutivos foram realizados em somente 29 espécies (Bawa 1974, Stephenson & Thomas 1977, Petersen *et al.* 1982, Bullock 1985, Bertin & Sullivan 1988, Gobatto-Rodrigues & Stort 1992, Vieira *et al.* 1992, Amaral 1992, Gibbs & Bianchi 1993, James & Knox 1993, Gibbs & Bianchi 1999). Com exceção de *Pyrostegia venusta* (Gobatto-Rodrigues & Stort 1992), *Astianthus viminalis* (Bullock 1985) e *Tecoma stans* (Singh & Chauhan 1996, Dutra & Machado 2001), todas as espécies se mostraram auto-incompatíveis. Em 18

⁷ Espécies ornitófilas usualmente possuem flores que apresentam um conspícuo disco nectarífero, responsável pela produção relativamente abundante de néctar, necessário à atração dos polinizadores.

destas espécies, as quais foram investigadas quanto ao sítio de reação de incompatibilidade, todas revelaram a ocorrência de auto-incompatibilidade de ação tardia *sensu* Seavey & Bawa (1986). Embora vários autores (e.g. Klekowski 1988, Seavey & Carter 1994, Gibbs and Sasaki, 1998) tenham verificado indicações de que a rejeição dos pistilos autopolinizados em algumas espécies se deve aos efeitos da depressão endogâmica - e.g. o aborto dos embriões em um *continuum* de estádios de desenvolvimento e a ocorrência de malformações durante a embriogênese -, existem evidências de que, em outros taxa, a auto-esterilidade se deve a um mecanismo de auto-incompatibilidade de ação tardia, controlada por um único gene principal (Lipow & Wyatt 2000), ou que a abscisão dos pistilos autopolinizados é desencadeada por eventos decorrentes do desenvolvimento dos tubos polínicos no estilete, antes que os mesmos alcancem os óvulos (Gibbs and Bianchi 1999; Lipow and Wyatt 1999; Sage *et al.* 1999). Embora a expressão fenotípica deste sistema de incompatibilidade - e.g. um atraso na penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados, relativamente à penetração dos óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada - possa algumas vezes ser verificada, a maior parte dos estudos que sugerem a ocorrência de auto-incompatibilidade tardia carecem de análises envolvendo a contagem de óvulos penetrados e não-penetrados em diferentes intervalos de tempo após as autopolinizações e polinizações cruzadas (porém ver Gibbs & Bianchi 1993, 1999).

Não há registros sobre a determinação do sistema reprodutivo em nenhuma das espécies de *Zeyheria*. Os objetivos do presente trabalho foram determinar o sistema reprodutivo, contribuir com dados adicionais sobre os eventos e os visitantes florais, e esclarecer a atual contradição quanto a origem do néctar de *Z. montana*.

4.3. Material e Métodos

Os trabalhos de campo foram realizados entre os meses de janeiro e outubro de 2000 e 2001 numa área protegida de cerrado localizada no vale do Ribeirão Mascate, no Parque Nacional da Serra do Cipó (19°23'S, 43°30'W), Estado de Minas Gerais. Dados adicionais sobre biologia floral foram

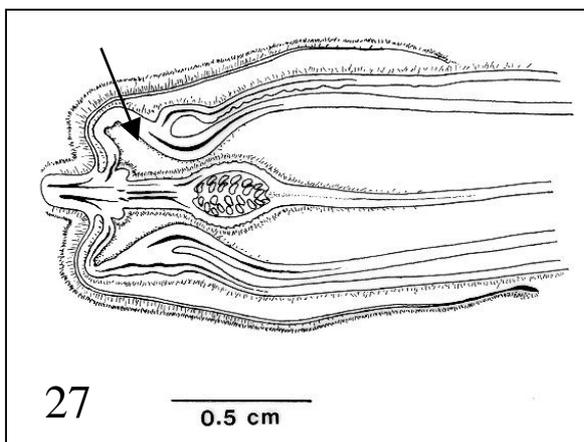
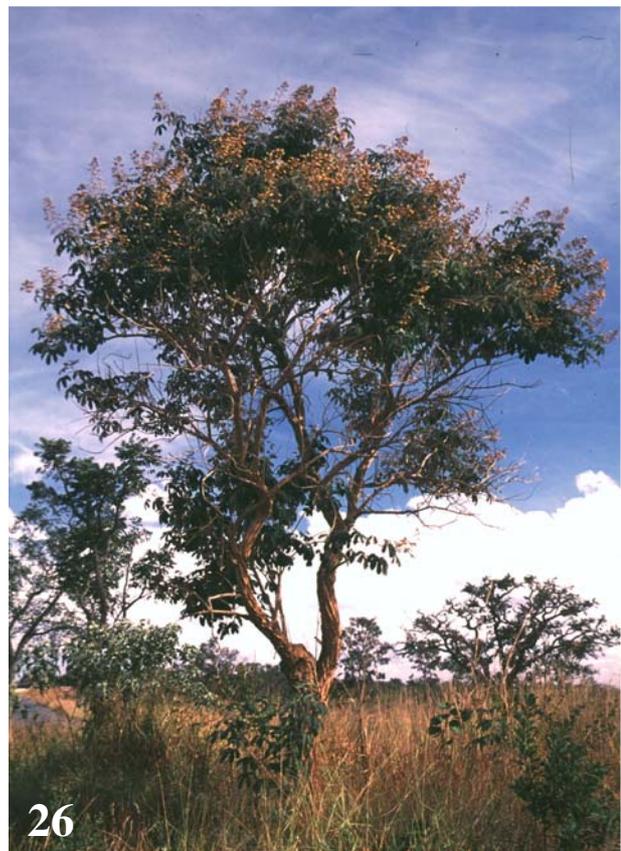
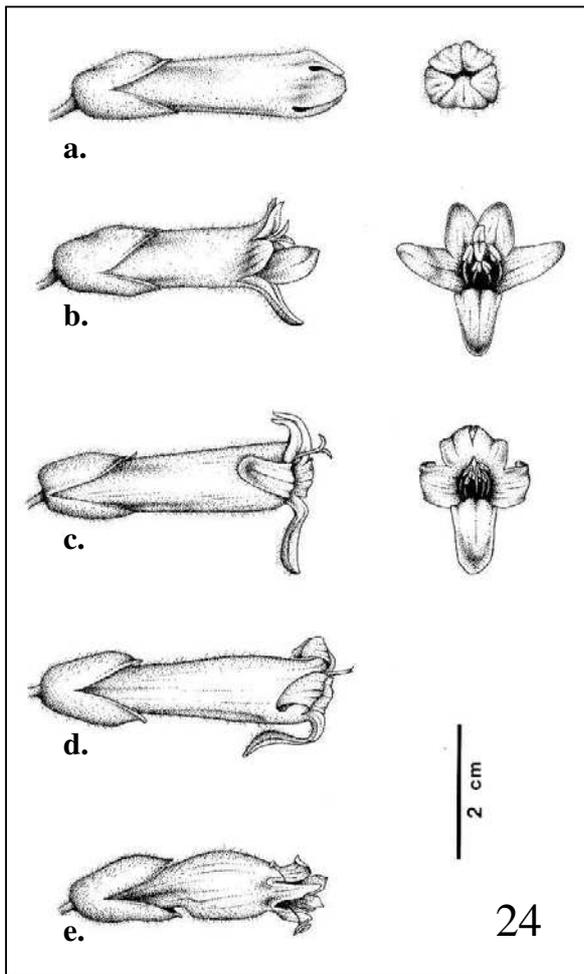
coletados em áreas perturbadas por atividades antrópicas, localizadas nos municípios de Lagoa Santa (19°34'S, 43°53'W), Belo Horizonte (19°49'S, 43°59'W) e São Roque de Minas (20°10'S, 46°27'W), Minas Gerais. Tais regiões apresentam clima temperado chuvoso (Cwa), de acordo com a classificação climática de Köppen (Antunes 1986).

Descrição da espécie

Trata-se de um arbusto usualmente com 1-3 m de altura (figura 25), embora eventualmente adquira o hábito arbóreo, ultrapassando esta altura (figura 26) (voucher UEC n^{os}. 106.335, 119.651, 119.649, 119.650; coletor n^{os}. 99/17, 01/85, 01/86, 01/87). Os ramos são predominantemente ortotrópicos, com filotaxia decussada. As folhas são digitadas e bastante discoloradas devido a sua superfície dorsal ser densamente revestida por tricomas tectores de cor paleácea ou acastanhada. Semelhantes tricomas tectores revestem a superfície externa das inflorescências e das partes mais jovens do caule, conferindo aos mesmos uma textura pulverulenta. O fruto é uma cápsula loculicida, subcordiforme, muricada e de consistência lenhosa (figura 29).

Na principal área de estudos (i.e. no Parque Nacional da Serra do Cipó), *Z. montana* floresceu de fevereiro à julho, embora ocasionalmente alguns indivíduos com flores tenham sido vistos fora deste período. A inflorescência de *Z. montana* é uma cimeira tirsóide, ereta e terminal, com 28-65 cm de comprimento por 18-35 cm de largura (figura 28). Os paracládios são decussados, emergem de 6-19 nós ao longo do eixo principal, e uma única inflorescência pode produzir até 1333 flores. Os arbustos mais altos usualmente apresentam inflorescências maiores, bem destacadas acima da folhagem. A maioria das inflorescências estão dispostas na parte superior da copa.

A flor de *Z. montana* é tubular, sem cheiro, nectarífera e com cálice e corola de textura subcartácea (figura 24). O cálice é bilateralmente fendido até a base e sua superfície externa é densamente coberta por tricomas tectores estrelados, de cor paleácea a acastanhada. O tubo corolino é cilíndrico, com 3-4 cm de comprimento por 0,9-1,2 cm de largura, ligeiramente estreitado próximo à base e



Figuras 24-29: *Zeyheria montana*. 24: Flores em diferentes fases da antese. *a.* pré-antese; *b.* recém-aberta; *c.* após várias horas; *d.* 2º dia; *e.* 6º-8º dias. 25: Hábito (arbustivo). 26: Hábito (arbóreo). 27: Secção longitudinal da base da flor. A seta indica a câmara nectarífera. 28: Inflorescência. 29: Frutos.

alargado na fauce. A face externa da corola também é densamente revestida por tricomas tectores semelhantes aos do cálice, mas a superfície interna é glabra e amarela, exceto pela região proximal. O androceu é didínamo, com um pequeno estaminódio posterior, e os filetes são basalmente expandidos e epipétalos. O tubo corolino apresenta uma ligeira constrição na porção proximal (0,5-0,7 cm acima da inserção da corola no receptáculo), onde os filetes estão inseridos. Assim, no nível desta constrição, os espaços existentes entre as bases de filetes, a superfície interna da corola e a superfície externa da parede do ovário são bastante estreitos, provavelmente restringindo o acesso à câmara nectarífera apenas aos visitantes melhor adaptados. As anteras são pendentes, podendo ser inclusas, subexertas ou exertas. O ovário é elipsóide e estipitado (estipe apresentando 2-3 mm de comprimento), densamente tomentoso na superfície externa e apresentando um estilete terminal com 1,8-2,7 cm de comprimento. O estreitamento da porção proximal do ovário em um estipe contribui para o espaço livre no interior da câmara nectarífera, onde o néctar é acumulado (figura 27). O estigma é bilamelado, exerto e muito sensível, fechando-se em poucos segundos após tocado.

Procedimentos

Trinta botões florais no estágio de pré-antese foram marcados em 5 indivíduos para o monitoramento dos eventos florais. O volume e a concentração do néctar foram medidos em flores do primeiro ou segundo dias previamente ensacadas com redes de nylon, utilizando-se seringa microvolumétrica e refratômetro de bolso, respectivamente. A presença de açúcares nas secreções da flor foi testada com papel indicador (Glico-Fita[®]). Os visitantes florais foram observados em diferentes horas do dia, desde o início da manhã (05:00 horas) até o início da noite (19:00 horas), totalizando 60 horas de observações. Pássaros e outros visitantes das flores foram observados diretamente, ou com o auxílio de binóculo, e também fotografados.

Em todas as áreas de estudo onde o trabalho foi realizado, a presença de uma galha associada às flores de *Z. montana* (figura 34) foi verificada com muita frequência (ver Resultados). As galhas foram coletadas, dissecadas para o exame de galhadores e parasitóides, e/ou acondicionadas em frascos de vidro tampados com rede de nylon de malha fina. Após eclosão dos insetos adultos, os mesmos foram sacrificados e montados à seco para identificação. Flores contendo galhas não foram utilizadas nos experimentos de polinizações controladas.

O sistema reprodutivo foi determinado através de polinizações manuais controladas em 13 indivíduos da população localizada no Parque Nacional da Serra do Cipó. Inflorescências inteiras, contendo botões florais em vários estádios de desenvolvimento, foram ensacadas com redes de nylon. Subseqüentemente, flores em antese de primeiro dia foram autopolinizadas (com pólen da mesma flor ou de outras flores da mesma planta), ou submetidas à polinização cruzada (com pólen de outro indivíduo, localizado a pelo menos 10 m de distância) e re-ensacadas. As polinizações manuais foram feitas de modo a cobrir com grãos de pólen toda a superfície receptiva do estigma (i.e. toda a superfície ventral de ambas as lâminas estigmáticas). Várias flores foram marcadas e ensacadas para testar a ocorrência de autopolinização espontânea. Flores não-ensacadas foram marcadas para o monitoramento da frutificação natural (controle). As flores foram marcadas com linhas coloridas, uma cor para cada tratamento. O número de flores submetidas a cada um dos 4 tratamentos citados foi aproximadamente o mesmo em cada indivíduo, e cada indivíduo recebeu todos os tratamentos. Frutos próximos à maturidade, provenientes de polinizações naturais e de polinizações cruzadas manuais, foram coletados 4 meses após a antese para a contagem do número de sementes. Os números de óvulos por ovário e de sementes por frutos resultantes de polinizações cruzadas manuais e polinizações naturais foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov com aderência Lilliefors e ao teste *t* bicaudal (Ayres *et al.* 2000).

Autopolinizações e polinizações cruzadas adicionais foram feitas manualmente em 5 indivíduos da população do Parque Nacional da Serra do Cipó para análises do crescimento dos tubos polínicos e

da incidência de óvulos penetrados. Os pistilos de ambos os tratamentos foram coletados nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas após a polinização e fixados em FAA50 (formaldeído 4%, ácido acético glacial e etanol 50% nas proporções de 5:5:90%; Johansen 1940). Em pelo menos 5 pistilos de cada tratamento e intervalo, a porção acima do ovário (i.e. o estilete e o estigma) foi amolecida e clarificada com NaOH 9N à 65° C por aproximadamente 30 minutos e corada com azul-de-anilina para a verificação da germinação dos grãos de pólen e do crescimento dos tubos polínicos em microscópio de epi-fluorescência (Martin 1959). Os ovários foram submetidos à microdissecção em estereomicroscópio de modo a remover a parede do ovário, expondo assim os óvulos. Em seguida, os ovários dissecados foram submetidas ao mesmo tratamento dado aos estiletos/estigmas. Sobre uma lâmina histológica contendo uma gota de azul-de-anilina, os óvulos de cada ovário foram raspados com o auxílio de uma agulha histológica, de modo a se soltarem da superfície placentária. Os óvulos embebidos em corante foram cobertos com lamínula e analisados em microscópio óptico comum e em microscópio de fluorescência para a quantificação do número de óvulos penetrados (i.e. apresentando um pedaço de tubo polínico atado à micrópila, figura 45) e de óvulos não-penetrados (i.e. sem tubo polínico) (Gibbs & Bianchi 1993). O material foi somente analisado em um microscópio Olympus BX 40, ou analisado e fotografado em um microscópio de epi-fluorescência Leitz Diaplan. O teste estatístico do qui-quadrado foi utilizado para comparar o número de óvulos penetrados e não-penetrados em pistilos autopolinizados *vs.* pistilos submetidos à polinização cruzada, em cada um dos intervalos de tempo após a polinização, combinando os totais dos 5 pistilos de cada tratamento. Foram analisados 2155 óvulos de um total de 40 pistilos.

O estudo comparativo de autopolinizações *vs.* polinizações cruzadas foi também realizado através de análises histológicas, não só de modo a confrontar estes resultados com os do procedimento realizado com o da metodologia proposta por Gibbs & Bianchi (1993), como também para obtenção de informações mais detalhadas sobre eventos posteriores à polinização, antes e após a penetração dos

óvulos pelos tubos polínicos⁸. Autopolinizações e polinizações cruzadas manuais, tal como descrito nos parágrafos anteriores, foram realizadas em três indivíduos localizados em uma capoeira, no Município de Lagoa Santa. Pelo menos 5 pistilos de cada tratamento foram coletados nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas após a polinização e fixados em FAA50 (Johansen 1940). Três ovários de cada tratamento e de cada intervalo após a polinização foram selecionados aleatoriamente, infiltrados em parafina utilizando-se série butílica (Johansen 1940) e submetidos a secções transversais seriadas em micrótomo rotativo Micron HM 240, nas espessuras de 8-12 μm . As secções foram coradas com azul-de-astra e fucsina-básica (Roeser 1972), analisadas e fotografadas em um fotomicroscópio Olympus BX50, utilizando-se Fujichrome Provia 100F. Foram analisadas secções de óvulos ao longo de todo o comprimento de cada ovário, sendo verificada a presença ou não de tubos polínicos no tecido transmissor, o número de óvulos penetrados (i.e. apresentando uma das sinérgides fortemente corada e a micrópila penetrada pelo tubo polínico, figuras 46-48) e o número de óvulos não-penetrados. Quando o tecido transmissor localizado no topo do ovário (i.e. na região de transição entre a base do estilete e o ovário) não apresentava tubos polínicos, o ovário foi interpretado como derivado de polinização malsucedida, sendo substituído por outro, de tratamento e intervalo correspondente. O teste estatístico do qui-quadrado foi utilizado para comparar o número de óvulos penetrados e não-penetrados em pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada, em cada um dos intervalos de tempo após a polinização, combinando os totais dos 3 pistilos de cada tratamento. Quando valores esperados (i.e. calculados) para óvulos penetrados e não-penetrados foram ≤ 5 , o teste do qui-quadrado foi substituído pelo teste de Fisher. Foram analisados 1045 óvulos de um total de 24 pistilos.

Os resultados das contagens de óvulos penetrados e não-penetrados segundo os dois métodos foram também combinados e submetidos aos testes do qui-quadrado. Todos os testes qui-quadrado, bem como os testes de Fisher, foram feitos utilizando-se o software Epi Info 6.0.

⁸ Infelizmente, os métodos de fixação e infiltração empregados para a obtenção das secções histológicas não permitiram uma preservação suficientemente adequada das estruturas do saco embrionário e do endosperma para uma análise detalhada

Para verificação dos possíveis sítios de secreção do néctar, e para uma análise comparativa dos tricomas glandulares do gineceu e da corola, a porção basal de flores em antese foi fixada em glutaraldeído 2%, em solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 (Gabriel 1982), e infiltrada em historesina (glicol-metacrilato). Secções transversais e longitudinais semi-seriadas, nas espessuras de 8-12 µm, foram obtidas em um micrótomo rotativo Micron HM 240. As secções foram coradas com fucsina-ácida e azul-de-toluidina O, ou submetidas ao teste histoquímico PAS (O'Brien & McCully 1981). Bases de flores adicionais foram submetidas à remoção parcial dos tricomas tectores (com o auxílio de um pincel) e aos procedimentos citados no parágrafo anterior para obtenção de secções seriadas de 12-18 µm, as quais foram analisadas em um microscópio óptico Olympus BX40. Os tricomas glandulares foram contados nas secções seriadas de 5 bases florais, ao longo de toda a superfície externa do ovário (estipe + porção fértil) e da superfície interna da parede da câmara nectarífera. Registros fotográficos foram feitos em um fotomicroscópio Olympus BX50, utilizando-se Fujichrome Provia 100F.

4.4. Resultados

Eventos florais

A despeito do grande número de flores que uma inflorescência pode produzir, apenas 0-4 flores por inflorescência iniciaram a antese à cada dia. Uma estimativa precisa do número de flores receptivas presentes em cada indivíduo e à cada dia não foi realizada. Entretanto este número é bastante variável, não somente porque indivíduos maiores apresentavam inflorescências maiores (i.e. com maior número de flores), mas também porque quanto maior o indivíduo, maior o número de inflorescências por ele produzidas. O número de flores em antese de primeiro dia apresentadas diariamente em 9 dos 13 arbustos utilizados nos experimentos de polinizações manuais controladas (arbustos com 2-2,5 m de

dos eventos posteriores à penetração dos óvulos, tal como conseguido com outras espécies investigadas na presente tese.

altura) foi de $3,9 \pm 2,7$ (média \pm desvio padrão), variando entre 1 e 11 flores em um total de 52 observações.

A antese em *Z. montana* durou de 6 a 8 dias, sendo a abertura da flor observada a qualquer hora do dia. A superfície interna dos lobos da corola no primeiro dia de antese⁹ é vivamente amarela, podendo cada lobo às vezes apresentar uma mancha de cor ocre na região mediana. Nos dias subseqüentes os lobos da corola gradualmente se tornam esbranquiçados, iniciando processo dessecativo por volta do quinto ou sexto dias. Além disso, durante as primeiras horas da antese os lobos da corola posicionam-se aproximadamente em ângulo reto com o eixo longitudinal do tubo corolino (figura 24b), mas ainda no primeiro dia os lobos começam a se curvar para trás (figura 24c), se tornando reflexos nos dias subseqüentes (figura 24d).

As anteras começam a sofrer deiscência pouco antes da abertura dos lobos da corola. Nas anteras recém-abertas, os grãos de pólen apresentam a mesma coloração da face interna dos lobos da corola, e o pólen foi verificado somente no primeiro dia de antese. Um ligeiro alongamento do estilete foi observado durante os dois primeiros dias de antese, ocasionalmente resultando na auto-deposição de uma pequena quantidade de pólen no estigma. Embora não tenham sido feitos testes de receptividade do estigma, este está receptivo no máximo até o fim do segundo dia, pois no terceiro dia o estigma já se encontrava murcho.

Dissecções de flores frescas em vários momentos, desde a abertura dos lobos até várias horas após o início da antese, revelaram que gotículas de néctar se acumulam sobre a superfície interna da parede da câmara nectarífera, confluindo-se gradualmente até encher toda a câmara nectarífera (a presença de açúcares nestas gotículas foi confirmada pelo teste da Glico-Fita). O volume do néctar e a concentração de açúcares no mesmo foram $39,1 \pm 9,6 \mu\text{l} / 20,7 \pm 2,9\%$ (média \pm desvio padrão, $n=12$), respectivamente, em flores de três indivíduos localizados na Serra do Cipó, e $28,9 \pm 3,3 \mu\text{l} / 16,4 \pm 0,9\%$

⁹ Considerou-se aqui flores cuja abertura ocorreu no período matutino.

(n=15), respectivamente, em flores de dois indivíduos localizados em Lagoa Santa¹⁰. Algumas flores em estágio de pré-antese (figura 24a) já apresentavam néctar ($26,0 \pm 7,1 \mu\text{l} / 20,6 \pm 1,1\%$, n=2). Embora em algumas flores em antese, não-ensacadas, tenha sido verificada a ausência de néctar, todas as flores em antese previamente ensacadas apresentaram néctar.

Visitantes florais

Quatro espécies de beija-flor foram vistas visitando as flores de *Z. montana*: o beija-flor-de-orelha-violeta, *Colibri serrirostris* (Vieillot), o beija-flor-tesoura, *Eupetomena macroura* (Gmelin), o beija-flor-de-garganta-verde, *Amazilia fimbriata* (Gmelin), e o beija-flor-branco-e-preto, *Melanotrochilus fuscus* (Vieillot). *Colibri serrirostris* (figuras 30-33) foi o visitante mais freqüente em todas as áreas de estudo. Este pássaro foi visto realizando várias seqüências de visitas às inflorescências de *Z. montana* ao longo do dia, sendo que várias flores de diversas inflorescências foram visitadas em cada seqüência. As visitas foram mais freqüentes no início da manhã (entre 05:00 e 09:00 horas), quando foi registrada, em um mesmo arbusto, em torno de uma seqüência de visitas a cada 15-20 minutos. Algumas vezes, após uma seqüência de visitas, o beija flor pousou num ramo próximo ou num paracládio, aparentemente vigiando seu território. No restante do dia a freqüência de seqüências de visitas diminuiu (≤ 1 seqüência de visitas/hora). As visitas de *C. serrirostris* foram sempre legítimas, envolvendo o contato com as anteras e o estigma. A deposição de pólen ocorreu na região frontal da cabeça do beija-flor, acima de suas narinas. Flores recém-abertas, i.e. apresentando coloração mais intensa e lobos corolinos não-reflexos ou apenas parcialmente reflexos (figura 24b, c), foram preferencialmente visitadas pelo beija-flor.

Na Serra do Cipó, *Amazilia fimbriata* foi o segundo visitante mais freqüente ($\cong 1$ seqüência de visitas/hora em alguns dos arbustos observados). Tal como descrito para *C. serrirostris*, *A. fimbriata*

¹⁰ O teste *t* indicou que a diferença entre as duas localidades não é significativa ($p < 0,05$).



Figuras 30-34: Visitas de *Colibri serrirostris* às inflorescências de *Zeyheria montana*. Setas indicam: (31) pássaro com o bico totalmente introduzido no tubo corolino, o que garante o contato

da região frontal da cabeça, acima da base do bico ("testa"), com as anteras e o estigma; (32) deposição de pólen sobre a "testa" do beija-flor. Figura 34: Acima, flor em antese (à esquerda) e seqüência de estádios sucessivos de desenvolvimento do fruto. Abaixo, flor em antese com galha no ovário (à esquerda) e galhas em sucessivos estádios de desenvolvimento.

visitou várias flores de diversas inflorescências a cada seqüência de visitas. Entretanto, na maioria das visitas o beija-flor perfurou a base da corola pelo lado externo para ter acesso ao néctar. Várias flores perfuradas foram encontradas em diferentes arbustos desta população. Portanto *A. fimbriata* parece ter atuado principalmente como pilhador de néctar. *Eupetomena macroura* foi um visitante esporádico (< 1 visita/hora), e *Melanotrochilus fuscus* foi observado em apenas duas ocasiões em Lagoa Santa. Este dois últimos beija-flores realizaram visitas legítimas.

As flores de *Z. montana* foram também freqüentemente visitadas por várias espécies de abelhas de pequeno porte (principalmente Meliponinae), em todas as áreas de estudo. Estas abelhas geralmente pousavam diretamente sobre as anteras para coletar pólen, e nunca foram observadas adentrando o tubo corolino em busca de néctar. Durante as visitas, estas abelhas eventualmente contatavam o estigma, mas a indução do fechamento do estigma muitas vezes foi rápida o suficiente para prevenir a deposição de pólen nas superfícies internas, receptivas, dos lobos estigmáticos. Quando realizada, a deposição de pólen no estigma por abelhas foi sempre em quantidade limitada.

Galhas

Muitas flores em antese (até 3 em cada 5 flores em indivíduos localizados no Parque Nacional da Serra do Cipó), ou mesmo botões florais próximos à antese, apresentaram o ovário intumescido (figuras 34), devido ao ataque de insetos galhadores. A galha apresentou formato globular, diâmetro variando de 0,5 até aproximadamente 3 cm, superfície externa pilosa e de cor marrom. As flores que continham a galha apresentaram estilete/estigma curtos, não raro deformados. Dissecções e exames de

galhas em estereomicroscópio revelaram que a intumescência é decorrente de hipertrofia variável da parede do ovário, do estipe, do septo, das placentas e dos óvulos. Eventualmente, a galha afetou também a morfologia do receptáculo, tornando-o intumescido e, neste caso, também os estames e o perianto tornaram-se curtos e/ou deformados. A morfologia externa da galha em desenvolvimento difere claramente da morfologia do fruto, pois as saliências características da superfície externa da cápsula madura começam a emergir logo nos estádios iniciais da transformação do ovário em fruto, ao passo que a galha nunca desenvolve tais saliências em sua superfície externa (figuras 34).



Figura 35: Galhas florais de *Zeyheria montana*, seccionadas longitudinalmente. A seta indica uma flor em antese.

As galhas apresentaram cavidades internas (lojas, figura 35) dentro das quais foram encontradas larvas ou pupas de *Asphondylia* sp.¹¹ (Cecidomyiidae, Diptera). Além do díptero, foram também encontradas ninfas ou pupas de uma espécie não identificada de Torymidae (Vespidae, Hymenoptera) e

¹¹ Segundo G. W. Fernandes (comunicação pessoal), trata-se de uma espécie nova, ainda a ser descrita para o gênero *Asphondylia*.

de uma segunda vespa, de cor preta e tamanho muito reduzido (0,2-0,3 mm), a qual não foi possível identificar nem mesmo a família à qual pertence.

Análise histológica da câmara nectarífera

Secções longitudinais da porção proximal da flor claramente demonstraram a presença de um disco rudimentar envolvendo a base do estipe (figuras 27 e 36). O tecido fundamental do disco é um parênquima pouco diferenciado, apresentando células poligonais compactamente justapostas, isodiamétricas, amplamente vacuoladas, de paredes delgadas e núcleo excêntrico e inconspícuo. O teste histoquímico PAS revelou a presença de alguns amiloplastos neste tecido, porém de tamanho reduzido e em pequena quantidade, e não foi observada qualquer discrepância entre o parênquima fundamental do disco e o parênquima de outros órgãos florais quanto a abundância de amiloplastos. O parênquima do disco não é vascularizado e é revestido por epiderme uniestratificada, com conteúdo celular hialino e vacuolado. A epiderme do disco apresenta numerosos tricomas tectores ramificados, cujos ramos possuem extremidades pontiagudas, paredes celulares espessas e lignificadas. Estômatos estão presentes, porém são pouco freqüentes. Nenhuma destas características anatômicas sugere o envolvimento do disco em atividades de secreção.

Tricomas glandulares são abundantes na base dos filetes, bem como em toda a superfície interna (epiderme ventral) da parede da câmara nectarífera (figura 37). A porção proximal do gineceu, i.e. o estipe, a porção fértil do ovário e a base do estilete, são revestidos externamente por densa camada de tricomas tectores ramificados, idênticos aos encontrados na epiderme do disco (figuras 27 e 41). Além dos tricomas tectores, a epiderme externa (dorsal) do ovário (i.e. estipe + porção fértil) apresenta também tricomas glandulares que ficam escondidos abaixo dos ramos dos tricomas tectores (figuras 41 e 42). Estruturalmente, tanto os tricomas glandulares da parede da câmara nectarífera como os tricomas glandulares do gineceu consistem de uma cabeça secretora, cujas células apresentam citoplasma denso

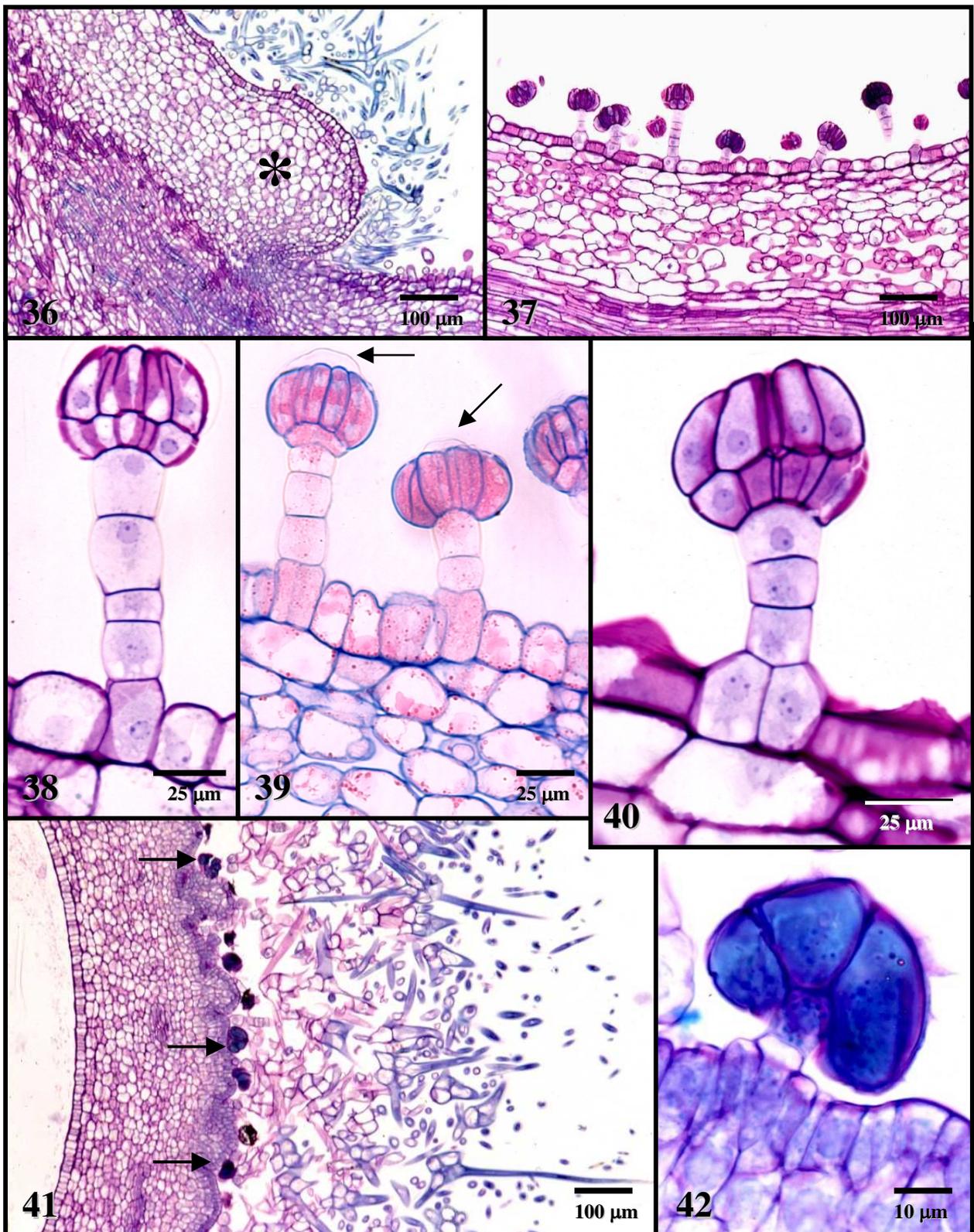


Figura 36-42: Seções histológicas da flor de *Zeyheria montana*. 36: Secção longitudinal da base do estipe, mostrando o disco rudimentar (asterisco). 37: Secção longitudinal da parede da câmara nectarífera, mostrando tricomas glandulares na epiderme ventral. 38-40: Tricomas secretores de néctar da parede da câmara nectarífera, em maior aumento. Setas indicam a cutícula. 41: Secção lon-

gitudinal da parede do ovário mostrando tricomas glandulares (setas) abaixo de uma densa camada de tricomas tectores. 42: Tricoma glandular do ovário, em maior aumento. Colorações: figura 39 - azul-de-astra e fucsina-ácida; demais figuras - azul-de-toluidina e fucsina-ácida.

e núcleo proeminente, radialmente dispostas no topo de um pedúnculo. Entretanto, o tricoma glandular do gineceu (figura 42) possui cerca de 32 μm de altura por 40 μm de largura e porção secretora de formato hemisférico, formada por 4-8 células com citoplasma destituído de vacúolos. O pedúnculo nos tricomas glandulares do gineceu é composto por uma única célula basal, vacuolada e profundamente ancorada à epiderme, e uma célula apical, de formato poliédrico, com um conspicuo núcleo centralmente posicionado, envolvido por vários plastídios. Já os tricomas glandulares da parede da câmara nectarífera e da base dos filetes possuem cerca de 100-180 μm de altura por 60 μm de largura, com uma cabeça de contorno elipsóide (quando vista de perfil) constituída de 18-28 células, algumas vezes dispostas em duas séries transversais (figuras 38 e 40), apresentando núcleo central e vacuola bipolar (figura 39). Uma delgada cutícula reveste externamente a cabeça secretora, e a secreção se acumula entre a cutícula e a parede periclinal externa das células secretoras (figura 39), antes de ser liberada na cavidade da câmara nectarífera. O pedúnculo consiste de uma série de 2-7 células vacuoladas, apresentando núcleo proeminente, central ou excêntrico. A célula proximal do pedúnculo pode estar ancorada à epiderme por uma ou duas células basais. As propriedades de coloração do citosol das células secretoras também não são as mesmas para os tricomas glandulares do gineceu e para os tricomas glandulares da parede da câmara nectarífera ou da base dos filetes, pois ao ser submetido à coloração com azul-de-toluidina, o citosol das células secretoras dos tricomas do gineceu adquiriu uma coloração azul-esverdeada e opaca (figura 42), enquanto nos demais tricomas o citosol adquiriu uma coloração púrpura e translúcida (figura 40). Deve-se ainda salientar que o mesmo tipo de

tricoma glandular encontrado no gineceu foi também observado nas epidermes do pedicelo e de regiões do perianto que não fazem parte da câmara nectarífera.

Os resultados das contagens de tricomas glandulares em secções transversais seriadas da base da flor são apresentados na Tabela 5. A diferença entre estes dois tipos de tricomas glandulares foi altamente significativa, sendo o número de tricomas na superfície do ovário (estipe + porção fértil) equivalente a apenas cerca de 12% do total de tricomas glandulares (ovário + parede da câmara nectarífera).

Tabela 5: Frequências absolutas e percentagens de tricomas glandulares do ovário (estipe + porção fértil) e de tricomas glandulares da parede da câmara nectarífera em secções transversais seriadas da base de flores de *Zeyheria montana* (n = 5).

	Valor numérico (média ± desvio padrão)	Valor percentual
Tricomas glandulares do gineceu	5.726,6 ± 441,3	11,8
Tricomas glandulares da parede da câmara nectarífera	43.018,4 ± 3.545,6	88,2
Total	48.745 ± 3.945,6	100

O tecido fundamental da parede da câmara nectarífera é um parênquima esponjoso (figura 37) com células apresentando núcleo excêntrico e inconspícuo, e citoplasma amplamente vacuolado, contendo pequenos plastídios (figura 39). Tais características protoplasmáticas também se aplicam às células da epiderme uniestratificada que reveste internamente a câmara nectarífera, embora estas células apresentem núcleo ligeiramente mais conspícuo. Portanto, tal como no disco, nem o parênquima, nem a epiderme interna da parede da câmara nectarífera apresentam características de tecidos secretores.

Sistema Reprodutivo

Os resultados dos experimentos de polinizações manuais controladas são apresentados na Tabela 6. Nenhuma das flores utilizadas nos testes de autopolinização espontânea e autopolinização manual formou fruto. Estas flores se secaram a partir do sexto dia de antese, sem apresentar qualquer crescimento do ovário. Apenas um quarto das flores submetidas à polinização cruzada manual frutificou; mesmo assim este valor foi proporcionalmente 4 vezes superior à quantidade de frutos formados a partir das flores marcadas para a estimativa da frutificação natural.

Os resultados das contagens de sementes por fruto e de óvulos por ovário são apresentados na Tabela 7. O número médio de sementes em frutos resultantes de polinizações cruzadas manuais ($53,1 \pm 10,0$, $n=13$) foi maior do que em frutos resultantes de polinizações naturais ($42,9 \pm 5,9$, $n=18$), e o teste t indicou ser esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O número de óvulos por ovário também diferiu significativamente do número de sementes em frutos resultantes de polinização natural, mas não diferiu significativamente do número de sementes em frutos resultantes de polinização cruzada manual.

Os resultados dos testes para determinação do sítio de reação de incompatibilidade por microscopia de fluorescência demonstraram que, tanto nas autopolinizações como nas polinizações cruzadas, centenas de tubos polínicos crescem ao longo do tecido transmissor do estilete, muitos deles alcançando o ovário apenas 24 horas após a polinização (figuras 43-45). Os resultados das contagens de óvulos penetrados e não-penetrados segundo a metodologia de Gibbs & Bianchi (1993) são mostrados na Tabela 8 e na figura 49A. Nos intervalos de 24, 72 e 96 horas após a polinização, a incidência de óvulos penetrados foi significativamente maior nos pistilos submetidos à polinização cruzada do que em pistilos autopolinizados ($\chi^2 = 19,62$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 9,77$, $df = 1$, $p < 0,01$; $\chi^2 = 14,39$, $df = 1$, $p < 0,001$, respectivamente). Não obstante, a diferença entre autopolinizações e polinizações cruzadas foi maior no intervalo de 24 horas do que nos demais intervalos. Tanto nas autopolinizações

como em polinizações cruzadas, mais da metade dos óvulos foram penetrados no intervalo de 72 horas, e quase todos os óvulos em ambos os tratamentos foram penetrados 96 horas após a polinização.

Após alcançarem o ovário, os tubos polínico crescem sobre as células da epiderme placentária até alcançarem os óvulos, penetrando-os pela micrópila (figuras 46-48). Os resultados das contagens de óvulos penetrados em secções transversais seriadas do ovário são mostrados na Tabela 9 e na figura

Tabela 6: Produção de frutos por polinizações manuais e naturais em *Zeyheria montana*.

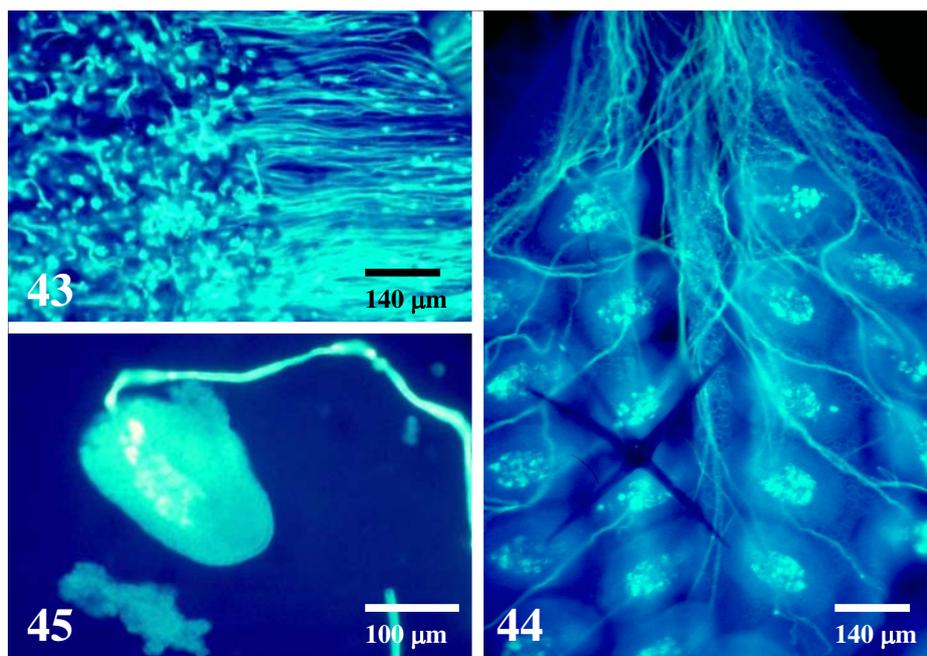
Plant a n ^o .	Autopolinização		Autopolinização manual				Polinização		Polinização	
	espontânea		I		II		cruzada manual		natural (controle)	
	flores	frutos	flores	frutos	flores	frutos	flores	frutos	flores	frutos
1	39	0	8	0	11	0	7	4	30	1
2	3	0	3	0	3	0	8	3	3	0
3	4	0	3	0	2	0	2	0	2	0
4	11	0	3	0	3	0	7	2	11	0
5	28	0	3	0	5	0	16	4	13	1
6	6	0	5	0	3	0	6	3	10	2
7	16	0	4	0	2	0	4	0	3	0
8	4	0	2	0	3	0	4	0	9	2
9	3	0	3	0	3	0	2	0	3	0
10	5	0	3	0	2	0	5	2	3	0
11	3	0	2	0	3	0	2	0	4	0
12	5	0	4	0	2	0	3	1	3	0
13	16	0	7	0	8	0	24	4	13	1
Total	143	0	50	0	50	0	90	23	107	7
%	100	0	100	0	100	0	100	25,5	100	6,5

I: com pólen da mesma flor; II: com pólen de outra flor da mesma planta.

Tabela 7: Número de óvulos por ovário e número de sementes por frutos resultantes de polinização natural e polinização cruzada manual em *Zeyheria montana*.

		média ± desvio padrão	n
n ^o . de sementes por fruto	polinização natural	42,89±5,87 ^a	18
	polinização cruzada manual	53,08±9,99 ^b	13
n ^o . de óvulos por ovário		47,34±9,08 ^b	48

Obs.: letras diferentes na coluna das médias ± desvios padrões indicam diferença significativa no teste *t* ($p < 0,05$).

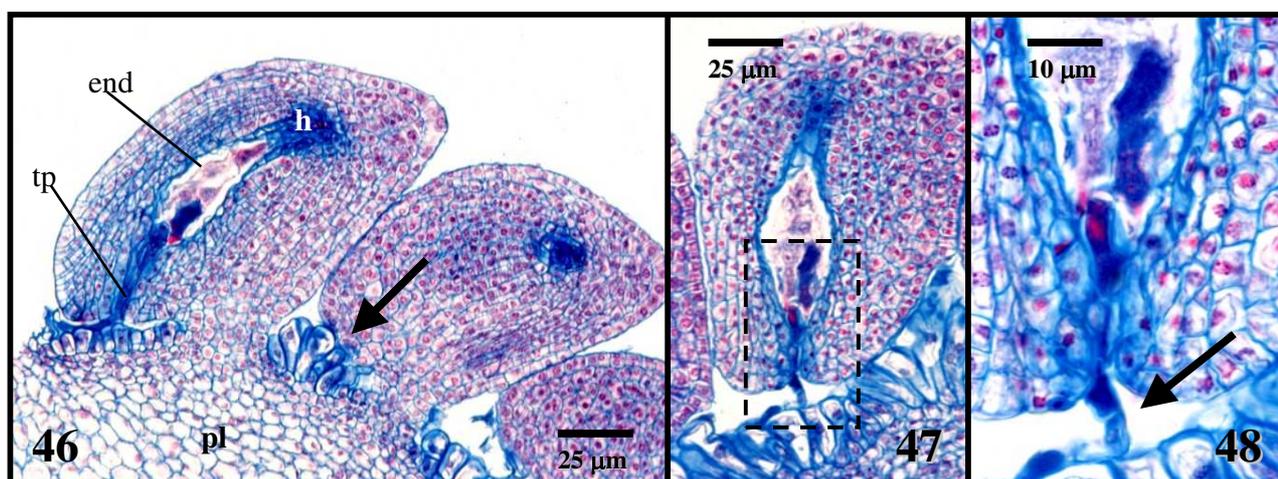


Figuras 43-45: Fotomicrografias em microscópio de fluorescência de pistilos autopolinizados de *Zeyheria montana*. 43: Região de transição estigma → estilete (esquerda → direita), 24 h após a polinização. 44: Tubos polínicos no ovário, 24 h após a polinização (transição estilete → ovário no topo da foto). 45: óvulo penetrado, 48 h após a polinização.

Tabela 8: Incidência de óvulos penetrados e não-penetrados* 24, 48, 72 e 96 horas após autopolinizações e polinizações cruzadas em *Zeyheria montana* (segundo metodologia proposta por Gibbs & Bianchi 1993).

	24 h		48 h		72 h		96 h	
	auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz
não-penetrados	258 (99,6%)	232 (91,0%)	159 (59,5%)	182 (54,3%)	129 (42,7%)	72 (29,4%)	30 (11,9%)	9 (3,8%)
penetrados	1 (0,4%)	23 (9,0%)	108 (40,5%)	153 (45,7%)	173 (57,3%)	173 (70,6%)	222 (88,1%)	231 (96,2%)
Total	259	255	267	335	302	245	252	240

* Foram analisados 5 ovários de cada tratamento e de cada intervalo após a polinização.



49B. Os resultados desta análise até certo ponto diferem dos resultados obtidos com o emprego da metodologia de Gibbs & Bianchi (1993), não só porque o número de óvulos penetrados verificado nas secções histológicas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a polinização foi maior em ambos os tratamentos, como também porque apenas nos intervalos de 24 e 48 horas após a polinização, o número de óvulos penetrados foi significativamente superior nos pistilos submetidos à polinização cruzada, relativamente aos pistilos autopolinizados ($\chi^2 = 10,89$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 3,79$, $df = 1$, $p \cong 0,05$,

respectivamente). Além disso, o número de óvulos penetrados em pistilos autopolinizados virtualmente se igualou ao número de óvulos penetrados em pistilos submetidos à polinização cruzada nos intervalos de 72 e 96 horas. Entretanto, tal como na análise por microscopia de fluorescência, quase todos os óvulos foram penetrados em ambos os tratamentos, no intervalo de 96 horas.

Combinando-se os resultados da incidência de óvulos penetrados e não-penetrados segundo ambas as metodologias (i.e. óvulos inteiros analisados por microscopia de fluorescência + análise histológica dos óvulos em secções seriadas), o número de óvulos penetrados em pistilos submetidos à polinização cruzada foi significativamente superior ao número de óvulos penetrados em pistilos auto-

Tabela 9: Incidência de óvulos penetrados e não-penetrados* em secções transversais seriadas dos ovários de *Zeyheria montana*, 24, 48, 72 e 96 horas após autopolinizações e polinizações cruzadas.

	24 h		48 h		72 h		96 h	
	auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz
não- penetrados	63 (51,2%)	43 (30,5%)	54 (37,5%)	42 (26,4%)	18 (17,5%)	22 (14,7%)	3 (3,1%)	6 (4,7%)
penetrados	60 (48,8%)	98 (69,5%)	90 (62,5%)	117 (73,6%)	85 (82,5%)	128 (85,3%)	95 (96,9%)	121 (95,3%)
Total	123	141	144	159	103	150	98	127

* Foram analisados 3 ovários de cada tratamento e de cada intervalo após a polinização.

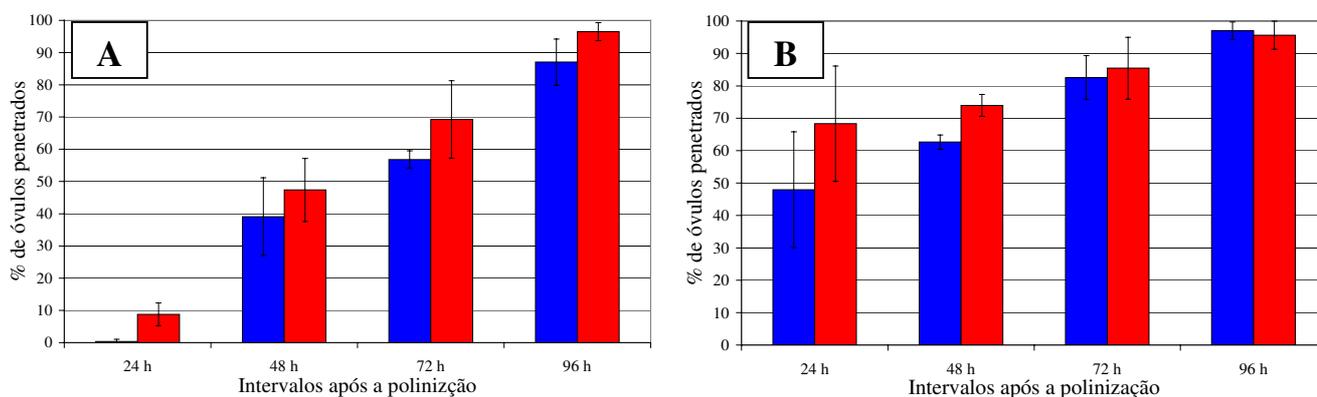


Figura 49: Incidência de óvulos penetrados em pistilos de *Zeyheria montana*, 24, 48, 72 e 96 horas após a polinização. A: segundo a metodologia proposta por Gibbs & Bianchi 1993; B: em secções transversais seriadas do ovário. Para cada tratamento e intervalo após a polinização, foram utilizados 5 pistilos em A e 3 pistilos em B. As barras verticais indicam os desvios padrões.

■ autopolinização; ■ polinização cruzada.

polinizados em todos os intervalos (i.e. 24, 48, 72 e 96 horas) após a polinização ($\chi^2 = 23,09$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 3,77$, $df = 1$, $p \cong 0,05$; $\chi^2 = 14,84$, $df = 1$, $p < 0,01$; $\chi^2 = 8,18$, $df = 1$, $p < 0,01$, respectivamente).

4.5. Discussão

Biologia floral e origem do néctar

Várias características da flor de *Zeyheria montana* são comumente associadas à síndrome de polinização por beija-flores, e.g. o tubo corolino relativamente longo, a ausência de odor, o perianto constituído por tecidos crassos, a conspícua produção de néctar e seu acúmulo numa câmara nectarífera, a distância entre os locais de acúmulo do néctar e apresentação do estigma. Não obstante, a cor vermelha é predominante em flores que atraem beija-flores, tanto em florestas de climas temperados (Grant 1966, Lange *et al.* 2000), como em vegetações tropicais do Novo Mundo (Stiles 1985, Snow & Snow 1986, Arizmendi & Ornelas 1990, Sazima *et al.* 1995, 1996). De acordo com Grant & Temeles (1992), a eficiência do beija-flor em forragear néctar é otimizada quando as flores apresentam tubo moderadamente alargado e comprimentos que não excedem o comprimento do bico + ≤ 5 mm de língua estendida, ou que excedam apenas ligeiramente este comprimento. O comprimento do tubo da corola de *Z. montana* é comparável à média do comprimento do tubo de outras flores polinizadas por beija-flores em ambientes neotropicais (3,31-3,42 cm; Snow & Snow 1980, Snow & Teixeira 1982, Arizmendi & Ornelas 1990), e é 0,5-1 cm mais longo do que as médias dos comprimentos de bicos das espécies de beija-flores visitantes das flores de *Z. montana*¹². Conseqüentemente, durante uma visita legítima, o beija-flor necessariamente tem que introduzir todo o bico no tubo corolino (figura 31), e o contato de sua testa com as anteras e o estigma é inevitável.

¹² Foram feitas medições em espécimes do Museu de História Natural da UNICAMP, bem como obtidos dados de literatura sobre comprimentos dos bicos de algumas das espécies.

Embora o número de flores apresentadas diariamente por um único arbusto possa ser relativamente grande, apenas uma pequena quantidade destas flores (\cong 4 flores em arbustos com 2-2,5 m de altura) são realmente receptivas. A produção de um número pequeno de flores por planta a cada dia tem sido interpretada como um caráter que promove o comportamento "trap-lining", sendo conseqüentemente esperado em espécies polinizadas por beija-flores (Stiles 1975, Feinsinger & Colwell 1978, Sazima *et al.* 1996). Por outro lado, a apresentação de um grande número de flores não-receptivas em várias inflorescências por arbusto tornam tais inflorescências mais visíveis à longas distâncias, favorecendo desta forma a atração dos polinizadores. Além disso, o padrão de floração observado em *Z. montana*, i.e. a abertura de relativamente poucas flores por dia durante um período muito longo (vários meses numa mesma estação de floração) é comparável ao padrão "steady-state" definido por (Gentry 1974), o qual é comum em plantas polinizadas por beija-flores e morcegos (Sazima *et al.* 1995, 1996). Portanto, as presentes observações indicam que, embora apresentando algumas características florais típicas da síndrome ornitófila e outras características que não se ajustam a esta síndrome, *Z. montana* é polinizada por várias espécies de beija-flores, mas especialmente por *Colibri serrirostris*. A sugestão de Gentry (1990), segundo a qual *Zeyheria* seria polinizada por abelhas não encontrou suporte nas presentes observações em *Z. montana*.

A formação de gotículas de néctar na superfície interna da região basal da corola, tal como sugerida por Yanagizawa 1982, foi confirmada. Embora as análises histológicas da base da flor não tenham compreendido outros testes histoquímicos além do teste PAS, partindo das premissas de que (1) o néctar da flor de *Z. montana* surge na forma de gotículas na superfície interna da parede da câmara nectarífera (reação positiva no teste da Glico-Fita), e (2) de que as únicas estruturas secretoras encontradas na região basal da flor foram os tricomas glandulares da corola/base dos estames e do gineceu, deduzimos a secreção do néctar pelos tricomas glandulares da parede da câmara nectarífera. A análise histológica do disco de *Z. montana* não revelou a presença de tecidos secretores. A presença de um conspicuo disco nectarífero é uma característica comum à maioria das espécies de Bignoniaceae,

sendo o néctar produzido por um parênquima secretor subepidérmico e exudado através dos estômatos (Elias & Gelband 1976, Subramanian & Inamdar 1985, 1986, 1989, Thomas & Dave 1992, Belmonte *et al.* 1994, Galetto 1995, Bittencourt Jr. 1995, Rivera 2000). Não obstante alguns taxa, tais como *Cydista*, *Clytostoma*, *Phryganocydia* (Gentry 1980, Rivera 1996, Lohmann 2003), *Lundia* (Gentry 1982, Lopes *et al.* 2002) e *Zeyheria* (Gentry 1992), carecem de um disco funcional. A presença de um disco não-funcional em *Z. montana* sugere ser este um órgão vestigial, tendo a função de secreção do néctar passado a ser desempenhada por tricomas glandulares da câmara nectarífera. Tal como em *Lundia cordata* (Lopes *et al.* 2002), a secreção do néctar por tricomas glandulares em *Z. montana* deve ser considerada como substitutiva, no sentido sugerido por Vogel (1997), pois evoluiu secundariamente em um subgrupo no qual o disco teria perdido sua função nectarífera.

O grande número de tricomas glandulares observados na parede da câmara nectarífera - 8 vezes superior ao número de tricomas glandulares na superfície do ovário, ou 88% do total de tricomas glandulares em toda a câmara nectarífera (i.e. parede + superfície do ovário) - claramente indica que, mesmo se os tricomas glandulares do gineceu fossem nectaríferos, o volume de néctar produzido pelos tricomas da parede da câmara nectarífera seria muito superior ao volume de néctar produzido pelos tricomas do gineceu. Não obstante, os tricomas glandulares da epiderme ovariana diferem dos tricomas glandulares da superfície interna da parede da câmara nectarífera, tanto estruturalmente como em suas propriedades de coloração. Além disso, tricomas glandulares com as mesmas características anatômicas observadas nos tricomas do gineceu foram também observados em outras partes da flor, incluindo nas superfícies externas do perianto, o que sugere seu envolvimento com outras funções não-relacionadas à produção de néctar. Portanto, os presentes resultados indicam que o néctar floral de *Z. montana* é secretado principalmente, talvez totalmente por tricomas da epiderme interna da parede da câmara nectarífera, e não por tricomas localizados na superfície do gineceu, tal como sugerido por Machado *et al.* 1995.

Galhas

Segundo Mani (1964), a sazonalidade da floração restringe a ocorrência de galhas em flores e botões forais, sendo dípteros da família Cecidomyiidae os principais responsáveis pela ocorrência destas galhas. A família Bignoniaceae está entre as que apresentam os mais baixos índices de formação de galhas (Mani 1964), sendo poucos os relatos de ocorrência de galhas em Bignoniaceae nativas no Brasil - e.g. Tavares (1918); Fernandes *et al.* (1988); Amaral (1992); Maia (2000). Espécies do gênero *Asphondylia* são galhadores comuns em diferentes famílias de plantas (Maia *et al.* 1992), e as presentes observações sugerem ser este cecidomiídeo o principal, ou talvez o único responsável pelas galhas das flores de *Z. montana*. Por outro lado, vespas da família Torymidae são conhecidas por atuarem como parasitóides de insetos galhadores (Jahradinik & Severa 1998); portanto é provável que pelo menos a espécie de Torymidae encontrada nas galhas de *Z. montana*, seja um parasitóide do cecidomiídeo galhador.

A frequência relativamente alta de flores afetadas pela galha na população localizada no Parque Nacional da Serra do Cipó, bem como os efeitos da galha sobre a morfologia floral, sugerem que a interação planta/cecidógeno pode acarretar conseqüências negativas para a reprodução por sementes em *Z. montana*. A hipertrofia de óvulos não-fecundados, bem como do septo e das placentas, em decorrência da ação do galhador é um fenômeno particularmente intrigante, tendo em vista os resultados obtidos nos experimentos de polinizações manuais, os quais demonstraram a dependência de polinizações cruzadas para que ocorra o desenvolvimento subsequente do ovário. Tais observações parecem sugerir que o galhador é capaz de "manipular" o programa morfogenético da flor, de modo a induzir o ovário a desenvolver-se, partenocarpicamente, em um "fruto" modificado e estéril, cujos tecidos internos seriam utilizados como alimento pelo cecidógeno. Estudos histológicos comparativos do desenvolvimento do fruto e da galha seriam de grande valia para um melhor conhecimento da natureza da interação planta/cecidógeno em *Z. montana*.

Sistema reprodutivo

Os resultados dos experimentos de polinizações manuais indicam que *Z. montana* é uma espécie totalmente auto-incompatível, uma vez que não houve formação de frutos em um total de 100 flores autopolinizadas, as quais abortaram sem apresentar qualquer crescimento do ovário posterior à polinização. Tanto nas autopolinizações como nas polinizações cruzadas, muitos tubos polínicos alcançaram o ovário, penetrando quase a totalidade dos óvulos no intervalo de 96 horas após a polinização. Embora não tenham sido feitas análises histológicas dos eventos posteriores à penetração dos óvulos, uma incidência de óvulos penetrados significativamente superior em pistilos submetidos à polinização cruzada, no intervalo de 24 horas após a polinização, foi verificada tanto através da análise dos óvulos inteiros por microscopia de fluorescência como por meio da análise de secções seriadas, o que claramente indica a ocorrência de um atraso na penetração dos óvulos em autopolinizações, relativamente às polinizações cruzadas. Este mesmo fenômeno tem sido relatado para outras espécies de Bignoniaceae (Gibbs & Bianchi 1999), e sugere a ocorrência de um mecanismo de reconhecimento dos tubos polínicos e rejeição dos pistilos autopolinizados, a despeito dos tubos polínicos alcançarem o ovário e penetrarem a maioria dos óvulos.

A diferença observada entre os resultados da quantificação de óvulos penetrados por meio da metodologia proposta por Gibbs & Bianchi (1993) e por meio da análise histológica de secções seriadas provavelmente se deve em parte a uma maior precisão na verificação dos óvulos penetrados em secções histológicas, e em parte ao fato dos dois tipos de procedimento terem sido executados com material botânico proveniente de populações distintas. Embora os testes estatísticos não tenham indicado diferença significativa nos intervalos de 48 horas, na análise dos óvulos por microscopia de fluorescência (número de ovários analisados = 5), e nos intervalos de 72 e 96 horas, na análise de secções seriadas (número de ovários analisados = 3), quando os resultados de ambas as análises foram combinados (total de ovários analisados em cada tratamento e para cada intervalo após a polinização = 7), o número de óvulos penetrados nas polinizações cruzadas foi significativamente maior do que nas

autopolinizações em todos os intervalos, sugerindo que a ausência de significância estatística observada nas análises em separado provavelmente se deveu a uma insuficiência amostral.

Se por um lado o atraso na penetração dos óvulos sugere a atuação de um mecanismo de reconhecimento dos tubos polínicos em pistilos autopolinizados, e portanto favorece um modelo de auto-incompatibilidade, por outro lado a constatação de que quase todos óvulos em cada ovário, tanto em autopolinizações como em polinizações cruzadas, são penetrados até o intervalo de 96 horas após a polinização, fortemente indica que este sistema de incompatibilidade não se ajusta ao modelos tradicionais de auto-incompatibilidade esporofítica (SSI) ou gametofítica (GSI). Além disso, nem o atraso na penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados, nem o aborto destes mesmos pistilos sem que haja crescimento do ovário seriam resultados esperados se a auto-esterilidade verificada em *Z. montana* fosse decorrente de um mecanismo de depressão endogâmica de ação precoce. Portanto, os presentes resultados indicam a ocorrência da auto-incompatibilidade de ação tardia em *Z. montana*.

As polinizações manuais foram realizadas de modo a ser depositado um montante excessivo de grãos de pólen no estigma, relativamente à média do número de óvulos por ovário, maximizando assim a probabilidade de todos os óvulos serem penetrados (ver Tabelas 8 e 9). Não obstante, em polinizações naturais, o número de grãos de pólen depositados no estigma nem sempre é suficiente para que todos os óvulos no ovário sejam penetrados pelos tubos polínicos (Waser 1978, Stephenson & Bertin 1983, Bawa & Webb 1984), de modo que o aborto dos óvulos não-penetrados torna-se neste caso a causa da diminuição do número de sementes que potencialmente poderiam derivar-se dos óvulos presentes no ovário. Os resultados das contagens de sementes em frutos derivados de polinizações cruzadas manuais e polinizações naturais revelaram uma diferença significativa entre o número médio de óvulos por ovário e o número médio de sementes formadas em frutos resultantes de polinizações naturais, mas não indicaram diferença significativa entre o número médio de óvulos por ovário e o número médio de sementes em frutos derivados de polinização cruzada manual. Tais resultados sugerem que a produção

de sementes em *Z. montana* pode ser limitada pela eficácia de deposição do pólen no estigma pelo polinizador.

4.6. Literatura Citada

- AMARAL, M. E. C. 1992. **Ecologia floral de dez espécies da tribo Bignoniae (Bignoniaceae) em uma floresta semidecídua no município de Campinas, SP.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ANTUNES, F. Z. 1986. Caracterização climática do Estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte 138:** 9-13.
- ARIZMENDI, M. C. & ORNELAS, J. F. 1990. Hummingbirds and their floral resources in a tropical dry forest in Mexico. **Biotropica 22:** 172-180.
- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L. & SANTOS, A. S. 2000. **BioEstat 2.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas de Ciências Biológicas e Médicas.** Belém: Sociedade Civil Mamirauá.
- BAWA, K. S. 1974. Breeding systems of tree species of lowland tropical community. **Evolution 28:** 85-92.
- BAWA, K. S. & WEBB, C. J. 1984. Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: Implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. **American Journal of Botany 71:** 736-751.
- BELMONTE, E.; CARDEMIL, L. & ARROYO, M. T. K. 1994. Floral nectary structure and nectar composition in *Eccremocarpus scaber* (Bignoniaceae), a hummingbird-pollinated plant of central Chile. **American Journal of Botany 81(4):** 493-503.
- BERTIN, R. I. & SULLIVAN, M. 1988. Pollen inference and cryptic self-fertility in *Campsis radicans*. **American Journal of Botany 75:** 1140-1147.
- BITTENCOURT Jr., N. S. 1995. Vascularização floral de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica 18:** 143-155.

- BULLOCK, S. H. 1985. Breeding systems in flora of tropical deciduous forest in Mexico. **Biotropica** **17**: 287-301.
- DUTRA, J. C. S. & MACHADO, V. L. L. 2001. Entomofauna visitante de *Stenolobium stans* (Juss.) Seem (Bignoniaceae), durante seu período de floração. **Neotropical Entomology** **30**: 43-53.
- ELIAS, T. S. & GELBAND, H. 1976. Morphology and anatomy of floral and extrafloral nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). **American Journal of Botany** **63**: 1349-1353.
- FEINSINGER, P. & COLWELL, R. K. 1978. Community organization among neotropical nectar-feeding birds. **American Zoologist** **18**: 779-795.
- FERNANDES, G. W. A. TAMEIRÃO NETO, E. & MARTINS, R. P. 1988. Ocorrência e caracterização de galhas entomógenas na vegetação do *Campus* da Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoologia** **5**: 11-29.
- GABRIEL, B. L. 1982. **Biological Electron Microscopy**. New York: van Nostrand Reinhold.
- GALETTO, L. 1995. Nectary structure and nectar characteristics in some Bignoniaceae. **Plant Systematics and Evolution** **196**: 99-121.
- GENTRY, A. H. 1974. Coevolutionary patterns in central American Bignoniaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **61**: 728-759.
- GENTRY, A. H. 1980. Bignoniaceae - Part I (Crescentiae and Tourretiae). **Flora Neotropica: Monograph 25 (I)**. Organization for Flora Neotropica, New York.
- GENTRY, A. H. 1982. Bignoniaceae. In **Flora de Venezuela 8** (Z. L. de Febes & J. A. Steyermark, eds.). Ediciones Fundación Educación Ambiental, Caracas, p. 1-130.
- GENTRY, A. H. 1990. Evolutionary patterns in neotropical Bignoniaceae. **Memories of the New York Botanical Garden** **55**: 118-129.
- GENTRY, A. H. 1992. Bignoniaceae - Part II (Tribe Tecomeae). **Flora Neotropica: Monograph 25 (II)**. Organization for Flora Neotropica, New York.

- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with Late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta** **106**: 64-71.
- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1999. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany** **84**: 449-457.
- GIBBS, P. E. & SASSAKI, R. 1998. Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae - Papilionoideae) in SE Brazil: the effects of pistillate sorting on fruit-set. **Annals of Botany** **81**: 735-740.
- GOBATTO-RODRIGUES, A. A. & STORT, M. N. 1992. Biologia floral e reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **15**: 37-41.
- GRANT, K. A. 1966. A hypothesis concerning the prevalence of red coloration in California hummingbird flowers. **The American Naturalist** **100**: 85-97.
- GRANT, V. & TEMELES, E. J. 1992. Foraging ability of rufous hummingbirds on hummingbird flowers and hawkmoth flowers. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **89**: 9400-9404.
- JAHRADINIK, J. & SEVERA, F. 1998. **A Field Guide in Colour to Bees and Wasps**. Leicester: Blitz Editors.
- JAMES, E. A. & KNOX, R. B. 1993. Reproductive Biology of the Australian species of the genus *Pandorea* (Bignoniaceae). **Australian Journal of Botany** **41**: 611-626.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill, New York.
- KLEKOWSKI JR., E. J. 1988. **Mutation, developmental selection, and plant evolution**. Columbia University Press, New York.
- LANGE, R. S.; SCOBELL, S. A. & SCOTT, P. E. 2000. Hummingbird-syndrome traits, breeding system, and pollinator effectiveness in two syntopic *Penstemon* species. **International Journal of Plant Sciences** **161**: 253-263.

- LIPOW, S. R. & WYATT, R. 1999. Floral morphology and late-acting self-incompatibility in *Apocynum cannabinum* (Apocynaceae). **Plant Systematics and Evolution** **219**: 99-109.
- LIPOW, S. R. & WYATT, R. 2000. Single gene control of postzygotic self-incompatibility in poke milkweed, *Asclepias exaltata* L. **Genetics** **154**: 893-907.
- LOHMANN, L. G. 2003. Bignoniaceae. In **Flowering Plant Families of Tropical America** (A. Henderson & S. Mori, eds.). New York Botanical Garden Press, New York (in press).
- LOPES, A.; VOGEL, S. & MACHADO, I. C. 2002. Secretory trichomes, a substitutive floral nectar source in *Lundia* A. DC. (Bignoniaceae), a genus lacking a functional disc. **Annals of Botany** **90**: 169-174.
- MACHADO, S. R.; GREGORIO, E. A. YANAGIZAWA, Y. & CARMELLO, S. M. 1995. Ultrastructural aspects of the peltate glandular trichomes of the gynoecium in *Zeyheria digitalis* (Vell.) Hoehne (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **18(2)**: 197-205.
- MAIA, V. C. 2000. Galhas de Cecidomyiidae em Bignoniaceae, Boraginaceae e Cactaceae na Restinga da Barra de Maricá (Rio de Janeiro, Brasil). In **XXIII Congresso Brasileiro de Zoologia**. Cuiabá, MT. Resumos, p.170-171.
- MAIA, V. C.; COURI, M. S. & MONTEIRO, R. F. 1992. Sobre seis espécies de *Asphondylia* Loew, 1850 do Brasil (Diptera, Cecidomyiidae). **Revista Brasileira de Entomologia** **36**: 653-661.
- MANI, M. S. 1964. **Ecology of plant galls**. Junk: The Hague.
- MARTIN, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes by means of fluorescence. **Stain Technology**. **34**: 125-128.
- O'BRIEN, T. P. & McCULLY, M. E. 1981. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcarphi Pty, Melbourne.
- PETERSEN, C., BROWN, J. H. & KODRIC-BROWN, A. 1982. An experimental study of floral display and fruit set in *Chilopsis linearis* (Bignoniaceae). **Oecologia** **55**: 7-11.

- RIVERA, G. L. 1996. Nectarios y tricomas florales em cuatro especies de Tecomeae (Bignoniaceae). **Darwiniana** **34**: 19-26.
- RIVERA, G. L. 2000. Nuptial nectary structure of Bignoniaceae from Argentina. **Darwiniana** **38**: 227-239.
- ROESER, K. R. 1972. Die Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos** **61**: 33-36.
- SAGE, T. L., STRUMAS, F., COLE, W. W. & BARRETT, S. C. 1999. Differential ovule development following self- and cross-pollination: The basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). **American Journal of Botany** **86**: 855-870.
- SAZIMA, I.; BUZATO, S. & SAZIMA, M. 1995. The saw-billed hermit **Ramphodon naevius** and its flowers in Southeastern Brazil. **Journal für Ornithologie** **136**: 195-206.
- SAZIMA, I.; BUZATO, S. & SAZIMA, M. 1996. An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in Southeastern Brazil. **Botanica Acta** **109**: 149-160.
- SEAVEY, S. R. & BAWA, K. S. 1986. Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. **The Botanical Review** **52**: 195-219.
- SEAVEY, S. R. & CARTER, S. K. 1994. Self-sterility in *Epilobium obcordatum* (Onagraceae). **American Journal of Botany** **81**: 331-338.
- SINGH, J. & CHAUHAN, S. V. S. 1996. Morphological changes in the stigma of seasonally transient sterile *Tecoma stans* L. **Phytomorphology** **46**: 1-7.
- SNOW, D. W. & SMOW, B. K. 1980. Relationships between hummingbirds and flowers in the Andes of Colombia. **Bulletin of the British Museum, Natural History (Zoology)** **38**: 105-139.
- SNOW, D. W. & SNOW, B. K. 1986. Feeding ecology of hummingbirds in the Serra do Mar, southeastern Brazil. **El Hornero** **12**: 286-296.
- SNOW, D. W. & TEIXEIRA, D. 1982. Hummingbirds and their flowers in the coastal mountains of SE Brazil. **Brazilian Journal of Ornithology** **123**: 446-450.

- SPANGLER, R. E. & OLMSTEAD, R. G. 1999. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences *rbcL* and *ndhF*. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **86**: 33-46.
- STEPHENSON, A. G. & BERTIN, R. I. 1983. Male competition, female choice, and sexual selection in pants. *In* **Pollination Biology** (L. A. Real, ed.). Academic Press, New York, p.109-149.
- STEPHENSON, A. G. & THOMAS W. W. 1977. Diurnal and nocturnal pollination of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae). **Systematic Botany** **2**: 191-198.
- STILES, F. G. 1975. Ecology, flowering phenology, and hummingbird pollination of some Costa Rican *Heliconia* species. **Ecology** **56**: 285-301.
- STILES, F. G. 1985. Seasonal patterns and coevolution in the hummingbird-flower community of a Costa Rican subtropical forest. **Ornithological Monographs** **36**: 757-787.
- SUBRAMANIAN, R. B. & INAMDAR, J. A. 1985. Occurrence, structure, ontogeny and biology of nectaries in *Kigelia pinnata* DC. **The Botanical Magazine** **98**: 67-73.
- SUBRAMANIAN, R. B. & INAMDAR, J. A. 1986. Nectaries in *Bignonia illicium* L. - Ontogeny, structure and functions. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences)** **96**: 135-140.
- SUBRAMANIAN, R. B. & INAMDAR, J. A. 1989. The structure, secretion and biology of nectaries in *Tecomaria capensis* Thunb (Bignoniaceae). **Phytomorphology** **39**: 69-74.
- TAVARES, J. S. 1918. Cecidologia brasileira - Cecídias que se criam nas plantas das famílias das Verbenaceae, Euphorbiaceae, Malvaceae, Anacardiaceae, Labiatae, Rosaceae, Annonaceae, Amperidaceae, Bignoniaceae, Aristolochiaceae e Solanaceae. **Brotéria - Séria Zoológica** **16**: 21-84.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1992. Structure and biology of nectaries in *Tabebuia serratifolia* Nichols (Bignoniaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **109**: 395-400.

- VIEIRA, M. F., MEIRA, R. M. S. A., QUEIROZ, L. P. & MEIRA NETO, J. A. A. 1992. Polinização e reprodução de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. (Bignoniaceae) em área de cerrado do sudeste brasileiro. **Anais do 8º Congresso da Sociedade Brasileira para Progresso da Ciência** 13-19.
- VOGEL, S. 1997. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives I. Substitutive nectaries. **Flora** **192**: 305-333.
- WASER, N. M. 1978. Competition for hummingbird pollination and sequential flowering in two Colorado wild flowers. **Ecology** **59**: 934-944.
- YANAGIZAWA, Y.; MAIMONI-RODELLA, R. C. S.; AMARAL, A. Jr. & RODELLA, R. A. 1982. Biologia floral de *Zeyheria digitalis* (Vell.) Hoehne (Bignoniaceae) na região de Botucatu, SP., Brasil. *In*: **34ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para Progresso da Ciência**. Campinas, SP., Resumos p. 827.

5. Biologia Reprodutiva e Estudo Histológico dos Eventos Posteriores à Polinização em *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), uma Espécie com Auto-Incompatibilidade de Ação Tardia.

5.1. Resumo - O sistema reprodutivo de *Spathodea campanulata* foi investigado através de observações dos eventos e dos visitantes florais, polinizações manuais controladas, estudo do crescimento de tubos polínicos por microscopia de fluorescência e análise de secções seriadas dos ovários para verificação dos eventos posteriores à polinização em pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada. Somente flores submetidas à polinização cruzada formaram frutos, e tanto as flores autopolinizadas como as não-polinizadas sofreram abscisão até o terceiro ou quarto dias. Entretanto, o crescimento dos tubos polínicos até o ovário em pistilos autopolinizados foi bem sucedido e a maioria dos óvulos foram penetrados e fecundados no intervalo de 48 horas, indicando a ocorrência da auto-incompatibilidade de ação tardia em *S. campanulata*. Verificou-se um atraso significativo na incidência de penetração e fecundação dos óvulos, bem como na iniciação dos endospermas em pistilos autopolinizados, relativamente aos pistilos submetidos à polinização cruzada, embora nenhum outro sinal de mal funcionamento no desenvolvimento posterior à penetração dos óvulos tenha sido detectado. O aborto dos pistilos autopolinizados ocorreu num estágio em que uma percentagem relativamente pequena dos óvulos apresentavam endosperma incipiente. Além disso, a abscisão dos pistilos autopolinizados foi anterior ao estágio em que, nos óvulos de pistilos submetidos à polinização cruzada, verificou-se a iniciação do proembrião. Tais resultados não se ajustam ao modelo de auto-esterilidade decorrente dos efeitos da depressão endogâmica.

Palavras-chave: Auto-incompatibilidade de ação tardia, sistema reprodutivo, tubos polínicos, endospermogênese, tubo proembriônico, embriologia, *Spathodea*, Bignoniaceae.

5.2. Introdução

A família Bignoniaceae é composta por aproximadamente 800 espécies distribuídas em 112 gêneros e em 7-8 tribos (Spangler & Olmstead 1999). Estudos sobre sistemas reprodutivos foram realizados somente em 29 espécies de Bignoniaceae (Bawa 1974, Stephenson & Thomas 1977, Petersen *et al.* 1982, Bullock 1985, Bertin & Sullivan 1988, Gobatto-Rodrigues & Stort 1992, Vieira *et al.* 1992, Amaral 1992, Gibbs & Bianchi 1993, James & Knox 1993, Gibbs & Bianchi 1999 - ver Tabela 2). Com exceção de *Pyrostegia venusta* (Gobatto-Rodrigues & Stort 1992), *Astianthus viminalis* (Bullock 1985), *Tecoma stans* (Singh & Chauhan 1996, Dutra & Machado 2001) e *Tabebuia chrysotricha* (capítulo 7), todas as espécies se mostraram auto-incompatíveis. Estudos sobre o sítio de reação de incompatibilidade foram realizados em apenas 18 destas espécies; porém todas elas apresentaram auto-incompatibilidade de ação tardia *sensu* Seavey & Bawa (1986).

Embora vários autores (e.g. Klekowski 1988, Seavey & Carter 1994, Gibbs and Sasaki, 1998) tenham encontrado indicações de que a rejeição dos pistilos autopolinizados em algumas espécies se deve aos efeitos da depressão endogâmica - e.g. o aborto dos embriões em um *continuum* de estádios de desenvolvimento e a ocorrência de malformações durante a embriogênese -, existem evidências de que, em outras taxa, a auto-esterilidade se deve a um mecanismo de auto-incompatibilidade de ação tardia, controlada por um único gene principal (Lipow & Wyatt 2000), ou que a abscisão dos pistilos autopolinizados é desencadeada por eventos decorrentes do desenvolvimento dos tubos polínicos no estilete, antes que os mesmos alcancem os óvulos (Gibbs and Bianchi, 1999; Lipow and Wyatt, 1999; Sage *et al.*, 1999). Entretanto, a auto-incompatibilidade tardia (LSI), ou auto-incompatibilidade ovariana (OSI), freqüentemente tem sido atribuída a espécies para as quais não foram feitos estudos envolvendo a contagem de óvulos penetrados e não-penetrados, bem como análises histológicas dos eventos posteriores à penetração dos óvulos em diferentes intervalos de tempo após as autopolinizações e polinizações cruzadas. Estudos sobre os eventos posteriores à polinização, tais como análises quantitativas da penetração dos óvulos e de seu desenvolvimento subsequente em pistilos

autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada, são essenciais para o levantamento de evidências que permitam concluir se a auto-esterilidade, em cada caso, se deve aos efeitos de uma depressão endogâmica de ação precoce, ou se é decorrente de um genuíno mecanismo de auto-incompatibilidade de ação tardia.

Spathodea campanulata pertence a um gênero monoespecífico, nativo de florestas tropicais do oeste da África, e é amplamente cultivada como árvore ornamental em ambientes urbanos de todo o mundo tropical (Gentry 1992). Tem sido relatada como colonizadora invasiva em várias localidades, e.g. Micronesia (Smith 1985, McConnell & Muniappan 1991) e Porto Rico (Rivera & Aide 1998). Apesar de sugestões contraditórias quanto a sua habilidade em se propagar vegetativamente (comparar por exemplo Menninger & Soderholm 1976 e McConnell & Muniappan 1991), a propagação por sementes parece ser a principal estratégia reprodutiva desta espécie, mesmo fora de seu habitat natural (Smith 1985, McConnell & Muniappan 1991, Rivera & Aide 1998). No Brasil, onde a espécie é comumente utilizada na arborização urbana, a ocorrência subespontânea de *S. campanulata* tem sido verificada em bordas de matas e vegetações em sucessão secundária, e a produção abundante de frutos e sementes em algumas localidades, mas não em outras, tem sido verificada (observações pessoais). É também importante salientar as implicações aparentemente negativas do cultivo e da dispersão desta espécie, devido ao efeito tóxico de suas secreções florais em abelhas nativas (Nogueira-Neto 1970, Trigo & Santos 2000). Tomadas em conjunto, tais considerações amplamente justificam um estudo cuidadoso da biologia reprodutiva desta espécie exótica em nosso país.

Em seu habitat natural, *S. campanulata* é polinizada por Passeriformes (Faegri & van der Pijl 1979, Gentry 1974), mas visitas de morcegos também têm sido relatadas (Ayensu 1974, Sussman & Raven 1978). Entretanto, tais registros carecem de descrições detalhadas sobre as visitas às flores de *S. campanulata*. Oliveira *et al.* (1991) sugeriram ser *S. campanulata* uma espécie xenógama, e portanto dependente de polinizadores substitutivos fora de seu habitat natural, bem como de polinizações cruzadas bem sucedidas para sua reprodução sexual. Não obstante, tal estudo se baseia em dados

experimentais limitados, uma vez que apenas 25 flores foram empregadas nos testes de polinizações manuais controladas.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a polinização e o sistema reprodutivo, bem como comparar, por meio de análise histológica quantitativa, os eventos posteriores às autopolinizações e polinizações cruzadas em flores de indivíduos cultivados de *S. campanulata*. Os únicos estudos que forneceram dados embriológicos sobre *S. campanulata* foram os de Raghavan & Venkatasubban (1940), Venkatasubban (1945), Rudramuniyappa & Marajan (1991) e Rudramuniyappa & Manure (1993). Entretanto tais estudos abordaram apenas aspectos da androsporogênese e do desenvolvimento do gametófito masculino, e até onde se sabe não há estudos sobre a organização estrutural do saco embrionário, a fecundação, a endospermogênese e o desenvolvimento embrionário em *S. campanulata*. Assim, o presente estudo também contribui para o estudo embriológico de Bignoniaceae, fornecendo dados sobre o saco embrionário maduro, o desenvolvimento inicial do endosperma e do proembrião em *S. campanulata*.

5.3. Material e Métodos

Descrição da espécie

O presente estudo foi realizado com indivíduos cultivados no Campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo. Na área de estudos, *S. campanulata* apresentou extensos períodos de floração - de novembro de 1999 a agosto de 2000, e de fins de outubro de 2000 a julho de 2001 -, embora a floração não tenha sido simultânea em todos os indivíduos ao longo de cada estação, e alguns indivíduos tenham sido observados portando flores fora dos períodos das estações citadas. Frutificação abundante foi verificada em muitas árvores na área de estudos, com a maior parte dos frutos concentrando-se no topo da copa.

As árvores alcançam cerca de 25 metros de altura, apresentando grandes folhas imparipinadas, 9-15 folioladas. A inflorescência é um corimbo terminal com 40-50 flores de maturação acrópeta e

antese diurna. Suas vistosas flores alaranjadas (raramente amarelas) apresentam cálice espatáceo e falciforme, viloso e acastanhado do lado dorsal, apresentando diminutos tricomas secretores do lado ventral, os quais produzem uma secreção aquoso-gelatinosa (Raghavan & Venkatasubban 1940, Fraino 1962). A corola é amplamente campanulada, com a base do tubo cilíndrica e estreitada. Os estames são didínamos com um pequeno estaminódio posterior, filetes curvos que tocam a face interna do lado posterior da corola (figura 50), anteras subexertas e divaricadas. A base do gineceu é envolvida por um robusto disco nectarífero cupuliforme. O pistilo linear possui um ovário bicarpelar e bilocular, um estilete curvo (7,0-7,5 cm de comprimento, $n = 10$) tocando a face interna do lado posterior da corola, e um estigma terminal, exerto, bilamelado e sensível ao toque, o qual se posiciona com a face receptiva (lado ventral das lamelas estigmáticas) ligeiramente voltada para o centro da inflorescência (figura 50). O egresso floral, i.e. a emergência da corola e dos verticilos internos da flor (D'Arcy 1986), ocorre pela ruptura do cálice ao longo de uma linha de deiscência longitudinal localizada no lado anterior. Durante a antese, a fauce encontra-se voltada para cima, de modo que o orvalho ou a água de chuvas ocasionais pode acumular-se dentro da corola.

Procedimentos

Vinte e cinco botões florais em estágio anterior ao egresso floral foram marcados em 5 indivíduos para o monitoramento dos eventos florais. O volume e a concentração do néctar foram medidos em flores do primeiro dia de antese, em inflorescências previamente envolvidas com sacos de papel-manteiga, utilizando-se seringa hipodérmica de 1 ml e refratômetro de bolso, respectivamente¹³. Os visitantes florais foram observados em diferentes horas do dia, desde o início da manhã (06:00 horas) até o início da noite (19:00 horas), totalizando 30 horas de observações. Pássaros e outros visitantes das flores foram observados diretamente, ou com o auxílio de binóculo. Observações

¹³ As medidas foram feitas no final da tarde, de modo que os volumes observados correspondem ao néctar acumulado ao longo do primeiro dia da antese.

adicionais do comportamento dos visitantes foram também eventualmente realizadas no período de floração de 2001-2002.



Figura 50: Inflorescência de *Spathodea campanulata*, vista do topo. Setas indicam posição do estigma em flores de primeiro dia.

Os experimentos de polinizações manuais controladas foram realizados com as mesmas 5 árvores, entre fevereiro e março de 2000, e subsequentemente com 8 árvores¹⁴ entre dezembro de 2001 e fevereiro de 2002. No primeiro ano de estudos, inflorescências contendo botões proximais em pré-antese foram envolvidas com sacos de papel-manteiga. Nos dias subsequentes, flores em antese de primeiro dia foram autopolinizadas (utilizando-se pólen da mesma flor ou de outra flor da mesma planta), ou submetidas à polinização cruzada (utilizando-se pólen de outro indivíduo, localizado a pelo menos 10 metros de distância¹⁵) e re-ensacadas. Polinizações cruzadas adicionais foram feitas

¹⁴ Foram utilizados os 5 indivíduos do ano anterior mais 3 árvores adicionais.

¹⁵ Embora os experimentos tenham sido conduzidos com plantas cultivadas, este cuidado foi tomado pois algumas árvores se encontravam muito próximas entre si e, nestes casos, não havia como assegurar que as árvores não fossem clones.

utilizando-se 12 flores de segundo dia e 8 flores de terceiro dia, para a verificação da receptividade estigmática. Várias flores foram apenas marcadas e ensacadas para se verificar a ocorrência de autopolinização espontânea. O monitoramento da frutificação natural foi realizado utilizando-se somente os ramos mais baixos, pois as inflorescências da parte superior da copa não puderam ser alcançadas. Para tanto um total de 167 inflorescências foram marcadas nos 5 indivíduos, verificando-se o número de frutos formados nas mesmas. O número estimado de flores produzidas por estas inflorescências foi obtido multiplicando-se o número médio de flores por inflorescência (43,5 flores, $n = 10$) pelo número de inflorescências marcadas¹⁶. Flores ou inflorescências foram marcadas com linhas coloridas, uma cor para cada tratamento.

Autopolinizações e polinizações cruzadas manuais adicionais foram realizadas para verificação do sítio de reação de incompatibilidade. Pelo menos 5 pistilos de cada tratamento (i.e. autopolinização e polinização cruzada), e de cada intervalo após a polinização (i.e. 24, 48 e 72 horas) foram fixados em FAA50 (formaldeído 4%, ácido acético glacial e etanol 50% nas proporções de 5:5:90%; Johansen 1940) e, subsequentemente, foram dissecados de modo a se remover a parede do ovário, corados com azul de anilina e utilizados no estudo do crescimento dos tubos polínicos no estilete e no ovário por microscopia de fluorescência (Martin 1959). Os óvulos foram arrancados das superfícies placentárias com o auxílio de uma agulha histológica e montados separadamente em uma gota de azul-de-anilina (Gibbs & Bianchi 1993). Porém, tentativas de se estimar a incidência de penetração dos óvulos pela contagem de óvulos portando um pedaço de tubo polínico atado à micrópila não foram bem sucedidas, pois a ruptura do tubo polínico, durante o processo de remoção dos óvulos, na maioria das vezes ocorreu dentro do canal micropilar¹⁷. A verificação da incidência de óvulos penetrados, entretanto, foi feita através da análise de secções histológicas seriadas (ver adiante).

¹⁶ Este procedimento foi indispensável, devido à baixa produtividade de frutos por polinizações naturais observada nos ramos mais baixos das árvores desta população.

¹⁷ A constatação da presença de remanescentes da parede do tubo polínico no interior da micrópila também não foi possível, pois as células endoteliais que revestem internamente o canal micropilar são ricas em amiloplastos, os quais devido à sua fluorescência, obscurecem a visualização de qualquer conteúdo do canal micropilar por esta técnica.

Frutos maduros foram coletados 4 meses após a realização dos experimentos. Para estimar a transformação dos óvulos em sementes, bem como a incidência de abortos de sementes em frutos derivados de pistilos submetidos à polinização compatível e excessiva, sementes de 10 frutos derivados de polinizações cruzadas manuais, selecionados aleatoriamente (2 frutos de cada indivíduo), foram quantificadas e analisadas quanto a morfologia e a presença de embrião¹⁸. O teste *t* bicaudal foi utilizado para se verificar a significância estatística da diferença entre o número de óvulos por ovário e o número de sementes por fruto. Cinquenta sementes sadias, i.e. portando um embrião de forma e tamanho normais, e mais 20 sementes portando embrião atrofiado foram tratadas com hipoclorito de sódio 0,5% e submetidas ao teste de germinação em câmara climática Eletrolab 102 FC, à 25° C e 12 horas de fotoperíodo.

Todas as polinizações manuais foram feitas de modo a cobrir toda a superfície receptiva do estigma (i.e. face ventral das lamelas estigmáticas) com pólen. Para estimar a proporção de grãos de pólen depositados no estigma relativamente ao número de óvulos no ovário, 10 pistilos foram submetidos à polinização cruzada, fixados no dia seguinte em FAA50 (Johansen 1940) e clarificados em NaOH 9N por 40 minutos em estufa à 70° C. Após lavagem em água destilada¹⁹, o estigma e parte do estilete de cada pistilo foram estendidos em lâminas de vidro, de modo que as lamelas estigmáticas permanecessem abertas e com a face portadora de grãos de pólen voltada para cima. O material assim preparado, após umedecido com algumas gotas de água destilada, foi coberto com lamínula e levado a um estereomicroscópio com câmara clara Olympus SZH 10. Sobre uma folha de papel, o contorno de uma das lamelas estigmáticas foi desenhado e, sobre este desenho, foram marcados pontos equivalentes aos grãos de pólen observados na superfície da lamela estigmática. Em seguida os pontos foram quantificados e o resultado foi multiplicado por 2, de modo a se obter uma estimativa do sucesso de

¹⁸ Parte das sementes foram dissecadas e analisadas em estereomicroscópio. Porém, uma vez que o tegumento da semente de *S. campanulata*, tanto na região da ala como na do corpo, é semi-translúcido, na maior parte das sementes a presença e o formato do embrião foram verificados simplesmente colocando cada semente contra uma fonte de luz.

¹⁹ Tanto a fixação como a lavagem do material após clarificação foram cuidadosamente realizados de modo a provocar o mínimo de turbulência possível, minimizando assim a perda de grãos de pólen.

deposição de pólen no estigma. O número de óvulos por ovário foi verificado em 10 amostras aleatórias (2 ovários de cada indivíduo), através de microdissecções em estereomicroscópio.

Para verificar se a eficácia da formação de sementes por fruto poderia ser limitada pela viabilidade dos grãos de pólen, foram feitos testes de coloração citoplasmática dos mesmos com carmim-acético (Radford *et al.* 1974), bem como testes de germinação *in vitro* em várias concentrações de sacarose ("ranging drop method" - Shivanna & Rangaswamy 1992), com e sem adição dos seguintes sais: 2×10^{-3} M H_3BO_3 , 4×10^{-3} M MgSO_4 e 6×10^{-3} M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Para o teste de coloração, os grãos de pólen das anteras superior e inferior de flores das 5 árvores utilizadas nos experimentos de polinizações manuais foram analisados separadamente. Para o teste de germinação, foi feita, previamente, uma mistura dos grãos de pólen de ambas as anteras de flores das mesmas árvores. O controle de ambos os testes foi realizado com grãos de pólen aquecidos em estufa à 65°C por 24, 48 e 72 horas, conforme recomendações de Rodriguez-Riano & Dafni (2000) para testes de viabilidade polínica de um modo geral.

No segundo ano de estudos, autopolinizações e polinizações cruzadas manuais foram feitas como no ano anterior, sendo os pistilos coletados nos intervalos de 24-72 horas e fixados em FAA50, ou coletados nos intervalos de 24-96 horas para autopolinizações e 1-14 dias para polinizações cruzadas, e fixados em glutaraldeído à 2% em solução-tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 (Gabriel 1982). Os pistilos tiveram a parede do ovário removida antes de serem submetidos à fixação. Para os pistilos fixados em FAA, os ovários foram infiltrados com álcool butílico terciário, embebidos em parafina (Johansen 1940) e submetidos a secções transversais seriadas na espessura de 8 μm , utilizando-se um micrótomo rotatório Micron HM 240 E. As secções foram coradas com fucsina-básica e azul-de-astra (Roeser 1972)²⁰, ou com fucsina-ácida e azul-de-toluidina O (O'Brien & McCully 1981,

²⁰ Este é um procedimento de coloração usual para se obter um bom contraste entre paredes celulares lignificadas e não-lignificadas, mas que no presente trabalho também forneceu ótimos resultados no contraste entre paredes celulósicas (coradas pelo azul-de-astra) e o conteúdo protoplasmático (corado pela fucsina-básica em diferentes intensidades, conforme

adaptado para secções em parafina). Os óvulos foram seccionados ao longo de todo o comprimento do ovário.

As secções seriadas obtidas de ovários fixados em FAA foram utilizadas na análise histológica quantitativa da penetração dos óvulos e de eventos posteriores. Foram examinadas todas as secções de 3 pistilos autopolinizados e de 3 pistilos submetidos à polinização cruzada, selecionados aleatoriamente em cada um dos intervalos de fixação (i.e. 24, 48 e 72 horas). Para cada tratamento e intervalo de fixação, os resultados foram tratados como pertencendo a um fundo comum. Utilizou-se o teste estatístico do qui-quadrado para se comparar o número de óvulos penetrados, bem como os vários estádios dos eventos posteriores à penetração dos óvulos, entre autopolinizações e polinizações cruzadas, empregando-se o software Epi Info 6.0. Foram analisados um total de 13.090 óvulos em 18 ovários.

Os ovários fixados em glutaraldeído foram embebidos em glicol-metacrilato e submetidos a secções transversais semi-seriadas, na espessura de 6 μ m. As secções foram coradas com azul-de-toluidina O, com fucsina-ácida e azul-de-toluidina O, ou com PAS e azul/preto-de-anilina (O'Brien & McCully 1981, modificado). Estas secções foram utilizadas para se confirmar detalhes estruturais de eventos do saco embrionário e do endosperma inicial, não sendo empregadas na análise quantitativa. Tanto as secções em metacrilato como as secções em parafina foram examinadas em um microscópio óptico Olympus BX 40. Os registros fotográficos foram obtidos em um fotomicroscópio Olympus BX50, utilizando-se diapositivos Fujichrome Provia 100 F.

a densidade citoplasmática) de células do saco embrionário/endosperma inicial e das células tegumentares que os envolviam.

5.4. Resultados

Eventos florais

O egresso floral ocorreu apenas um dia antes do início da antese. A abertura dos lobos da corola foi geralmente verificada entre 05:00 e 09:00 horas e, já neste estágio, as lamelas estigmáticas se encontravam ligeiramente abertas, apresentando papilas túrgidas e brilhantes em sua face ventral. No primeiro dia de antese, o estigma posiciona-se mais próximo do eixo central da inflorescência, afastando-se do mesmo nos dias subsequentes (figura 50) devido a uma ligeira flexão não só do estilete, mas de toda a flor na região pedicelo/receptacular. Em flores não-visitadas, o movimento de progressiva abertura das lamelas estigmáticas foi observado até o final da antese, quando se observou o enrolamento de suas extremidades distais. O começo da deiscência das anteras, sempre da extremidade proximal do estômio para a sua extremidade distal, foi observado logo após a abertura dos lobos da corola, porém levou várias horas para se completar. No segundo dia da antese, a textura da superfície ventral das lamelas estigmáticas se tornou opaca, devido ao murchamento das papilas. Sinais de murcha foram também observados nas anteras (conectivo e ápice dos filetes) e em algumas áreas da corola, e pontos de necrose (manchas marrons) surgiram no disco. No terceiro dia, as anteras e a corola já apresentavam pronunciada flacidez e áreas necrosadas, tornando-se o disco uniformemente marrom-escuro. A corola ou toda a flor sofreram abscisão entre o terceiro e quarto dias.

A secreção de néctar nas flores de *S. campanulata* foi abundante ($0,91 \pm 0,17$ ml) e a concentração do néctar = $16,3 \pm 1,9\%$ (média \pm desvio padrão, $n = 14$). O néctar foi armazenado numa concavidade da superfície ventral do lado anterior do tubo corolino, onde perfurações de pilhadores de néctar foram freqüentemente observadas. Néctar menos concentrado foi algumas vezes verificado em flores não-ensacadas, provavelmente devido a sua diluição pelo orvalho ou por chuvas ocasionais.

O estigma sensível de *S. campanulata* não se fechou totalmente após pressionado com a ponta do dedo, e este tratamento não evitou a reabertura dos lobos estigmáticos. Entretanto, a deposição de

pólen, tanto em autopolinizações como em polinizações cruzadas, utilizando-se um pincel fino, sempre induziu o fechamento permanente do estigma. O fechamento do estigma após a polinização não ocorreu tão rapidamente como em outras espécies de Bignoniaceae estudadas na presente tese, levando 10-20 minutos para se completar.

Visitantes

Várias espécies de pássaros foram observados visitando as inflorescências de *S. campanulata*, dentre eles *Mimus saturninus* (Mimidae), *Tyrannus melancholicus* (Tyranidae), *Coereba flaveola* (Parulidae), *Eupetomena macroura* (Trochilidae) e *Forpus xanthopterygius* (Psittacidae). *Eupetomena macroura* (freqüentemente) e *Coereba flaveola* (ocasionalmente) foram vistos perfurando o tubo da corola para ter acesso ao néctar, e portanto não contactavam as anteras e o estigma. O único pássaro cujo tamanho corporal e comportamento de visita o permitia atuar como polinizador das flores de *S. campanulata* na área de estudos foi *Mimus saturninus*. Grupos de 4-6 pássaros desta espécie foram observados em várias ocasiões visitando as flores de *S. campanulata* no início da manhã ou no final da tarde. Os pássaros utilizavam o conjunto de botões florais do centro da inflorescência como plataforma de pouso, contactando o estigma e as anteras com a parte ventral do pescoço ao introduzir o bico no interior da corola para alcançar o néctar. Durante cada seqüência de visitas, o pássaro visitou três ou mais flores da mesma inflorescência, passando de uma inflorescência à outra, na mesma árvore ou em árvores diferentes, e visitando preferencialmente as inflorescências do topo da copa.

Apis mellifera e *Trigona* sp. foram algumas vezes observadas coletando pólen em flores de *S. campanulata*. Durante suas visitas, *A. mellifera* utilizava suas mandíbulas para forçar a abertura de anteras ainda no início do processo de deiscência. As abelhas eventualmente tocavam no estigma ao caminharem de uma antera para a outra, porém depositando uma quantidade muito pequena de pólen na superfície receptiva e não sendo capazes de induzir o fechamento do estigma. Várias espécies de

abelhas, formigas e pequenas mariposas foram ainda freqüentemente encontradas mortas no interior da corola, geralmente submersas no néctar.

Viabilidade polínica e eficácia de deposição de grãos de pólen no estigma

Os resultados dos testes de germinação do pólen em diferentes concentrações de sacarose são mostrados na figura 51. A melhor concentração de sacarose para germinação dos grãos de pólen foi a de 10% e, de um modo geral, as percentagem de germinação nas diferentes concentrações de sacarose foram superiores nas soluções contendo a mistura de sais. Os testes de germinabilidade para avaliação da viabilidade dos grãos de pólen foram portanto conduzidos utilizando-se a solução de sacarose à 10%, contendo a mistura de sais.

Os resultados dos testes de germinabilidade e coloração citoplasmática dos grãos de pólen de *S. campanulata* são apresentados na Tabela 10. A germinabilidade foi bastante elevada para os grãos de pólen frescos (em torno de 98%), dramaticamente reduzida no pólen mantido em estufa por 24 horas e nula após 48 horas na estufa. No controle para o teste do carmim-acético, o percentual de grãos de

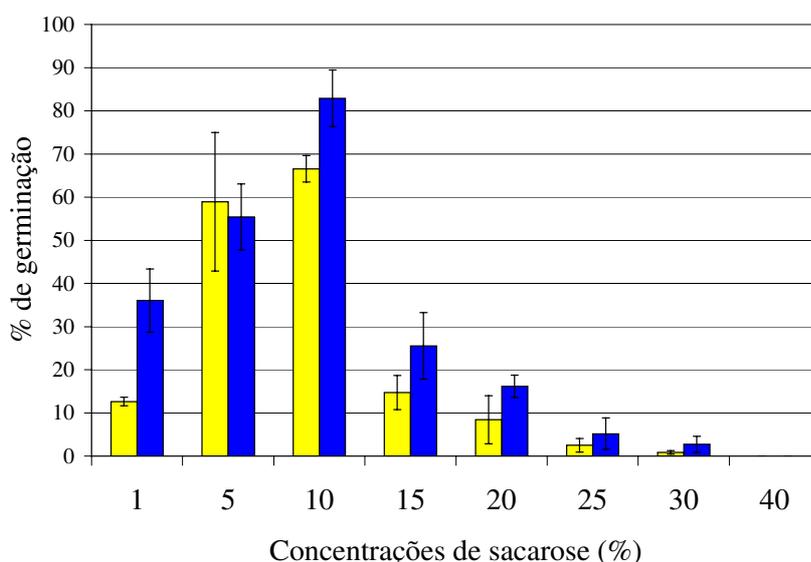


Figura 51: Testes de germinação *in vitro* - "ranging drop method" (Shivanna & Rangaswamy 1992) - dos grãos de pólen de *Spathodea campanulata*, em várias concentrações de sacarose, ■ com e ■ sem adição de sais (H_3BO_3 , $MgSO_4$ e $Ca(NO_3)_2$).

Tabela 10: Viabilidade (% média \pm desvio padrão) do pólen fresco e aquecido em estufa a 65°C por 24, 48 e 72 horas, determinada por teste de coloração com carmim-acético e teste de germinação *in vitro*.

	fresco	24h	48h	72h
Coloração	97.6 \pm 1.12	97.98 \pm 0,36	90.63 \pm 2.24	91.59 \pm 2.59
Germinação <i>in vitro</i>	82.87 \pm 6.56	6.55 \pm 0.57	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

pólen corados não apresentou queda significativa após aquecimento em estufa por 24-72 horas, permanecendo acima de 90%.

O número de grãos de pólen depositados manualmente no estigma (8.340 ± 1.725 , média \pm desvio padrão, $n = 10$)²¹ foi oito vezes maior que o número médio de óvulos por ovário (Tabela 13).

Sistema Reprodutivo

Os resultados dos experimentos de polinizações são apresentados na Tabela 11. Em todas as flores autopolinizadas, bem como nas flores do teste de polinização espontânea, a abscisão da corola e do estilete, ou de toda a flor, ocorreu 3-4 dias após a polinização. Nas poucas flores autopolinizadas em que o ovário persistiu após a abscisão da corola, o ovário, bem como o cálice já desidratado, caíram entre o primeiro e o segundo dias seguintes. Não foi verificado qualquer crescimento dos ovários autopolinizados (figura 52). Das flores submetidas à polinização cruzada manual, 55% formaram frutos (Tabela 11). A abscisão da corola e do estilete após polinizações cruzadas bem sucedidas ocorreu 3-4 dias após o início da antese, e o crescimento inicial do fruto tornou-se claramente visível apenas uma semana após a polinização (figura 52).

²¹ O resultado obtido é subestimado, uma vez que os grãos de pólen não ancorados ao estigma pelo tubo polínico tenderam a se soltar da superfície estigmática.

Tabela 11: Experimentos de polinizações controladas e frutificação em *Spathodea campanulata*.

Árvore n ^o .	Autopolinização espontânea		Autopolinização manual		Polinização cruzada manual	
	n ^o flores	n ^o frutos	n ^o flores	n ^o frutos	n ^o flores	n ^o frutos
1	40	0	20	0	25	12
2	35	0	24	0	26	15
3	42	0	22	0	28	14
4	30	0	17	0	12	8
5	19	0	18	0	9	6
Total	166	0(0%)	101	0 (0%)	100	55 (55%)

Polinização natural (controle): foram marcadas o equivalente a 7264 flores [média de flores por inflorescência (43,5, n = 10) x n^o de inflorescência marcadas (167)], das quais apenas 15 (0,21%) formaram frutos.

Eventos posteriores à polinização na porção ovariana do tecido transmissor

Em cada face do septo do ovário de *S. campanulata*, as placentas se apresentam como duas cristas longitudinais, sobre as quais os óvulos estão aderidos, tal como descrito para *Tabebuia* por Bittencourt Jr. & Mariath (2002a). As duas placentas de cada lado do septo são separadas pela porção ovariana do tecido transmissor (figura 53), o qual é formado por 2-5 camadas de células. Em secções transversais, o tecido transmissor do ovário consiste de células arredondadas apresentando denso citoplasma rico em amiloplastos, espaços intercelulares relativamente amplos e abundante matriz extracelular, a qual se cora fortemente pelo azul-de-astra, ou adquire coloração púrpura-avermelhada com o azul-de-toluidina. Uma secreção mucilaginosa foi verificada nos espaços intercelulares e na superfície externa do tecido transmissor, a qual também corou-se pelo azul-de-astra. A epiderme da placenta apresenta células papilosas e de aparência glandular (i.e. apresentam citoplasma denso, pouco vacuolado), atuando como uma extensão do tecido transmissor que permite o crescimento dos tubos polínicos até os óvulos. A mesma secreção observada na superfície e nos espaços intercelulares da

região intra-placentária do tecido transmissor foi também verificada sobre a superfície externa da epiderme placentária.

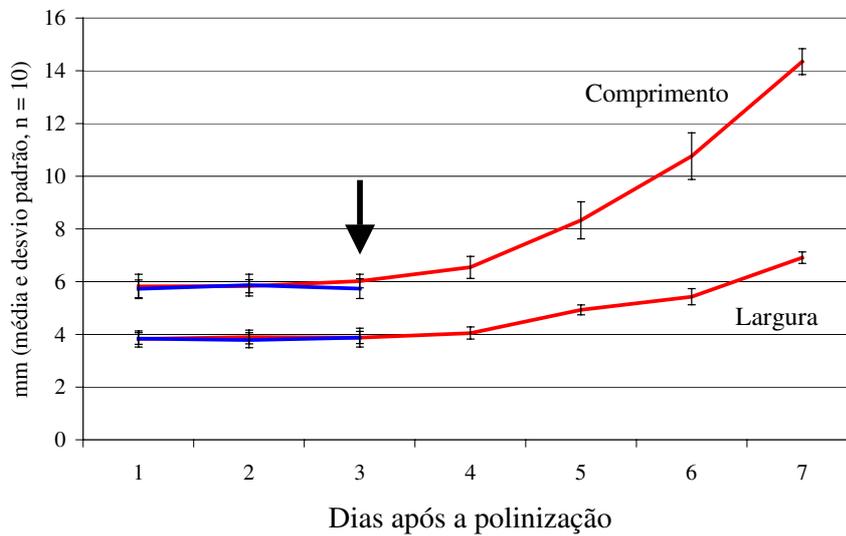


Figura 52: Crescimento do ovário de *Spathodea campanulata* após a polinização. A seta indica a abscisão dos pistilos autopolinizados; — azul — autopolinização; — vermelho — polinização cruzada.

Devido ao crescimento intrusivo de centenas de tubos polínicos, tanto em pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada, as células mais externas do tecido transmissor foram deslocadas para fora, i.e. afastadas umas das outras e empurradas em direção ao espaço locular acima da superfície do septo (figura 54). Nos intervalos de fixação de 48 horas em diante, 1-5 camadas de tubos polínicos entrelaçados entre si foram observadas sobre a epiderme placentária e entre os óvulos (figuras 68 e 78). Este denso crescimento de tubos polínicos sobre a superfície placentária, bem como o número muito grande de óvulos em cada ovário (Tabela 13), provavelmente contribuíram para o insucesso das tentativas de se contar o número de óvulos penetrados pela presença de um pedaço do tubo polínico atado à micrópila (método sugerido por Gibbs & Bianchi 1993).

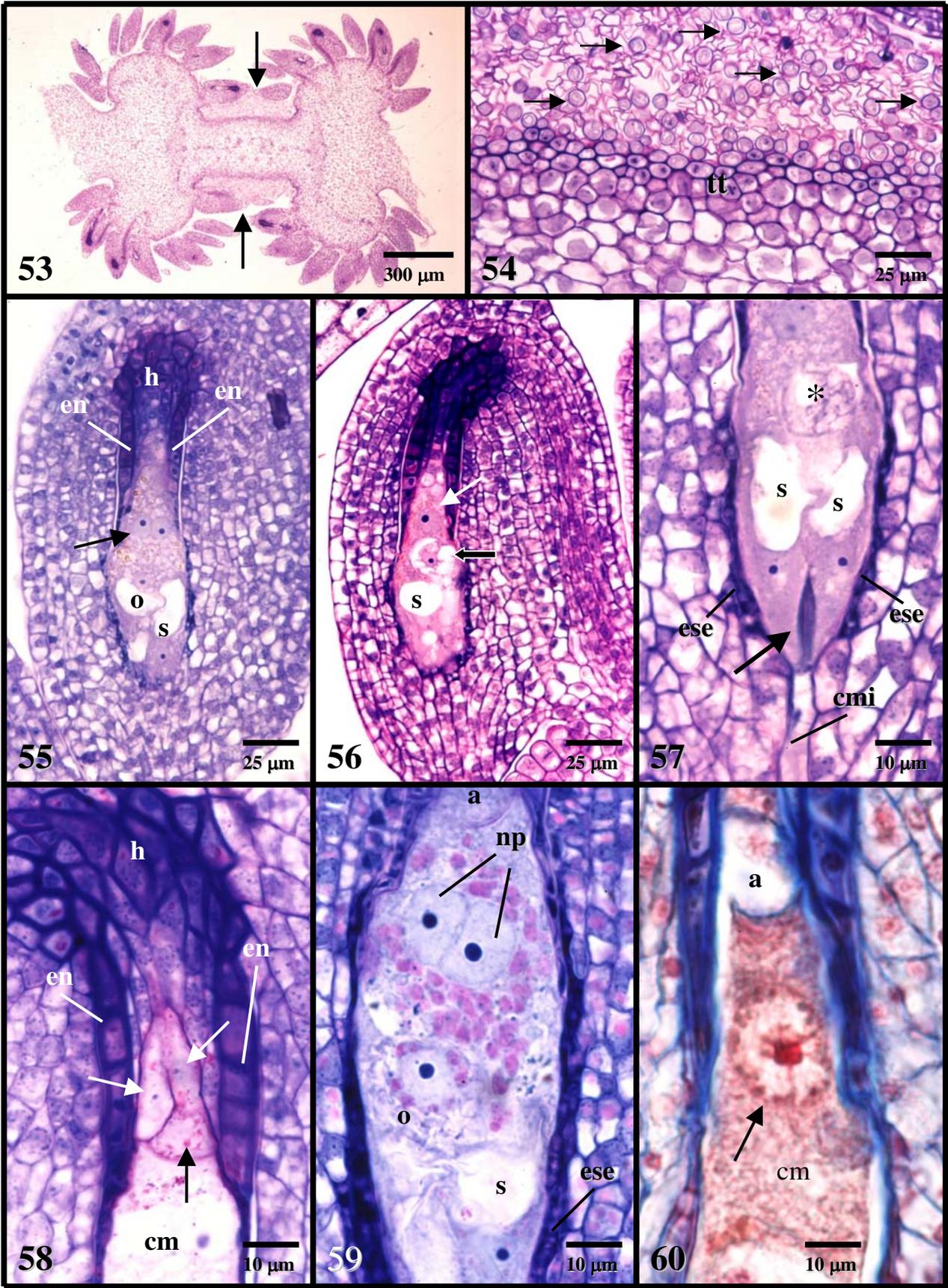


Figura 53-54: Secções transversais do ovário destituído de sua parede. 53: Aspecto geral. Setas indicam tecido transmissor. 54: Tecido transmissor (maior aumento da região indicada na figura anterior). Setas indicam células superficiais do tecido transmissor, deslocadas pelo crescimento intrusivo de tubos polínicos. Figura 55-59: Secções longitudinais de óvulos não-penetrados contendo saco embrionário maduro, orientados com o pólo calazal voltado para o topo da página. 55: Saco embrionário com núcleos polares ainda não fusionados (seta). 56: Saco embrionário com célula média apresentando apenas um único e conspícuo núcleo (seta clara) resultante da fusão dos núcleos polares. A seta escura indica a região calazal proeminente da oosfera. 57: Aparelho oosférico, mostrando as duas sinérgides. A seta indica o aparelho fibrilar. O asterisco indica o pólo calazal da oosfera em secção tangencial. 58: Pólo calazal do saco embrionário mostrando as antípodas (setas) e a hipóstase fortemente corada. 58: Saco embrionário sob o teste histoquímico PAS. Observe os amiloplastos (corpúsculos avermelhados) em torno dos núcleos polares e do núcleo da oosfera. Figura 60: Saco embrionário fecundado, apresentando núcleo secundário em Prófase mitótica (seta). Todas as secções provenientes de material fixado em glutaraldeído e embebido em metacrilato (exceto figura 60: material fixado em FAA50 e embebido em parafina). Colorações: 53-58: azul-de-toluidina e fucsina-ácida; 59: PAS e azul-de-toluidina; 60: azul-de-astra e fucsina-básica. a = antípodas; cm = célula média; cmi = canal micropilar; en = epiderme nucelar; ese = envoltório do saco embrionário; h = hipóstase; np = núcleos polares; o = oosfera; s = sinérgides; tt = tecido transmissor.

Penetração dos óvulos

Em todos os pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada examinados no intervalo de fixação de 24 horas, muitos tubos polínicos já haviam atravessado da base do estilete para o tecido transmissor do ovário, penetrando vários óvulos (Tabela 12, figura 61A). Entretanto, a incidência de óvulos penetrados foi significativamente superior em polinizações cruzadas, tanto no intervalo de 24, como nos de 48 e 72 horas após a polinização ($\chi^2 = 253,7$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 140,1$, $df = 1$, $p < 0,001$; e $\chi^2 = 92,8$, $df = 1$, $p < 0,001$, respectivamente), embora a maioria dos óvulos em ambos os tratamentos tenham sido penetrados e fecundados no intervalo de 48 horas (Tabela 12, figura

61A-C). Não foi observada qualquer variação no número de óvulos penetrados em diferentes níveis do ovário.

Tabela 12: Óvulos de *Spathodea campanulata*: eventos posteriores à polinização nos intervalos de fixação de 24, 48 and 72 horas, em pistilos autopolinizados (auto) vs. pistilos submetidos à polinização cruzada (cruz)*

	24h		48h		72h	
	auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz
np	1694 (84.9%)	1372 (65.6%)	477 (18.7%)	168 (7.5%)	102 (4.5%)	0
Σ pen	221 (11.1%)	668 (31.9%)	1961 (76.9%)	2058 (91.5%)	2026 (90.0%)	1924 (98.4%)
Σ fec	0	0	1871 (73.3%)	1931 (85.8%)	1999 (88.8%)	1924 (98.4%)
End 2c	0	0	3 (0.12%)	266 (11.8%)	835 (37.1%)	1180 (60.3%)
End 3c	0	0	0	2 (0.08%)	0	636 (32.5%)
End 3/5c	0	0	0	0	0	62 (3.2%)
SSE	52 (2.6%)	39 (1.9%)	91 (3.6%)	15 (0.67%)	97 (4.3%)	27 (1.4%)
SE anôm	26 (1.3%)	11 (0.52%)	22 (0.86%)	9 (0.4%)	26 (1.6%)	4 (0.20%)
Total de óvulos:	1993	2090	2551	2250	2251	1955

*Cada coluna contém observações de 3 pistilos selecionados aleatoriamente para cada tratamento. np = óvulos não-penetrados; Σ pen = soma dos óvulos penetrados (i.e. penetrados + fecundados + com endosperma inicial); Σ fec = soma dos óvulos fecundados (i.e. fecundados + com endosperma inicial); End 2c = óvulos contendo endosperma 2-celular; End 3c = óvulos contendo endosperma 3-celular; End 3/5c = óvulos contendo endosperma 5-celular, ou em estágio de transição entre 3-celular e 5-celular; SSE = óvulos sem saco embrionário; SE anôm = óvulos contendo saco embrionário anômalo.

Histologia do saco embrionário

Embora não tenham sido feitas observações do saco embrionário no primeiro dia de antese, quase todos os óvulos em ovários fixados no segundo dia continham um saco embrionário maduro normal (figura 55-59). O saco embrionário em *S. campanulata* é do tipo *Polygonum*, alongado, mais alargado no pólo micropilar, sendo esta região envolvida por remanescentes de células endoteliais,

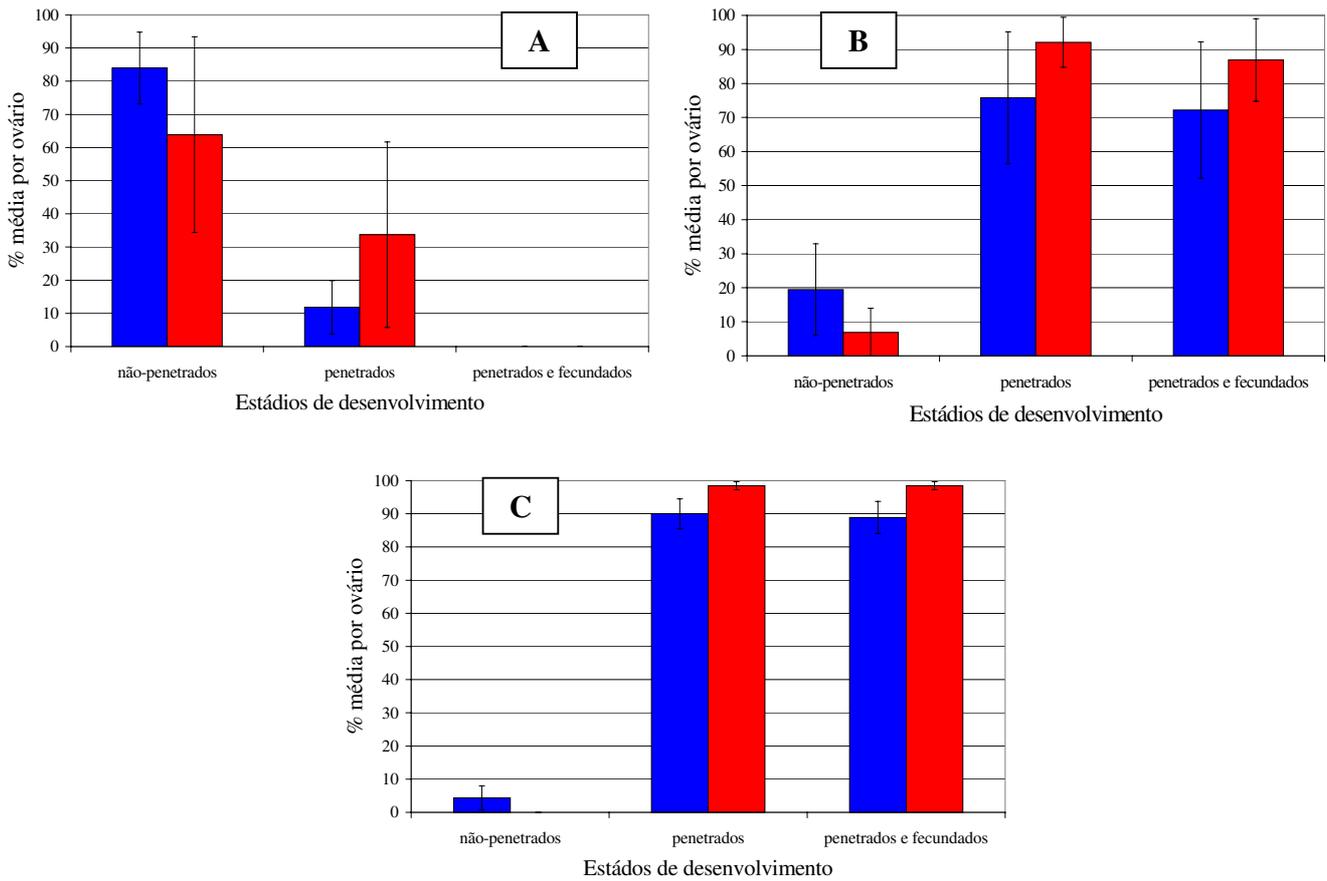


Figura 61: Incidência de óvulos penetrados e fecundados em *Spathodea campanulata*, 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após a polinização. Foram utilizados 3 pistilos para cada tratamento e intervalo após a polinização. As barras verticais indicam os desvios padrões. ■ autopolinização; ■ polinização cruzada.

ricas em amiloplastos, que sofreram degeneração e foram parcialmente absorvidas durante o crescimento do gametófito feminino (envoltório do saco embrionário, cf. Bittencourt Jr & Mariath 2002b). As sinérgides são mais largas e vacuoladas no pólo calazal, estreitando-se no pólo micropilar, no qual se observa um proeminente aparelho fibrilar PAS-positivo (figura 57). O formato da oosfera é semelhante ao das sinérgides, porém a oosfera assume um posicionamento ligeiramente mais calazal, sendo que sua extremidade micropilar não estabelece contato direto com o canal micropilar. Além disso, o núcleo da oosfera é envolvido por numerosos amiloplastos (figura 59) e posiciona-se no pólo

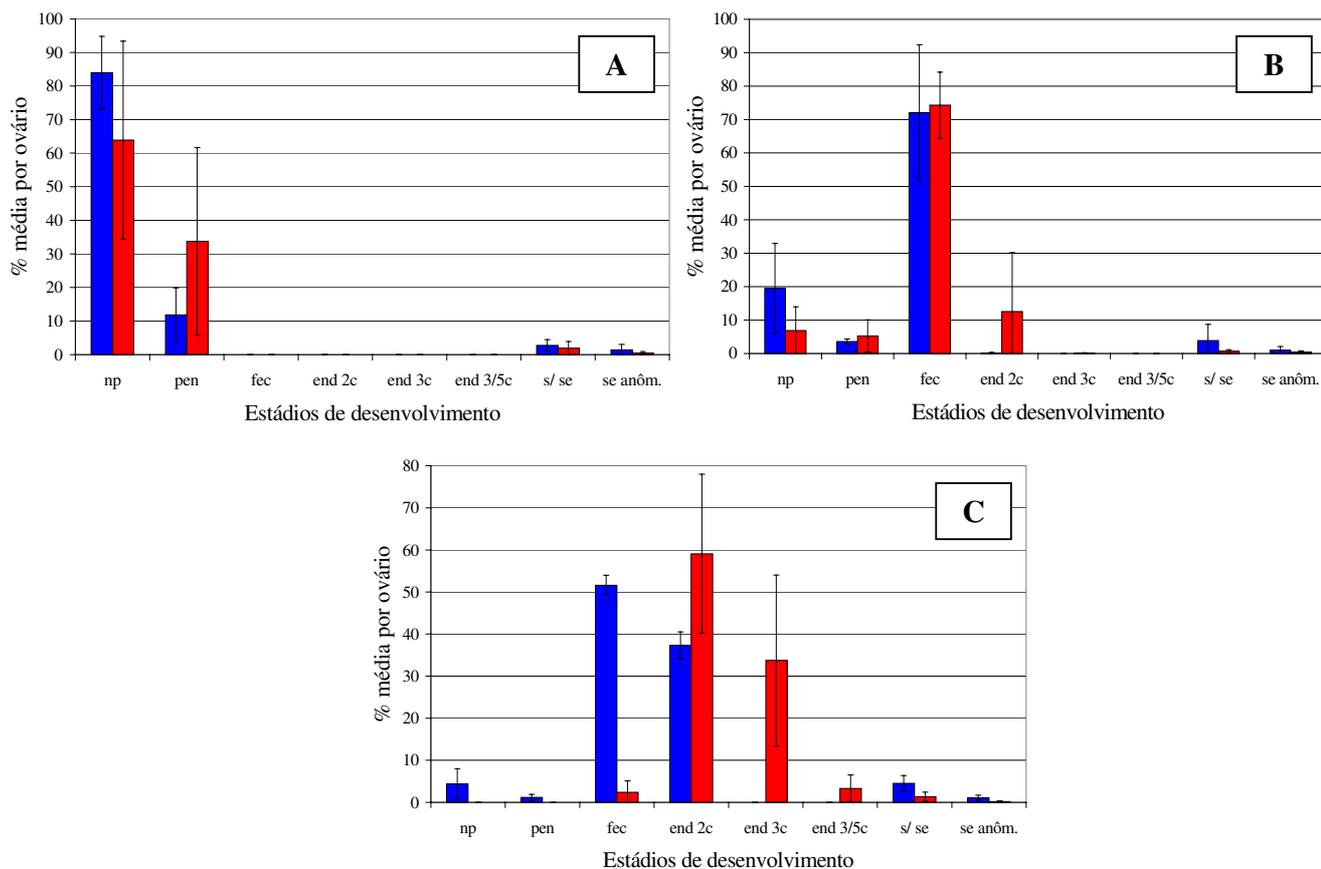


Figura 62: Óvulos de *Spathodea campanulata* 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após a polinização. Foram utilizados 3 pistilos para cada tratamento e intervalo após a polinização. As barras verticais indicam os desvios padrões. ■ autopolinização; ■ polinização cruzada; np = não-penetrados; pen = penetrados porém não-fecundados; fec = fecundados; end 2c = com endosperma 2-celular; end 3c = com endosperma 3-celular; end 3/5 = com endosperma 3 → 5-celular; s/se = sem saco embrionário; se anôm = com saco embrionário anômalo.

calazal, sendo as regiões média e micropilar do protoplasma conspicuamente vacuoladas (figura 55-56). Não foi constatada a presença de parede celular entre o pólo calazal do aparelho oosférico e a célula média, e um estreito espaço preenchido pelo protoplasto da célula média foi verificado entre as paredes laterais do aparelho oosférico e o envoltório do saco embrionário. Os dois núcleos polares da célula média permaneceram não-fusionados até o segundo dia da antese (figura 55), e embora a fusão possa ocorrer antes da penetração do óvulo pelo tubo polínico, núcleos polares não-fusionados ou incompletamente fusionados foram frequentemente observados em sacos embrionários recentemente penetrados. Amiloplastos são abundantes no citoplasma da célula média madura (figura 59), sendo

subseqüentemente herdados pelas células do endosperma inicial (figura 65). No estágio final da maturação do saco embrionário, i.e. pouco antes da cópula, o pólo calazal da oosfera se torna bastante proeminente, de modo que o núcleo da oosfera se aproxima dos núcleos (fusionados ou não) da célula média (figura 56). As antípodas apresentam citoplasma denso, porém contendo pequenos vacúolos (figura 58), e persistem até os estádios iniciais da formação do endosperma.

Penetração e fecundação do gametófito feminino em pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada

O início do processo degenerativo em uma das sinérgides, sinalizado pela coloração mais escura do citoplasma, foi observado somente após a micrópila ter sido penetrada, porém antes do tubo polínico estabelecer contato físico com o aparelho fibrilar. Após a cópula, o tubo polínico descarrega seu denso conteúdo protoplasmático no interior da sinérgide degenerativa, obscurecendo os componentes internos desta célula. Subseqüentemente, uma alça citoplasmática da própria sinérgide degenerativa se desenvolve, intrusivamente, entre a superfície calazal da oosfera e a superfície micropilar da célula média (figuras 63 e 64). Não foi possível observar de modo inequívoco a transferência dos núcleos das células espermáticas para os protoplasmas da oosfera e da célula média. Porém, estudos recentes realizados em várias espécies têm demonstrado que alça protoplasmática que se desenvolve no pólo calazal da sinérgide degenerativa está associada à formação da coroa actínica, um componente do citoesqueleto envolvido com a transferência das células espermáticas para dentro da oosfera e da célula média (Ye *et al.* 2001).

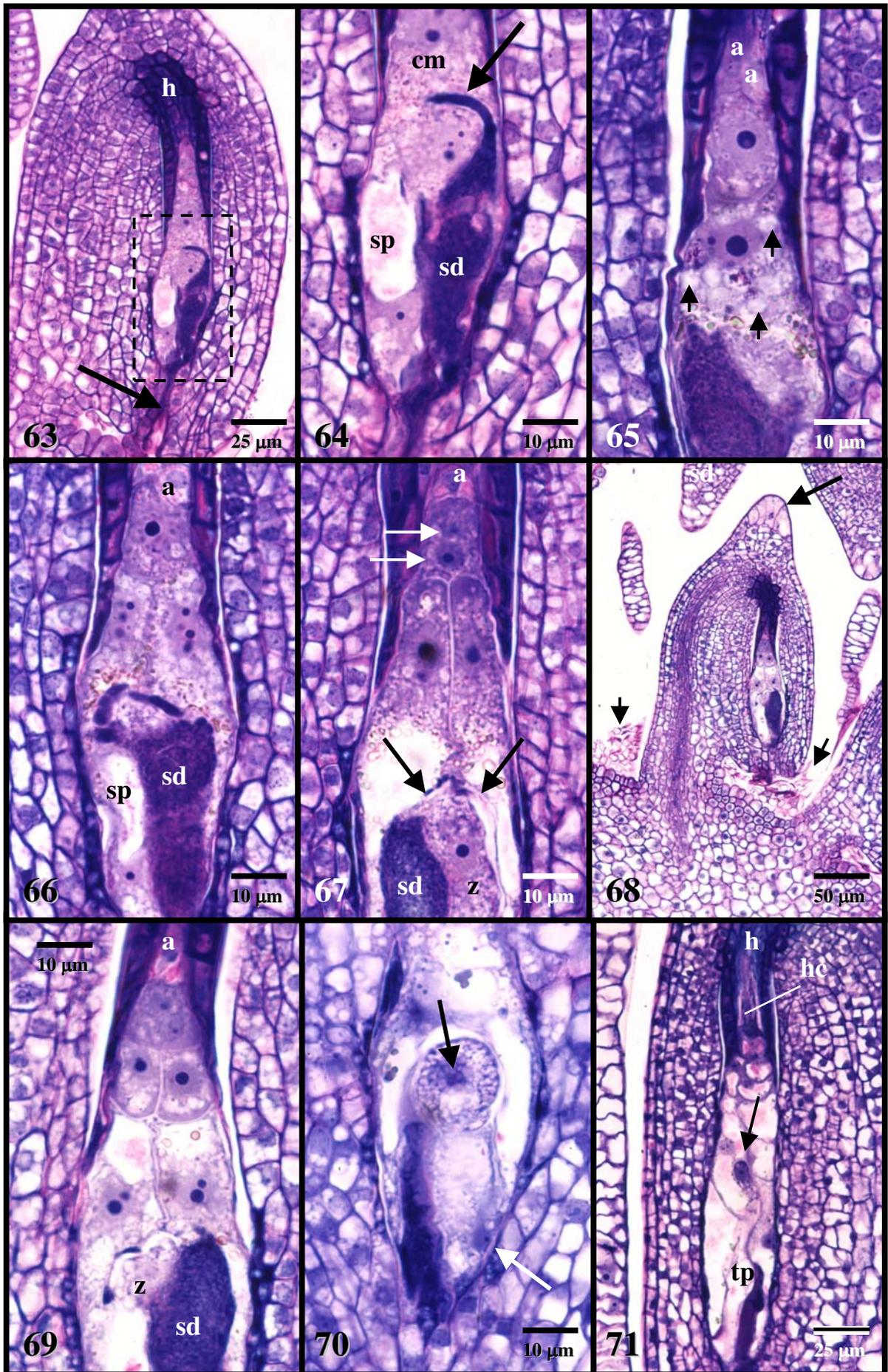
Da mesma forma, não foi possível observar direta e inequivocamente os processos da singamia e da fusão tripla. Entretanto a fusão tripla deve ocorrer antes da singamia, uma vez que na maioria dos sacos embrionários penetrados, contendo a alça citoplasmática do pólo calazal da sinérgide degenerada, um proeminente núcleo endospérmico primário em prófase mitótica foi observado (figura 60), enquanto nenhum sinal de alteração nuclear se verificava na oosfera. Os óvulos que apresentavam a

conspícua alça citoplasmática da sinérgide degenerada foram computados como fecundados, e um número significativamente maior de óvulos fecundados foram observados em pistilos submetidos à polinização cruzada, relativamente aos autopolinizados, nos intervalos de 48 e 72 horas após a polinização ($\chi^2 = 76,6$, $df = 1$, $p < 0,001$, $\chi^2 = 118,7$, $df = 1$, $p < 0,001$, respectivamente) (Tabela 12, figuras 61B-C e 62B-C).

Desenvolvimento do endosperma

Os estádios iniciais do desenvolvimento do endosperma na família Bignoniaceae são relativamente constantes, seguindo um padrão de endospermogênese celular muito característica (Govindu 1950, Johri *et al.* 1992, Shivaramiah 1998), e portanto útil ao monitoramento de eventos posteriores à penetração dos óvulos. A célula endospérmica primária divide-se transversalmente, dando origem a uma célula calazal menor e a uma célula micropilar maior (estádio 2-celular). A célula micropilar então divide-se longitudinalmente, originando 2 células no pólo micropilar (estádio 3-celular). O terceiro ciclo mitótico é sinalizado pela cariocinese do núcleo da célula calazal, a qual pode ou não ser seguida de uma citocinese longitudinal (estádios 4-celular ou 3-celular porém 4-nucleado, respectivamente). Subseqüentemente, na maioria dos taxa, cada uma das células no pólo micropilar do endosperma divide-se transversalmente, originando um par de células intermediárias e um novo par de células micropilares (estádios 6-celular ou 6-nucleado/5-celular, respectivamente). Daí em diante, o desenvolvimento do endosperma usualmente se processa por ondas de divisões sincronizadas de células derivadas do par intermediário.

No intervalo de 48 horas após a polinização, endospermas no estágio 2-celular (figura 65) foram observados em cerca de 12% dos óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada, ao passo que muito poucos endospermas 2-celulares foram vistos em pistilos autopolinizados (Tabela 2). Embora a segunda divisão mitótica do endosperma na câmara micropilar (figura 66) usualmente seja longitudinal,



Figuras 63-71: Secções longitudinais de óvulos fecundados e sementes em iniciação de *Spathodea campanulata*, em sucessivos estádios de desenvolvimento, orientados com o pólo calazal voltado para o topo da página. 63: Óvulo contendo sinérgide penetrada. A seta indica o tubo polínico dentro do canal micropilar. 64: Aparelho oosférico contendo sinérgide penetrada (inserção da figura anterior em maior aumento). A seta indica a alça protoplasmática da sinérgide degenerativa, entre a oosfera e a célula média. 65: Endosperma 2-celular. Setas indicam amiloplastos. 66: Endosperma 3-celular imediatamente após o segundo ciclo mitótico da endospermogênese. 67: Endosperma 3-celular após a expansão do par de células micropilares. Setas claras indicam os dois núcleos da célula calazal em diferentes planos de foco. Setas escuras indicam a parede celular em torno do pólo calazal do zigoto. 68: Aspecto geral de um óvulo contendo endosperma 5-celular. Seta maior indica a ala emergente. Setas menores indicam remanescentes de tubos polínicos, entrelaçados, sobre a superfície externa da placenta. 69: Endosperma 5-celular. 70: Tubo proembriônico em iniciação, 5 dias após a polinização. A seta clara indica o núcleo micropilar; a seta escura indica o núcleo calazal. 71: Endosperma e tubo proembriônico, 7 dias após a polinização. A seta indica a extremidade calazal do tubo proembriônico. O núcleo micropilar do tubo proembriônico não é mostrado. Todas as secções provenientes de material fixado com glutaraldeído e embebido em metacrilato. Coloração: azul-de-toluidina e fucsina-ácida. a = antípodas, cm = célula média; sd = sinérgide degenerativa; h = hipóstase; hc = haustório calazal; sp = sinérgide persistente; z = zigoto.

divisões transversais foram ocasionalmente verificadas. Ainda no intervalo de 48 horas, alguns óvulos contendo endosperma 3-celular foram vistos em polinizações cruzadas, mas nenhum endosperma 3-celular foi observado em pistilos autopolinizados (Tabela 2).

No intervalo de 72 horas, a maioria dos óvulos em polinizações cruzadas continham endospermas no estágio 2-celular ou em estágio posterior, enquanto em apenas 37% dos óvulos de pistilos autopolinizados, a primeira divisão do endosperma havia ocorrido. Novamente, esta diferença foi estatisticamente significativa: $\chi^2 = 227,7$, $df = 1$, $p < 0,001$. E enquanto neste intervalo de tempo 32% dos óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada apresentaram endospermas nos estádios 3-celular ou posterior (Tabela 12), óvulos contendo endosperma 3-celular foram vistos apenas em um

dos pistilos autopolinizados que sobreviveram até 96 horas após a polinização. Conseqüentemente, a diferença entre autopolinizações e polinizações cruzadas para óvulos com endosperma 3-celular foi altamente significativa. A diferença entre autopolinizações e polinizações cruzadas quanto ao número de óvulos fecundados, mas ainda não apresentando um endosperma em desenvolvimento (não mostrado) também foi estatisticamente significativa.

A presença de uma parede PAS-positiva no pólo calazal da oosfera (figura 67) é um indicativo de que a mesma se tornou um zigoto (Schulz & Jansen 1968, Olson & Cass 1981). Antes do terceiro ciclo de divisões no endosperma, as duas células micropilares passaram por um período de expansão volumétrica e vacuolação (figura 67), fazendo com que as paredes laterais do aparato oosférico se afastassem do envoltório do saco embrionário. Alguns óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada, apresentando tais endospermas com células micropilares vacuoladas, foram observados no intervalo de 72 horas. O terceiro ciclo mitótico do endosperma foi usualmente observado na célula calazal (figura 67). Esta divisão não foi seguida por formação de parede celular, originando uma célula binucleada que, posteriormente, diferenciou-se num haustório calazal (figura 72).

A divisão simultânea e transversal das duas células micropilares, já expandidas, do endosperma 3-celular pode ocorrer após, ou ao mesmo tempo em que a cariocinese tem lugar na câmara calazal. Este quarto ciclo de divisões é desigual, resultando em duas células intermediárias menores e duas células micropilares maiores (figuras 68 e 69). Portanto, neste estágio o endosperma 5-celular é constituído por duas células micropilares, duas células intermediárias e pelo futuro haustório calazal binucleado. A sinérgide persistente ainda se encontrava intacta neste estágio, mas degenerou-se logo em seguida. Embora alguns endospermas 5-celulares tenham sido vistos em óvulos de pistilos submetidos à polinização cruzada, 72 hora após a polinização, eles foram mais comuns no intervalo de 96 horas. No pistilo autopolinizado que sobreviveu até o intervalo de 96 horas, apenas 4 óvulos contendo endosperma 5-celular foram observados, e este foi o estado de desenvolvimento endospermico mais avançado, encontrado em pistilos autopolinizados. O alongamento tangencial de

células nas margens do tegumento único do óvulo de *S. campanulata*, o qual sinaliza o início do crescimento da ala da semente, foi claramente verificado a partir do estágio em que os pistilos passaram a apresentar endospermas 3 ou 5-celular (figura 68), incluindo em óvulos inviáveis (figuras 78 e 79). Em pistilos do 14º dia posterior à polinização cruzada, o último estágio monitorado, as jovens sementes usualmente apresentavam endospermas com 11 células, as quais, salvo o par de células da extremidade micropilar e o haustório calazal, descenderam do par de células intermediárias do endosperma 5-celular, com o par de células micopilares simplesmente sofrendo expansão e vacuolação. Estas divisões celulares foram usualmente perpendiculares ao eixo longitudinal do endosperma, de modo que o corpo do endosperma multicelular é constituído de duas fileiras celulares longitudinais, as quais são progressivamente menores na direção calazal (figuras 71-74). Pelo menos até este estágio, as células micopilares do endosperma nunca mostraram um aumento de densidade citoplasmática que pudesse sinalizar sua diferenciação em células haustoriais. Embora alguns endospermas com um arranjo celular algo diferente do descrito acima tenham sido ocasionalmente observados (figura 77), nenhum sinal de malformação no endosperma foi verificado, seja em autopolinizações ou em polinizações cruzadas. Efetivamente, até os intervalos de 96 horas em pistilos autopolinizados e 14 dias em pistilos submetidos à polinização cruzada, nenhum sinal de malfuncionamento (salvo o desenvolvimento mais lento em pistilos autopolinizados) foi observado nos endospermas.

Formação do tubo proembriônico

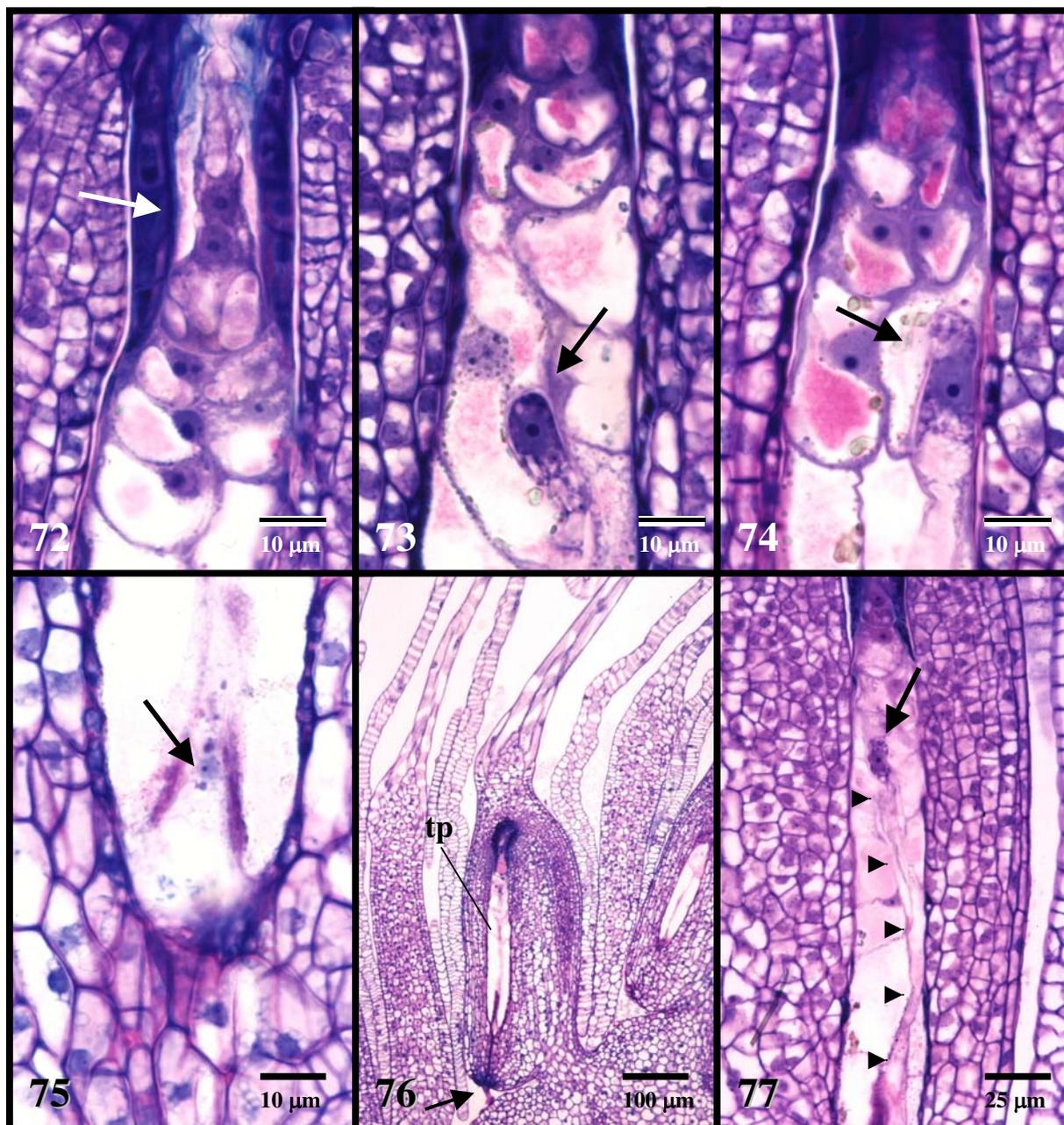
Após a fecundação, o zigoto gradualmente se torna cilíndrico. Embora não tenha sido feita nenhuma observação direta da cariocinese no núcleo do zigoto, um tubo proembriônico binucleado foi claramente verificado a partir do quinto ou sexto dias após a polinização cruzada (figura 70). O núcleo micropilar é menor do que o núcleo calazal, e um grande vacúolo se desenvolve entre eles. Nos estádios subseqüentes, o tubo proembriônico continua a se alongar em direção à calaza, usualmente

entre as duas fileiras longitudinais de células do corpo do endosperma (figura 71 e 77). Inicialmente, o alongamento do tubo proembriônico pareceu simplesmente acompanhar a expansão longitudinal do endosperma. Entretanto, o crescimento intrusivo da extremidade calazal do tubo proembriônico tornou-se evidente a partir do sétimo dia após a polinização, quando ele começou a penetrar a região calazal do endosperma (figuras 71 e 73), onde se localizam as menores células do mesmo. Neste estágio o núcleo calazal do tubo proembriônico é proeminente, apresentando um conspícuo nucléolo e sendo envolvido por um denso citoplasma, ao passo que o núcleo micropilar permanece inconspícuo e com nucléolo reduzido (figura 75). Os dois núcleos são separados por um extenso vacúolo, e não se verificou a formação de parede celular entre estes núcleos. O tubo proembriônico permaneceu binucleado até o último estágio examinado da jovem semente, ou seja, 14 dias após a polinização.

Restos das sinérgides permaneceram na extremidade micropilar do endosperma, adjacentes à base do tubo proembriônico, e o tubo polínico também permaneceu visível na abertura micropilar até o último estágio monitorado (figura 76). Tal como no desenvolvimento do endosperma, nenhum sinal de mal-funcionamento do tubo proembriônico foi verificado até o 14^o dia, embora alguma variação no seu progresso de desenvolvimento tenha sido observado, com alguns proembriões e endospermas se apresentando em estádios de desenvolvimento anteriores aos observados na maioria das demais jovens sementes do mesmo fruto.

Óvulos não-funcionais

Menos de 4% dos 13.090 óvulos observados em seções de ovários de ambos os tratamentos (Tabela 12) eram óvulos não-funcionais, i.e. destituídos de saco embrionário (figura 78) ou apresentando um saco embrionário degenerado, ou ainda contendo um gametófito feminino de estrutura anômala (i.e. em estádios 1-4 nuclear, ou apresentando um saco embrionário aparentemente maduro, porém destituído de algumas de suas células). Em alguns casos, tais óvulos desprovidos de um



Figuras 72-77: Secções longitudinais de sementes jovens de *Spathodea campanulata*, orientadas com o pólo calazal voltado para o topo da página. Extremidade calazal do endosperma, 7 dias após a polinização. A seta indica o haustório calazal binucleado. 73-74: Extremidade calazal do tubo proembriônico (setas) penetrando a região calazal do endosperma pelo meio (73) ou lateralmente (74) (8 dias após a polinização). 75: Núcleo micropilar do tubo proembriônico (seta). 76: Aspecto geral de uma semente jovem, 13 dias após a polinização. A seta indica remanescentes do tubo polínico na abertura micropilar. 77: Tubo proembriônico (pontas de setas), 10 dias após a polinização. A seta indica a extremidade calazal. Todas as secções provenientes de material fixado com glutaraldeído e embebido em metacrilato. Coloração: azul-de-toluidina e fucsina-ácida. tp = tubo proembriônico.

saco embrionário normal foram penetrados, tendo o tubo polínico se enrolado no interior da cavidade do saco embrionário (figura 79). Da mesma forma que óvulos funcionais, nos diferentes estádios de desenvolvimento pré- e pós-zigótico, se encontravam distribuídos ao longo de todo o ovário, não foi encontrada qualquer indicação da correlação entre óvulos não-funcionais e posições específicas no ovário.



Figuras 78-79: Secções longitudinais de óvulos não-funcionais. 78: Óvulo destituído de saco embrionário, 96 horas após a polinização. A seta indica o canal micropilar. 79: Óvulo penetrado, com o tubo polínico enrolado no interior da cavidade do saco embrionário. Material fixado em glutaraldeído e embebido em metacrilato. Coloração: azul-de-toluidina e fucsina-ácida.

Produção de sementes por fruto

Os resultados das contagens de óvulos por ovário e sementes por fruto resultante de polinização compatível e excessiva (i.e. polinização cruzada manual) são mostrados na Tabela 13. Foi possível classificar as sementes em três categorias: (1) sementes normais: apresentando comprimento e largura = $1,63 \pm 0,15 \times 3,26 \pm 0,36$ cm e contendo um embrião normal, cordiforme, com comprimento e largura = $0,38 \pm 0,03 \times 0,45 \pm 0,03$ cm (n = 10); (2) sementes anor-

mais tipo I: sementes de tamanho normal porém sem embrião, ou contendo embrião atrofiado e de formato irregular; (3) sementes anormais tipo II: sementes atrofiadas de vários tamanhos (<0,01-1,5 cm de largura) contendo embrião atrofiado e de formato irregular, ou sem embrião. Somente as sementes normais germinaram (percentagem de germinação = 100%), e o número de óvulos por ovário contrastou significativamente com o número de sementes viáveis produzidas por fruto.

Tabela 13: Número de sementes por fruto resultante de polinização cruzada manual e número de óvulos por ovário em *Spathodea campanulata*.

	Número de frutos/pistilos examinados	Média	Desvio padrão
Sementes normais	10	718,5	153,39
Sementes anormais tipo I	10	26,2	20,65
Sementes anormais tipo II	10	29	51,79
Óvulos por ovário	10	1019,7	46,90

O teste *t* bicaudal indicou diferença significativa entre o número de sementes normais por fruto e o número de óvulos por ovário ($p < 0.01$).

5.5. Discussão

Biologia da polinização

O conspícuo volume e a baixa concentração do néctar nas flores de *S. campanulata* são congruentes com a polinização por pássaros que empoleiram (Faegri & van der Pijl 1979, Waser 1983). Teixeira *et al.* (2002) sugeriram a polinização por beija-flores em árvores de *S. campanulata* cultivadas em áreas urbanas de Campo Grande, MS, mas não forneceram informações detalhadas sobre como o comportamento de visita de beija-flores permitiria o contato de partes específicas do corpo destes pássaros com as anteras e do estigma da flor de *S. campanulata*. As presentes observações indicam que, na área de estudos, o polinizador natural de *S. campanulata* foi substituído principalmente, ou talvez somente por *Mimus saturninus*. Uma vez que o pássaro pousa sobre os botões florais da região central da inflorescência, ao introduzir o bico no tubo corolino o pássaro contata as anteras e o estigma sempre com a parte ventral do pescoço, permitindo assim a deposição de pólen e induzindo o fechamento do estigma. O mesmo comportamento de visita às flores de *S. campanulata* foi relatado para um pássaro australiano - *Philemon* sp., Meliphagidae (Westerkamp 1990). Embora aparentemente *Mimus saturninus* visite as flores de *S. campanulata* em busca de néctar, não se pode descartar a possibilidade de que esta ave, e talvez outras espécies de pássaros, simplesmente utilizam as flores de *S. campanulata* como fonte de água, tal como sugerido por Borrero *et al.* (1979). Entretanto, *M.*

saturninus também visita e poliniza as flores de *Hortia brasiliana* (Rubiaceae), um arbusto nativo dos cerrados brasileiros (Barbosa 1999).

O atraso observado na abertura das anteras, relativamente ao momento de abertura dos lobos da corola, bem como o estigma ligeiramente aberto e apresentando papilas túrgidas desde o início da antese, indicam que as flores de *S. campanulata* são protogínicas, confirmando as observações de Newcombe (1924). Embora nenhum teste químico para a receptividade do estigma tenha sido realizado, os resultados dos testes de polinizações manuais - somente polinizações compatíveis em flores de primeiro dia resultaram na formação de frutos -, bem como o murchamento das papilas estigmáticas após o primeiro dia de antese, claramente indicam que o estigma está receptivo somente no primeiro dia.

Independente do tipo de tratamento, i.e. autopolinização ou polinização cruzada, quando uma quantidade suficiente de grãos de pólen foi depositada no estigma, os lobos estigmáticos se fecharam permanentemente. Newcombe (1924) igualmente observou o fechamento permanente do estigma de *S. campanulata*, ao ser polinizado. Conseqüentemente, parece ser possível estimar o sucesso da polinização natural em indivíduos de uma população simplesmente checando-se o número de flores com estigmas fechados, relativamente ou número de flores com estigma aberto num dado momento. A mesma conclusão foi relatada para outras espécies com estigmas sensíveis, tais como *Catalpa speciosa* (Stephenson & Thomas 1977) e *Tecoma stans* (Singh & Chauhan 1996). O fechamento do estigma em Bignoniaceae parece ser importante não somente para evitar a autopolinização, mas também pode favorecer o estabelecimento de um microambiente adequado à germinação dos grãos de pólen no estigma (Newcombe 1922, 1924). A polinização de *S. campanulata* por abelhas (*Apis mellifera* e *Trigona spinipes*), sugerida por Oliveira *et al.* (1991) com base simplesmente na frequência de visitas, não foi suportada pelas presentes observações, pois o montante de pólen depositado no estigma por abelhas foi muito limitado e seu comportamento de visita não foi capaz de induzir o fechamento do estigma.

Viabilidade polínica e eficácia da produção de sementes por fruto

Em polinizações cruzadas manuais, embora o número médio de grãos de pólen depositado no estigma tenha sido 8 vezes maior que o número médio de óvulos no ovário, apenas cerca de 70% destes óvulos resultaram em sementes viáveis (Tabela 13). Os testes de germinação do pólen *in vitro* sugeriram viabilidade acima de 80%, portanto bastante superior ao esperado se o número médio de sementes formadas por fruto tivesse sido limitado pela viabilidade dos grãos de pólen. Portanto, o excesso de grãos de pólen depositados no estigma, relativamente ao número de óvulos por ovário, e os altos níveis de viabilidade do pólen observados no teste de germinação *in vitro* indicam que o número de sementes viáveis por fruto resultante de polinização cruzada manual não foi limitado nem pela viabilidade do pólen, nem por deposição insuficiente de pólen no estigma. A coloração do citoplasma de grãos de pólen mortos por aquecimento em estufa claramente demonstra ser o teste do carmim-acético inadequado para se estimar a viabilidade dos grãos de pólen de *S. campanulata*.

Tal como esperado, a taxa de formação de sementes em frutos resultantes de polinização compatível e excessiva, relativamente ao número de óvulos ("seed/ovule ratio"), foi bastante elevada (em torno de 0,7), uma vez que uma taxa média de 0,5 em frutos formados por polinização natural foi reportada para espécies xenógamas e perenes (Wiens 1984). Entretanto, o número médio de óvulos por ovário em *S. campanulata* apresentou variação relativamente pequena, e a significativa diferença entre o número médio de óvulos por ovário e o de sementes viáveis por fruto claramente indica o aborto de uma boa parte dos óvulos (Tabela 13). A incidência de sementes anormais (i.e. sementes atrofiadas ou destituídas de um embrião viável) foi muito baixa se comparada ao número médio de sementes normais (i.e. viáveis), e foi equivalente à menos que 6% do número médio de óvulos por ovário. Portanto, aproximadamente 24% dos óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada não apresentou qualquer crescimento detectável durante o desenvolvimento do fruto. Embora a produção de um número muito maior de óvulos por ovário do que o de sementes por fruto seja uma condição perfeitamente normal em angiospermas (Seavey & Carter 1996), e em certos casos mesmo em se

tratando de polinizações artificiais (Bawa & Webb 1984), os dados do presente estudo indicam que causas pré-zigóticas são responsáveis por uma parcela muito pequena da diferença entre a fecundidade potencial e real em *S. campanulata*, pois a análise histológica indicou que apenas cerca de 4% dos óvulos no ovário eram não-funcionais (i.e. sem saco embrionário ou contendo saco embrionário anômalo ou degenerado). A média da frequência de fecundação para polinizações cruzadas, encontrada em *S. campanulata*, foi em torno de 98% (Tabela 12), similar à relatada para *Epilobium angustifolium* (Wiens *et al.* 1987). Excluindo-se os óvulos que apresentaram algum tipo de malformação do saco embrionário, todos os 94% restantes de óvulos funcionais (i.e. contendo um saco embrionário maduro normal durante a antese) foram penetrados e fecundados. Portanto, o número de óvulos não-funcionais por ovário contribuiu para uma parcela muito pequena dos óvulos que não se transformaram em sementes, e qualquer que seja a causa do aborto dos restantes 20%²² do total de óvulos por ovário que não se transformaram em sementes, o aborto destes óvulos necessariamente tem que ter ocorrido após a iniciação das sementes.

Embriologia

O saco embrionário do tipo *Polygonum* observado em *S. campanulata* é semelhante ao descrito por Bittencourt Jr. & Mariath (2002b) em *Tabebuia pulcherrima*, exceto pelo conspícuo aparelho fibrilar, pela ausência de parede celular no pólo calazal da oosfera e pela proeminente expansão da oosfera para dentro da célula média. Nas angiospermas de um modo geral, no saco embrionário maduro as paredes comuns entre as sinérgides, a oosfera e a célula média (porção calazal do aparelho oosférico) são muito delgadas, apresentam descontinuidades ou estão totalmente ausentes, sendo as células, neste último caso, delimitadas apenas pela membrana plasmática (Jensen 1972, Kapil & Bhatnagar 1981, Willemse & van Went 1984, Russell 1992, Huang & Russell 1992). A ausência total

²² Total de óvulos no ovário (100%) - percentagem de óvulos que se transformaram em sementes viáveis (70%) - percentagem de óvulos que se transformaram em sementes anormais (6%) - percentagem de óvulos inviáveis por ovário

ou parcial de paredes celulares na porção calazal do aparelho oosférico exerce um papel essencial na dupla fecundação, uma vez que os gametas masculinos, liberados pelo tubo polínico no interior de uma das sinérgides, precisam ser transferidos, um para a oosfera e outro para a célula média. Além disso, segundo Mansfield *et al.* (1991), a ausência de paredes celulares nessa região permite a livre translocação de nutrientes das sinérgides para a oosfera e para a célula média. A expansão do pólo calazal da oosfera para dentro da célula média, tal como verificado em *S. campanulata*, é essencial à aproximação espacial entre o núcleo da oosfera e os núcleos polares, o que por sua vez está correlacionado ao processo de transferência dos gametas masculinos e da dupla fecundação (Kapil & Bhatnagar 1981, Willemse & van Went 1984, Russell 1992, Huang & Russell 1992). A expansão calazal da oosfera de *S. campanulata* foi mais acentuada do que a observada em *T. pulcherrima*, confirmando a sugestão feita por Bittencourt Jr & Mariath (2002b), segundo a qual o formato da oosfera no saco embrionário maduro pode variar em diferentes espécies de Bignoniaceae.

O atraso da singamia e da divisão do zigoto, relativamente à fusão tripla e à divisão da célula endospermica primária, tal como verificado em *S. campanulata*, tem sido descrito também para outras espécies de Bignoniaceae (Ghatak 1956, Mehra & Kulkarni 1985). A regeneração da parede celular na região calazal da oosfera após a fecundação, também verificada no presente estudo, tem sido descrita como um fenômeno comum nas angiospermas (Schulz & Jensen 1968, Olson & Cass 1981), e uma das mais importantes indicações de que a unidade germinativa feminina (i.e. aparelho oosférico + célula média, Dumas *et al.* 1984) completou a sua função sexual, qual seja, a de garantir a dupla fecundação (Russell 1993).

O desenvolvimento inicial do endosperma em *S. campanulata* é do megatipo celular, tipo heteropolar-micropilar e subtipo longitudinal, de acordo com a classificação proposta por Di Fulvio (1983). Mauritzon (1935) distinguiu dois tipos principais de desenvolvimento endospermico em

(4%) = 20%.

Bignoniaceae: o tipo *Catalpa* e o tipo *Incarvillea*. No tipo *Catalpa*, tanto o haustório micropilar como o calazal são constituídos de 4 células. No tipo *Incarvillea*, ambos os haustórios são unicelulares. Nenhum aumento de densidade citoplasmática foi verificado nas duas células da extremidade micropilar do endosperma de *S. campanulata*, até o último estágio ontogenético monitorado. Tal como descrito para as quatro células micropilares do endosperma de *Jacaranda mimosifolia* (Govindu 1950), as duas células micropilares do endosperma de *S. campanulata* provavelmente não apresentam qualquer função haustorial, pelo menos até o último estágio monitorado. Portanto, o desenvolvimento do endosperma em *S. campanulata* não é congruente com a classificação de Mauritzon (1935), embora investigações adicionais, sobre o desenvolvimento subsequente do endosperma de *S. campanulata*, sejam necessárias para se concluir quanto a formação de um haustório micropilar.

Embora a formação de um longo tubo proembriônico tenha sido considerada uma característica típica da embriogênese das Sympetalae (Maheshwari 1950), as quais atualmente estão incluídas no grupo Asteridae (APG 1998), até onde se sabe, a formação de um tubo proembriônico binucleado nunca foi citada para Bignoniaceae. O alongamento do tubo proembriônico em direção ao pólo calazal do corpo do endosperma sugere um padrão de crescimento restrito à região apical, semelhante ao crescimento de um tubo polínico (Mascarenhas 1993). Além disso, o corpo do embrião propriamente dito necessariamente terá que se formar somente de células derivadas do núcleo calazal do tubo proembriônico, e o crescimento do tubo proembriônico em direção à calaza garante o posicionamento do futuro embrião em uma região nutricionalmente mais favorecida, devido a sua proximidade com a hipóstase (Bittancourt Jr & Matriath 2002a).

É importante salientar ainda que a penetração, pelo tubo polínico, de óvulos que careçam de saco embrionário, tal como constatado no presente estudo, contradiz a sugestão de que as sinérgides exerceriam importante função no direcionamento quimiotrópico do crescimento do tubo polínico (Huang & Hussell 1992, Russell 1992,1993).

Sistema reprodutivo

Spathodea campanulata é claramente uma espécie auto-incompatível (nenhum fruto foi formado em 101 flores autopolinizadas e em 5 indivíduos), mas isto se deve a algum tipo de LSI, uma vez que a maioria dos óvulos em pistilos autopolinizados foi penetrada e fecundada até 48 horas após a polinização.

Desenvolvimento posterior à penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados vs. pistilos submetido à polinização cruzada

Tal como é comum em estudos embriológicos, não foi possível estabelecer com precisão o momento da cariogamia na formação do zigoto e o da fusão tripla na formação do núcleo endospermico primário. Entretanto, a iniciação do endosperma em Bignoniaceae, com seu padrão consistente de divisões celulares, é suficientemente característico para permitir o acompanhamento passo a passo do desenvolvimento endospermico em pistilos autopolinizados, comparativamente ao mesmo desenvolvimento em pistilos submetidos à polinização cruzada.

Gibbs & Bianchi (1999) verificaram um atraso na incidência da penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados, comparado aos pistilos submetidos à polinização cruzada em *Tabebuia nodosa* e *Dolichandra cyanchooides*, duas espécies de Bignoniaceae com LSI, embora o número de óvulos penetrados em autopolinizações e polinizações cruzadas tenha se igualado no intervalo de 96 horas após a polinização. Entretanto, os autores não investigaram a histologia dos óvulos penetrados. Em *Spathodea campanulata* verificou-se um atraso similar na incidência de óvulos penetrados em autopolinizações vs. polinizações cruzadas nos intervalos de 24, 48 e 72, i.e. do início da antese até a abscisão da flor. Além disso, as presentes análises histológicas revelaram que, no intervalo de 48 horas após a polinização, o número de óvulos cujo endosperma havia alcançado o estágio bicelular foi quase cem vezes maior em pistilos submetidos à polinização cruzada, relativamente aos pistilos autopolinizados. No intervalo de 72 horas, efetivamente no último dia antes da abscisão da maioria dos

pistilos autopolinizados, novamente um número significativamente menor de óvulos com endosperma bicelular foi verificado nos pistilos autopolinizados (37%), relativamente aos pistilos submetidos à polinização cruzada (60%), e em nenhum óvulo de pistilos autopolinizados o endosperma alcançou o estágio 3-celular, comparado a 32% de óvulos com endospermas neste estágio em pistilos submetidos à polinização cruzada.

Os presentes resultados indicam que os pistilos autopolinizados de *S. campanulata* apresentam um tipo de LSI no qual o progresso do desenvolvimento em diferentes fases após a polinização, da penetração e fecundação dos óvulos até os estádios iniciais do desenvolvimento do endosperma, é atrasado relativamente ao progresso do desenvolvimento em pistilos submetido à polinização cruzada, porém sem outros sinais de anormalidade. Em nenhum estágio até a abscisão da flor foi encontrada qualquer indicação de malformação em óvulos de pistilos autopolinizados. Portanto, no presente estudo não foram encontradas evidências que suportem a visão de que os pistilos autopolinizados sofram abscisão devido à ocorrência de malformações no embrião ou no endosperma, as quais seriam decorrentes dos efeitos de alelos recessivos deletérios. A ausência de malformações no proembrião também caracterizou o desenvolvimento das jovens sementes, em pistilos submetidos à polinização cruzada, até 14 dias após a polinização.

Estudos anteriores sugeriram o controle da LSI por um gene principal em Sterculiaceae (Cope 1962, Jacob 1980). O estudo recente de Lipow & Wyatt (2000), baseado em cruzamentos dialélicos, demonstrou que a LSI em *Asclepias exaltata* é controlada por um único gene com múltiplos alelos operando esporofiticamente, ou talvez gametofiticamente, abrindo novas possibilidades para estudos sobre auto-incompatibilidade de ação tardia²³. Da mesma forma, o estudo de Sage *et. al.* (1999) demonstrou que, em *Narcissus triandrus*, o crescimento dos tubos polínicos no estilete de pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada exerceu diferentes efeitos sobre a

²³ Infelizmente a realização de cruzamentos dialélicos envolvendo sucessivas gerações, necessários a tais estudos genéticos, é inexequível em espécies arbóreas como *S. campanulata*, devido ao seu longo ciclo de vida.

maturação dos óvulos no ovário. Este estudo evidencia a possibilidade de que, em espécies com LSI, interações "negativas" entre os tubos polínicos e o estilete podem induzir o aborto dos pistilos autopolinizados, embora os tubos polínicos alcancem o ovário e fecundem os óvulos.

Dada a possibilidade do controle da LSI por um gene principal em alguns taxa, tal como demonstrado em *Asclepias*, e portanto sua similaridade com o controle genético da auto-incompatibilidade gametofítica (GSI), o estudo de Lush & Clarke (1997) sobre o crescimento dos tubos polínicos em pistilos autopolinizados de *Nicotiana glauca*, uma espécie com GSI, é de particular importância. Estes autores demonstraram que em *N. glauca* o crescimento dos tubos polínicos incompatíveis não é totalmente suprimido pela resposta de incompatibilidade, pois os tubos polínicos continuam se desenvolvendo no estilete, embora numa taxa de crescimento muito mais lenta do que a dos tubos polínicos em pistilos submetidos à polinização cruzada, até a flor senescer. Tais observações são similares às de Herrero & Dickinson (1980), os quais demonstraram que os tubos polínicos incompatíveis em *Petunia hybrida*, outra espécie com GSI, continuam crescendo lentamente no estilete por 5 dias após a polinização.

Uma característica peculiar da LSI em *S. campanulata* é que a longevidade das flores autopolinizadas é similar à das flores não-polinizadas, e elas sofrem abscisão em três dias, a despeito do fato de que, neste intervalo de tempo, a maioria dos óvulos no ovário tenham sido fecundados. As únicas diferenças verificadas nesta espécie entre pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada foram a menor incidência de penetração dos óvulos e as taxas mais lentas do desenvolvimento subsequente nos primeiros, relativamente aos últimos. A diferença na eficácia dos tubos polínicos em autopolinizações vs. polinizações cruzadas, característica da LSI em *S. campanulata*, assim como a diferença entre as taxas de crescimento dos tubos em pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada, em espécies com GSI, provavelmente são mais de natureza quantitativa do que qualitativa. Em plantas com GSI, o crescimento dos tubos polínicos em pistilos autopolinizados é tão severamente reprimido que os tubos nunca alcançam o ovário, enquanto que em *S. campanulata*, e

possivelmente em outras espécies com LSI, os tubos polínicos em pistilos autopolinizados são mais ativos, uma vez que eles alcançam o ovário em 24 horas, não obstante o atraso na fecundação dos óvulos possa significar o comprometimento do seu desenvolvimento subsequente, ou seja, que tais pistilos já estejam programados para sofrer abscisão.

5.6. Literatura Citada

- AMARAL, M. E. C. 1992. **Ecologia floral de dez espécies da tribo Bignoniae (Bignoniaceae) em uma floresta semidecídua no município de Campinas, SP.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden 85:** 531-553.
- AYENSU, E. S. 1974. Plant and bat interactions in West Africa. **Annals of the Missouri Botanical Garden 61:** 702-727.
- BARBOSA, A. A. A. 1999. *Hortia brasiliiana* Vand. (Rubiaceae): polinização por aves Passeriformes no cerrado do sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica 22:** 99-105.
- BAWA, K. S. 1974. Breeding systems of tree species of lowland tropical community. **Evolution 28:** 85-92.
- BAWA, K. S. & WEBB, C. J. 1984. Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. **American Journal of Botany 7:** 736-751.
- BERTIN, R. I. & SULLIVAN, M. 1988. Pollen interference and cryptic self-fertility in *Campsis radicans*. **American Journal of Botany 75:** 1140-1147.
- BITTENCOURT JR., N. S. & MARIATH, J. E. A. 2002a. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): megasporogenesis and integument development. **Revista Brasileira de Botânica 25:** 103-115.

- BITTENCOURT JR., N. S. & MARIATH, J. E. A. 2002b. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): embryo sac development. **Revista Brasileira de Botânica 25**: 117-127.
- BORRERO, J. I., PALTA, J. A. & SALGUERO, G. 1979. Las flores del tulipan africano (*Spathodea campanulata* Beauvois) y su significado para los insectos y las aves. **Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales 34**: 207-222.
- BULLOCK, S. H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. **Biotropica 17**: 287-301.
- COPE, F. W. 1962. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Heredity* 17: 157-182.
- D'ARCY, W. G. 1986. The calix in *Lycianthes* and some other genera. **Annals of the Missouri Botanical Garden 73**: 117-127.
- Di FULVIO, T. E. 1983. Los "tipos" de endosperma y de haustorios endospermicos. Su clasificación. **Kurtziana 16**: 7-31.
- DUMAS, C.; KNOX, R. B.; McCONCHIE, C. A. & RUSSELL, S. D. 1984. Emerging physiological concepts in fertilization. **What's New in Plant Physiology 15**: 17-20.
- DUTRA, J. C. S. & MACHADO, V. L. L. 2001. Entomofauna visitante de *Stenolobium stans* (Juss.) Seem (Bignoniaceae), durante seu período de floração. **Neotropical Entomology 30**: 43-53.
- FAEGRI, K. & PIJL, L. van der 1979. **The Principles of Pollination Ecology**. 3th ed. Oxford: Pergamon Press.
- FRAINO, R. 1962. Contribución al conocimiento de las glándulas de excreción de agua de los cálices acuíferos de *Spathodea campanulata* Beauv. I. **Acta Científica Venezolana 13**: 19-28.
- GABRIEL, B.L. 1982. **Biological Electron Microscopy**. New York: Van Nostrand Reinhold.
- GENTRY, A. H. 1974. Coevolutionary patterns in Central American Bignoniaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden 61**: 728-759.

- GENTRY, A. H. 1992. Bignoniaceae - Part II (Tribe Tecomeae). **Flora Neotropica: Monograph 25 (II)**. Organization for Flora Neotropica, New York.
- GHATAK, J. 1956. A contribution to the life history of *Oroxylum indicum* Vent. **Proceedings of the Indian Academy of Science B 43**: 73-83.
- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta 106**: 64-71.
- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1999. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany 84**: 449-457.
- GIBBS, P. E. & SASSAKI, R. 1998. Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae - Papilionoidae) in SE Brazil: the effects of pistillate sorting on fruit-set. **Annals of Botany 81**: 735-740.
- GOBATTO-RODRIGUES, A. A. & STORT, M. N. S. 1992. Biologia floral e reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica 15**: 37-41.
- GOVINDU, H. C. 1950. Studies in the embryology of some members of the Bignoniaceae. **Proceedings of the Indian Academy of Science B 32**: 164-178.
- HERRERO, M. & DICKINSON, H. G. 1980. Pollen tube growth following compatible and incompatible infraspecific pollination in *Petunia hybrida*. **Planta 148**: 217-221.
- HUANG, B.-Q. & RUSSELL, S. D. 1992. Female germ unit: Organization, isolation, and function. **International Review of Cytology 140**: 332-293.
- JACOB, V. J. 1980. Pollination, fruit-setting and incompatibility in *Cola nitida*. **Incompatibility Newsletter 12**: 50-56.
- JAMES, E. A. & KNOX, R. B. 1993. Reproductive biology of the Australian species of the genus *Pandorea* (Bignoniaceae). **Australian Journal of Botany 41**: 611-626.

- JENSEN, W. A. 1972. The embryo sac and fertilization in angiosperms. **Harold L. Lyon Arboretum Lecture 3:** 1-32.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant Microtechnique.** New York: McGraw-Hill.
- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B. & SRIVASTAVA, P. S. 1992. **Comparative Embryology of Angiosperms.** v. 2. Berlin: Springer-Verlag.
- KLEKOWSKI JR., E. J. 1988. **Mutation, Developmental Selection, and Plant Evolution.** Columbia University Press, New York.
- LIPOW, S. R. & WYATT, R. 1999. Floral morphology and late-acting self-incompatibility in *Apocynum cannabinum* (Apocynaceae). **Plant Systematics and Evolution** **219:** 99-109.
- LIPOW, S. R. & WYATT, R. 2000. Single gene control of postzygotic self-incompatibility in poke milkweed, *Asclepias exaltata* L. **Genetics** **154:** 893-907.
- LUSH, W. M. & CLARKE, A. E. 1997. Observations of pollen tube growth in *Nicotiana glauca* and their implications for the mechanism of self-incompatibility. **Sexual Plant Reproduction** **10:** 27-35.
- MAHESHWARI, P. 1950. **An Introduction to the Embryology of Angiosperms.** New York: McGraw-Hill.
- MANSFIELD, S. G., BRIARTY, L. G. & ERNI, S. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. **Canadian Journal of Botany** **69:** 447-460.
- MARTIN, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes by means of fluorescence. **Stain Technology.** **34:** 125-128.
- MASCARENHAS, J. P. 1993. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. **The Plant Cell** **5:** 1303-1314.
- MAURITZON, J. 1935. Etwas über die Embryologie der Bignoniaceen. **Botaniska Notiser** **1935:** 60-77.
- McCONNELL, J. & MUNIAPPAN, R. 1991. Introduced ornamental plants that have become weeds on Guam. **Micronesica, Suppl. 3:** 47-49.

- MEHRA, K. R. & KULKRANI, A. R. 1985. Embryological studies in Bignoniaceae. **Phytomorphology 35**: 239-251.
- MENNINGER, E. A. & SODERHOLM, P. K. 1976. Propagating the yellow African tulip tree. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society 88**: 443-444.
- NEWCOMBE, F. C. 1922. Significance of the behavior of sensitive stigmas. **American Journal of Botany 9**: 99-120.
- NEWCOMBE, F. C. 1924. Significance of the behavior of sensitive stigmas II. **American Journal of Botany 11**: 85-93.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1970. **Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão (Meliponinae)**. 2^a ed. São Paulo: Chacaras e Quintais.
- O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. 1981. **The Study of Plant Structure Principles and Selected Methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty.
- OLIVEIRA, R. M.; GIANNOTTI, E. & MACHADO, V. L. L. 1991. Visitantes florais de *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae). **Bioikos 5**: 7-30.
- OLSON, A. R. & CASS, D. D. 1981. Changes in megagametophyte structure in *Papaver nudicaule* L. (Papaveraceae) following in vitro placental pollination. **American Journal of Botany 68**: 1333-1341.
- RADFORD, A. E.; DICKINSON, W. C.; MASSEY, J. R. & BELL, C. R. 1974. **Vascular Plant Systematics**. New York: Harper & Tow Publ.
- RAGHAVAN, T. S. & VENKATASUBBAN, K. R. 1940. Studies in the Bignoniaceae. I. Chromosome number and epidermal hydathodes in *Spathodea campanulata*. **Journal of the Indian Botanical Society 73**: 303-315.
- RIVERA, L.W. & AIDE, T. M. 1998. Forest recovery in the karst region of Porto Rico. **Forest Ecology and Management 108**: 63-75.

- RODRIGUEZ-RIANO, T. & DAFNI, A. 2000. A new procedure to access pollen viability. **Sexual Plant Reproduction** **12**: 241-244.
- ROESER, K. R. 1972. Die Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos** **61**: 33-36.
- RUDRAMUNIYAPPA, C. K. & MAHAJAN, P. B. 1991. Histochemical and fluorescence microscopic study of the anther development in *Spathodea campanulata* Beauv. **Phytomorphology** **41**: 175-188.
- RUDRAMUNIYAPPA, C. K. & MANURE, A. R. 1993. A review on histochemical aspects of microsporogenesis in angiosperms. **Advances in Pollen-Spore Research** **20**: 173-251.
- RUSSELL, S. D. 1992. Double fertilization. **International Review of Cytology** **140**: 357-388.
- RUSSELL, S. D. 1993. The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. **The Plant Cell** **5**: 1349-1359.
- PETERSEN, C.; BROWN, J. H. & KODRIC-BROWN, A. 1989. An experimental study of floral display and fruit set in *Chilopsis linearis* (Bignoniaceae). **Oecologia** **55**: 7-11.
- SAGE, T. L.; STRUMAS, F.; COLE, W. W. & BARRETT, S. C. 1999. Differential ovule development following self- and cross-pollination: The basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). **American Journal of Botany** **86**: 855-870.
- SCHULZ, S. R. & JENSEN, W. A. 1968. *Capsella* embryogenesis: the egg, zygote, and young embryo. **American Journal of Botany** **55**: 807-819.
- SEAVEY, S. R. & BAWA, K. S. 1986. Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. **The Botanical Review** **52**:195-219.
- SEAVEY, S. R. & CARTER, S. K. 1994. Self-sterility in *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) **American Journal of Botany** **81**: 331-338.
- SEAVEY, S.R. & CARTER, S. K. 1996 Ovule fates in *Epilobium obcordatum* (Onagraceae). **American Journal of Botany** **83**: 316-325.

- SHIVANNA, K. R. & RANGASWAMY, N. S. 1992. **Pollen Biology: A Laboratory Manual**. Springer, Berlin.
- SHIVARAMIAH, G. 1998. Endosperm development in Bignoniaceae. **Phytomorphology** **48**: 45-50.
- SINGH, J. & CHAUHAN, S. V. S. 1994. Floral polymorphism and establishment of self incompatibility in *Tecoma stans* L. **Journal of Tree Science** **13**: 57-60.
- SMITH, C. W. 1985. Impact of alien plants on Hawaii's native biota. In **Hawaii's Terrestrial Ecosystems: Preservation and Management**. (C. P. Stone & J. M. Scott, eds.). Manoa: Cooperative National Park Resources Studies Unit, University of Hawaii, p.203.
- SPANGLER, R. E. & OLMSTEAD, R. G. 1999. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences *rbcL* and *ndhF*. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **86**: 33-46.
- STEPHENSON, A. G. & THOMAS, W. W. 1977. Diurnal and Nocturnal pollination of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae). **Systematic Botany** **2**: 191-198.
- SUSSMAN, R. W. & RAVEN, P. H. 1978. Pollination by lemurs and marsupials: an archaic coevolutionary system. **Science** **200**: 731-734.
- TEIXEIRA, R. C.; AMARAL, P.; FERREIRA, F. F. & ARAÚJO, A. C. 2002. Aves visitantes de flores de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae) numa área urbana, Campo Grande, MS. In **53º Congresso Nacional de Botânica**. Recife, PE. Resumos, p. 259.
- TRIGO, J. R. & SANTOS, W. F. 2000. Insect mortality in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae) flowers. **Revista Brasileira de Biologia** **60**: 537-538.
- VENKATASUBBAN, K. R. 1945. Cytological studies in Bignoniaceae. IV. The cytology of *Dolichandrone reedii* Seem. and allied genera. **Proceedings of the Indian Academy of Science B** **21**: 77-92.
- VIEIRA, M. F.; MEIRA, R. M. S. A.; QUEIROZ, L. P. & MEIRA NETO, J. A. A. 1992. Polinização e reprodução de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. (Bignoniaceae) em área de Cerrado do Sudeste Brasileiro. **Anais do 8º Congresso da SBPC**, 13-19.

- WASER, N. M. 1983. The adaptive nature of floral traits: ideas and evidence. *In* **Pollination Biology** (L. Real, ed.). Orlando: Academic Press, p.241-285.
- WESTERKAMP, C. 1990. Bird flowers: hovering *versus* perching exploitation. **Botanica Acta** **103**: 366-371.
- WIENS, D. 1984. Ovule survivorship, brood size, life history, breeding systems, and reproductive success in plants. **Oecologia** **64**: 47-53.
- WIENS, D.; CAVIN, C. L.; WILSON, C. A.; DAVERN, C. I.; FRANK, D. & SEAVEY, S. R. 1987. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. **Oecologia** **71**: 501-509.
- WILLEMSE, M. T. M. & van WENT, J. L. 1984. The female gametophyte. *In* **Embryology of Angiosperms** (B.M. Johri, ed.). Berlin: Springer-Verlag, p.159-196.
- YE, X.-L.; YEUNG, E. C. & ZEE, S.-Y. 2002. Sperm movement during double fertilization of a flowering plant, *Phaius tankervilleae*. **Planta** **215**: 60-66.

6. Sistema Reprodutivo e Aspectos da Biologia Floral de *Cybistax antisiphilitica* (Martius) Martius (Bignoniaceae)

6.1. Resumo - *Cybistax antisiphilitica* é árvore de ampla distribuição na América do Sul, sendo particularmente freqüente nos cerrados do Planalto Central Brasileiro. Foram realizados estudos sobre a biologia reprodutiva desta espécie, através da observação dos eventos e dos visitantes florais, experimentos de polinizações controladas, observações do crescimento *in situ* dos tubos polínicos por microscopia de fluorescência e quantificação do número de óvulos penetrados em sucessivos intervalos após autopolinizações e polinizações cruzadas. A antese durou apenas um dia, sendo produzido um volume considerável de néctar, o qual pode escorrer por um sulco longitudinal existente no "assoalho" do tubo corolino, acumulando-se na base do lobo anterior. A atração de polinizadores à curtas distâncias pela apresentação do próprio néctar é sugerida. Na população investigada, as flores de *C. antisiphilitica* foram polinizadas por abelhas de médio e grande porte, especialmente abelhas do gênero *Epicharis*. A formação de frutos quase somente por polinizações cruzadas, o atraso na penetração dos óvulos pelos tubos polínicos em pistilos autopolinizados (embora a maioria dos óvulos nos mesmos pistilos sejam penetrados) e o aborto uniforme dos pistilos autopolinizados num intervalo relativamente curto após a polinização, indicam a ocorrência da LSI em *C. antisiphilitica*.

Palavras-chave: Auto-incompatibilidade de ação tardia, *Cybistax*, Bignoniaceae, sistema reprodutivo, biologia floral, melitofilia, polinização.

6.2. Introdução

Única espécie do gênero, *Cybistax antisyphilitica* (Martius) Martius (Bignoniaceae) apresenta ampla distribuição na América do Sul, estendendo-se por todo o território brasileiro extra-amazônico até o Paraguai, a Bolívia e a porção mais árida da vertente amazônica dos Andes peruanos, tendo ainda uma população disjunta ao extremo sul do Suriname (Gentry 1992). Trata-se de uma espécie particularmente freqüente no cerrado (Lorenzi 1992). No Brasil, *C. antisyphilitica* é popularmente conhecida como ipê-verde, caroba-brava, cinco-chagas e ipê-mandioca (Martins & Girnos 2000).

No único estudo até então publicado sobre análise filogenética em Bignoniaceae, baseado em seqüências combinadas (*rbcL* e *ndhF*) de cpDNA, Spangler & Olmstead (1999) sugerem que os taxa *Cybistax*, *Tabebuia* e *Crescentieae* constituam um grupo monofilético bastante derivado na família, embora as relações entre estes taxa sejam ainda mal definidas. Segundo Gentry (1990), *C. antisyphilitica* está entre as espécies de Bignoniaceae das quais menos se tem registros sobre a biologia reprodutiva, desconhecendo-se até mesmo quais são os visitantes de suas flores. Não há registros sobre estudos de sistema reprodutivo realizados com *C. antisyphilitica*. No presente trabalho foram realizados estudos sobre a biologia reprodutiva desta espécie, através da observação dos eventos e dos visitantes florais, experimentos de polinizações manuais controladas e determinação do sítio de resposta de auto-incompatibilidade.

6.3. Material e Métodos

Descrição da espécie

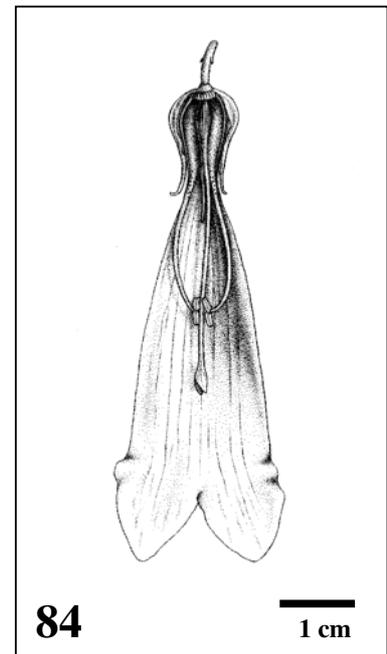
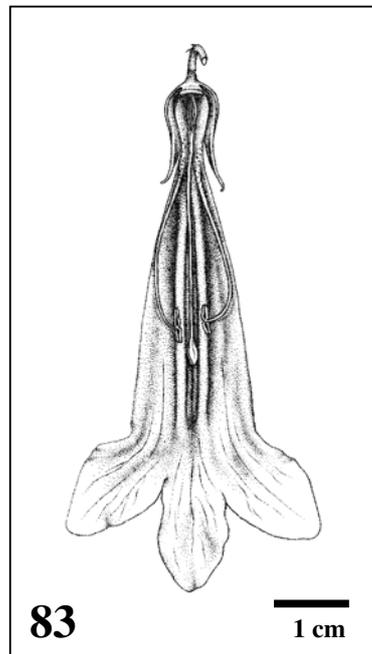
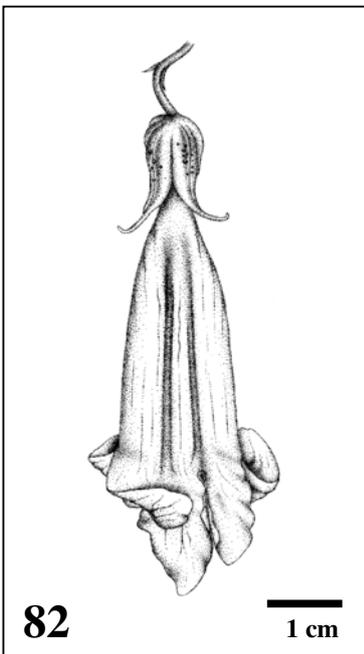
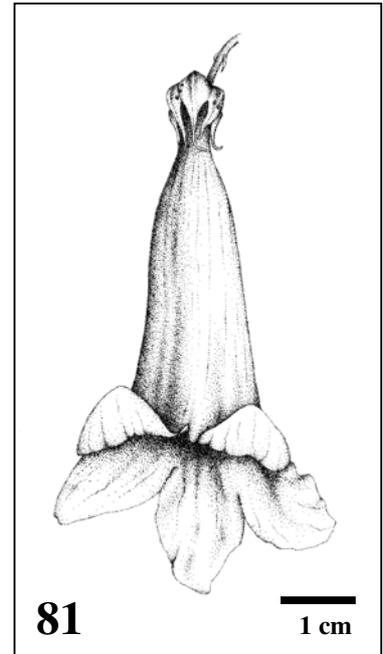
Árvore decídua de 1,5-20 m de altura, com folhas digitadas 5-7 folioladas, apresentando filotaxia decussada. As inflorescências são tirsos terminais, semi-pendulados, bastante ramificados e portando ramos dicasiais (figura 80). Cada inflorescência pode produzir de 13 a 82 flores, e uma vez que o desenvolvimento das inflorescências é precedido pelo rebrotamento das folhas novas dos nós subjacentes, as flores ficam semi-ocultas sob a folhagem. As flores (figuras 81-84, 85-89) são de cor

verde-limão, porém bem mais claras na região dos lobos da corola, e não apresentam odor. O cálice é glabro, clorofilado, apresentando lobos terminados em lacínios e conspícuos nectários extraflorais (figuras 82-83 e 91). Estes últimos são funcionais e frequentemente foram vistos sendo visitados por formigas, vespas e abelhas. A corola é tubular-campanulada, 5-lobada, pendente, com fauce ântero-posteriormente achatada. O lado anterior do tubo corolino apresenta duas pregas longitudinais, entre as quais há um sulco estendendo-se da abertura da câmara nectarífera até a base do lobo anterior (figuras 82-83). O lobo anterior da corola é ligeiramente curvo e voltado para cima, de modo que sua área basal assume o formato de uma pequena concha (figura 85). O androceu é didínamo, apresentando um estaminódio posterior de tamanho reduzido. As anteras são rimosas, ditecas e apicefixas, produzindo grãos de pólen de coloração amarela. A base do ovário é envolvida por um disco nectarífero anular-puvinado. O ovário é ovóide-oblongo, ligeiramente comprimido no plano dorsiventral e longitudinalmente costado. O estilete terminal possui 3,2-3,8 cm de comprimento e é encimado por um estigma bilamelado, sensível ao toque. O fruto capsular é elíptico, alongado e com ápice acuminado, apresentando deiscência longitudinal perpendicular ao septo placentário e valvas naviculares percorridas por costelas longitudinais. As sementes exalbuminosas apresentam embrião cordiforme envolvido em um núcleo seminífero (corpo) achatado, cuja margem é totalmente envolvida por uma ala hialino-membranácea.

Procedimentos

Os estudos de campo foram realizados com árvores cultivadas no Campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Município de Campinas, Estado de São Paulo, nos períodos de setembro à fevereiro dos anos de 1999/2000 e 2000/2001. A presença de inflorescências e flores em antese foi verificada em 6 árvores, ao longo das duas estações de floração. Foram marcados 100 botões florais em 13 inflorescências pertencentes a dois indivíduos para o monitoramento dos eventos florais. Os dados foram registrados em vários horários da manhã ou da tarde, sendo que em uma das

inflorescências marcadas em cada árvore (total de 12 flores) foram feitas pelo menos duas observações à cada dia. Medições do volume e da concentração do néctar foram realizadas nos mesmos indivíduos,



Figuras 80-84: *Cybistax antisiphilitica*. 80: Inflorescência. 81: Flor - lado posterior. 82: Flor - lado anterior. 83 e 84: Flores seccionadas longitudinalmente. 83: Vista da superfície interna do lado anterior. 84: vista da superfície interna do lado posterior.

tanto em botões florais como em flores de primeiro dia de antese, previamente ensacadas com redes de nylon, utilizando-se seringa microvolumétrica e refratômetro de bolso. Observações dos visitantes foram feitas durante a realização dos experimentos de polinizações manuais e durante a verificação dos eventos florais, em diversos horários entre as 6:00 e as 19:00 horas, totalizando mais de 400 horas de observação. Os principais visitantes foram capturados para observação da deposição de grãos de pólen e montagem à seco para identificação.

Os experimentos de polinizações manuais controladas foram realizados em 3 indivíduos durante a primeira estação de floração e em 3 outros indivíduos na segunda estação. Inflorescências inteiras, contendo botões florais em vários estádios de desenvolvimento, foram ensacadas com redes de nylon. Subseqüentemente, flores em antese de primeiro dia foram autopolinizadas (com pólen da mesma flor ou de outras flores da mesma planta), ou submetidas à polinização cruzada (com pólen de outro indivíduo) e re-ensacadas. As polinizações manuais foram feitas de modo a cobrir com grãos de pólen toda a superfície receptiva do estigma (i.e. toda a superfície ventral de ambas as lâminas estigmáticas). Várias flores foram marcadas e ensacadas para testar a ocorrência de autopolinização espontânea. Flores não-ensacadas foram marcadas para o monitoramento da frutificação natural (controle). As flores foram marcadas com linhas coloridas, uma cor para cada tratamento. Testes de coloração citoplasmática dos grãos de pólen das anteras proximais e distais em 5 flores das árvores 2 e 3 foram feitos com carmim-acético (Radford *et al.* 1974). Frutos em início de deiscência, resultantes de polinizações cruzadas manuais, foram coletados entre o 5º e o 6º mês após o período de realização das polinizações para a contagem do número de sementes. Cinquenta sementes sadias, i.e. portando um embrião de forma e tamanho normais (ver Resultados), e mais 10 sementes portando embrião atrofiado foram tratadas com hipoclorito de sódio 0,5% e submetidas ao teste de germinação em câmara climática Eletrolab 102 FC, à 25º C e 12 horas de fotoperíodo.

Parte dos pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada dos experimentos realizados na segunda estação de floração foram utilizados nas análises do crescimento dos tubos

polínicos e da incidência de óvulos penetrados. Os pistilos de ambos os tratamentos foram coletados nos intervalos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a polinização e fixados em FAA50 (formaldeído 4%, ácido acético glacial e etanol 50% nas proporções de 5:5:90%; Johansen 1940). Em pelo menos 5 pistilos de cada tratamento e intervalo, a porção acima do ovário (i.e. o estilete e o estigma) foi amolecida e clarificada com NaOH 9N à 65° C por aproximadamente 30 minutos e corada com azul-de-anilina para a verificação da germinação dos grãos de pólen e do crescimento dos tubos polínicos em microscópio de epi-fluorescência (Martin 1959). Os valores das distâncias percorridas pelos tubos polínicos no estilete, nos intervalos de 24 e 48 horas após a polinização, foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov com aderência Lilliefors e ao teste *t* bicaudal (Ayres et al. 2000). Os ovários foram submetidos à microdissecção em estereomicroscópio de modo a remover a sua parede, expondo assim os óvulos. Em seguida, os ovários dissecados foram submetidos ao mesmo tratamento dado aos estiletos/estigmas. Sobre uma lâmina histológica contendo uma gota de azul-de-anilina, os óvulos de cada ovário foram raspados com o auxílio de uma agulha histológica, de modo a se soltarem da superfície placentária. Os óvulos embebidos em corante foram cobertos com lamínula e analisados em microscópio óptico Olympus BX 40 e em microscópio de epi-fluorescência Leitz Diaplan para a quantificação do número de óvulos penetrados (i.e. apresentando um pedaço de tubo polínico atado à micrópila) e de óvulos não-penetrados (i.e. sem tubo polínico) (Gibbs & Bianchi 1993). Registros fotográficos foram obtidos utilizando-se diapositivos Fujichrome Provia 100F. Os óvulos cuja presença ou não de tubo polínico na micrópila era duvidosa foram desconsiderados. O teste estatístico do qui-quadrado foi utilizado para comparar o número de óvulos penetrados e não-penetrados em pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada, em cada um dos intervalos de tempo após a polinização, combinando os totais dos 5 pistilos de cada tratamento. Os cálculos do qui-quadrado foram feitos utilizando-se o software BioEstat 2.0. Foram analisados 20.997

óvulos²⁴ de um total de 70 pistilos.

6.4. Resultados

Fenologia de floração

Os períodos de floração de *C. antisyphilitica* na área de estudos são mostrados na Tabela 14. A floração concentrou-se principalmente entre os meses de outubro à dezembro, embora tenha-se observado uma certa divergência entre e indivíduos quanto ao início e termino da floração. Além disso, alguns indivíduos apresentaram episódios de 2 ou 3 florações durante cada estação. Pelo menos um indivíduo (n^o 5) não floresceu em uma das estações verificadas.

Tabela 14: Períodos de floração de *Cybistax antisyphilitica* no Campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) nas duas estações de floração investigadas.

Árvore n ^o	1999				2000		2000				2001	
	set.	out.	nov.	dez.	jan.	fev.	set.	out.	nov.	dez.	jan.	fev.
1	██████████							██████████		██████████		
2			██████████					██████████		██████████		
3			██████████					██████████		██████████		
4	██████████			██████████				██████████				
5								██████████				
6			██████████			██████████			██████████	██████████		██████████

Eventos florais

Os botões florais levaram cerca de 21 dias para completar o seu desenvolvimento, desde o primórdio de botão floral (\cong 0,5 cm de comprimento) até a abertura dos lobos da corola. O egresso floral ocorreu quando o botão apresentava entre 1,5 e 2,0 cm de comprimento. O tempo decorrente entre o egresso floral e o início da antese foi de aproximadamente 9 dias. Botões florais pouco antes início da abertura dos lobos (pré-antese) apresentaram em média 5,5 cm de comprimento (n = 22). O

²⁴ Este valor corresponde à soma de todos os óvulos nos 70 pistilos examinados. O total de óvulos computados como

tempo que os lobos da corola levaram para se distender, de seu posicionamento imbricado nos botões em pré-antese até a flor totalmente aberta, foi verificado em duas ocasiões e durou em torno de uma hora e meia. A antese durou apenas um dia, sendo que cada inflorescência apresentou 0-4 flores em antese à cada dia. A abertura de flores individuais (início da antese) foi verificada ao longo de todo o dia, e o murchamento da corola teve início ainda no primeiro dia de antese (em flores que se abriram no início da manhã), ou no dia seguinte. A abscisão da corola ocorreu usualmente no dia seguinte ao da abertura da flor.

A deiscência das anteras é anterior à abertura dos lobos da corola. O início da deiscência foi verificado em botões florais com cerca de 4,5 cm de comprimento e, neste estágio, os estames já se encontram em sua posição usual verificada na flor em antese, i.e. didínamos, com os filetes curvos (figuras 83-84) e extremidade distal voltada para o eixo longitudinal mediano da flor e para cima, com as anteras tocando o teto do tubo corolino. Porém o movimento de abdução das tecas (cf. *Tabebuia pulcherrima*, Bittencourt Jr. & Mariath 1997) só se completa momentos antes da abertura dos lobos da corola, quando as anteras já se encontram totalmente abertas e com a face interna de suas valvas voltada para baixo (i.e. para o "assoalho" do tubo corolino), expondo totalmente os grãos de pólen.

A abertura do estigma é igualmente anterior ao início da antese, pois as extremidades distais das lamelas estigmáticas começam a se afastar uma da outra aproximadamente no mesmo estágio em que se observa a deiscência estomial, quando a superfície ventral (receptiva) das lamelas estigmáticas apresentam papilas túrgidas e brilhantes. A curvatura dos lobos estigmáticos prossegue após iniciada a antese, sendo interrompida apenas ao ser tocado; do contrário o movimento culmina com o enrolamento dos lobos estigmáticos para trás, no final da antese.

No primeiro dia de antese o estigma é esverdeado, tornando-se amarelado e passando a apresentar sinais de murcha no dia seguinte. Em flores de primeiro dia, o fechamento do estigma

penetrados e não-penetrados foi de 14.533 óvulos.

induzido pelo toque ocorreu em apenas 10-15 segundos, e o fechamento foi permanente em todos os estigmas polinizados. Na maioria das flores monitoradas até o final da antese, o estigma se encontrava fechado e apresentando grãos de pólen nas margens dos lobos²⁵, indicando que a flor havia sido visitada e polinizada.

O volume e a concentração de açúcares no néctar em flores de primeiro dia variou entre 31,50 - 98,50 µl (65,75±18,14 µl, média ± desvio padrão) e 23,5 - 29,5% (25,7±1,2%, média ± desvio padrão), respectivamente (n = 22). Medidas realizadas em botões florais em pré antese (comprimento do botão ≅ 5,5 cm) indicaram volume e concentração iguais a 16,04±1,19 µl e 25,7±0,6% (média ± desvio padrão, n = 5). Em flores ensacadas, parte do néctar acumulado freqüentemente escorreu ao longo da fenda longitudinal do lado anterior ("assoalho") da corola (figura 83), formando uma gota junto à concavidade da base do lobo anterior, de modo que parte do néctar ficava exposto do lado de fora da fauce. Manchas de necrose, indicando o término da atividade secretora do disco, foram verificadas em flores cuja corola apresentava sinais de murcha. Porém após a abscisão da corola, vestígios de néctar foram freqüentemente verificados dentro do cálice, os quais eram forrageados por formigas, vespas e abelhas Meliponinae.

Visitantes

As abelhas que visitaram as flores de *C. antisiphilitica* durante as estações investigadas são apresentadas na Tabela 15. Esta listagem não tem a pretensão de esgotar os forrageadores das flores da espécie estudada, mesmo porque o estudo foi conduzido somente com indivíduos cultivados em área urbana. Não obstante, fornece indicações conclusivas quanto aos polinizadores potenciais e efetivos de *C. antisiphilitica* na área de estudos.

²⁵ A presença de grãos de pólen na superfície estigmática pôde ser facilmente verificada com auxílio de lupa de bolso, pois a coloração amarela do pólen contrastava com a cor esverdeada do estigma.

Em larga escala, os visitantes mais freqüentes foram machos de abelhas do gênero *Epicharis* (figuras 85-88), sendo que sua atividade nas inflorescências de *C. antisyphilitica* foi verificada ao longo de todo o dia. Freqüentemente se observou visitas de até quatro abelhas deste gênero ao mesmo tempo, numa mesma árvore, não raro apresentando comportamentos agonísticos. Em cada seqüência de visitas, a abelha visitava duas ou mais flores da mesma inflorescência, quase sempre passando por várias inflorescências antes de abandonar o local. Ao visitar uma flor, a abelha pousava preferencialmente no lobo anterior da corola (figura 86), caminhando sobre a superfície ventral do lado anterior ("assoalho") do tubo até alcançar a câmara nectarífera, e contatando o estigma e as anteras com o dorso do tórax. A deposição nototribica de grãos de pólen foi constatada após visitas de flores recém-abertas. Além de visitar flores abertas, as abelhas também visitaram botões florais em pré-antese, utilizando-se de suas mandíbulas para rasgar os lobos imbricados da corola e penetrar o tubo (figura 87). É provável que estas abelhas utilizem as flores de *C. antisyphilitica* não somente como fonte de alimento, mas também como abrigo temporário, pois em algumas ocasiões se observou a abelha permanecer imóvel dentro do tubo corolino (com a cabeça voltada para a câmara nectarífera) por vários minutos (figura 88).

Visitas de *Euglossa* sp. foram bem menos freqüentes do que as de *Epicharis* (foram presenciadas de zero à três visitas ao dia numa mesma árvore). As visitas ocorreram tanto durante a manhã como à tarde. Ao visitar uma inflorescência, a abelha sempre apresentava o característico comportamento de pairar vários segundos à frente de uma flor aberta, antes de pousar geralmente no lobo anterior da corola e penetrar a fauce, caminhando até o fundo do tubo para alcançar o néctar. Entretanto as abelhas fêmeas visitaram as flores também para coletar pólen nas anteras. Visitas de *Xylocopa brasilianorum*, *Oxaea austera* e *O. flavescens* ocorreram várias vezes ao longo do dia, embora estas abelhas sempre pousassem do lado de fora da corola (figuras 89-90), perfurando a base do tubo para ter acesso ao néctar, portanto atuando apenas como pilhadoras. Além das espécies citadas na Tabela 15, foram também observadas visitas de várias espécies não identificadas de Meliponinae e Halictidae, sendo que as primeiras forrageavam o pólen e vestígios de néctar que permaneciam dentro

do cálice após a abscisão da corola, e as últimas foram vistas somente pilhando pólen. Visitas dos principais pilhadores de néctar (*Xylocopa* e *Oxaea*) e pólen (*Trigona*) não foram verificadas durante a primeira metade da floração em cada indivíduo.

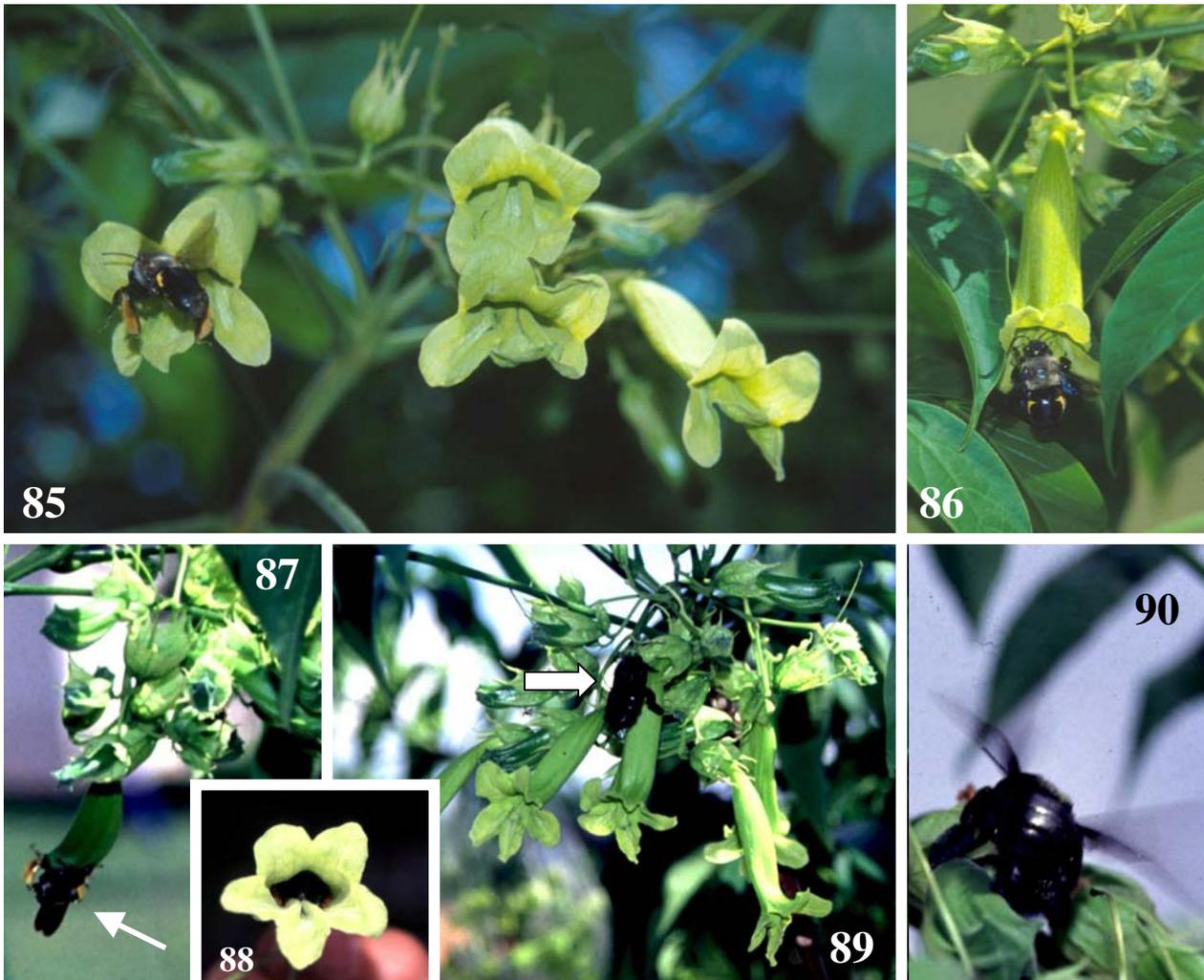
Tabela 15: Abelhas visitantes das flores de *Cybistax antisyphilitica* no Campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Espécie	Tribo, Família	Tipo de visita - recurso forrageado
<i>Epicharis (Epicharana)</i> sp. (macho)	Centridini, Apidae	Legítima - néctar
<i>Epicharis (Triepicharis)</i> cf. <i>schrottkyi</i> (macho)	Centridini, Apidae	Legítima - néctar
<i>Epicharis (Epicharis)</i> sp. (fêmea)	Centridini, Apidae	Legítima - néctar
<i>Euglossa</i> sp. (macho e fêmea)	Euglossini, Apidae	Legítima - néctar
<i>Apis mellifera</i>	Apini, Apidae	Legítima - pólen
<i>Trigona spinipes</i>	Meliponinae, Apidae	Legítima ou ilegítima ²⁶ - pólen
<i>Xylocopa (Neoxylocopa) brasilianorum</i>	Xylocopini, Apidae	Ilegítima - néctar
<i>Oxaea austera</i>	Oxaeninae, Andrenidae	Ilegítima - néctar
<i>Oxaea flavescens</i>	Oxaeninae, Andrenidae	Ilegítima - néctar

Sistema reprodutivo

Os resultados dos experimentos de polinizações realizados na primeira estação de floração são mostrados na Tabela 16. Não ocorreu formação de frutos por autopolinização espontânea, e apenas uma flor autopolinizada (0,62% do total das autopolinizações) formou fruto. Embora a proporção de frutos formados por polinizações cruzadas, relativamente ao número de flores utilizadas neste tratamento, tenha sido baixa, a maior parte das polinizações cruzadas nos indivíduos 2 e 3 foram cruzamentos recíprocos, os quais não resultaram em formação de frutos. Ainda assim, a produção de frutos por

²⁶ Frequentemente, estas abelhas utilizavam-se de suas fortes mandíbulas para fazer aberturas no tubo corolino de botões florais, penetrando em seu interior para coletar grãos de pólen. A pilhagem de pólen por *Trigona spinipes* intensificou-se particularmente no final de cada floração, ocasiões em que quase todos os botões florais foram violados por estas abelhas.



Figuras 85-90: Visitantes das flores de *Cybistax antisiphilitica*. 85-86: *Epicharis* visitando flores em antese. 87: *Epicharis* violando um botão floral (seta). 88: *Epicharis* utilizando a flor como abrigo temporário. 89-90: *Xylocopa* pilhando néctar em uma flor em antese (89, seta) e em um botão floral (90).

polinizações naturais foi inferior à frutificação por polinizações cruzadas manuais. O teste do carmim-acético revelou a presença de citoplasma em mais de 96% dos grãos de pólen em flores das árvores 2 e 3. Descartou-se a possibilidade da rejeição recíproca do pólen entre as árvores 2 e 3 ser decorrente das mesmas serem clones, pois embora estas árvores se localizassem muito próximas uma da outra (distanciadas por não mais do que 3 m), diferenças fenotípicas entre estes indivíduos quanto à morfologia do cálice foram verificadas (figura 91).

Tabela 16: Experimentos de polinizações controladas e frutificação em *Cybistax antisiphilitica*, durante a primeira estação.

Árvore n ^o .	Autopolinização			Autopolinização manual						Polinização			Polinização		
	espontânea			I			II			cruzada manual			natural (controle)		
	n ^o fl.	n ^o fr.	% fr.	n ^o fl.	n ^o fr.	% fr.	n ^o fl.	n ^o fr.	% fr.	n ^o fl.	n ^o fr.	% fr.	n ^o fl.	n ^o fr.	% fr.
1	50	0	0	15	0	0	20	1	5	37 ^a	19	51,4	56	0	0
2	64	0	0	57	0	0	33	0	0	56 ^b	0	0	33	1	3
3	16	0	0	16	0	0	19	0	0	84 ^a	0	0	33	4	12,1
Total	130	0	0	88	0	0	72	0	1,39*	177	19	10,7	122	5	4,1

a. Maior parte das polinizações com pólen proveniente da árvore n^o 2.

b. Maior parte das polinizações com pólen proveniente da árvore n^o 3.

* Percentagem de frutos em relação ao número total de autopolinizações (I + II): 0,62%.

I: com o pólen da mesma flor; II: com o pólen de outra flor da mesma planta; fl. = flores; fr. = frutos.

Os resultados dos experimentos realizados na segunda estação são apresentados na Tabela 17.

Não houve formação de frutos por autopolinização manual ou espontânea. O indivíduo n^o 5 não frutificou e, tal como na estação anterior a produção de frutos por polinizações naturais foi muito inferior à produção de frutos resultantes de polinizações cruzadas manuais.

Tabela 17: Experimentos de polinizações controladas e frutificação em *Cybistax antisiphilitica*, durante a segunda estação.

Árv. n ^o .	Autopolinização			Autopolinização manual						Polinização			Polinização		
	espontânea			I			II			cruzada manual			natural (controle)		
	n ^o fl.	n ^o fr.	% fr.	n ^o fl.	n ^o fr.	% fr.	n ^o fl.	n ^o fr.	% fr.	n ^o fl.	n ^o fr.	% fr.	n ^o fl.	n ^o fr.	% fr.
1	0	0	0	30	0	0	29	0	0	76 ^a	50	65,8	100	1	1
4	100	0	0	182	0	0	100	0	0	0	0	0	100	2	2
5	60	0	0	32	0	0	32	0	0	70 ^b	0	0	100	0	0
6	40	0	0	8	0	0	8	0	0	10 ^c	6	60	0	0	0
Total	200	0	0	252	0	0	169	0	0	156	56	35,9	300	3	1,3

a. Pólen proveniente da árvore n^o 4. b. Pólen proveniente das árvores n^{os} 1 e 2.

c. Pólen proveniente de outras árvores, não registradas.

I: com o pólen da mesma flor; II: com o pólen de outra flor da mesma planta; fl. = flores; fr. = frutos.

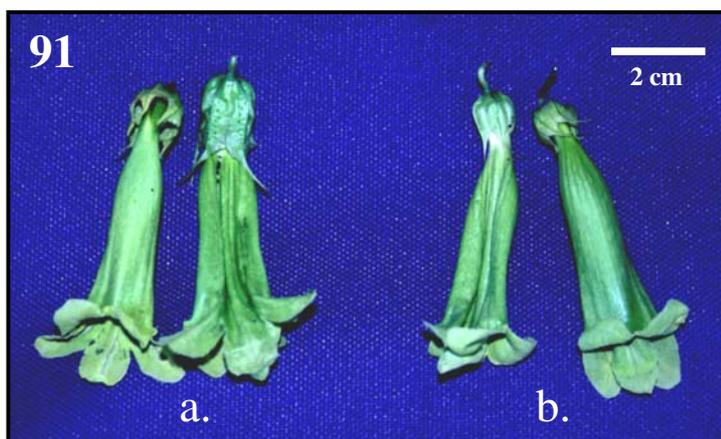


Figura 91: Flores das árvores 3 (a) e 2 (b). A árvore 3 apresentou flores com cálice maior e mais aberto do que o das flores da árvore 2 .

Crescimento dos tubos polínicos no estilete

Os resultados da análise de microscopia de fluorescência sobre o crescimento dos tubos polínicos no estilete de pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada são apresentados na Tabela 18. Tanto em autopolinizações como em polinizações cruzadas, centenas tubos polínicos alcançaram a porção ovariana do tecido transmissor, penetrando muitos óvulos no intervalo de 72 horas após a polinização (figuras 92-94). O teste *t* para a distância percorrida pelos tubos polínicos nos intervalos de 24 e 48 horas, relativamente ao comprimento total do estilete, não indicou discrepância estatisticamente significativa entre pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada ($p > 0,05$).

Penetração dos óvulos

Os resultados das contagens de óvulos penetrados e não-penetrados são mostrados na Tabela 19 e na figura 96. No intervalo de 48 horas após a polinização, alguns poucos óvulos penetrados foram observados em pistilos submetidos à polinização cruzada, ao passo que nenhum óvulo penetrado foi verificado em pistilos autopolinizados. Nos intervalos subsequentes, o número de óvulos penetrados nas polinizações cruzadas foi sempre significativamente superior ao número de óvulos penetrados em autopolinizações ($\chi^2 = 111,0$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 66,9$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 137,0$, $df = 1$, $p <$

Tabela 18: Crescimento dos tubos polínicos no estilete em pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada em *Cybistax antisiphilitica*, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a polinização (média \pm desvio padrão²⁷, n = 3 pistilos).

Tratamento	24h		48h		72h	
	c. e.	d. p. (%)	c. e.	d. p. (%)	c. e.	d. p. (%)
autopolinização	3,73 \pm 0,02	2,51 \pm 0,07 (67%)	3,76 \pm 0,07	3,37 \pm 0,20 (90%)	3,68 \pm 0,11	3,68 \pm 0,11 (100%)
polinização cruzada	3,54 \pm 0,01	2,24 \pm 0,11 (63%)	3,58 \pm 0,15	3,46 \pm 0,15 (97%)	3,69 \pm 0,13	3,69 \pm 0,13 (100%)

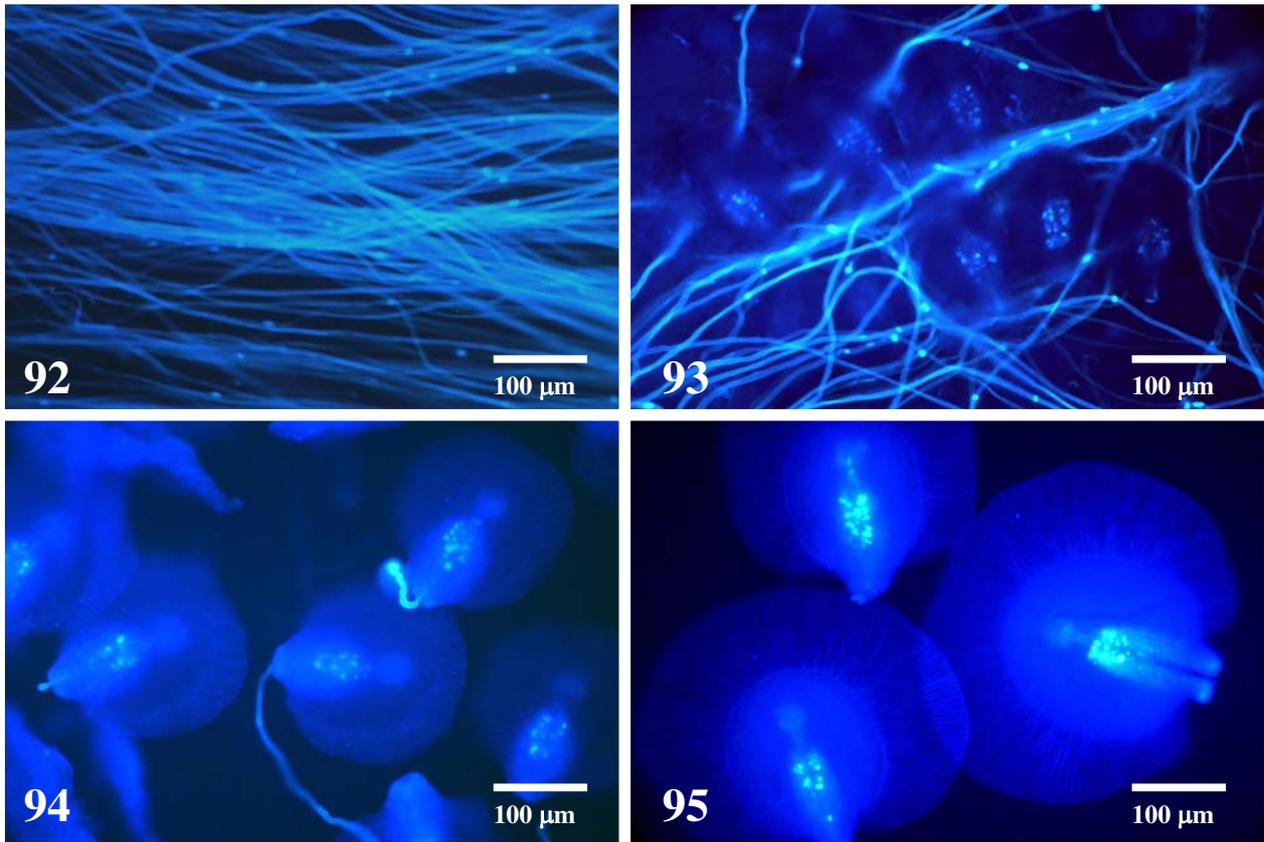
c. e. = comprimento do estilete (cm); d. p. (%) = distância percorrida pelos tubos polínicos (cm) e percentagem da distância até o topo do ovário. O teste *t* (tanto para dados percentuais submetidos à transformação arco-seno como para dados não-transformados) não indicou diferença estatisticamente significativa entre autopolinizações e polinizações cruzadas em nenhum dos intervalos ($p > 0,05$).

Tabela 19: Incidência de óvulos penetrados e não-penetrados* 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após autopolinizações e polinizações cruzadas em *Cybistax antisiphilitica*.

	48h		72h		96h		120h		144h		168h	
	auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz	auto	cruz
np.	1030 (100%)	991 (99,7%)	1058 (94,2%)	716 (78,5%)	1008 (76,6%)	613 (60,9%)	810 (66,1%)	436 (41,6%)	559 (51,8%)	245 (28,0%)	305 (38,1%)	166 (14,9%)
pen.	0 (0%)	3 (0,3%)	65 (5,8%)	196 (21,5%)	307 (23,4%)	393 (39,1%)	416 (33,9%)	613 (58,4%)	520 (48,2%)	630 (72,0%)	496 (61,9%)	949 (85,1%)
Tot.	1030	994	1123	912	1315	1006	1226	1049	1079	875	801	1115

* Foram analisados 5 ovários de cada tratamento e de cada intervalo após a polinização. np. = óvulos não-penetrados; pen. = óvulos penetrados; Tot. = soma dos óvulos penetrados e não-penetrados (i.e. excluindo-se os duvidosos).

²⁷ O desvio padrão neste caso não reflete a verdadeira variação no crescimento dos tubos polínicos, pois o ponto médio aproximado da distância percorrida por centenas de tubos polínicos ao longo do tecido transmissor do estilete, em cada intervalo após a polinização, foi estabelecido visualmente.



Figuras 92-94: Fotomicrografias de fluorescência em pistilos de *Cybistax antisiphilitica*. 92: Tubos polínicos na base do estilete, 48 horas após autopolinização. 93: Tubos polínicos no ovário, 72 horas após autopolinização. 94: Óvulos penetrados, 96 horas após autopolinização (observar ala emergente). 95: Sementes jovens com ala emergente, 168 horas após polinização cruzada.

0,001, $\chi^2 = 113,1$, $df = 1$, $p < 0,001$, $\chi^2 = 135,2$, $df = 1$, $p < 0,001$, respectivamente), sendo que a maioria dos óvulos, tanto em polinizações cruzadas como em autopolinizações, foi penetrada no intervalo de 168 horas.

Os ovários de pistilos autopolinizados apresentaram um ligeiro crescimento, porém inferior ao dos pistilos submetidos à polinização cruzada no mesmo período (figura 97). Os pistilos não polinizados sofreram abscisão entre o 4^o e o 6^o dias após o início da antese, e os pistilos autopolinizados entre o 6^o e o 8^o dias após a polinização.

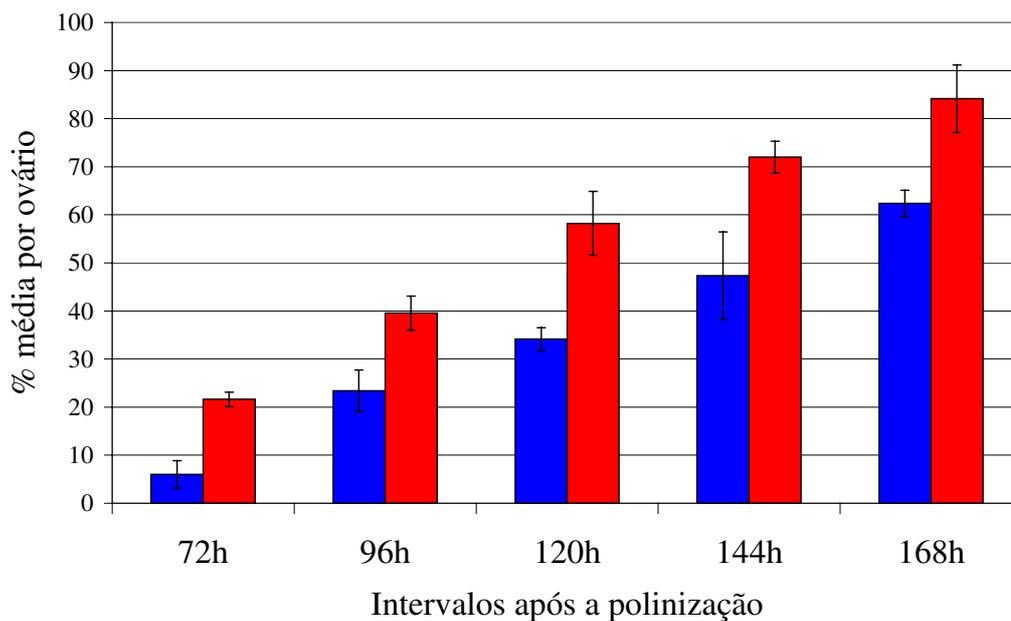


Figura 96: Incidência de óvulos penetrados em ovários de *Cybistax antisiphilitica*, segundo metodologia proposta por Gibbs & Bianchi 1993. Para cada tratamento e intervalo após a polinização, foram utilizados 5 pistilos. As barras verticais indicam os desvios padrões. ■ autopolinização; ■ polinização cruzada.

Produção e viabilidade das sementes

Os resultados das contagens óvulos por ovário e de sementes em frutos obtidos por polinização cruzada manual são mostrados na Tabela 20. As sementes puderam ser classificadas em três categorias, conforme suas dimensões, a presença, o formato e o tamanho do embrião: (1) sementes normais - sementes de tamanho normal (comprimento e largura = $2,88 \pm 0,23$ x $4,06 \pm 0,32$ cm), apresentando embrião cordiforme e de tamanho normal (comprimento e largura = $5,40 \pm 0,55$ x $7,10 \pm 0,82$ mm) (n = 5) -; (2) sementes anormais tipo I - sementes de tamanho normal, mas com embrião atrofiado, i.e. de formato irregular e tamanho reduzido (comprimento e largura = 2,4 x 3,5 mm, ou menor) -; (3) sementes anormais tipo II - sementes de tamanho normal ou reduzido (i.e. em um *continuum* de tamanhos inferiores à 2,4 cm de comprimento por 3,5 cm de largura), destituídas de embrião. As sementes normais e as sementes sem embrião compreenderam cerca de 65% e 30% do total de sementes por fruto, respectivamente. Das sementes submetidas ao teste de germinação, apenas 76% das

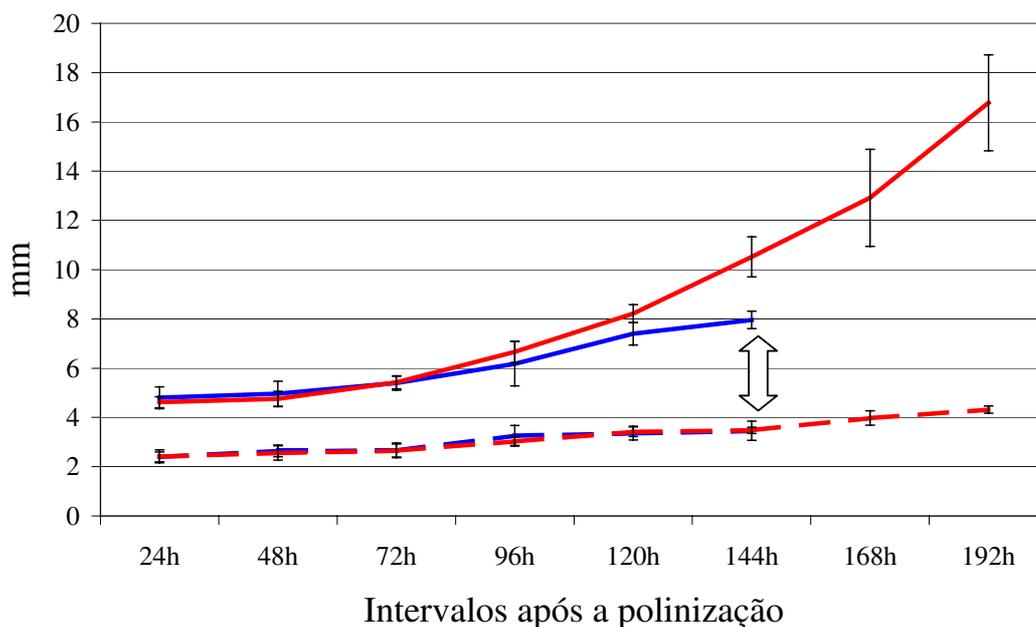


Figura 97: Crescimento do ovário de *Cybistax antisiphilitica* após autopolinização (azul) e polinização cruzada (vermelho). — comprimento; - - - largura. Para cada tratamento e intervalo após a polinização foram medidos 5 pistilos. A seta indica a abscisão dos pistilos autopolinizados.

sementes normais germinaram, o que corresponde a uma viabilidade em torno de 50% do total de sementes por fruto.

Tabela 20: Número de sementes por fruto resultante de polinização cruzada manual e número de óvulos por ovário em *Cybistax antisiphilitica*.

	Número de frutos/pistilos examinados	Média	Desvio padrão
Sementes normais	10	206,9	46,4
Sementes anormais tipo I	10	14,3	8,5
Sementes anormais tipo II	10	98,7	28,3
Óvulos por ovário	70	300*	46

O teste *t* bicaudal indicou diferença significativa entre o número de sementes normais por fruto e o número de óvulos por ovário ($p < 0,01$). *O valor aqui apresentado é ligeiramente subestimado, devido à perda de alguns óvulos em cada pistilo, durante o processamento do material para contagem de óvulos penetrados.

6.5. Discussão

Biologia floral

As flores de *C. antisiphilitica* são melitófilas, produzindo néctar abundante, cuja concentração de açúcares é comparável à encontrada em outras espécies com flores zigomorfas, polinizadas por abelhas (Kevan & Baker 1983). A variação encontrada para o volume de néctar na flor provavelmente decorreu de limitações do método de amostragem, pois uma vez que a abertura da flor (i.e. o início da antese) ocorreu a qualquer hora ao longo do dia, não houve nenhum controle em relação a quanto tempo teria decorrido do início da antese até o momento em que o néctar foi mensurado em cada flor amostrada, e portanto sobre quanto néctar teria sido acumulado na flor no mesmo período. A presença de néctar em botões florais em pré-antese, bem como o comportamento das *Epicharis* de violar estes botões florais para forragear néctar, demonstram que a produção do néctar se inicia antes da abertura da flor.

Por apresentar corola membranácea e estames inclusos, a flor de *C. antisiphilitica* se ajusta relativamente bem ao tipo *Anemopaegma*, conforme a classificação morfológica proposta por Gentry (1974); porém devido ao achatamento antero-posterior do tubo corolino, a flor de *C. antisiphilitica* deve ser considerada intermediária entre os tipos *Anemopaegma* e *Cydista* da mesma classificação. A morfologia da corola, com o seu sulco longitudinal estendendo-se ao longo da superfície ventral do lado anterior do tubo, bem como a observação de que parte do néctar secretado escorre por este sulco até acumular-se na base do lobo anterior, sugerem uma importante estratégia de atração de polinizadores à curtas distâncias pela apresentação do próprio néctar, junto à abertura do tubo corolino²⁸. Tal interpretação é corroborada pela observação de que muitas vezes as flores ensacadas pareciam ser mais atrativas às abelhas do gênero *Epicharis* do que as não ensacadas, pois freqüentemente estas abelhas pousavam sobre as redes de nylon, frente à abertura de flores em antese

²⁸ Flores não visitadas tenderiam a se tornar cada vez mais atrativas aos polinizadores, durante o período de antese, devido ao acúmulo de néctar na base do lobo anterior.

nelas contidas, e tentavam cortar a rede com suas mandíbulas (porém sem o conseguir) para ter acesso ao néctar retido na base do lobo anterior. Uma vez que em algumas espécies o néctar reflete a radiação UV, sendo portanto possível que os polinizadores sejam nestes casos atraídos visualmente pelo néctar (Thorp *et al.* 1975), análises da possível reflexão da luz UV pelo néctar de *C. antisiphilitica* seriam relevantes para um melhor entendimento do significado funcional da apresentação do néctar junto à abertura do tubo corolino.

Embora a presença de um sulco entre duas dobras longitudinais no "assoalho" do tubo corolino seja uma característica morfológica compartilhada por muitas espécies de diferentes tribos de Bignoniaceae (Gentry 1974, Yanagizawa 1983, Amaral 1992), em algumas espécies, tais como em *Stizophyllum perforatum* (Amaral 1992) e na espécie presentemente estudada, este sulco parece ser mais profundo. Devido às visitas de borboletas de grande porte (*Papilio astyalys* e *Battus polydamas*, Papilionidae) observadas em *Stizophyllum perforatum*, Amaral (1992) interpretou a fenda longitudinal do lado anterior do tubo corolino como "guia de língua". Em *C. antisiphilitica* a polinização por borboletas deve ser descartada, pois o ovário multiovulado e o grande número de sementes em frutos formados por polinização natural nesta espécie, tornam improváveis tanto o transporte de um número proporcionalmente grande de grãos de pólen aderidos à probólide de borboletas como a sua deposição eficaz no estigma. Por outro lado, um acúmulo de néctar em sulcos longitudinais da superfície interna do lobo anterior da corola, semelhante ao observado em *C. antisiphilitica*, foi também relatado em *Chilopsis linearis*, Bignoniaceae (Whitham 1977), uma espécie melitófila.

Embora não tenham sido feitos testes de reflexão de luz ultravioleta pela flor, tomadas em conjunto, as constatações acima citadas quanto ao modo de apresentação do néctar, bem como a coloração esverdeada das flores, o fato das inflorescências ficarem semi-ocultas sob a folhagem, e a ausência dos principais pilhadores de néctar ou pólen na primeira metade do período de floração em cada indivíduo, sugerem a atuação de uma sofisticada estratégia de atração preferencial dos polinizadores efetivos, em detrimento das visitas de forrageadores que não contribuiriam, ou mesmo

poderiam prejudicar o sucesso reprodutivo de *C. antisiphilitica*. Não obstante o efeito positivo da pilhagem de néctar sobre o sucesso reprodutivo de algumas espécies tenha sido sugerido diversas vezes (e.g. Heinrich & Raven 1972, Gentry 1978, Camargo *et al.* 1984, Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1988, Vieira *et al.* 1992, Santos & Machado 1998, Dutra & Machado 2001), há escassez de estudos experimentais que testem tal hipótese e, embora estudos realizados em *Impatiens capensis* (Zimmerman & Cook 1985) e em *Corydalis caseana* (Maloof 2001), tenham indicado que a presença dos pilhadores de néctar induz os polinizadores legítimos a voar distâncias mais longas para satisfazer as suas necessidades energéticas, aumentando assim o fluxo de pólen e favorecendo a xenogamia, um estudo realizado em *Ipomopsis aggregata* (Irwin & Brody 1998) indicou que a pilhagem de néctar causa um decréscimo na produção de frutos e sementes, com um efeito negativo sobre a aptidão da planta.

Os resultados das observações de campo indicaram que as abelhas do gênero *Epicharis* foram os principais polinizadores de *C. antisiphilitica* na área de estudos, não só devido à frequência elevada de suas visitas, como também pelo porte corporal, a presença de pêlos abundantes no dorso torácico (os quais auxiliam a adesão dos grãos de pólen nesta região) e o comportamento de visita destas abelhas às flores da espécie estudada. Não obstante, a deposição geitonogâmica (i.e. incompatível) de pólen no estigma deve ser altamente favorecida, uma vez que as abelhas visitam muitas flores de várias inflorescências à cada seqüência de forrageamento. Esta provavelmente é a principal causa da baixa taxa de frutificação natural verificada na população, tendo em vista que a maior parte das flores em antese aparentemente foi visitada e polinizada por estas abelhas. *Euglossa* sp. atuou apenas como polinizador secundário, não só por sua baixa frequência de visitas, como também devido ao seu porte reduzido. Todavia o achatamento ântero-posterior do tubo corolino e a fenda longitudinal característica do seu lado anterior provavelmente direcionam os movimentos da abelha durante a visita, induzindo-a a tocar inadvertidamente a superfície receptiva do estigma e, portanto, atuar como polinizadora.

Sistema reprodutivo

Do total de 581 flores autopolinizadas manualmente durante as duas estações de floração, apenas uma (0,17%) formou fruto, claramente indicando que *C. antisiphilitica* é uma espécie auto-incompatível. Não obstante, isto se deve a algum tipo de LSI, uma vez que a maioria dos óvulos em pistilos autopolinizados foi penetrada e fecundada até 168 horas após a polinização, semelhantemente ao verificado em *Tabebuia aurea*, *T. ochracea* (Gibbs & Bianchi 1993), *T. nodosa* e *Dolichandra cynanchoides* (Gibbs & Bianchi 1999). O fato das flores não polinizadas terem sofrido abscisão até o 5º dia após o fim da antese, enquanto a abscisão dos pistilos autopolinizados foi verificada entre o 6º e o 8º dias após a polinização, bem como o pequeno crescimento do ovário em pistilos autopolinizados antes de sua abscisão, são indicativos de que algum desenvolvimento posterior à penetração dos óvulos (e.g. iniciação do endosperma em óvulos fecundados) deve provavelmente ocorrer nos pistilos autopolinizados. Entretanto, tal como verificado nas espécies de Bignoniaceae investigadas por Gibbs & Bianchi (1993, 1999), os pistilos autopolinizados em *C. antisiphilitica* são abortados uniformemente, i.e. durante um curto período após a polinização, o que normalmente está associado a um mecanismo de auto-incompatibilidade, e não seria esperado se a auto-esterilidade verificada em *C. antisiphilitica* fosse decorrente de depressão endogâmica, situação em que o aborto dos óvulos/sementes deveria ocorrer em vários estádios de desenvolvimento (Seavey & Bawa 1986, Sage *et al.* 1994).

A rejeição recíproca de grãos de pólen observada nos cruzamentos entre os indivíduos 2 e 3, após aproximadamente 130 flores polinizadas, claramente indica a inter-incompatibilidade entre os mesmos, pois a formação de frutos por polinização natural (Tabela 16) permitiu descartar a possibilidade destas árvores serem estéreis. A possibilidade das mesmas árvores serem clones deve igualmente ser descartada, uma vez que, a despeito de estarem localizadas muito próximas uma da outra (portanto sob influência das mesmas vicissitudes ambientais), estas árvores apresentaram diferenças macromorfológicas, especialmente quanto à morfologia do cálice. Além disso, embora o

resultado do teste de coloração citoplasmática não seja propriamente um indicador de viabilidade dos grãos de pólen (ver capítulo 5), exclui pelo menos em parte a possibilidade de uma baixa viabilidade decorrente de malformações dos grãos de pólen nas árvores 2 e 3. Admitindo-se a existência de SI com base genética do tipo mais comum em *C. antisiphilitica*, i.e. o controle genético da SI por um único *locos* multialélico, diferentes causas poderiam ser atribuídas à inter-incompatibilidade observada entre os indivíduos 2 e 3, e.g. o casual compartilhamento de alelos idênticos no *locus S*, e/ou a ocorrência de um número restrito de alelos alternativos na população investigada. Infelizmente, o estabelecimento de uma base genética para a SI em uma dada espécie só pode ser realizado com estudos de cruzamentos dialélicos, envolvendo várias gerações de indivíduos da espécie analisada. Isto torna a determinação do mecanismo genético da SI em plantas perenes, com seus longos ciclos de vida, quase sempre uma tarefa inexecutável. Porém, cruzamentos adicionais, envolvendo maior número de indivíduos, inclusive em populações naturais poderiam pelo menos fornecer dados sobre a frequência com a qual a inter-incompatibilidade intraespecífica ocorre em *C. antisiphilitica*.

Os resultados da análise do crescimento dos tubos polínicos no estilete sugerem não haver diferença significativa entre pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada quanto às taxas de crescimento dos tubos polínicos. Não obstante, alguns poucos óvulos foram penetrados em pistilos submetidos à polinização cruzada no intervalo de 48 hora após a polinização, ao passo que nenhum óvulo penetrado foi verificado em pistilos autopolinizados no mesmo intervalo. Nos intervalos de 72-168 horas após a polinização, a incidência de óvulos penetrados foi sempre significativamente maior em polinizações cruzadas, relativamente às autopolinizações. Estes resultados claramente indicam que, embora não tenham sido encontradas evidências de interações "negativas" entre os tubos polínicos e o estilete em pistilos autopolinizados, a baixa incidência de penetração dos óvulos sinaliza uma menor eficácia dos tubos polínicos no ovário, a qual pode ser decorrente de um mecanismo de reconhecimento tardio e rejeição dos tubos polínicos incompatíveis. O mesmo atraso na penetração dos

óvulos em pistilos autopolinizados foi verificado em *Tabebuia nodosa* e *Dolichandra cynanchoides* (Gibbs & Bianchi 1999).

Embora o número médio de sementes produzidas em frutos resultantes de polinização compatível (i.e. polinização cruzada) e excessiva tenha sido equivalente ao número médio de óvulos por ovário, apenas a metade destas sementes eram viáveis. Além disso, cerca de 5% do total de sementes apresentaram embriões atrofiados e 30% eram sementes destituídas de embrião. Estudos recentes em *Epilobium obcordatum* demonstraram que mesmo os óvulos não fecundados podem ser induzidos a se desenvolver em sementes estéreis, devido a sua proximidade com óvulos fecundados do mesmo fruto, os quais seguem um padrão normal de transformação em sementes (Seavey *et al.* 2000). Portanto, as sementes sem embrião verificadas em frutos de *C. antisiphilitica* poderiam ser decorrentes do desenvolvimento de óvulos não-fecundados, ou mesmo com qualquer tipo de malformação pré-zigótica do saco embrionário. Entretanto, a elevada taxa de penetração dos óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada até o intervalo de 168 horas sugere, indiretamente, uma frequência média de fecundação relativamente alta (85%, ver Tabela 19)²⁹, de modo que a esterilidade de pelo menos parte das sementes destituídas de embrião resultou de distúrbios dos eventos posteriores à penetração dos óvulos ou do desenvolvimento pós-zigótico. Além disso, a presença de sementes estéreis portando embriões atrofiados, em frutos de *C. antisiphilitica* resultantes de polinizações cruzadas manuais, indica que a ocorrência de malformações no desenvolvimento embrionário por si só não é evidência suficiente para a ocorrência de depressão endogâmica, pois sementes contendo embriões malformados são comuns mesmo em frutos resultantes de polinizações cruzadas.

²⁹ Este valor pode ter sido subestimado, caso os óvulos que não foram considerados, por sua condição duvidosa como penetrados ou não, na verdade sejam óvulos penetrados, nos quais a ruptura do tubo polínico durante a preparação do material ocorreu dentro da micrópila (ver capítulo 5.3).

6.6. Literatura Citada

- AMARAL, M. E. C. 1992. **Ecologia floral de dez espécies da tribo Bignoniae (Bignoniaceae) em uma floresta semidecídua no município de Campinas, SP.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L. & SANTOS, A. S. 2000. **BioEstat 2.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas de Ciências Biológicas e Médicas.** Belém: Sociedade Civil Mamirauá.
- BITTENCOURT Jr., N. S. & MARIATH, J. E. A. 1997. Ontogenia dos estratos parietais da antera de *Tabebuia pulcherrima* Sandw. (Bignoniaceae). **Acta Botanica Brasílica 11:** 9-30.
- CAMARGO, J. M. F.; GOTTSBERGER, G. & SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. 1984. On the phenology and flower visiting behavior of *Oxaea flavescens* (Klug) (Oxaeinae, Andrenidae, Hymenoptera) in São Paulo, Brazil. **Beiträge zur Biologie der Pflanzen 59:** 159-179.
- DUTRA, J. C. S. & MACHADO, V. L. L. 2001. Entomofauna visitante de *Stenolobium stans* (Juss.) Seem (Bignoniaceae), durante seu período de floração. **Neotropical Entomology 30:** 43-53.
- GENTRY, A. H. 1974. Coevolutionary patterns in Central American Bignoniaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden 61:** 728-759.
- GENTRY, A. H. 1978. Anti-pollinators of mass-flowering plants? **Biotropica 10:** 68-69.
- GENTRY, A. H. 1990. Evolutionary patterns in Neotropical Bignoniaceae. **Memories of the New York Botanical Garden 55:** 118-129.
- GENTRY, A. H. 1992. Bignoniaceae - Part II (Tribe Tecomeae). **Flora Neotropica: Monograph 25 (II).** Organization for Flora Neotropica, New York.
- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta 106:** 64-71.
- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1999. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany 84:** 449-457.

- HEINRICH, B. & RAVEN, P. H. 1972. Energetics and pollination ecology. **Science** **176**: 597-602.
- IRWIN, R. E. & BRODY, A. K. 1998. Nectar robbing in *Ipomopsis aggregata*: effects on pollinator behavior and plant fitness. **Oecologia** **116**: 519-527.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill.
- KEVAN, P.G. & BAKER, H. G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. **Annual Review of Entomology** **28**: 407-453.
- LORENZI, H. 1992. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum.
- MALOOF, J. E. 2001. The effects of a bumble bee nectar robber on plant reproductive success and pollination behavior. **American Journal of Botany** **88**: 1960-1965.
- MARTIN, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes by means of fluorescence. **Stain Technology**. **34**: 125-128.
- MARTINS, L. M. & GIRNOS, E. C. 2000. Morfologia de frutos e sementes e morfo-anatomia de plântulas de duas espécies arbóreas do cerrado, Município de Afonso Cunha, Martanhão. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica** **16**: 29-52.
- RADFORD, A. E.; DICKINSON, W. C.; MASSEY, J. R. & BELL, C. R. 1974. **Vascular Plant Systematics**. New York: Harper & Tow Publ.
- SAGE, T. L.; BERTIN, R. J. & WILLIAMS, E. G. 1994. Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. *In* **Genetic Control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants**. (E. G. Willianms; A. E. Clarke & R. B. Knox, eds.). Kluwer Academic, Dordrecht, p.116-140.
- SAGE, T. L.; STRUMAS, F.; COLE, W. W. & BARRETT, S. C. 1999. Differential ovule development following self- and cross-pollination: The basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). **American Journal of Botany** **86**: 855-870.
- SANTOS, M. J. L. & MACHADO, I. C. 1998. Biologia floral e heterostilia am *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Clusiaceae). **Acta Botanica Brasilica** **12**: 451-464.

- SEAVEY, S. R. & BAWA, K. S. 1986. Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. **The Botanical Review** **52**:195-219.
- SEAVEY, S. R.; MANGELS, S. K. & CHAPPEL, N. J. 2000. Unfertilized ovules of *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) continue to grow in developing fruits. **American Journal of Botany** **87**: 1765-1768.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. & GOTTSBERGER, G. 1988. A polinização de plantas do cerrado. **Revista Brasileira de Biologia** **48**: 651-663.
- SILVEIRA, F. A.; ALMEIDA, E. A. B. & MELO, G. A. R. **Taxonomia da Abelhas do Brasil - Chaves de Identificação**. Belo Horizonte: Comitê para Coleções Taxonômicas do ICB, Universidade Federal de Minas Gerais.
- SPANGLER, R. E. & OLMSTEAD, R. G. 1999. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences rbcL and ndhF. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **86**: 33-46.
- THORP, R. W.; BRIGGS, D. L.; ESTES, J. R. & ERICKSON, E. H. 1975. Nectar fluorescence under ultraviolet irradiation. **Science** **189**: 476-478.
- VIEIRA, M. F.; MEIRA, R. M. S. A.; QUEIROZ, L. P. & MEIRA NETO, J. A. A. 1992. Polinização e reprodução de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. (Bignoniaceae) em área de Cerrado do Sudeste Brasileiro. **Anais do 8º Congresso da SBPC**, 13-19.
- WHITHAM, T. G. 1977. Coevolution of foraging in *Bombus* and nectar dispensing in *Chilopsis*: A last dreg theory. **Science** **197**: 593-596.
- YANAGIZAWA, Y. 1983. **Aspectos da Biologia Floral de Espécies de Arrabidaea e Jacaranda, no Município de Botucatu, SP**. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- ZIMMERMAN, M. & COOK, S. 1985. Pollinator foraging, experimental nectar-robbing and plant fitness in *Impatiens capensis*. **American Midland Naturalist** **113**: 84-91.

7. Variação do Sistema Reprodutivo e Aspectos da Biologia Floral no Gênero *Tabebuia* Gomes (Bignoniaceae)

7.1. Resumo - Embora o sistema reprodutivo tenha sido determinado em apenas 9 das cerca de 100 espécies de *Tabebuia*, todas revelaram-se auto-incompatíveis, sendo que nas 4 espécies onde o sítio de reação de incompatibilidade foi verificado, encontrou-se indicações da LSI. Porém a poliembrião tem sido verificada em *T. chrysotricha* e em *T. ochracea*, sendo que nesta última a origem adventícia dos embriões supranumerários foi constatada. No presente trabalho, a biologia reprodutiva de *T. chrysotricha*, *T. heptaphylla*, *T. impetiginosa*, *T. umbellata* e *T. vellosi* foi investigada através de experimentos de polinizações controladas (intra- e interespecíficas), observação dos eventos e dos visitantes florais e testes de germinação das sementes. Além disso, a análise do desenvolvimento *in situ* dos tubos polínicos, por microscopia de fluorescência, e o estudo histológico quantitativo dos eventos posteriores à autopolinização vs. polinização cruzada, foram feitos em *T. vellosi* e *T. impetiginosa*, respectivamente. As florações ocorreram predominantemente no período mais seco do ano, i.e. de julho à setembro. A duração da antese variou entre 1 à 6 dias, embora as flores usualmente sejam receptivas apenas durante o 1º dia. Todas as espécies foram polinizadas por abelhas de médio e grande porte. Somente *T. chrysotricha* e *T. heptaphylla* formaram frutos por autopolinização, em proporções comparáveis à frutificação resultante de polinizações cruzadas, e tanto as sementes obtidas por autopolinização como por polinização cruzada apresentaram altos índices de germinação. A poliembrião foi verificada somente em sementes de *T. chrysotricha* e de frutos resultantes dos cruzamentos entre *T. chrysotricha* e *T. ochracea*, indicando portanto que a quebra da auto-incompatibilidade em *Tabebuia* não está necessariamente associada à apomixia. *Tabebuia impetiginosa*, *T. umbellata* e *T. vellosi* são 100% auto-incompatíveis. Embora a taxa de crescimento dos tubos polínicos em pistilos de *T. vellosi*, submetidos à polinização cruzada, tenha sido maior que em pistilos autopolinizados, a diferença não foi estatisticamente significativa. A penetração dos óvulos

iniciou-se mais cedo em pistilos submetidos à polinização cruzada; porém centenas de óvulos foram penetrados em pistilos autopolinizados. Em *T. impetiginosa*, embora a maioria dos óvulos em pistilos autopolinizados também tenha sido penetrada e fecundada, verificou-se não só um atraso na incidência de penetração, fecundação e iniciação do desenvolvimento endospérmico, mas também uma desaceleração do progresso de desenvolvimento endospérmico precedendo a abscisão dos pistilos autopolinizados. Em todas as espécies auto-incompatíveis, o aborto dos pistilos autopolinizados ocorreu em um curto período após a polinização, sendo que em *T. umbellata* nenhum crescimento do ovário posterior à autopolinização foi verificado. Todos estes resultados são congruentes com a ocorrência de LSI em *T. impetiginosa*, *T. umbellata* e *T. vellosi*, não tendo sido encontradas evidências de que a auto-esterilidade nestas espécies seria decorrente dos efeitos de genes recessivos deletérios. Os testes de polinizações interespecíficas indicaram a ocorrência de inter-fertilidade uni- ou bilateral entre algumas espécies de *Tabebuia*, sugerindo a inexistência de barreiras genéticas que impeçam a hibridização e a introgressão gênica entre as mesmas.

Palavras-chave: Sistemas reprodutivos, auto-incompatibilidade de ação tardia, auto-compatibilidade, poliembrião, apomixia, *Tabebuia*, Bignoniaceae, polinização, biologia floral inter-fertilidade.

7.2. Introdução

O gênero *Tabebuia* compreende cerca de 100 espécies de árvores e arbustos neotropicais, ocorrendo desde os 28° de latitude norte (Sonora e Chihuahua, México e Ilhas Bahamas) até o norte da Argentina e Uruguai (Gentry 1973, 1992). Muitas das espécies arbóreas são de grande importância econômica, devido a sua ampla utilização na indústria madeireira e na composição de paisagens urbanas. Embora existam vários trabalhos abordando aspectos da biologia floral em espécies de *Tabebuia* (e.g. Knuth 1905, Janzen 1967, Borrero 1972, Gentry 1973, 1974a, b, 1976, 1978, Reich & Borchert 1982, Stevens 1991, Thomas & Dave 1992, Vitali & Machado 1995, Figueiroa & Fournier

1996 e Barros 2001 - ver Tabela 1), muitos destes trabalhos são levantamentos em várias espécies de diversas famílias, abordando diferentes aspectos da biologia reprodutiva porém não fornecendo informações detalhadas sobre a biologia floral de cada espécie. O sistema reprodutivo foi determinado de modo conclusivo em 9 espécies (Bawa 1974, Bawa & Webb 1984, Seavey & Bawa 1986, Bullock 1985 e Gibbs & Bianchi 1993, 1999 - ver Tabela 2), sendo que a auto-incompatibilidade foi verificada em todas elas. Entretanto, estudos sobre os sítios de barreira de incompatibilidade foram realizados em apenas 4 espécies (Tabela 2) e em todas elas foram encontradas indicações da ocorrência de algum tipo de auto-incompatibilidade de ação tardia.

A auto-incompatibilidade de ação tardia (LSI), também conhecida como auto-incompatibilidade ovariana (OSI), e a depressão endogâmica de ação precoce são dois diferentes tipos de auto-esterilidade que, embora se manifestem de maneira muito semelhante - i.e. a baixa produtividade ou mesmo a não-formação de frutos e sementes por autopolinização, a despeito do desenvolvimento dos tubos polínicos em pistilos autopolinizados ser aparentemente tão bem sucedido como em polinizações cruzadas -, resultam de causas totalmente diversas (Seavey & Bawa 1986, Klekowski 1988, Sage *et al.* 1994). Na LSI, o aborto de pistilos autopolinizados ocorre devido a ação de um genuíno mecanismo de incompatibilidade, controlado provavelmente por um conjunto de genes com relações de dominância entre si (Cope 1962), ou por um único *locus* S principal (Lipow & Wyatt 2000). Já na depressão endogâmica de ação precoce, o aborto de pistilos autopolinizados é desencadeado pela expressão de genes deletérios recessivos, durante o desenvolvimento do embrião ou do endosperma (Klekowski 1988, Nic Lughadha 1998). Entretanto, alguns autores parecem referir-se à LSI e à depressão endogâmica de ação precoce como um mesmo fenômeno (e.g. Nettancourt 1977, Wiens 1984). Além disso, embora vários tipos de análise tenham sido propostos para se distinguir entre a depressão endogâmica e a LSI (Seavey & Bawa 1986, Sage *et al.* 1994), dentre elas a verificação da incidência de óvulos penetrados (Gibbs & Bianchi 1999) e a análise histológica quantitativa dos eventos pré- e pós-zigóticos (Sage *et al.* 1999) em diferentes intervalos de tempo após autopolinizações e polinizações

cruzadas, a discriminação entre os dois fenômenos é uma tarefa laboriosa e difícil, e a LSI frequentemente tem sido atribuída a espécies para as quais estas análises não foram realizadas.

Embora a família Bignoniaceae seja citologicamente pouco conhecida (Bawa 1973, Goldblatt & Gentry 1979, Piazzano 1998), com base em um estudo sobre determinação do número cromossômico de várias espécies, pertencentes à diversos gêneros e tribos desta família, Goldblatt & Gentry (1979) salientaram que os gêneros de Bignoniaceae são muito constantes, citologicamente, sendo a poliploidia uma condição rara. Ainda segundo o referido estudo, das 8 espécies de *Tabebuia* até então citologicamente investigadas, apenas *Tabebuia chrysantha* revelou-se $2n = 38$; em todas as demais espécies³⁰, inclusive *T. impetiginosa* e *T. heptaphylla*, o número cromossômico encontrado foi $2n = 40$. Não obstante, a ocorrência de poliploidia, i.e. $2n = 80$, foi constatada em *Macfadyena unguis-cati* (Bowden 1945, Venkatasubban 1945, Jullier 1989, Piazzano 1998) e, mais recentemente, em *T. chrysotricha* (Piazzano 1998, Matos 2003) e em *T. ochracea* (Matos 2003). Paralelamente, a ocorrência de poliembrião tem sido relatada em *T. chrysotricha* (Piazzano 1998, Sampaio *et al.* 2000) e em *T. ochracea* (Costa *et al.* 2000, Costa & Sampaio 2001, Salomão & Allem 2001, Sampaio 2002). Além disso, a origem esporofítica dos embriões supranumerários em *T. ochracea*, i.e. a partir de células da hipóstase e do endotélio, foi recentemente determinada por Sampaio *et al.* (2002) e Sampaio (2002). Questiona-se se a poliembrião e a poliploidia seriam fenômenos de algum modo relacionados, uma vez que os mesmos co-ocorrem em 2 das 3 espécies para as quais o número cromossômico $2n = 80$ foi verificado (não há registros sobre a ocorrência de poliembrião em *Macfadyena unguis-cati*). Quanto aos sistemas reprodutivos, a ocorrência de LSI foi verificada em *T. ochracea* (Gibbs & Bianchi 1993) e, embora com base em um número limitado de polinizações manuais, Vitali & Machado (1995) sugeriram a auto-compatibilidade facultativa em *T. chrysotricha*. Tais constatações evidenciam a

³⁰ O mesmo número cromossômico foi posteriormente verificado em *T. pulcherrima* (Piazzano 1998).

importância da realização de estudos mais detalhados sobre a biologia reprodutiva das espécies poliplóides de Bignoniaceae.

No presente trabalho foram investigados os sistemas reprodutivos - através de experimentos de polinizações controladas (intra- e interespecíficas) e testes de germinação das sementes - e aspectos da biologia floral de *Tabebuia chrysotricha* (Martius ex de Candolle) Standley, *T. heptaphylla* (Vellozo) Toledo, *T. impetiginosa* (Martius ex de Candolle) Standley, *T. umbellata* (Sonder) Sandwith e *T. vellosi* Toledo. Foram também realizados a análise do sítio de reação de incompatibilidade por microscopia de fluorescência em *T. vellosi*, e o estudo histológico comparativo dos eventos posteriores à autopolinização vs. polinização cruzada em *T. impetiginosa*.

7.3. Material e Métodos

Áreas de estudo

O estudo foi realizado entre os anos de 1999 e 2002. O estudo de *T. vellosi* foi feito com plantas nativas, encontradas em matas ciliares dos campos rupestres do Alto do Palácio (19°10'S, 43°30'W), localidade que faz parte da Área de Proteção Ambiental (APA) do Morro da Pedreira, pertencente ao Parque Nacional da Serra do Cipó (voucher UEC n^{os}. 108.671, 109.191; coletor n^{os}. 99/27, 99/30). O clima nesta região é do tipo temperado chuvoso, segundo a classificação de Köppen (Antunes 1986), e a vegetação está compreendida no bioma do cerrado (Costa *et al.* 1998). Para *T. chrysotricha* foram utilizadas tanto plantas nativas localizadas na vertente sul e extremo leste da Serra da Mantiqueira, nos Municípios de Santa Rita de Jacutinga (22°10'S, 44°05'W) e Bom Jardim de Minas (21°57'S, 44°12'W), Minas Gerais (voucher UEC n^{os}. 109.106, 111.863, 114.057, 115.058, 115.059), como árvores cultivadas no Campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O clima da área de estudos das populações naturais de *T. chrysotricha* é do tipo subtropical de altitude, segundo a classificação de Köppen (Antunes 1986), e a vegetação original é de floresta estacional semidecidual

(Costa *et al.* 1998). O estudo das demais espécies foi realizado apenas com árvores cultivadas no Campus da UNICAMP.

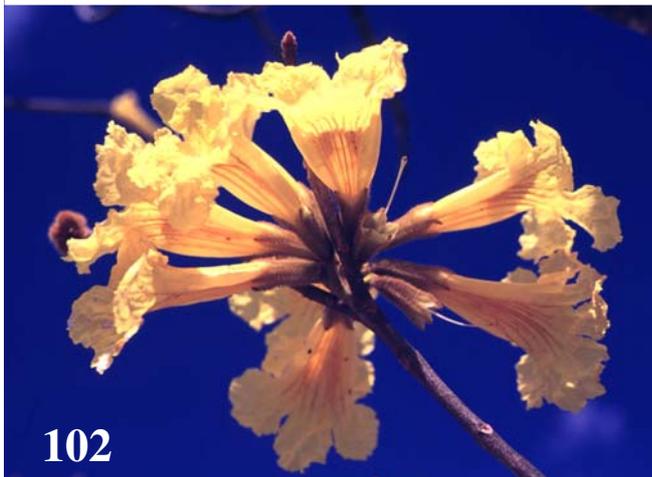
Descrição das espécies

Segue-se características usuais da morfologia de *Tabebuia*: folhas digitadas, 5-7-folioladas; filotaxia decussada; inflorescências terminais, tirsóides ou botrióides; cálice 5-lobado ou 5-dentado, com pilosidade bastante variável; corola amarela, rosa ou branca, tubular-infundibuliforme, 5-lobada; estames didínamos com estaminódio posterior reduzido, apresentando tricomas glandulares pedunculados na base dos filetes; anteras ditecas e apicefixas, rimosas, adjacentes ao "teto" do tubo e, após deiscentes, com a superfície interna das valvas voltadas para baixo, expondo os grãos de pólen; disco nectarífero anular-puvinado em torno da base do gineceu; ovário linear-oblongo, bicarpelar e bilocular, glabro ou apresentando tricomas tectores ou glandulares (ou ambos), não raro também apresentando nectários extraflorais; cápsula loculicida, linear-cilíndrica, coriácea, glabra ou pubescente, frequentemente apresentando nectários extraflorais; sementes anemocóricas, exalbuminosas, bialadas, com embrião cordiforme envolvido em um núcleo seminífero (corpo) achatado, e alas membranáceas, translúcidas ou opacas. A maioria das espécies de *Tabebuia* caracteriza-se pela floração sazonal, com produção maciça de flores durante 3-10 semanas, ou por floração explosiva durante apenas alguns dias - florações dos tipos "cornucopia" e "big-bang", respectivamente, segundo a classificação proposta por Gentry (1974). Alguns estudos têm demonstrado que a floração em várias espécies de *Tabebuia*, incluindo *T. impetiginosa* e *T. ochracea*, resulta do rebrotamento de seus ramos prolépticos (já diferenciados em meristemas florais), desencadeado pela reidratação da planta, durante ou no final da estação seca, seja devido a precipitações ou à diminuição da evapotranspiração, decorrente da queda das folhas (Reich & Borchert 1982, Borchert 1983, 1992, 1994).

Segundo Gentry (1992), *Tabebuia chrysotricha* (figuras 97-99) é árvore da Mata Atlântica brasileira, com 2-10 m de altura, bastante comum em ambientes de restinga, mas também encontrada em florestas arbustivas abertas, tais como em topos de morros e áreas perturbadas, especialmente em solos arenosos. Suas flores (figuras 102-103) são grandes³¹ (4-7,5 cm de comprimento, 2-3,5 cm de largura da fauce e 5,5-8,5 cm de envergadura dos lobos) e com corola vivamente amarela, apresentando achatamento antero-posterior da fauce, guias de nectário de cor ferrugínea e tricomas tectores uniseriados na superfície ventral do lado anterior, convergindo para o fundo do tubo. O cálice caracteriza-se pela densa cobertura de tricomas tectores ramificados de cor marrom-ferrugínea na sua superfície externa (dorsal), sendo que os mesmos tricomas estão mais esparsamente distribuídos ao longo das nervuras principais da face externa (dorsal) da corola.

Em áreas de pastagens da região de Santa Rita de Jacutinga e Bom Jardim de Minas, *T. chrysotricha*, localmente conhecida como "pau-mulato", comporta-se como espécie extremamente robusta e resistente, reproduzindo-se vegetativamente por brotamento do sistema axial subterrâneo. Este sistema de reprodução não parece ser muito comum em outras espécies de *Tabebuia*, e aparentemente está associado às perturbações decorrentes da manutenção das áreas de pastagens, pois em muitas delas *T. chrysotricha* pareceu ser a espécie lenhosa mais abundante, com "indivíduos" muito pouco afastados entre si e raramente ultrapassando 1 m de altura (figuras 100-101). O rebrotamento dos seus ramos aéreos nestas áreas de pastagens também se dá ano após ano, sempre que o mato é roçado ou queimado. Em virtude do desmatamento constante no local, poucos indivíduos alcançam maturidade suficiente para ostentar um porte mais avantajado. Entretanto, alguns indivíduos esparsos são sempre preservados e seu tronco rígido e resistente é localmente utilizado na fabricação de cabos de ferramentas.

³¹ Relativamente ao tamanho das flores na maioria das espécies de *Tabebuia*.



Figuras 97-103: *Tabebuia chrysotricha*. 97: Hábito de uma árvore em floração, cultivada no Campus da UNICAMP. 98: Hábito de uma árvore nativa em floração, localizada na Serra da Mantiqueira. 99: Hábito de uma arboreta nativa com aproximadamente 2,5 m de altura, localizada em área de pastagem na Serra da Mantiqueira. 100-101: Indivíduos jovens localizados em área de pastagem na Serra da Mantiqueira. 102-103: Inflorescências em árvore nativa (102) e em árvore cultivada (103).

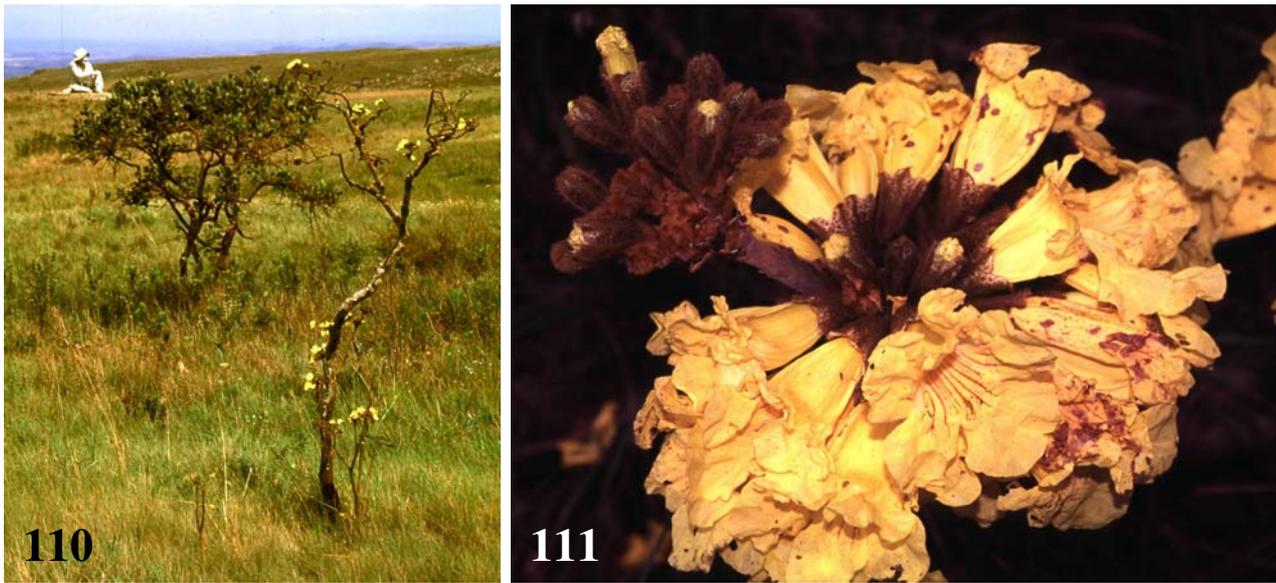
Tabebuia chrysotricha e *T. ochracea* são espécies muito relacionadas, e a ocorrência natural de formas intermediárias entre *T. ochracea*, uma espécie típica dos cerrados do Planalto Central Brasileiro, e *T. chrysotricha* tem sido citada na literatura (e.g. Gentry 1992), o que provavelmente se deve à eventos de hibridização e introgressão gênica entre estas taxa, e freqüentemente ocasiona problemas na identificação dos espécimes. Além disso, *T. chrysotricha* também é muito semelhante à *T. pedicellata*, uma espécie de distribuição restrita à região costeira do Rio de Janeiro e à caatinga do interior de Minas Gerais (Gentry 1992). Na área de estudos do presente trabalho na Serra da Mantiqueira, foram encontrados somente indivíduos da morfo-espécie *T. chrysotricha*, conforme as descrições de Gentry (1992) para *T. chrysotricha* e espécies afins.

Tabebuia impetiginosa (figura 106) é talvez a espécie de ipê-roxo mais comum encontrada no país. De ampla distribuição neotropical, ocorre desde o noroeste do México até o noroeste da Argentina. Tem preferência por florestas estacionais decíduais ou semi-decíduais, ocorrendo também em regiões áridas da Amazônia (Gentry 1992). Alcança até 30 m e é proximamente relacionada à *T. heptaphylla* (figura 104), sendo esta última mais comum na mata atlântica da região litorânea da Bahia ao Rio Grande do Sul, ocorrendo também no oeste do Paraná e Rio Grande do Sul, Paraguai, nordeste da Argentina e esparsamente no oeste da Bolívia (Gentry 1992). As flores de *T. impetiginosa* e *T. heptaphylla* são muito semelhantes (figuras 105 e 107) e sua coloração se modifica ao envelhecer (ver Resultados). As duas espécies distinguem-se principalmente por sua distribuição predominantemente alopatrica, mas também por algumas características morfológicas, tais como inflorescências em geral mais globulares (i.e. congestionadas, figura 106) e o folíolo inteiro em *T. impetiginosa*, ao passo que as inflorescências apresentam flores mais espaçadas entre si e folíolo geralmente serrado em *T. heptaphylla*.

Tabebuia umbellata é uma árvore de Mata Atlântica com 5-25 m de altura, distribuindo-se desde o Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (Gentry 1992). Suas flores (figuras 108-109). são



Figuras 104-105: *Tabebuia heptaphylla*. 104: Hábito. 105: Inflorescências. Figuras 106-107: *T. impetiginosa*. 106: Hábito. 107: Inflorescência. Figuras 108-109: Inflorescências de *T. umbellata*.



Figuras 110-111: *Tabebuia vellosi*. 110: Em primeiro plano, arboreta em floração. 111: Inflorescências.

amarelas, com fauce achatada ântero-posteriormente, apresentando guias de néctar de cor ferrugínea sobre as reentrâncias das nervuras principais no "assoalho" do tubo corolino.

Tabebuia vellosi (figura 110) é árvore de 2-20 m de altura, ocorrendo nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná, especialmente em floresta montana (acima de 1000 m) (Gentry 1992). Trata-se de uma árvore bastante comum em matas ciliares dos campos rupestres de Minas Gerais. A corola é vivamente amarela (figura 111), apresentando achatamento antero-posterior da fauce, guias de néctar de cor marrom-ferrugínea e tricomas tectores uniseriados na superfície ventral do lado anterior, convergindo para o fundo do tubo. O cálice caracteriza-se pela densa cobertura de tricomas tectores de cor marrom-escuro na sua superfície externa (dorsal).

Tabebuia chrysotricha, *T. impetiginosa* e *T. heptaphylla* são espécies amplamente utilizadas na arborização urbana, devido ao seu crescimento relativamente rápido e à beleza de suas florações, sendo a primeira também muito adequada ao plantio sob rede elétrica, devido ao seu porte relativamente pequeno.

Fenologia de floração, eventos e visitantes florais

A presença de inflorescências e flores em antese em indivíduos marcados foi verificada ao longo de pelo menos duas estações de floração em cada espécie. Para o monitoramento dos eventos florais, 60 botões florais foram marcados em 3 árvores de *T. impetiginosa*³², e 30 botões florais foram marcados em 5 árvores de *T. vellosi*, durante as florações do ano 2000. Os dados foram registrados em vários horários da manhã ou da tarde, sendo que em pelo menos 10 flores marcadas em cada espécie foram feitas duas observações à cada dia. Medições do volume e da concentração do néctar foram realizadas somente em *T. vellosi*, tanto em botões florais como em flores de 1°, 2°, 3° e 4° dias de antese, previamente ensacadas com redes de nylon, utilizando-se seringa microvolumétrica e refratômetro de bolso. Observações dos visitantes foram feitas durante a realização dos experimentos de polinizações manuais em todas as espécies, e também durante a verificação dos eventos florais em *T. impetiginosa* e *T. vellosi*. Os principais visitantes foram capturados para montagem à seco, observações da deposição de grãos de pólen e identificação.

Sistemas reprodutivos

Para realização dos experimentos de polinizações manuais controladas, inflorescências inteiras, contendo botões florais em vários estádios de desenvolvimento, foram ensacadas com redes de nylon, ou com sacos de papel-manteiga. Subseqüentemente, flores em antese de primeiro dia foram autopolinizadas (com pólen da mesma flor ou de outras flores da mesma planta), ou submetidas à polinização cruzada (com pólen de outro indivíduo³³) e re-ensacadas. As polinizações manuais foram feitas de modo a cobrir com grãos de pólen toda a superfície receptiva do estigma (i.e. toda a superfície ventral de ambas as lâminas estigmáticas) para se evitar que a taxa de óvulos fecundados fosse limitada pela quantidade de grãos de pólen depositadas no estigma. Várias flores foram marcadas e ensacadas

³² Porém, observações suplementares sobre os eventos florais foram realizadas em muitos outros indivíduos, tanto em *T. impetiginosa* como em *T. heptaphylla*.

para testar a ocorrência de autopolinização espontânea. Flores não-ensacadas foram marcadas para o monitoramento da frutificação natural (controle). As flores foram marcadas com linhas coloridas, uma cor para cada tratamento. O mesmo procedimento utilizado nas polinizações cruzadas manuais foi empregado nas polinizações interespecíficas, realizadas conforme a Tabela 31.

Em cada espécie, alguns frutos resultantes de polinizações manuais foram protegidos com redes de nylon até o início de deiscência³⁴, quando foram coletados para a contagem do número de sementes e realização de testes de germinação. Em *T. chrysotricha*, a análise estatística das diferenças entre os números de sementes por frutos resultantes dos diferentes tratamentos de polinização foram feitas através do teste do qui-quadrado, utilizando-se o software BioEstat 2.0. Sementes sadias³⁵, i.e. portando um embrião de forma e tamanho normais (ver Resultados) foram tratadas com hipoclorito de sódio 0,5% e submetidas ao teste de germinação em câmara climática Eletrolab 102 FC, à 25° C e 12 horas de fotoperíodo. Para verificar a ocorrência ou não de poliembrionia foram também testadas as sementes de espécies pertencentes à alguns outros gêneros da Tribo Tecomeae: *Cybistax antisiphilitica*, *Sparattosperma leucanthum*, *Spathodea campanulata*, *Tecoma stans* e *Zeyheria montana*³⁶. Foram consideradas "germinadas" as sementes cujo embrião apresentou desenvolvimento da radícula \geq à 1,5 cm, bem como crescimento geotrópico negativo do hipocótilo, cotilédones clorofilados e em ângulo reto com o eixo longitudinal da plântula.

Autopolinizações e polinizações cruzadas adicionais foram realizadas em *T. vellosi*, para a verificação dos sítios de reações de incompatibilidade (Martin 1959). Os pistilos de ambos os tratamentos foram coletados nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas após a polinização e fixados em

³³ Nos casos de *T. vellosi* e de indivíduos da população natural de *T. chrysotricha*, a planta doadora de pólen localizava-se sempre à distância de pelo menos 10 m do indivíduo polinizado.

³⁴ 3-4 semanas (*T. chrysotricha*, *T. vellosi* e *T. umbellata*), ou 11-12 semanas (*T. heptaphylla* e *T. impetiginosa*) após o período de realização das polinizações.

³⁵ Nos casos de *T. impetiginosa*, *T. heptaphylla* e *T. vellosi*, cujas sementes apresentam envoltório opaco e portanto não permitem a visualização do embrião, este foi removido de dentro do tegumento e submetido aos tratamentos subsequentes para o teste de germinação.

FAA50 (formaldeído 4%, ácido acético glacial e etanol 50% nas proporções de 5:5:90%; Johansen 1940). Em pelo menos 5 pistilos de cada tratamento e intervalo, a parede do ovário foi removida por microdissecção em estereomicroscópio. Os pistilos destituídos da parede ovariana foram então amolecidos e clarificados em NaOH 9N à 65° C por 20-40 minutos e corados com azul-de-anilina para a verificação da germinação dos grãos de pólen no estigma e do crescimento dos tubos polínicos no estilete e no ovário, utilizando-se um microscópio de epi-fluorescência Leitz Diaplan. Os valores das distâncias percorridas pelos tubos polínicos no estilete em autopolinizações vs. polinizações cruzadas foram comparados utilizando-se o teste *t*.

No terceiro ano de estudos (2001), autopolinizações e polinizações cruzadas manuais foram feitas em *T. impetiginosa*, tal como no ano anterior. Os pistilos foram coletados nos intervalos de 24-216 horas após a polinização, tiveram a parede do ovário removida por microdissecção em estereomicroscópio e foram fixados em FAA50 (Johansen 1940). Pelo menos um pistilo de cada tratamento e intervalo após a polinização foi obtido de cada uma das 6 árvores³⁷ utilizadas neste experimento. Os ovários foram infiltrados com álcool butílico terciário, embebidos em parafina (Johansen 1940) e submetidos a secções transversais seriadas na espessura de 8 µm, utilizando-se um micrótomo rotatório Micron HM 240 E. As secções foram coradas com fucsina-básica e azul-de-astra (Roeser 1972) e utilizadas na análise histológica quantitativa da penetração dos óvulos e de eventos posteriores em um microscópio Olympus BX40. Quando o tecido transmissor localizado no topo do ovário (i.e. na região de transição entre a base do estilete e o ovário) não apresentava tubos polínicos, o ovário foi interpretado como derivado de polinização malsucedida, sendo substituído por outro, de tratamento e intervalo correspondente. Foram examinadas todas as secções (i.e. ao longo de todo o comprimento do ovário) de 4 pistilos autopolinizados e de 4 pistilos submetidos à polinização cruzada,

³⁶ Procedência das sementes: *Sparattosperma leucanthum*: plantas nativas, Município de Santa Rita de Jacutinga, MG; *Tecoma stans*: plantas cultivadas, Município de Lagoa Santa, MG; *Zeyheria montana*: plantas nativas, Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. Demais espécies: plantas cultivadas, Campus da UNICAMP, Campinas, SP.

³⁷ Incluindo os indivíduos utilizados nos experimentos de polinizações executados no ano anterior.

selecionados aleatoriamente em cada um dos intervalos de fixação. Utilizou-se o teste estatístico do qui-quadrado para se comparar o número de óvulos penetrados, bem como os vários estádios dos eventos posteriores à penetração dos óvulos, entre autopolinizações e polinizações cruzadas, empregando-se o software BioEstat 2.0. Para cada tratamento e intervalo de fixação, os resultados foram tratados como pertencendo a um fundo comum. Foram analisados 12.529 óvulos em 72 ovários. Registros fotográficos foram feitos em um fotomicroscópio Olympus BX50, utilizando-se diapositivos Fujichrome Provia 100F.

7.4. Resultados

Fenologia de floração

Os períodos de floração das espécies investigadas, em suas respectivas áreas de estudos, são mostrados na Tabela 21. As florações ocorreram de maio à novembro, porém predominaram entre os meses mais secos do ano, i.e. de julho à setembro. Somente na população de *T. chrysotricha* localizada na Serra da Mantiqueira, a floração na maioria dos indivíduos foi caracterizada por dois episódios de apresentação de flores em antese, sendo cada um subsequente a um período chuvoso de não mais do que três dias. Embora a floração em cada população tenha durado em média 45 dias, a floração em cada indivíduo durou apenas cerca de 2-2,5 semanas (não mais que 10 dias em *T. umbellata*).

Eventos florais

Em *Tabebuia vellosi*, o egresso floral ocorreu quando os botões florais apresentavam entre 2,04 e 2,31 cm de comprimento. O comprimento dos botões florais no dia anterior ao do início da antese foi de 4,5-5,6 cm. A abertura dos lobos da corola (início da antese) ocorreu em diferentes horários ao longo do dia, porém a maioria das flores abriu no início da manhã (de 5:00 às 9:00 horas). A antese durou de 4 a 5 dias, sendo o fim da antese sinalizado pela abscisão da corola. Não se verificou mudança de coloração da corola durante a senescência da flor, salvo por um ligeiro clareamento. Porém

os guias de néctar, que inicialmente apresentavam cor ferrugínea, e portanto contrastavam nitidamente com o amarelo vivo da corola, tornaram-se também amarelos à medida em que a flor envelheceu.

A abertura das anteras foi observada somente várias horas após o início da antese, porém o início da murcha e o aparecimento de pontos de necrose nas anteras foram verificados já no segundo dia. Observou-se uma certa variação (em diferentes flores de uma mesma árvore) quanto ao posicionamento do estigma, relativamente ao posicionamento das anteras, sendo que algumas flores apresentaram o estigma em posição intermediária entre o par de anteras distais e o par proximal, enquanto outras flores apresentaram o estigma à frente do par de anteras distais (um *continuum* de situações intermediárias entre os dois posicionamentos citados foi também verificado). O estigma já se encontrava receptivo no início da antese, uma vez que os lobos estigmáticos encontravam-se semi-abertos e apresentando, em suas superfícies ventrais, papilas estigmáticas túrgidas e brilhantes. A superfície ventral dos lobos estigmáticos tornou-se opaca, devido à murcha das papilas estigmáticas, entre o 2^o e o 3^o dias de antese. Das 30 flores monitoradas, 14 (47%) apresentaram estigmas fechados ao término da antese, indicando que as mesmas haviam sido visitadas e, provavelmente, polinizadas. Nas demais flores o movimento de abertura dos lobos prosseguiu até o fim da antese, quando ocorreu o enrolamento das extremidades distais dos mesmos para trás. O aparecimento de manchas de necrose no disco ocorreu um ou dois dias antes da abscisão da corola.

A flor apresentou odor suave e agradável do início ao fim da antese. Lesões foram observadas em vários pontos da corola desde o estágio de botão floral em pré-antese até o fim da antese, devido à ação de herbívoros, especialmente uma larva de Lepidoptera (espécie não identificada), a qual não só se alimentava das pétalas mas também utilizava o tubo corolino como abrigo. O volume e a concentração do néctar em flores ensacadas de 1^o, 2^o, 3^o e 4^o dias de antese foram $4,40 \pm 1,29 \mu\text{l}$ e $27,80 \pm 2,41\%$ ($n = 5$), $8,43 \pm 3,31 \mu\text{l}$ e $24,71 \pm 3,59\%$ ($n = 7$), $14,60 \pm 2,33 \mu\text{l}$ e $27,10 \pm 1,52\%$ ($n = 5$), $36,67 \pm 5,69 \mu\text{l}$ e

30,67±1,55% (n = 3), respectivamente (média ± desvio padrão). Botões florais em pré-antese (n = 3) e flores no momento da abertura dos lobos da corola (n = 3) não apresentaram néctar.

Em *T. impetiginosa*, o egresso floral ocorreu quando os botões florais apresentavam entre 0,67 e 1,00 cm de comprimento, e o tempo decorrente entre o egresso floral e a abertura dos lobos da corola (início da antese) foi de 5-7 dias. O período da antese - i.e., da abertura dos lobos corolinos até a queda da corola - durou de três a seis dias, tendo sido mais extenso num dos indivíduos (média 5,3 dias) relativamente aos demais (médias 3,2 e 3,3 dias). A abertura dos lobos corolinos em cada flor foi verificada ao longo de todo o dia. Dos 60 botões florais monitorados, seis abortaram antes da antese, e apenas três flores formaram frutos naturalmente.

O início da antese foi claramente marcado por um colorido geral bem vivo de toda a corola, esmaecendo-se nos dias subseqüentes. Numa flor de primeiro dia (figura 107), a face interna do lado posterior ("teto") do tubo é lisa e geralmente de cor amarelo-pálida, sendo que a saturação variou de indivíduo para indivíduo. O lado anterior do tubo apresenta duas pregas longitudinais, separadas por um sulco mediano - tal como descrito para *Cybistax antisiphilitica* (capítulo 6) -; sua face interna é de cor amarela-ouro muito intensa, podendo as nervuras destacar-se por coloração róseo-avermelhada, neste caso atuando visualmente como guias de néctar. A coloração dos lobos e da face externa do tubo varia de indivíduo para indivíduo, de róseo-alva até magenta escura, sendo o lado posterior geralmente mais escuro que o anterior, e a base do tubo esbranquiçada.

A mudança de coloração nos dias subseqüentes à abertura da flor foi especialmente notável na face interna do lado anterior do tubo (figura 107). Em alguns indivíduos, esta região se tornou amarelo-pálida no segundo dia; noutros ela assumiu uma coloração ferrugínea ou terrosa. Do terceiro dia em diante esta região se tornou rosada; porém em muitos indivíduos houve uma fase intermediária em que ela se tornou esbranquiçada antes de assumir o tom róseo que marca o fim da antese. Os lobos e o lado externo do tubo apenas tornaram-se progressivamente mais claros na medida em que a flor envelheceu.

Tabela 21: Períodos de floração das espécies de *Tabebuia* em suas respectivas áreas de estudos.

Espécie	Área de estudos	Ano	Nº. indiv. monit.	Período de floração						
				mai	jun	jul	ago	set	out	nov
<i>T. chrysotricha</i>	Campus UNICAMP	1999	6			■	■	■		
		2001	6				■	■	■	
<i>T. chrysotricha</i>	Serra da Mantiqueira	2000	8				■		■	
<i>T. heptaphylla</i>	Campus UNICAMP	1999	3			■	■	■		
		2000	5			■	■			
		2002	22			■	■			
<i>T. impetiginosa</i>	Campus UNICAMP	2000	8	■	■	■	■			
		2001	8	■	■	■	■			
<i>T. umbellata</i>	Campus UNICAMP	1999	3			■	■			
		2000	5				■	■		
<i>T. vellosi</i>	Serra do Cipó	1999	8					■	■	
		2000	10						■	■

Os eventos que se sucederam no androceu e no gineceu durante a antese foram semelhantes aos já descritos para *T. vellosi*. Tanto as anteras como o estigma já se encontravam receptivos no primeiro dia da antese, embora a abertura das anteras tenha coincidido com o momento da abertura dos lobos da corola. De um modo geral, no 2º dia, as anteras já apresentavam pouco ou nenhum pólen, murchando do 3º dia em diante. A perda de turgescência das papilas estigmáticas foi verificada a partir do 2º dia. Testes realizados numa tarde ensolarada (temperatura $\cong 30^\circ$ C) demonstraram que o estigma se fecha entre 5 e 15 segundos após ter sido tocado, dependendo este tempo do quanto os lobos estigmáticos se encontravam inicialmente afastados. Em flores não visitadas, o movimento de abertura dos lobos estigmáticos progrediu gradativamente até os mesmos se enrolarem para trás, o que ocorreu somente após a abscisão da corola. Se o estigma é tocado mas sem que haja deposição de pólen na superfície receptiva, os lobos se fecham; porém, lentamente, tornam a se abrir. Quando há deposição de pólen no estigma, os lobos se fecham permanentemente.

O odor muito agradável da flor de *T. impetiginosa* foi mais intenso nos dois primeiros dias da antese, suavizando-se nos dias subseqüentes. Foi detectado néctar nas flores do primeiro até o último dia da antese, porém o disco algumas vezes apresentou manchas de necrose um ou dois dias antes da queda da corola.

Embora os eventos florais não tenham sido detalhadamente monitorados nas demais espécies, os mesmos padrões de mudança de coloração da corola, observados em *T. impetiginosa*, também caracterizaram a senescência das flores de *T. heptaphylla* (figura 105). Em *T. chrysotricha* e *T. umbellata*, não se observou mudança de coloração da corola à medida em que flor envelhecia, salvo pelo clareamento dos guias de néctar, e os eventos que se sucederam no androceu e no gineceu destas espécies, bem como em *T. heptaphylla*, foram semelhantes aos verificados em *T. vellosi* e *T. impetiginosa*; porém as alterações do androceu e do gineceu ocorreram mais rapidamente em flores de *T. umbellata*, nas quais a abscisão da corola ocorreu entre o 2º e o 3º dias após o início da antese.

Visitantes

Os principais visitantes das espécies de *Tabebuia* em suas respectivas áreas de estudo são apresentados na Tabela 22. Na Serra da Mantiqueira, os principais polinizadores de *T. chrysotricha* foram *Bombus atratus*, *B. morio* e espécies de *Centris*. A atividade destas abelhas nas copas das árvores de *T. chrysotricha* foi verificada ao longo de todo o dia, embora tenha sido mais intensa de 10:00 às 12:00 horas, e de 14:00 às 16:00 horas, com vários indivíduos visitando ao mesmo tempo as flores da copa de uma mesma árvore. As visitas de *Bombus morio* foram realizadas quase sempre por operárias; porém visitas de rainhas foram ocasionalmente observadas. Embora algumas das operárias de *B. morio* e *B. atratus* apresentassem pólen armazenado em suas corbículas, não foi verificada a coleta de pólen por parte destas abelhas em flores de *T. chrysotricha*. As visitas de *Bombus* e *Centris* foram legítimas, envolvendo o contato com o estigma e as anteras e a deposição nototribica de grãos de pólen. Machos de *Centris* freqüentemente apresentaram comportamento de patrulha, i.e. vôos agitados de ida e volta entre as flores, em linha reta ou circulares, ou ainda formando um ∞ ; porém eventualmente também pousavam sobre o lado superior externo do tubo ou sobre os lobos posteriores da corola para aguardar a visita de fêmeas.

Além das espécies apresentadas na Tabela 22, várias espécies de Meliponinae foram vistas visitando as flores de *T. chrysotricha* para pilhar-lhes o pólen. Algumas espécies de vespas foram também verificadas não só freqüentando as flores (forrageando as secreções dos nectários extraflorais do cálice), como também os frutos. Formigas foram visitantes freqüentes não só dos nectários extraflorais, como também do próprio néctar produzido pelo disco, o qual as formigas tiveram acesso graças às perfurações à base da corola, realizadas por pilhadores primários. Estes últimos foram principalmente beija-flores, cebinhos e *Xylocopa*.

Porém o visitante ilegítimo mais freqüentemente observado em flores de *T. chrysotricha* na Serra da Mantiqueira foi *Trigona spinipes*, a qual atacava intensamente as flores, os botões florais em

pré-antese e, especialmente, os frutos. Nas flores e nos botões florais, a atividade mais constante de tais abelhas foi a pilhagem de pólen, tal como observado em *Cyristax antisyphilitica* (capítulo 6) e outras espécies de *Tabebuia* (ver adiante). Eventualmente estas abelhas foram também vistas introduzindo suas mandíbulas nas perfurações realizadas na base da corola por pilhadores primários, aumentando-lhes a extensão para ter acesso ao néctar. Os frutos na maioria dos indivíduos desta população sofreram danos significativos devido a ação de enxames destas abelhas. Utilizando-se de suas fortes mandíbulas para dilacerar as paredes carpelares, estas abelhas procuravam ter acesso às secreções das cavidades loculares, onde as jovens sementes se desenvolviam. Frutos em estádios iniciais de desenvolvimento foram preferencialmente predados, provavelmente por apresentarem tecidos mais macios. As abelhas atacavam especialmente a região de articulação do fruto com o receptáculo para iniciar a atividade perfuradora. Em decorrência disto, grande parte dos frutos terminavam por ser decepados, ocasionando perda total de suas sementes. Embora a formação natural de numerosos frutos tenha sido verificada em diversas arboretas, muitas delas não mais apresentavam frutos nas últimas observações realizadas.

No Campus da UNICAMP, a entomofauna visitante das flores de *T. chrysotricha* foi mais diversificada, com maior número de espécies polinizadoras em potencial (Tabela 22). Os principais visitantes foram também espécies de *Bombus* e *Centris*, os quais exibiram comportamentos semelhantes aos dos polinizadores de *T. chrysotricha* na Serra da Mantiqueira, e o mesmo padrão de intensa atividade sobre as copas das árvores. Além dos pilhadores de néctar citados na Tabela 22, *Coereba flaveola* (L.) e algumas espécies de beija-flor, tais como *Eupetomena macroura* (Gmelin) e *Amazilia lactea* (Lesson), visitaram freqüentemente as flores perfurando a base da corola para ter acesso ao néctar. A pilhagem de pólen exercida por *Trigona spinipes* em flores de *T. chrysotricha* no Campus foi semelhante à observada na Serra da Mantiqueira, não tendo sido verificada a predação de frutos por estas abelhas em árvores do Campus. Entretanto, larvas de uma espécie não identificada de

vespa³⁸ foram parasitóides muito freqüentes nos frutos de *T. chrysotricha* em árvores do Campus. Estas larvas se alimentavam de tecidos do septo e das sementes em desenvolvimento. Cada fruto parasitado abrigou 2-6 larvas de vespas, sendo que grande parte de suas sementes foi danificada. Porém as sementes não afetadas geralmente alcançaram a maturidade, mesmo em frutos muito danificados.

As flores de *T. chrysotricha* em árvores do Campus da UNICAMP foram ainda visitadas por *Thraupis sayaca* (L.) (Emberizidae - Thraupinae). Estes pássaros pousavam em ramos próximos às inflorescências, ou sobre o próprio ramo da inflorescência visitada para se alimentar de pedaços dos lobos da corola, os quais o pássaro arrancava com o bico. As visitas de *Thraupis sayaca* ocorreram predominantemente no final da tarde.

De um modo geral, *T. heptaphylla* e de *T. impetiginosa* compartilharam os mesmos visitantes florais. Devido ao seu comportamento de visitas legítimas e porte corporal, *Centris (Hemisiella) cf. tarsata* é provavelmente o polinizador mais eficaz. Porém espécies de *Centris* de porte menor, bem como *Exomalopsis* sp., foram os visitantes legítimos mais freqüentes (intensa atividade de vários indivíduos ao mesmo tempo foi verificada nas copas das árvores ao longo de todo o dia, mas especialmente entre 9:00 e 16:00 horas); porém devido ao seu porte, o contato com o estigma e com as anteras durante suas visitas às flores de *T. heptaphylla* e *T. impetiginosa* provavelmente foi menos freqüente (ou menos eficaz) do que os de *Centris tarsata*. As visitas de *Euglossa* sp. foram relativamente freqüentes e, devido ao seu porte, tais abelhas provavelmente atuaram como polinizadores de importância secundária. Além dos visitantes legítimos citados na Tabela 22, visitas legítimas de uma espécie não identificada de Bombyliidae (Diptera) foram ocasionalmente verificadas, sendo este também um polinizador secundário potencial não só devido ao seu porte e comportamento

³⁸ As tentativas de se isolar os frutos parasitados para que as larvas sofressem metamorfose e o inseto adulto pudesse ser identificado foram mal sucedidas, pois o confinamento sempre provocou a morte das larvas. Verificou-se que, em dias chuvosos, as larvas mais desenvolvidas de frutos protegidos com redes de nylon sempre abandonavam os mesmos, ficando aprisionadas na malha da rede. Estas observações parecem sugerir que as larvas provavelmente completam o seu desenvolvimento no solo (R. A. S. Pereira, comunicação pessoal).

de visita às flores de *T. heptaphylla* e *T. impetiginosa*, mas também por sua morfologia e abundante pilosidade corporal.

Várias espécies de Meliponinae foram observadas pilhando o pólen das flores de *T. heptaphylla* e *T. impetiginosa*, especialmente *Trigona spinipes*. Estas últimas atacavam tanto as flores em antese como os botões florais, utilizando-se de suas fortes mandíbulas para fazer aberturas no lado inferior do tubo corolino para ter acesso ao pólen em estames ainda imaturos. Estas aberturas foram utilizadas por outros insetos, tais como borboletas (Nymphalidae), formigas e outras abelhas para explorar os recursos da flor. A atividade de *T. spinipes*, especialmente no final das florações de *T. impetiginosa* e *T. heptaphylla* foi tão intensa que em algumas árvores não foi encontrada uma só flor intacta. Somente flores e botões florais de inflorescências ensacadas quando os botões florais ainda se encontravam em estádios anteriores ao egresso floral ficaram livres dos danos provocados por *T. spinipes*. *Apis mellifera* foi também um visitante freqüente, adentrando flores em antese pela fauce, ou utilizando as perfurações realizadas por *T. spinipes* para coletar pólen e, provavelmente, também secreções de tricomas glandulares das superfícies internas da corola e da base dos estames.

Embora não tenham sido feitas observações detalhadas sobre os visitantes das flores de *T. umbellata*, apenas *Euglossa* sp., *Centris (Hemisiella)* cf. *tarsata* e *Exomalopsis* sp. foram visitantes legítimos freqüentes e podem ser considerados polinizadores efetivos ou potenciais das árvores de *T. umbellata* cultivadas no Campus da UNICAMP. Visitas de pilhadores de néctar (*Xylocopa* e *Oxaea*) ou pólen (*Trigona spinipes* e outras Meliponinae, *Apis mellifera*) foram também observadas. Os mesmos pássaros que visitaram as flores de *T. chrysotricha* (exceto *Thraupis sayaca*) também foram visitantes freqüentes de *T. umbellata*, *T. impetiginosa* e *T. heptaphylla*. Embora as visitas de beija-flores tenham sido geralmente ilegítimas, em algumas ocasiões estes pássaros foram vistos visitando também legitimamente as flores de *T. umbellata*, *T. impetiginosa* e *T. heptaphylla*.

Tabela 22: Principais abelhas visitantes das espécies de *Tabebuia* presentemente estudadas.

Espécie vegetal	Local	Visitantes	Tribo, Família	Tipo de visita	Recurso forrageado
<i>T. chrysotricha</i>	Serra da Mantiqueira	<i>Bombus morio</i>	Bombini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Bombus atratus</i>	Bombini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Centris (Trachina) sp. (macho)</i>	Centridini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Centris sp. (macho)</i>	Centridini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Xylocopa sp.</i>	Xylocopini, Apidae	Ilegítima	Néctar
		<i>Apis mellifera L.</i>	Apini, Apidae	Legítima	Pólen
		<i>Trigona spinipes</i>	Meliponinae, Apidae	Ilegítima ou legítima	Pólen e néctar
	Campus UNICAMP	<i>Bombus morio</i>	Bombini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Centris (Trachina) sp. (macho)</i>	Centridini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Epicharis (Triepicharis) cf. schrottkyi</i>	Centridini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Eulaema nigrita</i>	Euglossini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Apis mellifera L.</i>	Apini, Apidae	Legítima	Pólen
		<i>Euglossa sp. (macho)</i>	Euglossini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Xylocopa (Neoxylocopa) brasiliatorum</i>	Xylocopini, Apidae	Ilegítima	Néctar
		<i>Oxaea austera</i>	Oxaeinae, Andrenidae	Ilegítima	Néctar
<i>Trigona spinipes</i>	Meliponinae, Apidae	Ilegítima ou legítima	Pólen e néctar		
<i>T. heptaphylla</i>	Campus UNICAMP	<i>Centris (Hemisiella) sp. (macho e fêmea)</i>	Centridini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Centris (Hemisiella) cf. tarsata (macho)</i>	Centridini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Xylocopa (Neoxylocopa) brasiliatorum</i>	Xylocopini, Apidae	Ilegítima	Néctar
		<i>Exomalopsis sp.</i>	Exomalopsini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Oxaea flavescens</i>	Oxaeinae, Andrenidae	Ilegítima	Néctar
		<i>Apis mellifera L.</i>	Apini, Apidae	Legítima	Pólen
		<i>Trigona spinipes</i>	Meliponinae, Apidae	Ilegítima ou legítima	Pólen e néctar

Tabela 22 (Continuação)

Espécie vegetal	Local	Visitantes	Tribo, Família	Tipo de visita	Recurso forrageado
<i>T. impetiginosa</i>	Campus UNICAMP	<i>Centris (Hemisiella)</i> sp. (macho e fêmea)	Centridini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Centris (Hemisiella)</i> cf. <i>tarsata</i> (macho)	Centridini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Xylocopa (Neoxylocopa) brasilianorum</i>	Xylocopini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Exomalopsis</i> sp.	Exomalopsini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Euglossa</i> sp. (fêmea)	Euglossini, Apidae	Legítima	Pólen e néctar
		<i>Oxaea austera</i>	Oxaeinae, Andrenidae	Ilegítima	Néctar
		<i>Oxaea flavescens</i>	Oxaeinae, Andrenidae	Ilegítima	Néctar
		<i>Apis mellifera</i> L.	Apini, Apidae	Legítima	Pólen
<i>T. umbellata</i>	Campus UNICAMP	<i>Trigona spinipes</i>	Meliponinae, Apidae	Ilegítima ou legítima	Pólen e néctar
		<i>Euglossa</i> sp. (fêmea)	Euglossini, Apidae	Legítima	Pólen e néctar
		<i>Exomalopsis</i> sp.	Exomalopsini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Centris (Hemisiella)</i> cf. <i>tarsata</i> (fêmea)	Centridini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Xylocopa (Neoxylocopa) brasilianorum</i>	Xylocopini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Oxaea austera</i>	Oxaeinae, Andrenidae	Ilegítima	Néctar
		<i>Apis mellifera</i> L.	Apini, Apidae	Legítima	Pólen
		<i>Trigona spinipes</i>	Meliponinae, Apidae	Ilegítima ou legítima	Pólen e néctar
<i>T. vellosi</i>	Serra do Cipó	<i>Centris (Ptilotopus)</i> sp.	Centridini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Bombus atratus</i>	Bombini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Xylocopa (Schonherria)</i> sp.	Xylocopini, Apidae	Legítima	Néctar
		<i>Trigona spinipes</i>	Meliponinae, Apidae	Ilegítima ou legítima	Pólen e néctar

Os visitantes mais frequentes das flores de *T. vellosi* foram abelhas de médio e grande porte, e as visitas ocorreram durante todo o dia, mas especialmente de 10:00 às 12:00, e de 14:00 às 16:00 horas. As visitas foram raras ou mesmo nulas nas primeiras horas da manhã, provavelmente devido ao nevoeiro quase sempre presente na área de estudos, durante o período em que as observações foram realizadas. Dias chuvosos foram igualmente caracterizados pela baixa frequência de visitantes florais. *Centris (Ptilotopus)* sp. foi em larga escala o visitante mais frequente (≥ 1 seqüência de visitas à cada 30 minutos, numa mesma árvore). As visitas desta abelha foram sempre legítimas e, devido ao seu grande porte e à abundância de pêlos no dorso torácico, esta espécie provavelmente é o principal polinizador de *T. vellosi* na área de estudos. Visitas legítimas de *Eupetomena macroura* foram ocasionalmente observadas.

Além dos visitantes já citados, as flores de todas as espécies de *Tabebuia* presentemente investigadas foram utilizadas como abrigo e fonte alimentar por trips (Thysanoptera) e por pequenos besouros.

Sistemas reprodutivos

Os resultados dos experimentos de polinizações manuais controladas intraespecíficas são mostrados na Tabela 23. Os testes para a verificação da ocorrência de agamospermia, realizados em *T. chrysotricha* e *T. vellosi*, são apresentados separadamente, na Tabela 24.

Tabebuia chrysotricha

Ao contrário do que foi verificado nas outras espécies de Bignoniaceae presentemente investigadas, os experimentos de polinizações controladas realizados em *T. chrysotricha* no ano de 1999 indicaram que a proporção de frutos e sementes derivados de autopolinizações manuais foi comparável à proporção obtida por polinizações cruzadas manuais, ainda que, tal como nas demais espécies investigadas, o número de frutos formados por tais tratamentos tenha sido bastante superior ao

número de frutos formados por polinizações naturais. Os resultados dos testes da agamospermia não sugerem a ocorrência deste fenômeno em *T. chrysotricha*, salvo se a mesma for dependente da polinização (pseudogamia). A ausência de frutificação a partir do grande número de flores submetidas ao teste da autopolinização espontânea sugere não só a impossibilidade da ocorrência de autogamia, como também da formação de sementes agamospérmicas sem que haja polinização.

Os frutos em início de deiscência foram coletados um mês após a realização dos experimentos de polinização. As sementes puderam ser classificadas em 5 categorias, conforme o tamanho das mesmas, bem como a presença, forma e tamanho dos embriões: (1) sementes normais: apresentando comprimento e largura = $1,04 \pm 0,12$ e $4,02 \pm 0,24$ cm, contendo embrião principal³⁹ cordiforme e de tamanho normal, com comprimento e largura = $0,7 \pm 0,04$ e $1,0 \pm 0,08$ cm ($n = 5$) (figura 112a); (2) sementes anormais tipo I: de tamanho normal, porém apresentando um ou mais embriões atrofiados (i.e. de formato irregular, comprimento e largura $\leq 0,5$ cm) (figura 112b); (3) sementes anormais tipo II: de tamanho normal, porém destituída de embriões (figura 112c); (4) sementes anormais tipo III: sementes atrofiadas (i.e. de formato irregular, comprimento e largura $\leq 0,7$ e $2,0$ cm, e com embrião atrofiado) (figura 112d); (5) sementes anormais tipo IV: sementes atrofiadas, sem embrião (figura 112e). Os resultados das contagens das sementes de cada uma destas categorias por fruto são apresentados na Tabela 26 . Os testes qui-quadrado para o número de sementes normais e o número de sementes anormais (dados agregados das categorias "sementes anormais tipos I, II, III e IV") indicaram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos de autopolinização vs. polinização cruzada ($\chi^2 = 52,35$, $df = 1$, $p < 0,001$), autopolinização vs. polinização natural ($\chi^2 = 60,58$, $df = 1$, $p < 0,001$) e polinização cruzada vs. polinização natural ($\chi^2 = 12,48$, $df = 1$, $p < 0,05$).

Os testes de germinação das sementes normais revelaram altas taxas de germinação, tanto em sementes obtidas por autopolinização como em sementes obtidas por polinização cruzada (Tabela 25).

³⁹ Isto é, o embrião mais desenvolvido.

Além disso, a maior parte das sementes em cada fruto apresentou embriões supranumerários, i.e. 2-4 embriões na mesma semente. Em casos extremos, observou-se a germinação de até 8 embriões de diversos tamanhos, a partir de uma mesma semente.

A repetição dos experimentos de polinizações no ano seguinte, porém em árvores de uma população natural de *T. chrysotricha*, revelou o mesmo padrão de formação de frutos por autopolinizações e polinizações cruzadas (Tabela 23). Não obstante, um dos indivíduos (árvore n^o 97) não formou frutos por autopolinização. O número de flores empregadas no tratamento de autopoliniza-

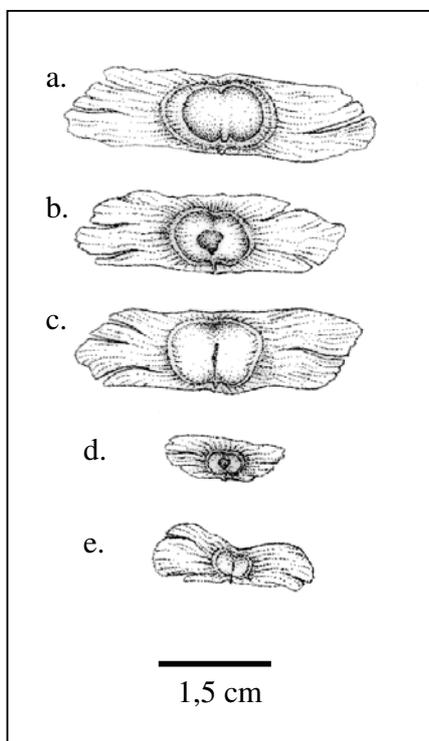


Figura 112: Sementes de *Tabebuia chrysotricha*, tipos normal (a) e anormais I (b), II (c), III (d) e IV(e).

ção neste indivíduo (35 flores) foi relativamente alto, se comparado ao número de flores utilizadas no mesmo tratamento em outros indivíduos, o que torna improvável a aleatoriedade deste resultado. Dissecções de sementes revelaram a ocorrência de poliembrião também nas árvores da Serra da Mantiqueira, tanto em frutos obtidos por autopolinização como por polinização cruzada manual. Os resultados dos testes de autopolinização espontânea e polinização natural (controle) foram semelhantes aos obtidos no ano anterior em árvores cultivadas.

Tabebuia heptaphylla

Os resultados dos testes para verificação da ocorrência

de autopolinização espontânea nos dois anos de estudo em *T.*

heptaphylla demonstram a dependência de polinizadores para que haja a formação de frutos (Tabela 23). Verificou-se a iniciação de frutos tanto a partir de flores autopolinizadas como de flores submetidas à polinização cruzada na árvore n^o 1. Entretanto, no primeiro ano de estudos, todos os frutos resultantes de autopolinização manual na árvore n^o 1 abortaram ainda em estádios iniciais do

desenvolvimento, ao passo que quase a metade das flores submetidas à polinização cruzada formou frutos até a maturidade. O número de flores utilizadas para se estimar a frutificação natural (controle) foi insuficiente, pois a despeito de alguns frutos resultantes de polinização natural terem sido verificados nesta árvore, nenhuma das flores marcadas formou fruto durante o mesmo ciclo reprodutivo, o que sugeriu uma taxa de frutificação natural extremamente baixa neste indivíduo, no ano de 1999.

No segundo ano de estudos, pouco mais da metade das flores autopolinizadas e 80% das flores submetidas à polinização cruzada no mesmo indivíduo n^o. 1 frutificaram. Na árvore n^o. 90, verificou-se a iniciação de vários frutos tanto em autopolinizações como em polinizações cruzadas manuais; porém estes frutos abortaram ainda em estádios iniciais do desenvolvimento. A despeito de não ter sido verificado o desenvolvimento de frutos até a maturidade, resultantes de polinização cruzada manual nesta árvore n^o. 90, 10% das flores marcadas neste indivíduo para a estimativa da frutificação natural formaram frutos. Ao contrário do observado para os indivíduos n^{os}. 1 e 90, a árvore n^o. 91 formou frutos somente por polinizações cruzadas. A produção de frutos por polinização natural no indivíduo n^o. 1 no ano de 2000 foi bastante superior à do ano anterior; porém, tal como verificado nas demais espécies de *Tabebuia*, a taxa de frutificação natural em *T. heptaphylla* de um modo geral foi inferior à da produção de frutos por polinizações manuais.

Frutos deiscentes foram coletados entre a 11^a e a 12^a semanas após a realização dos experimentos de polinização. Os resultados dos testes de germinação das sementes de *T. heptaphylla* são apresentados na Tabela 27. As taxas de germinação foram altas em ambos os tratamentos; porém, ao contrário do observado em *T. chrysotricha*, não foi verificada a poliembriãoia em *T. heptaphylla*.

Tabebuia impetiginosa

Não houve formação de frutos por autopolinização espontânea ou induzida em *T. impetiginosa*, ao passo que mais da metade das flores submetidas à polinização cruzada manual frutificou. A forma-

Tabela 23: Experimentos de polinizações intraespecíficas controladas e frutificação em *Tabebuia*.

Espécie	Local (ano)	Ár. n ^o .	Autopolin. Espontânea				Autopolinização manual I				Autopolinização manual II				Polinização cruzada manual				Polinização natural (contr.)				
			n ^o . fl.	n ^o . fr.	% fr.	% tot.	n ^o . fl.	n ^o . fr.	% fr.	% tot.	n ^o . fl.	n ^o . fr.	% fr.	% tot.	n ^o . fl.	n ^o . fr.	% fr.	% tot.	n ^o . fl.	n ^o . fr.	% fr.	% tot.	
<i>Tabebuia chrysostricha</i>	Campus UNICAMP (1999)	2	20	0	0	0	11	2	18,2	20 ^a	11	3	27,3	29,4 ^a	23	7	30,4	23,1 ^a	47	3	6,4	9,9	
		3	20	0	0		11	3	27,3		10	4	40		20	3	15		38	4	10,5		
		6	20	0	0		13	2	15,4		13	3	23,1		22	5	22,7		66	8	12,1		
	Serra da Mantiqueira (2000)	93	25	0	0	0	15	5	33,3	29,4	16	5	31,2	20,9	13	2	15,4	35,6	25	3	12	5,6	
		95	5	0	0		2	1	50		2	1	50		4	2	50		5	1	20		
		96	25	0	0		14	6	42,8		13	2	15,4		22	5	22,7		26	0	0		
		97	30	0	0		16	0	0		19	0	0		35	7	20		1	0	0		
		104	50	0	0		4	3	75		17	6	35,3		27	20	74,1		50	2	4		
	<i>Tabebuia heptaphylla</i>	Campus UNICAMP (1999)	1	20	0	0	0	10	0 ^b	0	0	10	0 ^b	0	0	11	5 ^d	45,5	45,5	40	0	0	0
		Campus UNICAMP (2000)	1	30	0	0	0	15	7	46,7	18,9	10	6	60	17,6	25	20	80	35	40	11	27,5	16,2
90			20	0	0	10		0 ^b	0	10		0 ^b	0	20		0 ^d	0	20		2	10		
91			50	0	0	12		0	0	14		0	0	38		9 ^c	23,7	20		0	0		
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Campus UNICAMP (2000)	86	30	0	0	0	10	0	0	0	21	0	0	0	21	11	52,4	58,2	25	1	4	8	
		87	20	0	0		14	0	0		10	0	0		21	13	61,9		25	3	12		
		88	30	0	0		12	0	0		15	0	0		24	15	62,5		30	4	13,3		
		89	35	0	0		22	0	0		20	0	0		32	18	56,2		20	0	0		
<i>Tabebuia umbellata</i>	Campus UNICAMP (1999)	5	21	0	0	0	11	0	0	0	12	0	0	0	23	6	26,1	27,9 ^e	37	3	8,1	10,4	
		8	20	0	0		13	0	0		10	0	0		20	6	30		40	5	12,5		
	Campus UNICAMP (2000)	8	60	0	0	0	11	0	0	0	14	0	0	0	15	4	26,7	19,8	50	4	8	6,7	
		98	72	0	0		36	0	0		35	0	0		41	7	17,1		40	2	5		
		99	20	0	0		5	0	0		5	0	0		5	1	20		20	1	5		
		100	20	0	0		10	0	0		10	0	0		10	1	10		20	2	10		
		103	20	0	0		5	0	0		5	0	0		20	5	25		20	1	5		

^a Os frutos que iniciaram o desenvolvimento mas não alcançaram a maturidade abortaram com 0,96-12,8 cm de comprimento.

^b Foi observada a iniciação de vários frutos, porém estes abortaram antes de alcançar 3,5 cm de comprimento.

^c Os frutos que iniciaram o desenvolvimento mas não alcançaram a maturidade abortaram com 1,0-13,4 cm de comprimento.

^d Vários frutos iniciaram desenvolvimento, mas abortaram ainda em estádios iniciais.

^e Os frutos que iniciaram o desenvolvimento mas não alcançaram a maturidade abortaram com 1,21-4,90 cm de comprimento.

Ár. = árvore; n^o fl. = número de flores polinizadas; n^o fr. = número de frutos formados (até a maturidade das sementes); % fr. = percentagem de frutos formados; % tot. = percentagem de frutos formados, relativamente ao total de flores polinizadas em todos os indivíduos.

Tabela 23 (continuação).

Espécie	Local	Ár. n°	Autopolin. espontânea				Autopolinização manual I				Autopolinização manual II				Polinização cruzada manual				Polinização natural (contr.)			
			n° fl.	n° fr.	% fr.	% tot.	n° fl.	n° fr.	% fr.	% tot.	n° fl.	n° fr.	% fr.	% tot.	n° fl.	n° fr.	% fr.	% tot.	n° fl.	n° fr.	% fr.	% tot.
<i>Tabebuia vellosi</i>	Serra do Cipó	10	9	0	0	0	8	0	0	0	16	0	0	0	8	3	37,5	22 ^f	16	0	0	11,8
		11	37	0	0		19	0	0		13	0	0		26	7	26,9		21	5	23,8	
		12	8	0	0		9	0	0		4	0	0		23	2	8,7		17	1	5,9	
		13	2	0	0		1	0	0		2	0	0		17	3	17,6		21	2	9,5	
		14	73	0	0		10	0	0		16	0	0		22	5	22,7		20	4	20	
		15	-	0	0		-	0	0		3	0	0		3	0	0		7	2	28,6	
		16	0	0	0		3	0	0		3	0	0		3	2	66,7		5	0	0	
		17	0	0	0		7	0	0		11	0	0		16	4	25		20	1	5	

^f A maioria dos frutos que não alcançaram a maturidade abortaram ao alcançar 0,85-2,59 cm de comprimento.

Ár. = árvore; n° fl. = número de flores polinizadas; n° fr. = número de frutos formados (até a maturidade das sementes); % fr. = percentagem de frutos formados; % tot. = percentagem de frutos formados, relativamente ao total de flores polinizadas em todos os indivíduos.

Tabela 24: Teste para verificação da ocorrência de agamospermia (do tipo não-dependente da polinização) em *Tabebuia chrysotricha* e *T. vellosi*.

Espécie	Local	Ár. n°	Flores emasculadas e ensacadas				Flores emasculadas, não-ensacadas			
			n° fl.	n° fr.	% fr.	% tot.	n° fl.	n° fr.	% fr.	% tot.
<i>Tabebuia chrysotricha</i>	Campus da UNICAMP	2	10	0	0	0	10	0	0	2
		3	20	0	0		20	1	5	
		6	20	0	0		20	0	0	
<i>Tabebuia vellosi</i>	Serra do Cipó	10	2	0	0	0	2	0	0	25
		11	5	0	0		5	1	20	
		12	2	0	0		3	1	33,3	
		13	3	0	0		3	0	0	
		14	5	0	0		5	2	40	
		15	-	-	-		-	-	-	
		16	3	0	0		3	0	0	
17	2	0	0	7	3	42,8				

Ár. = árvore; n° fl. = número de flores polinizadas; n° fr. = número de frutos formados (até a maturidade das sementes); % fr. = percentagem de frutos formados; % tot. = percentagem de frutos formados, relativamente ao total de flores polinizadas em todos os indivíduos.

Tabela 25: Teste comparativo da germinação de sementes de *Tabebuia chrysotricha*, resultantes de polinizações cruzadas e autopolinizações manuais.

Tratamento	Árvore n ^o	Fruto n ^o	N ^o de sementes semeadas	N ^o de sementes germinadas (%)	Poliembrião (+/-)	Total de sementes semeadas	Total de sementes germinadas (%)
Autopolinização	2	1	100	83 (83%)	+	650	517 (79,5%)
		2	100	75 (75%)	+		
		3	50	40 (80%)	+		
		4	100	69 (69%)	+		
	3	5	100	48 (48%)	+		
		6	100	72 (72%)	+		
Polinização cruzada	2	8	100	91 (91%)	+	750	612 (81,6%)
		9	100	92 (92%)	+		
		10	100	64 (64%)	+		
		11	100	47 (47%)	+		
	3	12	100	68 (68%)	+		
		13	100	74 (74%)	+		
		14	100	88 (88%)	+		
	6	15	50	44 (88%)	+		

Tabela 26: Número de sementes normais e de sementes anormais tipos I, II, III e IV em frutos de *Tabebuia chrysotricha*, resultantes dos experimentos de polinizações controladas (árvores n^o 2 e 3).

Tratamento	N ^o de frutos examinados	Categorias de sementes	Média	Desvio padrão
Autopolinização manual	9	normais	285,44	63,04
		anormais tipo I	23,78	7,76
		anormais tipo II	18,67	10,44
		anormais tipo III	4,22	4,76
		anormais tipo IV	44,78	14,46
		total de sementes	376,89	66,47
Polinização cruzada manual	10	normais	330,90	46,11
		anormais tipo I	18,90	10,34
		anormais tipo II	18,30	9,57
		anormais tipo III	1,90	1,79
		anormais tipo IV	30,80	14,60
		total de sementes	400,80	47,71
Polinização natural	3	normais	298,33	55,52
		anormais tipo I	12,00	8,48
		anormais tipo II	9,67	2,08
		anormais tipo III	2,33	0,58
		anormais tipo IV	26,00	7,94
		total de sementes	344,67	41,20

Tabela 27: Teste comparativo da germinação de sementes de *Tabebuia heptaphylla*, resultantes de polinizações cruzadas e autopolinizações manuais.

Tratamento	Árvore n ^o	Fruto n ^o	N ^o . de sementes semeadas	N ^o . de sementes germinadas (%)	Poliembriõnia (+/-)	Total de sementes semeadas	Total de sementes germinadas (%)
Autopolinização	1	1	25	19 (76%)	-	50	36 (72%)
		2	25	17 (68%)	-		
Polinização cruzada	1	3	25	20 (84%)	-	50	41 (86%)
	91	4	25	21 (80%)	-		

ção de frutos por polinização natural foi verificada em apenas 8% das flores marcadas (Tabela 23). O baixo número de frutos obtidos no procedimento controle, bem como a formação de apenas três frutos a partir das 60 flores marcadas para verificação dos eventos florais, indicam uma baixa taxa de frutificação natural. A deiscência dos frutos maduros ocorreu entre a 11^a e a 12^a semanas após a realização dos experimentos de polinizações.

O aborto dos pistilos autopolinizados ocorreu de 168 a 216 horas após a polinização. Verificou-se um ligeiro crescimento dos ovários antes da abscisão dos pistilos autopolinizados, porém inferior ao crescimento dos ovários em pistilos submetidos à polinização cruzada no mesmo período (figura 113).

Tabebuia umbellata

Tal como em *T. impetiginosa*, não ocorreu formação de frutos por autopolinização espontânea ou por autopolinização induzida em *T. umbellata* (Tabela 23). Entretanto, tanto os pistilos não-polinizados como os autopolinizados murcharam ou sofreram abscisão entre o 2^o e o 3^o dias após a polinização, sem apresentar qualquer crescimento do ovário. À exemplo do observado nas demais espécies de *Tabebuia*, a produção de frutos por polinização cruzada manual foi quase 3 vezes superior à produção de frutos por polinização natural.

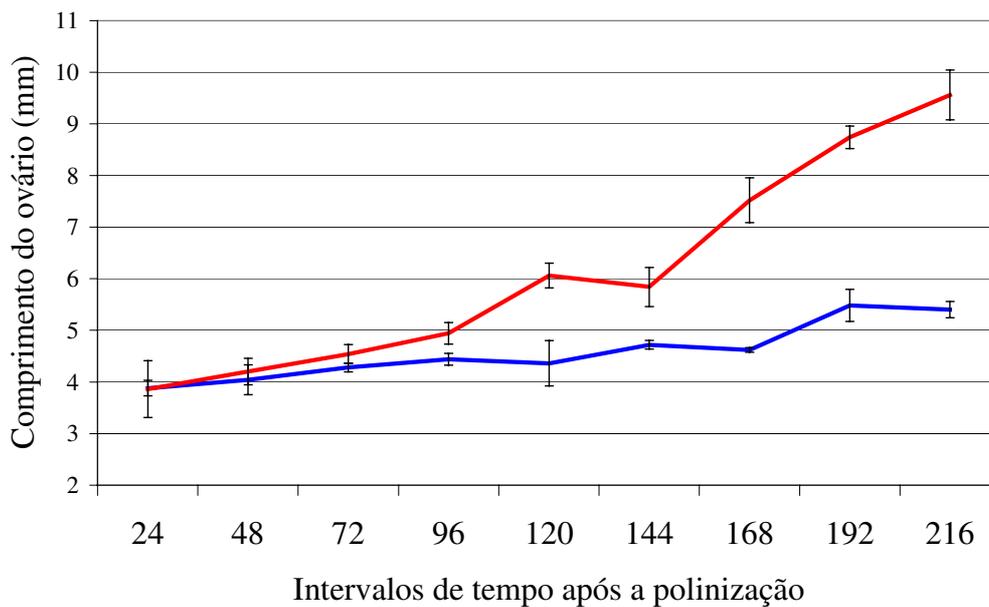


Figura 113: Crescimento do ovário em pistilos de *Tabebuia impetiginosa*, nos intervalos de 24-216 horas após — autopolinização e — polinização cruzada (n = 5, para cada tratamento e intervalo após a polinização).

Tabebuia vellosi

Tal como verificado em *T. impetiginosa* e *T. umbellata*, não ocorreu formação de frutos a partir de flores autopolinizadas ou não-polinizadas em *T. vellosi* (Tabela 23), e o número de frutos formados por polinizações cruzadas manuais foi duas vezes maior que o número de frutos formados por polinizações naturais. Os resultados do teste para a agamospermia não sugerem a ocorrência deste fenômeno em *T. vellosi* (Tabela 24), embora não excluam a possibilidade de ocorrer pseudogamia. A deiscência dos frutos maduros ocorreu um mês após a realização dos experimentos de polinizações.

A maior parte dos pistilos autopolinizados sofreu abscisão 144-168 horas após a polinização; porém, tal como verificado em *T. impetiginosa*, a abscisão dos pistilos autopolinizados foi precedida por um ligeiro crescimento do ovário, embora inferior ao crescimento do ovário em pistilos submetidos à polinização cruzada no mesmo período (figura 114). A análise do crescimento dos óvulos em pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada igualmente revelou tanto o desenvolvimento posterior à polinização em pistilos autopolinizados como a discrepância entre os dois tratamentos, a

qual foi particularmente evidente em relação ao aumento da largura da semente em iniciação, decorrente da emergência da ala (figura 114).

A análise do crescimento dos tubos polínicos no estilete por microscopia de fluorescência sugeriu um pequeno atraso no crescimento dos tubos polínicos em pistilos autopolinizados, relativamente ao crescimento dos tubos polínicos em pistilos submetidos à polinização cruzada, nos intervalos de 24 e 48 horas após a polinização (Tabela 28). Entretanto esta diferença não é estatisticamente significativa, conforme indicado pelo teste t ($p > 0,05$). Apesar da maioria dos

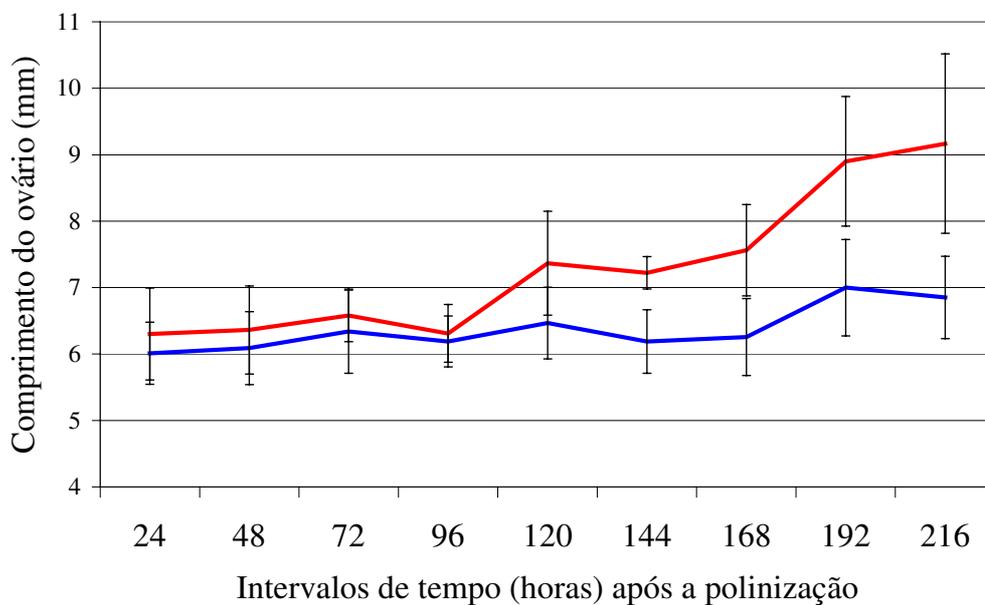


Figura 114: Crescimento do ovário em pistilos de *Tabebuia vellosi*, nos intervalos de 24-216 horas após — autopolinização e — polinização cruzada ($n = 9$, para cada tratamento e intervalo após a polinização).

tubos polínicos em autopolinizações e polinizações cruzadas terem percorrido, respectivamente, não mais que 84 e 89% da distância entre o estigma e a base do estilete até 48 horas após a polinização, alguns tubos polínicos, neste mesmo intervalo, alcançaram a porção ovariana do tecido transmissor, penetrando alguns óvulos nos pistilos submetidos à polinização cruzada. Embora o número de óvulos penetrados não tenha sido quantificado, centenas de tubos polínicos alcançaram o ovário penetrando

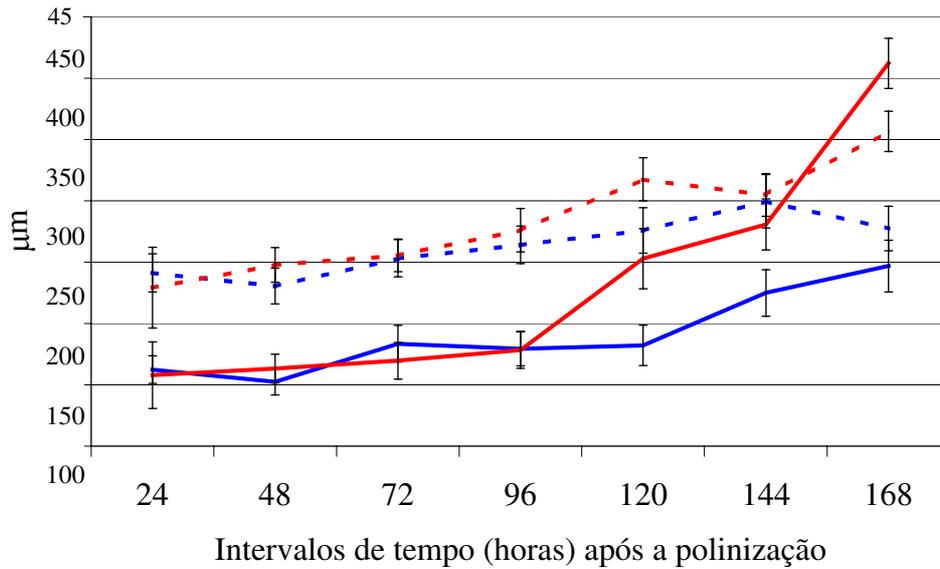


Figura 115: Crescimento dos óvulos de *Tabebuia vellosi* em pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada, 24-168 horas após a polinização. --- comprimento; _____ largura; azul = autopolinização; vermelho = polinização cruzada (n = 10, para cada tratamento e intervalo após a polinização).

muitos óvulos no intervalo de 72 horas após a polinização, tanto em pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada.

Eventos posteriores à polinização em Tabebuia impetiginosa

Em cada face do septo do ovário de *T. impetiginosa*, as placentas se apresentam como duas cristas longitudinais, sobre as quais os óvulos anátropos, unitegumentados e tenuinucelados estão aderidos. As duas placentas de cada lado do septo são separadas pela porção ovariana do tecido transmissor (figura 116), o qual é formado por 7-9 camadas de células. Em pistilos não polinizados, o tecido transmissor do ovário, em secção transversal, consiste de células arredondadas apresentando citoplasma denso (porém vacuolado), espaços intercelulares relativamente amplos e abundante matriz extracelular, a qual se cora fortemente pelo azul-de-astra (figura 117). Uma secreção mucilaginosa foi verificada nos espaços intercelulares e na superfície externa do tecido transmissor, a qual também

corou-se pelo azul-de-astra. A epiderme da placenta apresenta células ligeiramente papilosas e com características histológicas semelhante às do tecido transmissor. A mesma secreção observada na superfície e nos espaços intercelulares do tecido transmissor foi também verificada sobre a superfície externa da epiderme placentária.

Tabela 28: Crescimento dos tubos polínicos no estilete em pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada em *Tabebuia vellosi*, nos intervalos de 24, 48 e 72 hora após a polinização (média \pm desvio padrão⁴⁰, n = 5 pistilos).

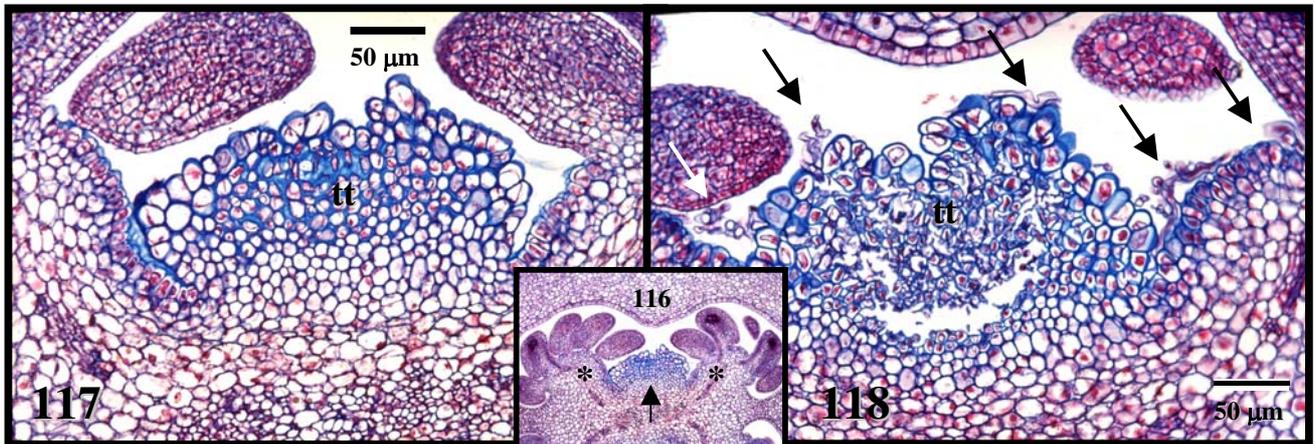
Tratamento	24h		48h		72h	
	c. e.	d. p. (%)	c. e.	d. p. (%)	c. e.	d. p. (%)
Autopolinização	3,20 \pm 0,25	1,44 \pm 0,42 (45%)	3,10 \pm 0,29	2,60 \pm 0,25 (84%)	3,20 \pm 0,27	3,20 \pm 0,27 (100%)
Polinização cruzada	3,14 \pm 0,27	1,60 \pm 0,45 (50%)	3,32 \pm 0,28	2,96 \pm 0,34 (89%)	3,32 \pm 0,30	3,32 \pm 0,30 (100%)

c. e. = comprimento do estilete (cm); d. p. (%) = distância percorrida pelos tubos polínicos (cm) e percentagem da distância até o topo do ovário. O teste *t* (tanto para dados percentuais submetidos à transformação arco-seno como para dados não-transformados) não indicou diferença estatisticamente significativa entre autopolinizações e polinizações cruzadas em nenhum dos intervalos ($p > 0,05$).

Tanto nos pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada, o crescimento de grande número de tubos polínicos sobre a superfície externa e nos espaços intercelulares de tecido transmissor do estilete e do ovário ocasionou o colapso de suas células (figura 118). Após atingir a porção ovariana do tecido transmissor, os tubos polínicos abandonaram o mesmo, desenvolvendo-se sobre a superfície externa da epiderme placentária até alcançarem os óvulos e penetrá-los através da micrópila (figura 122).

O desenvolvimento do saco embrionário de *T. impetiginosa* é do tipo *Polygonum*, tal como usualmente verificado em Bignoniaceae. Entretanto, em todos os ovários examinados no intervalo de

24 horas após a polinização, uma parcela dos óvulos apresentavam saco embrionário ainda imaturo (figura 119) - i.e. nos estádios de cenócitos 2-, 4-, ou 8-nucleados (aproximadamente 43% dos óvulos em pistilos autopolinizados e 30% dos óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada) -, ou eram



Figuras 116-118: Secções transversais do ovário de *Tabebuia impetiginosa*. 116: Placentas (asteriscos) e tecido transmissor (seta). 117-118: Tecido transmissor antes (117) e após (118) o desenvolvimento dos tubos polínicos (setas). Coloração: azul-de-astra e fucsina básica. tt = tecido transmissor.

óvulos não-funcionais (figuras 137-138) - i.e. destituídos de saco embrionário, ou contendo saco embrionário de estrutura anômala⁴¹ (aproximadamente 6% dos óvulos em pistilos de ambos os tratamentos) (Tabela 29 e figura 125A e 132A). O restante dos óvulos apresentavam saco embrionário maduro e de estrutura normal (figuras 120-121), i.e. com duas sinérgides, e uma oosfera no pólo micropilar, uma ampla célula média na região central e três antípodas no pólo calazal (aproximadamente 51% dos óvulos em pistilos autopolinizados e 64% em pistilos submetidos à polinização cruzada; Tabela 29 e figura 125A e 132A). O teste do qui-quadrado indicou diferença estatisticamente significativa quanto ao número de óvulos contendo saco embrionário imaturo vs. sem esta condição, entre pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada no intervalo de 24 horas ($\chi^2 = 24,6$, $df = 1$, $p < 0,001$).

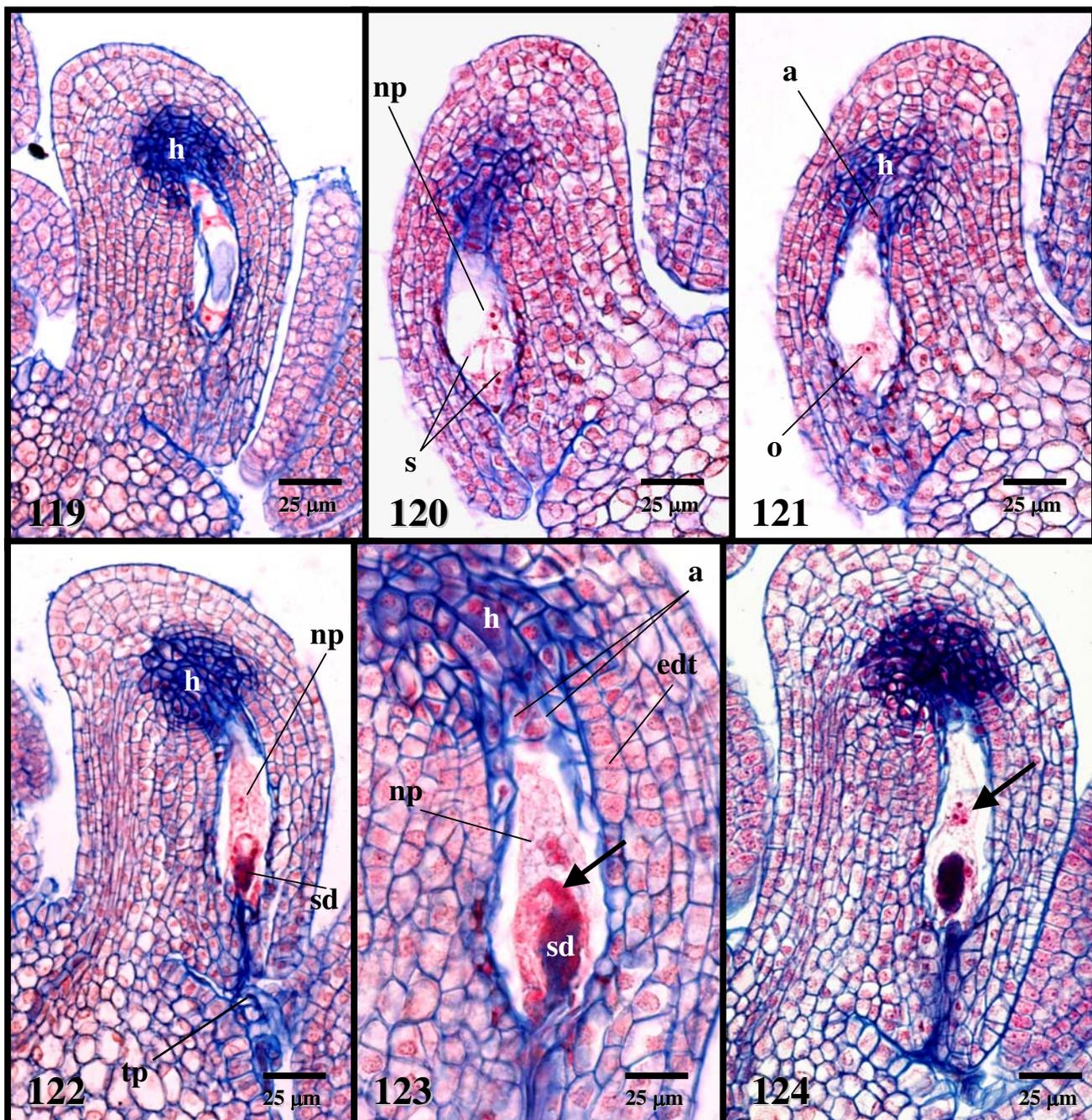
⁴⁰ O desvio padrão neste caso não reflete a verdadeira variação no crescimento dos tubos polínicos, pois o ponto médio aproximado da distância percorrida por centenas de tubos polínicos ao longo do tecido transmissor do estilete, em cada intervalo após a polinização, foi estabelecido visualmente.

Penetração dos óvulos

Em todos os pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada examinados no intervalo de fixação de 48 horas, vários óvulos já haviam sido penetrados por tubos polínicos (Tabela 29). Entretanto, a incidência de óvulos receptivos (i.e. portando um saco embrionário maduro e funcional) penetrados, relativamente ao total de óvulos receptivos, foi significativamente superior em polinizações cruzadas, tanto no intervalo de 48, como no de 72 horas após a polinização ($\chi^2 = 117,7$, $df = 1$, $p < 0,001$; $\chi^2 = 37,1$, $df = 1$, $p < 0,001$, respectivamente), embora a maioria dos óvulos receptivos em ambos os tratamentos tenham sido penetrados e fecundados no intervalo de 72 horas (Tabela 29, figura 125C). A percentagem de óvulos receptivos penetrados em pistilos autopolinizados praticamente se igualou à mesma em pistilos submetidos à polinização cruzada no intervalo de 72 horas; porém a discrepância entre os dois tratamentos quanto ao número de óvulos receptivos não-penetrados foi ainda significativa neste intervalo, desaparecendo nos intervalos subseqüentes (Tabela 29, figura 125C-E). Virtualmente, todos os óvulos funcionais, tanto em autopolinizações como em polinizações cruzadas, foram penetrados 120 horas após a polinização (Tabela 29, figura 125E). Não foi observada qualquer variação no número de óvulos penetrados em diferentes níveis do ovário.

Após a cópula, o tubo polínico descarrega seu denso conteúdo protoplasmático no interior da sinérgide degenerativa, obscurecendo os componentes internos desta célula (figuras 122-124). Tal como no estudo histológico dos eventos posteriores à penetração dos óvulos realizados em *Spathodea campanulata* (capítulo 5), não foi possível observar diretamente a transferência dos núcleos das células espermáticas para os protoplasmas da oosfera e da célula média. Porém os óvulos contendo uma sinérgide penetrada fortemente corada, bem como apresentando uma alça citoplasmática no seu pólo calazal, (figuras 122-123) foram computados como óvulos fecundados. A incidência de óvulos

⁴¹ Foram considerados anômalos os sacos embrionários não celularizados apresentando protoplasma contraído e irregularmente corado, ou os sacos embrionários não celularizados com formato irregular, algumas vezes apresentando núcleos extra-numerários e em posicionamento não usual.



Figuras 119-124: Secções longitudinais de óvulos de *Tabebuia impetiginosa*. 119: Saco embrionário imaturo (2-nucleado). 120-121: Secções seriadas de um mesmo óvulo contendo saco embrionário maduro (receptivo); 120: sinérgides e núcleos polares; 121: oosfera e antípodas. 122: Óvulo penetrado e fecundado. 123: Saco embrionário fecundado, com sinérgide degenerativa apresentando alça citoplasmática em torno do pólo calazal da oosfera (seta). 124: Óvulo fecundado no momento da fusão tripla (seta). Coloração: azul-de-astra e fucsina-básica. a = antípodas; edt = endotélio; h = hipóstase; np = núcleos polares; o = oosfera; s = sinérgides; sd = sinérgide degenerativa; tp = tubo polínico.

Tabela 29: Óvulos de *Tabebuia impetiginosa*: eventos posteriores à polinização nos intervalos de fixação de 24-216 horas, em pistilos autopolinizados (auto) vs. pistilos submetidos à polinização cruzada (cruz)*

Estádio de desenvolv.	24 h		48 h		72 h		96 h		120 h		144 h		168 h		192		216	
	auto	cruz	auto	cruz														
se 2n	31 (4,6%)	20 (3,2%)	20 (3,1%)	6 (0,9%)	3 (0,4%)	1 (0,1%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
se 4n	184 (27,4%)	133 (21,1%)	101 (15,8%)	116 (16,9%)	58 (7,8%)	50 (5,8%)	17 (2,5%)	18 (2,3%)	3 (0,5%)	1 (0,1%)	0	0	0	0	0	0	0	0
se 8n	75 (11,2%)	35 (5,6%)	16 (2,5%)	15 (2,2%)	2 (0,3%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
se 7c (np)	345 (51,3%)	400 (63,6%)	416 (65,0%)	295 (43,0%)	51 (6,9%)	8 (0,9%)	9 (1,3%)	6 (0,8%)	0	1 (0,1%)	2 (0,3%)	0	10 (1,2%)	0	1 (0,1%)	0	0	0
se 7c (p)	0	0	11 (1,7%)	25 (3,6%)	11 (1,5%)	2 (0,2%)	1 (0,1%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
se 7c (f)	0	0	40 (6,2%)	187 (27,2%)	364 (49,1%)	234 (27,4%)	60 (9,0%)	8 (1,0%)	5 (0,9%)	0	9 (1,3%)	0	2 (0,2%)	0	1 (0,1%)	0	1 (0,1%)	0
end 2c	0	0	0	0	154 (20,8%)	329 (38,5%)	229 (34,2%)	111 (14,1%)	13 (2,4%)	2 (0,3%)	10 (1,5%)	0	15 (1,8%)	0	1 (0,1%)	1 (0,1%)	0	0
end 3c	0	0	0	0	2 (0,3%)	25 (2,9%)	59 (8,8%)	49 (6,2%)	15 (2,8%)	5 (0,7%)	10 (1,5%)	1 (0,1%)	7 (0,8%)	0	0	0	0	0
end 4c	0	0	0	0	0	38 (4,4%)	93 (13,9%)	180 (22,9%)	83 (15,3%)	26 (3,8%)	60 (9,0%)	10 (1,5%)	19 (2,3%)	0	7 (1,0%)	0	4 (0,6%)	0
end 5c	0	0	0	0	0	0	3 (0,4%)	19 (2,4%)	13 (2,4%)	5 (0,7%)	7 (1,0%)	0	1 (0,1%)	0	0	0	0	0
end 6c	0	0	0	0	0	0	10 (1,5%)	174 (22,1%)	233 (43,1%)	358 (52,3%)	344 (51,1%)	240 (36,4%)	384 (46,5%)	37 (5,7%)	238 (33,0%)	3 (0,4%)	176 (27,7%)	0
end 7c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 (0,7%)	9 (1,3%)	6 (0,9%)	11 (1,3%)	3 (0,4%)	7 (1,0%)	1 (0,1%)	7 (1,1%)	0
end 8c	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (0,4%)	63 (9,2%)	47 (7,0%)	186 (28,2%)	119 (14,4%)	328 (50,2%)	217 (30,0%)	145 (21,3%)	221 (34,7%)	39 (5,0%)
end 9c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,1%)	0	0	10 (1,5%)	0	13 (1,9%)	3 (0,5%)	7 (0,9%)
end 10c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,1%)	1 (0,1%)	7 (1,1%)	4 (0,5%)	73 (11,2%)	4 (0,5%)	280 (41,1%)	3 (0,5%)	256 (33,1%)
end 11c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (0,4%)	0	15 (1,9%)
end 12c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (0,3%)	0	24 (3,5%)	0	164 (21,2%)
end 13c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (0,4%)
end 14c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19 (2,4%)
anôm (np)	29 (4,3%)	27 (4,3%)	16 (2,5%)	27 (3,9%)	80 (10,8%)	139 (16,2%)	148 (22,1%)	189 (24,0%)	125 (23,1%)	167 (24,4%)	138 (20,5%)	121 (18,3%)	168 (20,4%)	113 (17,3%)	128 (17,7%)	90 (13,2%)	118 (18,5%)	96 (12,4%)
anôm (p)	0	0	0	0	2 (0,3%)	1 (0,1%)	0	2 (0,2%)	3 (0,5%)	6 (0,9%)	1 (0,1%)	6 (0,9%)	4 (0,5%)	6 (0,9%)	4 (0,5%)	10 (1,5%)	4 (0,6%)	3 (0,4%)
sse (np)	8 (1,2%)	14 (2,2%)	20 (3,1%)	15 (2,2%)	14 (1,9%)	28 (3,3%)	40 (6,0%)	30 (3,8%)	43 (7,9%)	40 (5,9%)	34 (5,0%)	77 (11,7%)	79 (9,6%)	77 (11,8%)	111 (15,4%)	103 (15,12%)	95 (14,9%)	165 (21,3%)
sse (p)	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,1%)	3 (0,5%)	4 (0,6%)	0	6 (0,9%)	2 (0,2%)	4 (0,6%)	3 (0,4%)	8 (1,2%)	4 (0,6%)	7 (0,9%)
Total	672	629	640	686	741	855	669	787	541	684	673	660	825	653	722	681	636	774

Legenda da Tabela 29: * Cada coluna contém observações de 4 pistilos selecionados aleatoriamente para cada tratamento. se 2n = óvulo contendo saco embrionário 2-nucleado; se 4n = óvulo com saco embrionário 4-nucleado; se 8n = óvulo com saco embrionário 8-nucleado; se 7c (np) = óvulo portando saco embrionário maduro (7-celular), não-penetrado pelo tubo polínico; se 7c (p) = óvulo penetrado pelo tubo polínico, contendo saco embrionário maduro ainda não fecundado; se 7c (f) = óvulo penetrado e com saco embrionário fecundado; end 2c = óvulo contendo endosperma 2-celular; end 3c = óvulo contendo endosperma 3-celular; óvulo com endosperma 4-celular; end 5c = óvulo com endosperma 5-celular; end 6c = óvulo com endosperma 6-celular; end 7c = óvulo com endosperma 7-celular; end 8c = óvulo com endosperma 8-celular; end 9c = óvulo com endosperma 9-celular; end 10c = óvulo com endosperma 10-celular; end 11c = óvulo com endosperma 11-celular; end 12c = óvulo com endosperma 12-celular; end 13c = óvulo com endosperma 13-celular; end 14c = óvulo com endosperma 14-celular; anôm (np) = óvulo contendo saco embrionário anômalo ou degenerado, não-penetrado pelo tubo polínico; anôm (p) = óvulo contendo saco embrionário anômalo ou degenerado, penetrado pelo tubo polínico; sse (np) = óvulo destituído de saco embrionário, não-penetrado pelo tubo polínico; sse (p) = óvulo destituído de saco embrionário, penetrado pelo tubo polínico.

receptivos fecundados, relativamente ao total de óvulos receptivos, foi significativamente maior em pistilos submetidos à polinização cruzada, nos intervalos de 48 e 72 horas ($\chi^2 = 109,1$, $df = 1$, $p < 0,001$, $\chi^2 = 45,0$, $df = 1$, $p < 0,001$, respectivamente; Tabela 29, figuras 132B-C).

Desenvolvimento do endosperma

Após a fusão tripla (figura 124), a célula média sofre uma divisão transversal, originando uma célula micropilar e uma célula calazal (estádio bicelular do endosperma), sendo a primeira mais volumosa que a segunda (figura 126). No intervalo de 72 horas após a polinização, endospermas bicelulares foram observados em cerca de 20,8% dos óvulos em pistilos autopolinizados e em 38,5% dos óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada (Tabela 29, figura 132C). Embora o segundo ciclo de divisões em geral tenha sido observado simultaneamente em ambas as células do endosperma

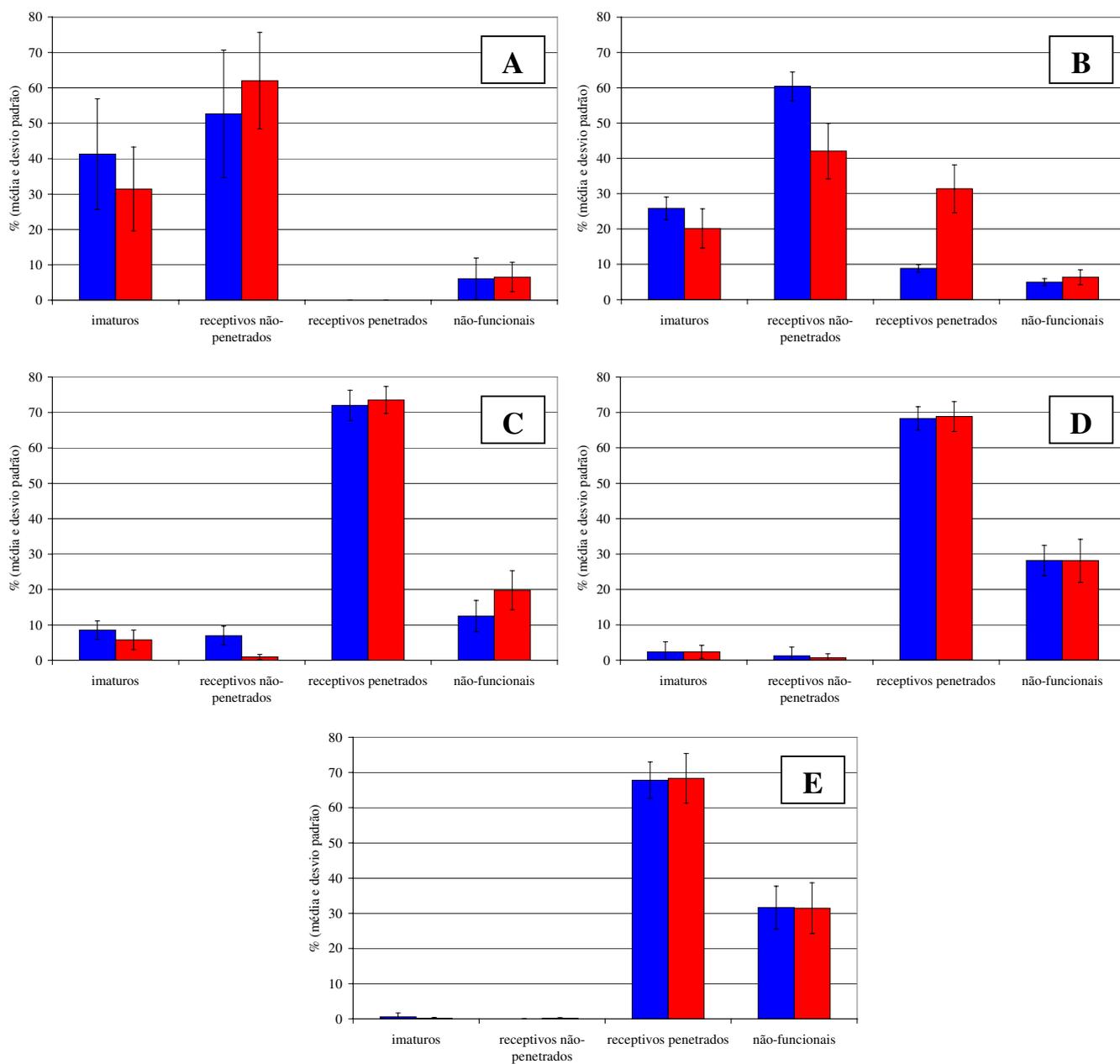
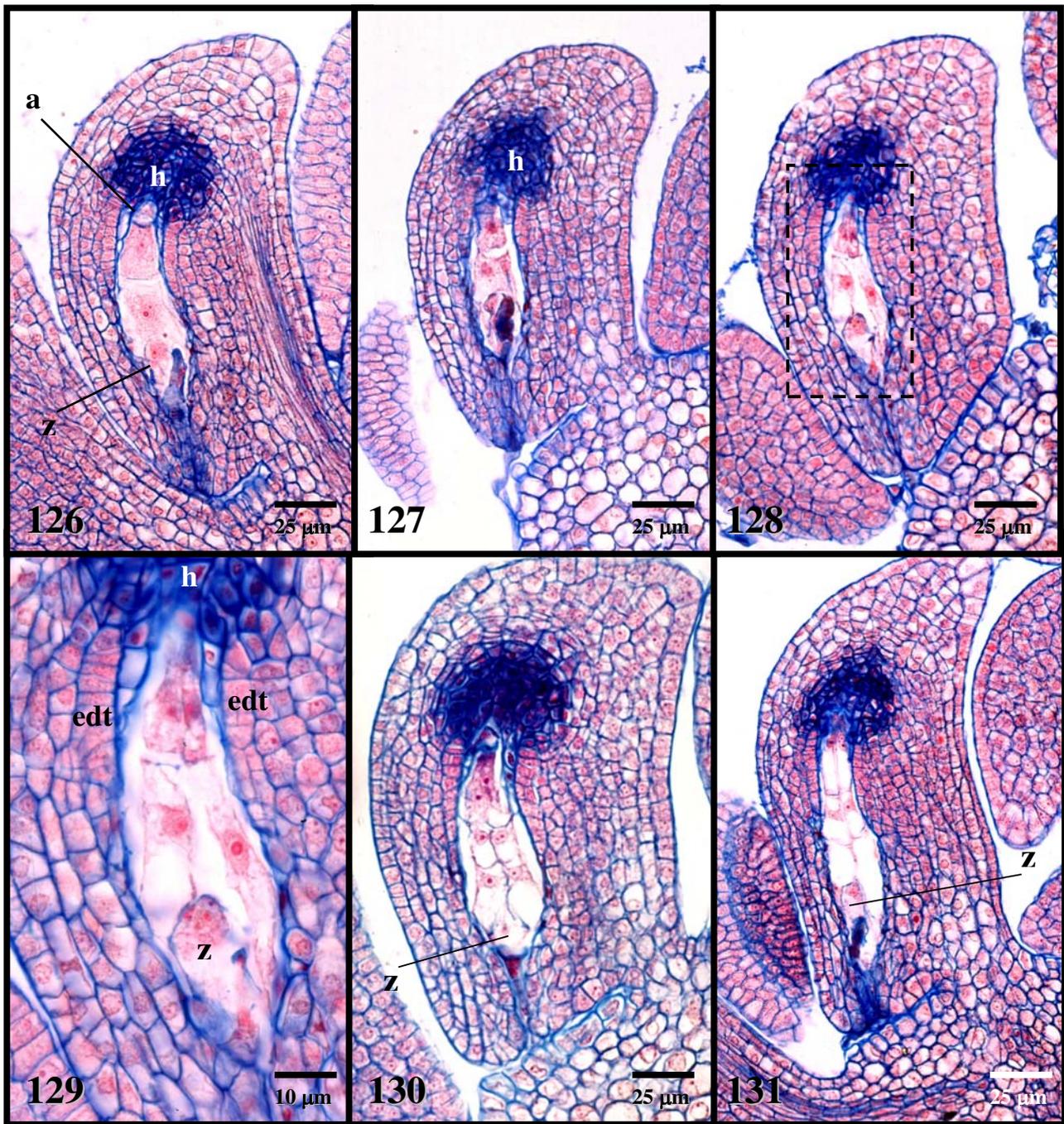
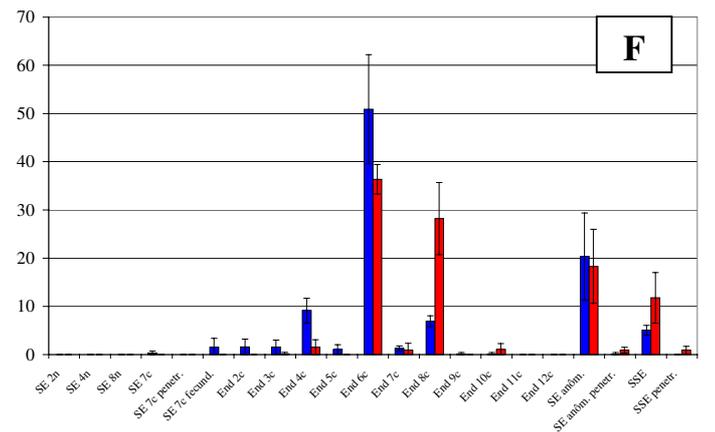
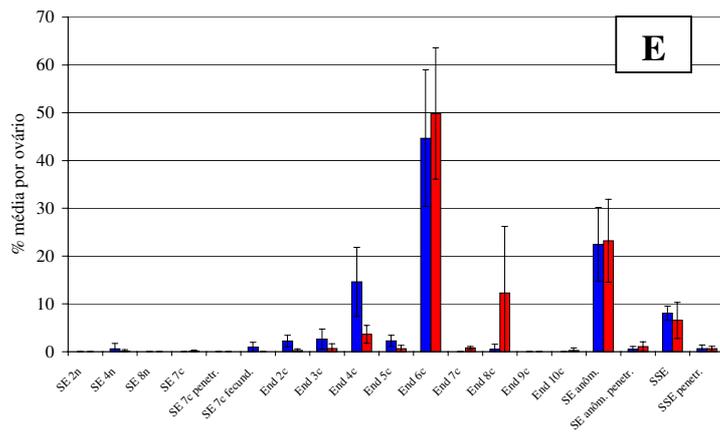
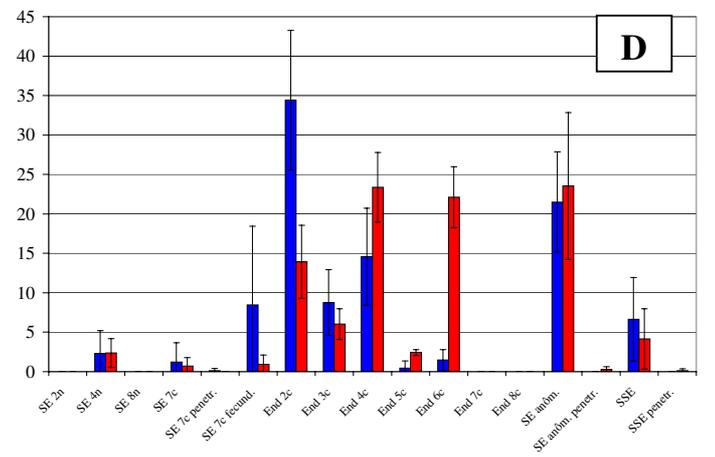
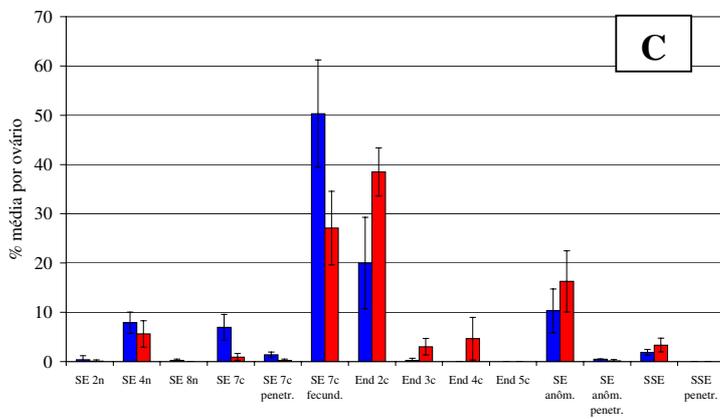
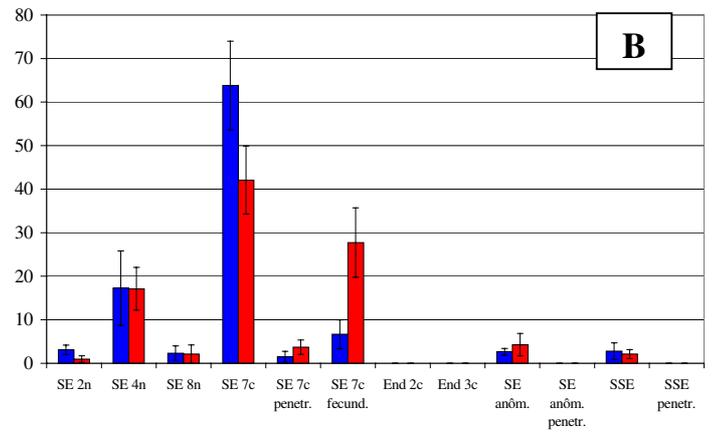
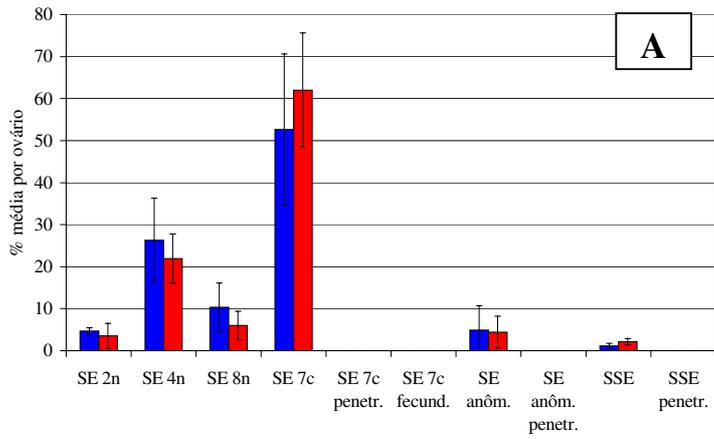


Figura 125: Óvulos de *Tabebuia impetiginosa*, 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) e 120 (E) horas após a polinização (versão sumária). Foram utilizados 4 pistilos para cada tratamento e intervalo após a polinização. ■ autopolinização; ■ polinização cruzada.



Figuras 126-131: Secções longitudinais de óvulos de *Tabebuia impetiginosa*. 126: Endosperma 2-celular. 127: Endosperma 3-celular; 128: Endosperma 4-celular. 129: Inserção da figura anterior em maior aumento. 130: Endosperma 6-celular. 131: Endosperma 6-celular (em estágio posterior ao mostrado na figura anterior. Coloração: azul-de-astra e fucsina-básica. a = antípodas; edt = endotélio; h = hipóstase; z = zigoto.



Estádios de desenvolvimento

Estádios de desenvolvimento

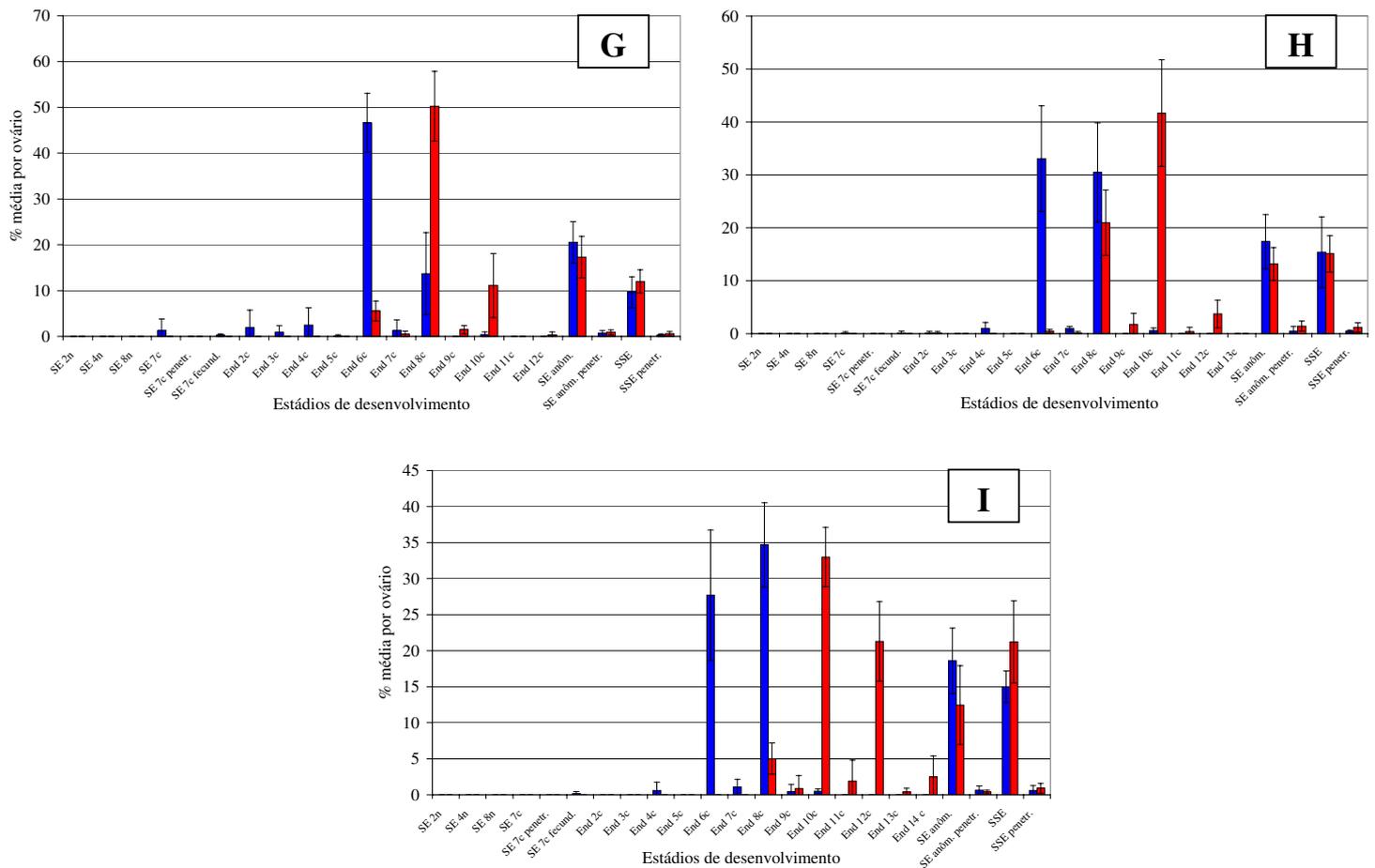


Figura 132: Óvulos de *Tabebuia impetiginosa*, 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D), 120 (E), 144 (F); 168 (G), 192 (H) e 216 (I) horas após a polinização (versão detalhada). Foram utilizados 4 pistilos para cada tratamento e intervalo após a polinização. As barras verticais indicam os desvios padrões. SE = saco embrionário; 2n, 4n e 8n = 2-, 4- e 8-nucleado, respectivamente; 7c = 7-celular (receptivo); penetr. = penetrado porém não-fecundado; fecund. = fecundado; End = endosperma; 2c, 3c, 4c, 5c, 6c, 7c, 8c, 9c, 10c, 11c, 12c, 13c, 14c = 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-celular, respectivamente. ■ autopolinização; ■ polinização cruzada.

2-celular, originando o endosperma 4-celular (figuras 128-129), em alguns óvulos a divisão da célula micropilar precedeu a divisão da célula calazal, dando origem a um efêmero estágio 3-celular (figura 127). As divisões nas células micropilar e calazal do endosperma 2-celular foram usualmente longitudinais, embora em algumas ocasiões uma divisão transversal na célula micropilar tenha sido

observada. Ao contrário do observado em *Spathodea campanulata* (capítulo 5), a divisão da célula calazal no endosperma 2-celular foi sempre seguida de citocinese. O número de óvulos contendo endosperma 3-celular no intervalo de 72 horas foi maior em pistilos submetidos à polinização cruzada (Tabela 29). Ainda no intervalo de 72 horas, alguns óvulos contendo endosperma 4-celular foram vistos em polinizações cruzadas, mas nenhum endosperma 4-celular foi observado em pistilos autopolinizados neste intervalo (Tabela 29). As diferenças entre pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada, tanto para óvulos fecundados mas ainda não apresentando endosperma em iniciação vs. óvulos apresentando endosperma 2-celular ou em estágio posterior, como para óvulos com endosperma 2-celular ou em estágio precedente vs. óvulos contendo endosperma em estágio 3- ou 4-celular, foram estatisticamente significativas (Tabela 30).

No intervalo de 96 horas após a polinização, 13,9% dos óvulos em pistilos autopolinizados apresentaram endosperma 4-celular, ao passo que em pistilos submetidos à polinização cruzada a percentagem de óvulos contendo endosperma 4-celular foi de 22,9% (Tabela 29, figura 132D). Novamente a diferença entre autopolinizações e polinizações cruzadas quanto ao número de óvulos contendo endospermas em estágio 3-celular ou precedente vs. óvulos apresentando endosperma 4-celular ou posterior foi estatisticamente significativa (Tabela 30). Da mesma forma, a incidência de óvulos contendo endospermas 5- e 6-celulares vs. óvulos sem estas condições foi significativamente maior em pistilos submetidos à polinização cruzada no intervalo de 96 horas (Tabelas 29 e 30, figura 132D).

Por outro lado, a incidência de óvulos fecundados mas ainda não apresentando um endosperma em iniciação, bem como o número de óvulos contendo endosperma 2- ou 3-celular, tornaram-se inferiores em pistilos submetidos à polinização cruzada, relativamente aos autopolinizados, no intervalo de 96 horas (Tabela 29, figura 132D). Este mesmo ciclo de ascensão e queda da incidência de óvulos contendo endospermas em um determinado estágio de desenvolvimento, ambas ocorrendo mais cedo em pistilos submetidos à polinização cruzada do que em pistilos autopolinizados, foi observado

em todos os estádios de desenvolvimento do endosperma até o último intervalo de fixação verificado (Tabela 29, figuras 132E-I, figuras 139-140), sendo as diferenças entre autopolinizações e polinizações cruzadas sempre estatisticamente significativas (Tabela 30). Porém verificou-se também uma progres-

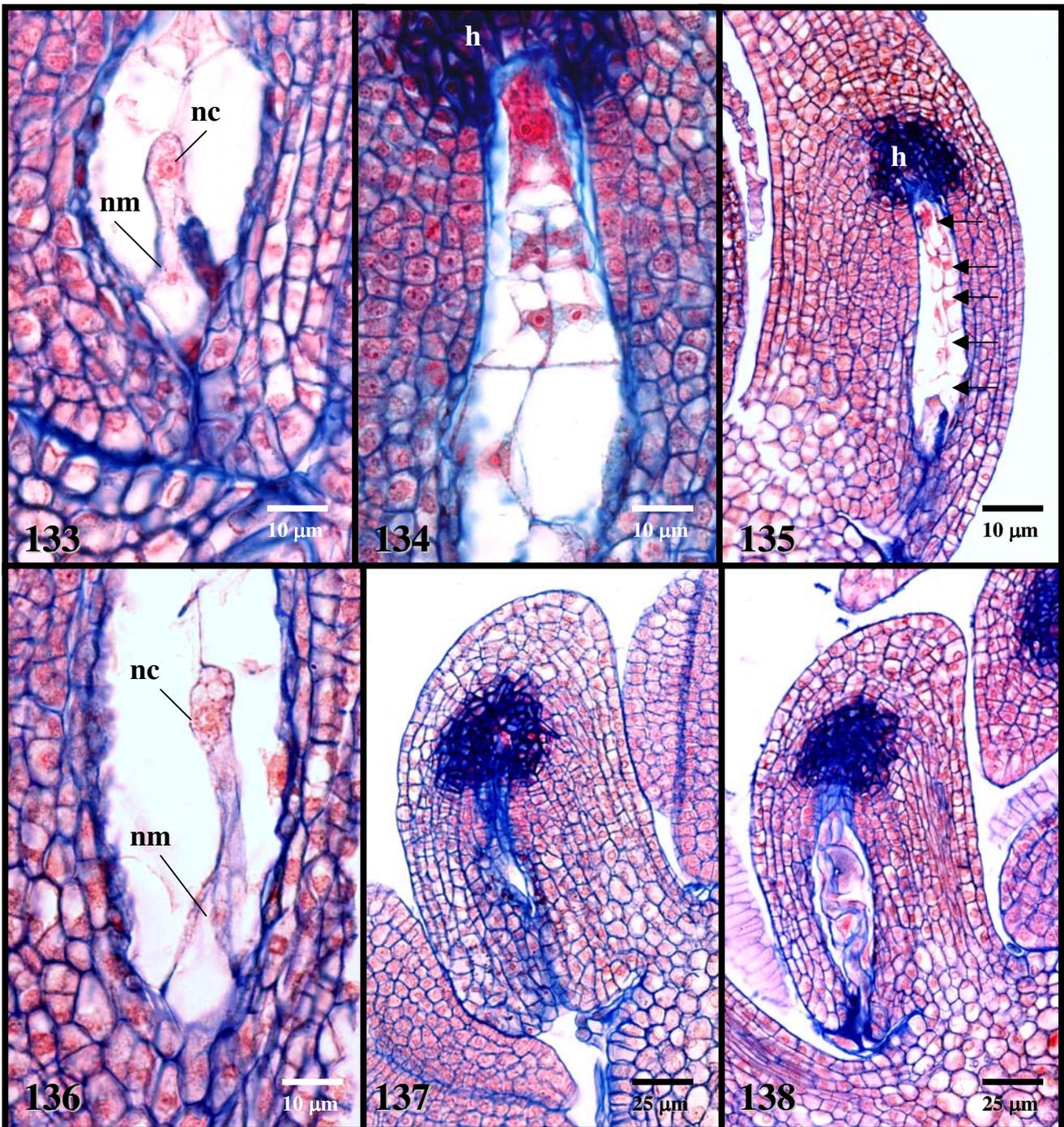
Tabela 30: Testes qui-quadrado da significância estatística da diferença entre pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada, relativamente à incidência de óvulos portando endospermas nos estádio 2-14-celulares, nos intervalos de 72-216 horas após a polinização.

Intervalo de fixação (h)	Estádios de desenvolvimento testados	χ^2	df	p
72	Óvulos fecundados mas ainda não apresentando endosperma em iniciação vs. óvulos apresentando endosperma 2-celular ou em estágio posterior.	148,9	1	< 0,001
	Óvulos com endosperma 2-celular ou em estágio precedente vs. óvulos contendo endosperma em estágio 3- ou 4-celular.	55,0	1	< 0,001
96	Óvulos contendo endosperma em estágio 3-celular ou precedente vs. óvulos apresentando endosperma 4-celular ou em estágio posterior.	207,0	1	< 0,001
	Óvulos contendo endosperma 5-celular ou em estágio precedente vs. óvulos com endosperma 6-celular.	165,6	1	< 0,001
	Óvulos contendo endosperma 6-celular ou em estágio precedente vs. óvulos sem esta condição.	148,3	1	< 0,001
120	Óvulos contendo endosperma 6-celular ou em estágio precedente vs. óvulos com endosperma 7-celular ou em estágio posterior.	53,1	1	< 0,001
	Óvulos contendo endosperma 7-celular ou em estágio precedente vs. óvulos com endosperma 8-celular.	48,5	1	< 0,001
144	Óvulos contendo endosperma 7-celular ou em estágio precedente vs. óvulos com endosperma 8-celular ou em estágio posterior.	136,6	1	< 0,001
168	Óvulos contendo endosperma 7-celular ou em estágio precedente vs. óvulos com endosperma 8-celular ou em estágio posterior.	491,8	1	< 0,001
	Óvulos contendo endosperma 8-celular ou em estágio precedente vs. óvulos com endosperma 9- ou 10-celular.	102,2	1	< 0,001
192	Óvulos contendo endosperma 9-celular ou em estágio precedente vs. óvulos com endosperma 10-celular ou em estágio posterior.	445,5	1	< 0,001
	Óvulos contendo endosperma 10-celular ou em estágio precedente vs. óvulos com endosperma 11- ou 12-celular.	28,1	1	< 0,001
216	Óvulos contendo endosperma 9-celular ou em estágio precedente vs. óvulos com endosperma 10-celular ou em estágio posterior.	738,9	1	< 0,001
	Óvulos contendo endosperma 10-celular ou em estágio precedente vs. óvulos com endosperma 11-celular ou em estágio posterior.	212,3	1	< 0,001

siva desaceleração do desenvolvimento em óvulos de pistilos autopolinizados, relativamente ao desenvolvimento dos óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada, e conseqüentemente um aumento progressivo da discrepância entre autopolinizações e polinizações cruzadas quanto ao progresso de desenvolvimento dos óvulos (figuras 139-140). Além disso, a abscisão da maioria dos

pistilos autopolinizados ocorreu num momento em que a incidência de óvulos apresentando endosperma 8-celular ainda apresentava uma tendência ascendente (figura 139), ao passo que nos pistilos submetidos à polinização cruzada a ascensão e a queda da incidência de óvulos contendo endospermas 8- e 10-celulares foi verificada no mesmo período (figura 140). Muito poucos óvulos apresentando endosperma 10-celular (figura 135) foram vistos em pistilos autopolinizados (144-216 horas após a polinização; Tabela 29, figuras 132F-I), e este foi o estágio mais avançado do desenvolvimento endospermico observado em pistilos autopolinizados, ao passo que óvulos contendo endospermas 11-, 12-, 13- e 14-c foram verificados em pistilos submetidos à polinização cruzada (168-216 horas após a polinização; Tabela 29, figuras 132G-I e 140).

Do estágio 6-celular (figuras 130-131) até os últimos estágios da endospermogênese verificados, tanto em pistilos autopolinizados como em pistilos submetido à polinização cruzada, as divisões celulares foram usualmente transversais, originando duas fileiras longitudinais de células (figuras 134-135), todas elas derivadas do par transversal mediano de células do corpo do endosperma 6-celular, tal como verificado em *Spathodea campanulata* (capítulo 5). Não foram observadas divisões nos pares micropilar e calazal de células endospermicas, e tradicionalmente admite-se que as células micropilares e calazais do endosperma em iniciação de Bignoniaceae estão destinadas a constituir os haustórios micropilar e calazal, respectivamente (Johri *et al.* 1992; Shivaramiah 1998). Já no estágio 6-celular um aumento de densidade citoplasmática foi observado no par de células calazais do endosperma de *T. impetiginosa* (figura 130), ao passo que nenhum aumento de densidade citoplasmática foi verificado nas células micropilares. Embora as sucessivas divisões em cada par de células da região intermediária do corpo do endosperma tenham sido geralmente simultâneas, algumas divisões não-sincronizadas, tal como observado na transição dos estágios 4-6-celulares, foram verificadas, resultando nos efêmeros estágios com números ímpares de células nos endospermas (Tabela 29). Embora alguns endospermas com um arranjo celular algo diferente do descrito acima tenham sido ocasionalmente observados, nenhum sinal de malformação no endosperma foi verificado,



Figuras 133-138: Secções longitudinais de óvulos e de sementes jovens de *Tabebuia impetiginosa*. 133: Tubo proembriônico inicial (144 horas após polinização cruzada). 134: Endosperma 8-celular. 135: endosperma 10-celular. Setas indicam os 5 pares de células endospermicas 136: Tubo proembriônico, 168 horas após polinização cruzada. 137: Óvulo sem saco embrionário (não-penetrado). 138: Óvulo com saco embrionário anômalo, penetrado. Coloração: azul-de-astro e fucsina-básica. h = hipóstase, nc = núcleo calazal do tubo proembriônico, nm = núcleo micropilar do tubo proembriônico,

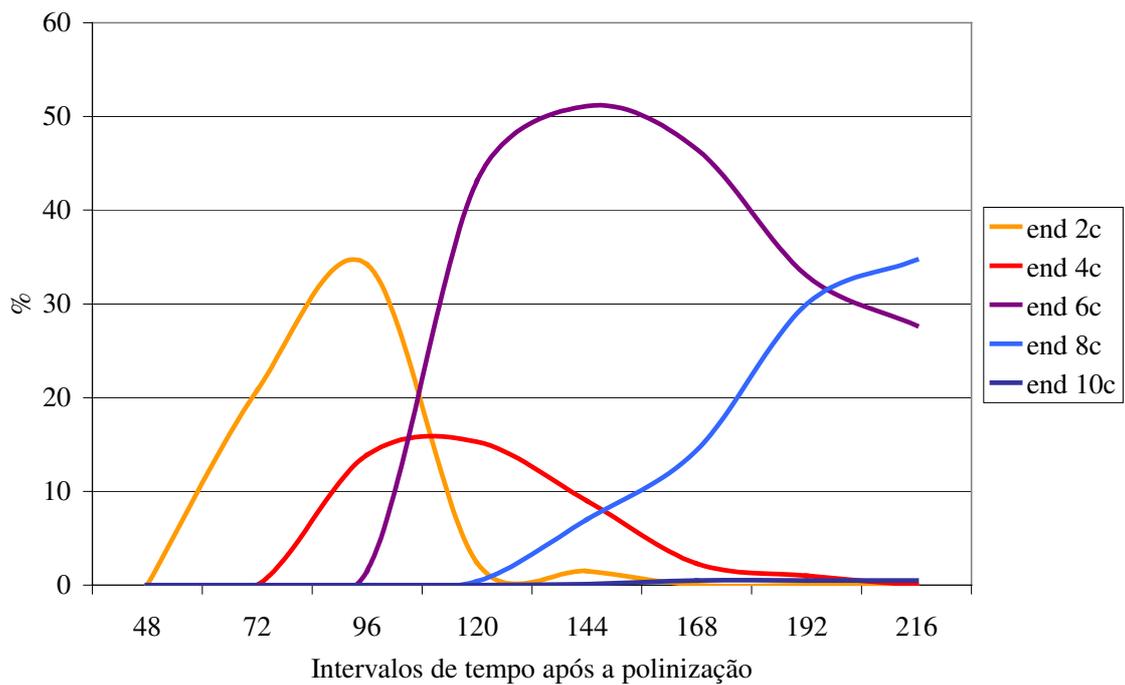


Figura 139: Percentagens de óvulos contendo endospermas 2-, 4-, 6-, 8- e 10-celulares em pistilos autopolinizados de *Tabebuia impetiginosa*, nos intervalos de 48-216 horas após a polinização (n = 4 pistilos).

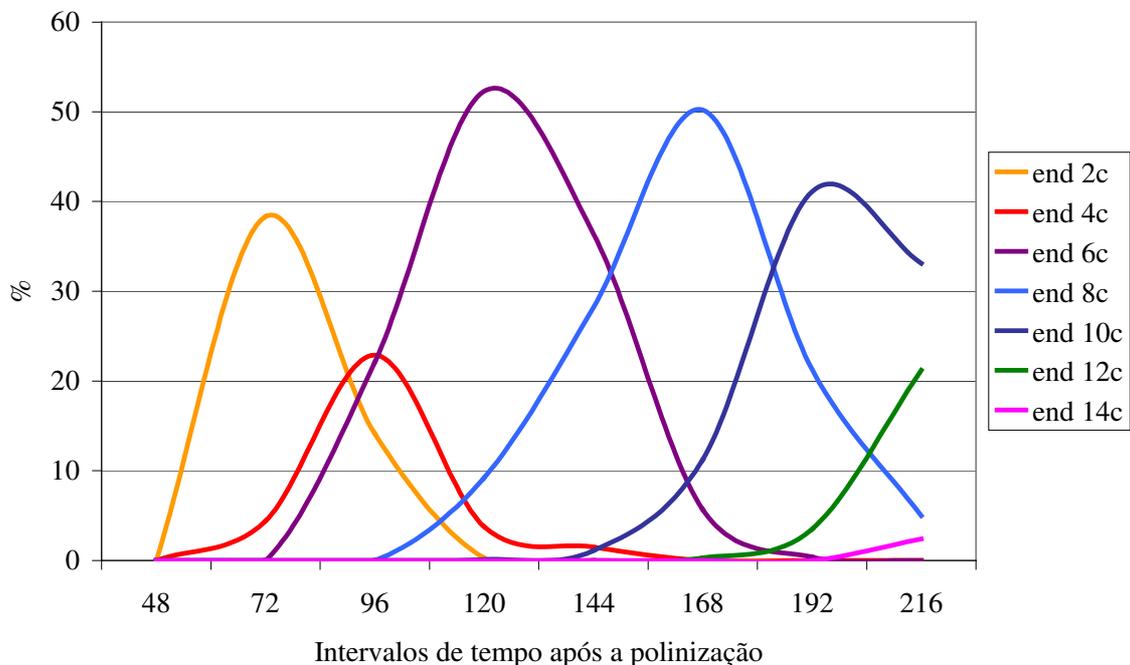


Figura 140: Percentagens de óvulos contendo endospermas 2-, 4-, 6-, 8-, 10-, 12- e 14-celulares em pistilos submetidos à polinização cruzada de *Tabebuia impetiginosa*, nos intervalos de 48-216 horas após a polinização (n = 4 pistilos).

seja em autopolinizações ou em polinizações cruzadas. Efetivamente, até o intervalo de 216 horas, tanto em pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada, nenhum sinal de mal-funcionamento (salvo o desenvolvimento mais lento em pistilos autopolinizados) foi observado nos endospermas

Formação do tubo proembriônico

A presença de uma parede celular corada pelo azul-de-astra no pólo calazal da oosfera entre os estádios 4-6-celular do desenvolvimento endospérmico (figura 129) é um indicativo de que a mesma se tornou um zigoto. Nos estádios subseqüentes o zigoto gradualmente se torna cilíndrico (figura 131). Embora não tenha sido feita nenhuma observação direta da cariocinese no núcleo do zigoto, um tubo proembriônico binucleado foi claramente verificado a partir do 6^o ou 7^o dias após a polinização, tanto em pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada (figuras 133 e 136). O tubo proembriônico de *T. impetiginosa* apresentou as mesmas características do tubo proembriônico de *S. campanulata* (capítulo 5), i.e.: núcleo micropilar inconspícuo e posicionado junto à base do proembrião; núcleo calazal proeminente, posicionado junto à extremidade apical do proembrião e envolvido por denso citoplasma; núcleos calazal e micropilar separados por um amplo vacúolo; crescimento apical em direção à região e calazal, entre as duas fileiras longitudinais de células endospérmicas. Restos das sinérgides permaneceram na extremidade micropilar do endosperma, adjacentes à base do tubo proembriônico (figuras 133 e 135), e o tubo polínico também permaneceu visível na abertura micropilar até o último estágio monitorado. Tal como no desenvolvimento do endosperma, e tal como em *S. campanulata*, nenhum sinal de mal-funcionamento do tubo proembriônico foi verificado, sendo que o mesmo permaneceu binucleado até o último estágio monitorado.

Óvulos imaturos e óvulos não-funcionais

Embora representem uma parcela muito pequena dos óvulos em pistilos fixados 24 hora após a polinização, os óvulos não-funcionais passaram a constituir cerca de 35% do total de óvulos no intervalo de 216 horas (Tabela 29), sendo que a maior parte do aumento da incidência de óvulos não-funcionais se deu entre os intervalos de 24 e 120 horas após a polinização (figura 125A-E). Contrariamente, observou-se um decréscimo da incidência de óvulos imaturos até a sua total extinção em pistilos fixados 144 horas após a polinização. Verificou-se durante as análises histológicas que o saco embrionário na maior parte dos óvulos imaturos, especialmente em óvulos contendo sacos embrionários 2- e 4-nucleados, aparentemente não seguiu a rota de desenvolvimento normal da ontogênese do gametófito feminino em *Tabebuia* (cf. Bittencourt Jr. & Mariath 2002), terminando por sofrer degeneração. Tais observações sugerem que a maioria dos óvulos imaturos contribuíram para o aumento da incidência de óvulos não-funcionais verificado nos intervalos de 24-144 horas, tanto em pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada.

Tal como observado em *S. campanulata*, alguns óvulos não-funcionais foram penetrados, tendo o tubo polínico se enrolado no interior da cavidade do saco embrionário (figura 138). E da mesma forma que óvulos funcionais, nos diferentes estádios de desenvolvimento pré- e pós-zigótico, se encontravam distribuídos ao longo de todo o ovário, não foi encontrada qualquer indicação da correlação entre óvulos não-funcionais e posições específicas no ovário.

Polinizações interespecíficas

Os resultados dos experimentos de polinizações interespecíficas são apresentados na Tabela 31. Verificou-se a formação de frutos e sementes nos cruzamentos entre as espécies *T. umbellata* e *T. chrysotricha* quando a segunda contribuiu como doadora de pólen, mas não houve frutificação quando os cruzamentos foram realizados na direção contrária. Em 182 sementes provenientes de 2 frutos resultantes do cruzamento entre *T. umbellata* e *T. chrysotricha*, examinadas em estereomicroscópio,

apenas 50 sementes (27%) apresentavam embriões aparentemente sadios. As demais sementes apresentaram embriões atrofiados e deformados, ou eram destituídas de embrião. Ocorreu a formação de frutos e sementes nos cruzamentos entre *T. umbellata* e *T. ochracea*; porém 100% das sementes resultantes destes cruzamentos apresentaram embriões atrofiados ou eram destituídas de embrião. Os cruzamentos realizados entre *T. chrysotricha* e *T. impetiginosa* também não resultaram em formação de frutos. Nos demais cruzamentos ocorreu a formação de frutos e sementes sadias.

Os resultados dos testes de germinação das sementes resultantes de cruzamentos interespecíficos, bem como de sementes resultantes de polinizações naturais ou de polinizações cruzadas manuais em *Tabebuia* (exceto *T. chrysotricha* e *T. heptaphylla*⁴²) e em algumas espécies de outros gêneros de Tecomeae são mostrados na Tabela 32.

Tabela 31: Produção de frutos por polinizações interespecíficas em *Tabebuia*.

Planta polinizada		Planta doadora de pólen		Período (mês/ano)	Nº. de flores	Nº. de frutos (%)
Espécie	Árvore nº.	Espécie	Árvore nº.			
<i>T. umbellata</i>	7	<i>T. chrysotricha</i>	-	agosto 1999	10	5 (50)
<i>T. umbellata</i>	98	<i>T. chrysotricha</i>	-	agosto 2000	22	20 (91)
<i>T. chrysotricha</i>	6	<i>T. umbellata</i>	-	agosto 1999	10	0
<i>T. chrysotricha</i>	2	<i>T. umbellata</i>	-	agosto 2000	45	0
<i>T. umbellata</i>	103	<i>T. ochracea</i>	101	agosto 2000	12	10 (83)
<i>T. umbellata</i>	99	<i>T. ochracea</i>	101	agosto 2000	3	1 (33)
<i>T. chrysotricha</i>	2	<i>T. ochracea</i>	101	agosto 2000	25	24 (96)
<i>T. umbellata</i>	98	<i>T. impetiginosa</i>	-	agosto 2000	12	6 (50)
<i>T. chrysotricha</i>	2	<i>T. impetiginosa</i>	-	agosto 2000	12	0
<i>T. heptaphylla</i>	91	<i>T. impetiginosa</i>	92	julho 2000	20	8 (40)
<i>T. heptaphylla</i>	1	<i>T. impetiginosa</i>	92	julho 2000	20	8 (40)
<i>T. impetiginosa</i>	92	<i>T. heptaphylla</i>	91	julho 2000	20	7 (35)
<i>T. impetiginosa</i>	92	<i>T. heptaphylla</i>	1	julho 2000	20	14 (70)

⁴² Para estas espécies ver Tabelas 25 e 26, respectivamente.

Tabela 32: Resultados dos testes de germinação das sementes resultantes de cruzamentos interespecíficos (polinizações manuais) e intraespecíficos (polinizações manuais ou naturais) em *Tabebuia* e em algumas espécies de outros gêneros da Tribo Tecomeae.

	Espécies	Nº. de sementes semeadas*	Nº. de indiv. /frutos	Nº. de sementes germinadas (%)	Poliembrionia (+/-)
Intraespecíficos	<i>Cybistax antisyphilitica</i>	50	3/5	38 (76)	-
	<i>Sparattosperma leucanthum</i>	50	5/5	40 (80)	-
	<i>Spathodea campanulata</i>	50	5/5	50 (100)	-
	<i>Tabebuia impetiginosa</i>	50	5/5	41 (82)	-
	<i>Tabebuia umbellata</i>	60	2/2	60 (100)	-
	<i>Tecoma stans</i>	100	2/6	55 (55)	-
	<i>Zeyheria montana</i>	50	5/5	33 (66)	-
Interespecíficos	<i>T. impetiginosa</i> x <i>T. heptaphylla</i>	50	1/4	43 (86)	-
	<i>T. heptaphylla</i> x <i>T. impetiginosa</i>	50	2/6	40 (80)	-
	<i>T. chrysotricha</i> x <i>T. ochracea</i>	52	1/3	33 (63)	+
	<i>T. umbellata</i> x <i>T. impetiginosa</i>	100	1/6	93 (93)	-
	<i>T. umbellata</i> x <i>T. chrysotricha</i>	50	2/4	37 (74)	-

* Somente sementes que apresentavam um ou mais embriões aparentemente sadios.

7.5. Discussão

Biologia floral

Embora a ocorrência de dois ou mais episódios de apresentação de flores em antese no mesmo indivíduo, porém restritos a um mesmo período de 4-10 semanas, ano após ano venha sendo observada em algumas espécies de *Tabebuia*, tais como *T. roseo-alba*, *T. ochracea* e *T. chrysotricha* (observação pessoal), no presente trabalho, a ocorrência de mais de um episódio de apresentação de flores em antese durante o mesmo período de floração foi verificada somente em indivíduos da população natural de *T. chrysotricha*, localizada na Serra da Mantiqueira. Este padrão de seqüências de curtos episódios de floração durante um determinado período do ano indica que, em pelo menos algumas espécies de *Tabebuia*, a fenologia de floração pode ser considerada como intermediária entre os padrões "cronocopia" e "multiple bang" estabelecidos por Gentry (1974). Além disso, a observação de dias chuvosos precedendo os dois episódios de apresentação de flores em antese nos indivíduos de *T. chrysotricha* da Serra da Mantiqueira corrobora os estudos de Reich & Borchert (1982) e Borchert (1983, 1992, 1994), os quais indicam que a apresentação de flores em antese em espécies de *Tabebuia*

que ocorrem em ambientes sob influência de secas sazonais é desencadeada por fatores que favorecem a reidratação da planta, durante a estação seca.

De um modo geral, os atributos florais verificados em *Tabebuia*, tais como a acentuada zigomorfia, o odor agradável, a presença de uma plataforma de pouso (lobo anterior da corola), a antese diurna, as cores da corola, a presença de indicadores de néctar e o acúmulo do néctar numa câmara nectarífera localizada na base do tubo corolino, estão associados à melitofilia (Faegri & van der Pijl 1979) e são encontrados em muitas outras espécies da família Bignoniaceae polinizadas por abelhas (Gentry 1974, 1990, Stephenson & Thomas 1977, Bittencourt 1981, Yanagizawa & Gottsberger 1981, Petersen et al 1982, Yanagizawa 1983, Amaral 1992, Vieira *et al.* 1992, Bittencourt Jr. 1992, Barros 2001, Dutra & Machado 2001). A concentração do néctar de *T. vellosi* é comparável à encontrada em outras espécies melitófilas com flores zigomorfas (Kevan & Baker 1983) e, embora se saiba que a quantidade de néctar produzida em flores de um mesmo indivíduo (Cruden 1976, Opler 1983, Vogel 1983), ou em diferentes indivíduos de uma população (Heinrich 1975, Vogel 1983), possa variar significativamente, o crescente volume de néctar verificado em flores ensacadas de *T. vellosi*, em sucessivos estádios após a abertura da flor, parece sugerir que o néctar seja secretado continuamente, durante a maior parte do período de antese.

Mudanças da coloração floral durante o período de antese são comuns em espécies de diversas famílias (Kevan 1983), inclusive em Bignoniaceae (Barrows 1977, Amaral 1992), e admite-se que a alteração cromática sinalize o término da antese (Vogel 1983), ou a ausência de recompensa aos visitantes (Gori 1983). Em *T. impetiginosa* e *T. heptaphylla* as mudanças cromáticas são muito evidentes à percepção visual humana, e provavelmente também o são para os padrões visuais dos polinizadores, pois sabe-se que a cor amarela, conspicuamente refletida pela superfície interna do lado anterior do tubo corolino de tais flores no início da antese, faz parte do espectro de sensibilidade visual em abelhas (Chittka & Waser 1997). Segundo Gori (1983) a sinalização da ausência de recompensa pode conferir uma vantagem adaptativa para a planta, pois induziria os polinizadores a visitarem flores

com recompensa (i.e. receptivas), evitando o desperdício de pólen em flores não receptivas ou já polinizadas, ao passo que o polinizador otimizaria o seu tempo de permanência na planta, visitando apenas flores com recompensa. Portanto, é provável que a mudança de cores da corola de *T. impetiginosa* e *T. heptaphylla*, e talvez também o esmaecimento das linhas indicadoras de néctar da corola de *T. vellosi*, sinalizem o término da receptividade e da presença de recompensa nas flores.

A morfologia floral das espécies presentemente investigadas se ajusta ao tipo *Cydistia*, conforme a classificação de Gentry (1974a), embora o achatamento ântero-posterior do tubo corolino seja menos acentuado em *T. impetiginosa* e *T. heptaphylla*. Esta compressão do tubo corolino é de vital importância quanto ao mecanismo da polinização, pois obriga o polinizador a ter que forçar a abertura do tubo para entrar na flor, o que torna inevitável o contato da região dorsal de seu corpo com o estigma e as anteras, posicionados junto ao "teto" do tubo. Além disso, a compressão ântero-posterior do tubo atua também como um mecanismo de exclusão de alguns tipos de pilhadores de néctar ou pólen (e.g. borboletas de probólide curta, vespas e certas abelhas de pequeno porte), os quais não têm o corpo anatomicamente adaptado, ou força suficiente, para afastar os lados anterior e posterior ("assoalho" e "teto") do tubo corolino para penetrá-lo.

As duas pregas longitudinais verificadas no lado anterior do tubo floral em *Tabebuia impetiginosa* e *T. heptaphylla*, bem como em *Cybistax antisyphilitica* (capítulo 6), também caracterizam tipicamente a morfologia de muitas outras espécies de Bignoniaceae (Gentry 1974a, Yanagizawa 1983, Amaral 1992), e estão associadas ao mecanismo da polinização, pois por direcionarem o movimento das abelhas que realizam visitas legítimas ao caminharem no "assoalho" do tubo - i.e. por atuarem como guias de néctar do tipo estrutural -, induzem-nas a estabelecer contato com o estigma e as anteras, mesmo quando o diâmetro torácico em abelhas de médio porte não é suficiente para preencher o espaço interno do tubo corolino. Além disso, as dobras longitudinais do lado anterior do tubo corolino favorecem a polinização nototribica, pois promovem uma certa pressão mecânica do

corpo do visitante contra o estigma e as anteras, tal como descrito para várias espécies de lianas da família Bignoniaceae e para algumas espécies de *Jacaranda* (Yanagizawa 1983, Amaral 1992).

Embora não tenham sido feitos testes químicos para monitorar a receptividade do estigma, os sinais morfológicos do processo de senescência, i.e. perda de turgescência das papilas estigmáticas e o aparecimento de sinais de murcha, ou de manchas de necrose nos lobos estigmáticos, permitiram inferir que o estigma nas flores de *Tabebuia* só está receptivo no 1º dia, ou talvez durante o 1º e parte do 2º dia de antese. Da mesma forma, a ausência de grãos de pólen no estigma e o aparecimento de sinais de murcha ou de manchas de necrose nas anteras indicam que as mesmas são funcionais apenas durante o primeiro dia. Não obstante, a abscisão da corola ocorreu entre o 4º e o 5º dias após a abertura da flor em *T. vellosi* e entre o 3º e o 6º dias em *T. impetiginosa*. A floração maciça durante um período em que a árvore se encontra sem folhas, comum em muitas espécies de *Tabebuia*, tem sido apontada como estratégia que permite a atração de polinizadores à longas distâncias (Janzen 1967, Gentry 1974a), e a persistência da corola após o término do período em que a flor se encontra receptiva parece estar associada à mesma estratégia.

O fechamento permanente do estigma polinizado em *Tabebuia* é um indicativo da possibilidade de se estimar o sucesso da polinização natural em indivíduos de uma população, simplesmente checando-se o número de flores com estigmas fechados, relativamente ou número de flores com estigma aberto num dado momento, tal como sugerido para outras espécies com estigmas sensíveis - e.g. *Catalpa speciosa* (Stephenson & Thomas 1977) e *Tecoma stans* (Singh & Chauhan 1996). Entretanto, a percentagem de flores de *T. vellosi* apresentando estigma fechado no final da antese, relativamente ao total de flores monitoradas, foi mais que duas vezes superior à percentagem de frutos formados por polinização cruzada manual, indicando portanto que a eficácia das polinizações naturais efetivamente realizadas deve ser bastante inferior à das polinizações compatíveis e excessivas. Esta é justamente a situação esperada em plantas com o padrão de floração verificado em *Tabebuia*, as quais atraem grande número de polinizadores apresentando centenas de flores receptivas ao mesmo tempo,

favorecendo portanto altas taxas de polinização geitonogâmica, porém, salvo em casos excepcionais, impedindo a auto-fertilidade mediante um forte sistema de auto-incompatibilidade.

Sistemas reprodutivos

Tabebuia chrysotricha

Os resultados dos experimentos de polinizações controladas realizados no ano de 1999 sugeriram que, ao contrário de todas as demais espécies de *Tabebuia* até então estudadas, *T. chrysotricha* seria uma espécie auto-compatível, embora a presença de poliembriõnia torne os resultados menos conclusivos, pois não permitem descartar a possibilidade da ocorrência de algum tipo de apomixia dependente da polinização. Uma vez que os resultados obtidos poderiam ter alguma relação com o fato de terem sido utilizados somente indivíduos cultivados, experimentos de polinização adicionais foram realizados no ano seguinte com indivíduos de uma população natural. Os resultados obtidos no ano 2000 foram semelhantes aos do ano anterior, i.e. sementes poliembriônicas foram obtidas tanto por autopolinização como por polinização cruzada. Porém em um dos indivíduos estudados (árvore n^o: 97) não foi verificada a formação de frutos por autopolinização, o que sugere a auto-incompatibilidade e, portanto, a existência de variabilidade na expressão do sistema reprodutivo nesta população.

Sabe-se que a poliploidia pode estar associada com a quebra da GSI (Nettancourt 1977) e também pode estar ligada ao estabelecimento da apomixia, pois para híbridos poliplóides a apomixia é uma forma de escapar da esterilidade (Richards 1997). Oliveira *et al.* (1992) sugeriram que a auto-incompatibilidade de ação tardia poderia favorecer o estabelecimento da apomixia, pois em espécies com LSI, tal como verificado em *Tabebuia ochracea* e *T. caraiba* (= *T. aurea*) (Gibbs & Bianchi 1993), a formação de um zigoto dormente e a iniciação do desenvolvimento endospermico em óvulos de pistilos autopolinizados criariam as condições ideais para a emergência da embriõnia adventícia, uma vez que as primeiras divisões celulares da endospermogênese estimulariam células esporofíticas a

iniciarem embriões adventícios, os quais seqüestrariam recursos maternos, prevenindo assim o aborto dos pistilos autopolinizados. Segundo Gibbs & Bianchi (1993), a rejeição do pistilo autopolinizado poderia ser "sinalizada" por uma determinada quantidade de óvulos "auto-fecundados" no ovário, os quais desenvolvem-se normalmente porém geram um tipo errado de *feedback* hormonal para a planta-mãe, o que resulta no aborto do pistilo, ao contrário do que ocorreria em um pistilo submetido à polinização cruzada, no qual o *feedback* hormonal gerado pelo desenvolvimento dos óvulos fecundados seria o correto, preservando assim o desenvolvimento do fruto. Assim, o tempo decorrente entre a autopolinização e a rejeição do pistilo seria suficiente para o estabelecimento dos embriões adventícios, cujo *feedback* hormonal seria interpretado pela planta-mãe como sendo idêntico ao gerado pelo desenvolvimento de óvulos em pistilos submetidos à polinização cruzada.

Os argumentos acima apresentados, aliados às recentes descobertas de que (1) a poliembrião em *T. ochracea* é resultante da formação de embriões adventícios - i.e. a partir de células da hipóstase e do endotélio (Sampaio 2002) -, (2) de que indivíduos de *T. ochracea* que produzem sementes poliembriônicas podem ser tetraplóides (Matos 2003), e (3) de que a LSI está presente na maioria, senão em todas as espécies auto-incompatíveis de Bignoniaceae (Gibbs & Bianchi 1999), parecem indicar que a poliembrião em *T. chrysotricha* também seja resultante da formação de embriões adventícios, e que a formação de frutos por autopolinização em *T. chrysotricha* seja decorrente não da alteração do sistema genético da auto-incompatibilidade, mas da emergência de um certo tipo de pseudogamia, favorecida pelas peculiaridades fisiológicas da auto-incompatibilidade de ação tardia e provavelmente associada à poliploidia.

Não obstante, algumas importantes questões necessitam ainda ser respondidas para um melhor suporte científico da hipótese acima apresentada. Em primeiro lugar, não há, até o presente momento, evidências que consubstanciem a suposição de que o desenvolvimento inicial do endosperma estimule a diferenciação de células esporofíticas responsáveis pela formação dos embriões adventícios em *Tabebuia* - definidas por Sampaio (2002) como "células precursoras de embriões adventícios". E

mesmo que tais evidências sejam descobertas em futuro próximo, a questão de *como* ou *por quê* o desenvolvimento inicial do endosperma induziria a formação de tais células precursoras de embriões adventícios permaneceria em aberto. Em segundo lugar, a despeito da poliploidia e da poliembrionia co-ocorrerem tanto em *T. chrysotricha* como em *T. ochracea*, em experimentos de polinizações manuais realizados em *T. ochracea* (Gibbs & Bianchi, 1993), não houve a formação de frutos por autopolinização (210 flores autopolinizadas em 4 árvores). Como explicar o contraste entre os sistemas reprodutivos de *T. chrysotricha* e *T. ochracea*? Em terceiro lugar, não se sabe se a iniciação do desenvolvimento dos embriões adventícios em *T. ochracea* (e presumivelmente em *T. chrysotricha*) realmente ocorre antes da iniciação do processo de rejeição dos pistilos autopolinizados. Em quarto lugar, embora a ocorrência de poliembrionia em sementes de frutos obtidos por polinização cruzada indique que os embriões adventícios são formados mesmo na presença de um embrião zigótico, não há evidências de que o endosperma, em óvulos de pistilos autopolinizados, seria capaz de se desenvolver independentemente do desenvolvimento do embrião zigótico⁴³. Estudos histológicos comparativos do desenvolvimento pós-zigótico dos óvulos em pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada, bem como em pistilos não-polinizados, seriam de grande valia para o esclarecimento de algumas destas questões.

Por outro lado, admitindo-se a hipótese de que a formação de frutos tanto por autopolinização como por polinização cruzada em *T. chrysotricha* seja decorrente de quebra do sistema de auto-incompatibilidade, os presentes resultados sugerem que esta perda da auto-incompatibilidade pode ter sido provocada por perturbações antrópicas sobre populações naturais e cultivadas deste taxon. A intensa atividade predatória sobre flores e frutos exercida por *Trigona*, bem como a ação de vespas que parasitam o septo e as sementes em desenvolvimento, provavelmente exercem um impacto negativo

⁴³ Admitindo-se que a depressão endogâmica seja um importante fator gerador da pressão seletiva que mantém a auto-incompatibilidade em espécies de Bignoniaceae, a combinação de genes deletérios em homozigose nos embriões zigóticos poderia ocasionar o aborto dos mesmos nos pistilos autopolinizados, de modo que, em cada óvulo, o endosperma e, conseqüentemente, os embriões adventícios, teriam que ser capazes de se desenvolver na ausência da quantidade mínima de embriões zigóticos em desenvolvimento necessária para que o pistilo não seja abortado.

sobre o sucesso da reprodução sexual em *T. chrysotricha*. Além disso, tal como salientado por Oliveira *et al.* (1992), a intensa predação de flores e frutos causando perda de fertilidade pode favorecer o estabelecimento da apomixia. Parece pouco provável que o efeito de tais predadores e parasitóides sobre a reprodução sexual de *T. chrysotricha*, nas condições naturais do ecossistema da floresta mesófila, possam ser tão dramáticos quanto nos ambientes perturbados, pois em circunstâncias ecológicas semelhantes às condições originais para *T. chrysotricha*, os recursos buscados nesta espécie pelos referidos predadores e parasitóides poderiam ser encontrados também em outras espécies vegetais, diluindo-se assim as pressões exercidas por estes animais sobre a reprodução sexual de *T. chrysotricha*.

No modelo explicativo acima apresentado, a auto-compatibilidade em *T. chrysotricha* sem dúvida seria uma condição derivada a partir de ancestrais auto-incompatíveis. Várias linhas de evidência contribuem para tal conclusão. Em primeiro lugar, de todas as espécies de *Tabebuia* já investigadas quanto ao sistema reprodutivo, apenas *T. chrysotricha* expressou-se como auto-compatível. Além disso, a auto-incompatibilidade é a condição esmagadoramente predominante em Bignoniaceae, presente inclusive em *Cybistax* (capítulo 6), um dos gêneros mais proximamente relacionados à *Tabebuia* (Spangler & Olmstead 1999). Em segundo lugar, Gibbs & Bianchi (1993) demonstraram a auto-incompatibilidade em *T. ochracea*, a qual parece ser a espécie mais relacionada à *T. chrysotricha* (Gentry 1992). Somando-se à tais evidências a aparente auto-incompatibilidade da árvore 97, sugerida pelos presentes resultados, parece razoável admitir-se que a presumível auto-compatibilidade verificada em *T. chrysotricha* emergiu dentro dos limites do próprio taxon.

Em consiliência com tal hipótese parece estar a sugestão feita por Schemske & Lande (1985), segundo a qual espécies compostas de grandes populações com ampla dispersão de pólen/sementes e alta fecundidade serão capazes de manter um fluxo gênico adequado e tolerar um baixo nível de auto-fecundação. A ampla distribuição geográfica de *Tabebuia chrysotricha* (Rio Grande do Sul e nordeste da Argentina até a Paraíba) é assegurada pela eficiente dispersão anemocórica de suas sementes; e

contribuiriam para sua alta fecundidade a estratégia de utilização de um amplo espectro de polinizadores, através de florações explosivas e altamente sincronizadas, durante a estação seca. A suposta depleção da fecundidade nas populações naturais de *T. chrysotricha* na Serra da Mantiqueira, imposta pelos distúrbios ecológicos causados por extensas pastagens mantidas desde muitas décadas, pode ter favorecido o espalhamento dos genótipos auto-compatíveis, os quais por não dependerem da troca de pólen com outros indivíduos garantiriam uma maior produção de frutos e sementes, compensando assim as perdas causadas por predadores e parasitóides. Além disso, a apomixia, bem como outras formas de reprodução vegetativa, podem ter contribuído para a fixação dos genótipos auto-compatíveis. Semelhantes alterações do ambiente natural em outras populações de *T. chrysotricha* poderiam ter desencadeado o mesmo processo de expansão dos genótipos auto-compatíveis.

Uma das implicações do modelo explicativo acima sugerido seria a de que o sistema de auto-incompatibilidade atuante em espécies de *Tabebuia* é do tipo simples, i.e. regido por vários alelos de um único *locus-S*, pois a restrição filogenética resultante de num sistema genético mais complexo (i.e. com vários *loci*) tornaria bem menos provável a quebra da auto-incompatibilidade (Olmstead 1989). Neste contexto, o alto grau de conservação encontrado para a auto-incompatibilidade em *Tabebuia* e outros gêneros de Bignoniaceae parece contrário à existência de um sistema genético simples e facilmente alterável, salvo se, a despeito de um sistema genético simples, a SI nos taxa até então investigados de Bignoniaceae for mantida por fortes pressões seletivas.

Embora a depleção da produção de frutos e sementes em *T. chrysotricha*, decorrente do ataque de predadores e parasitóides, pareça ser óbvia nas populações investigadas, estudos adicionais empregando-se métodos mais precisos seriam necessários para se constatar até que ponto tais agentes realmente afetam o sucesso da reprodução sexual dos indivíduos da espécie investigada. A relação causal entre, de um lado, a atividade dos agentes depletadores da produção de frutos e sementes e, de outro, as alterações antrópicas impostas aos ecossistemas dos quais *T. chrysotricha* faz parte, é também não mais do que mera especulação. Estudos do sistema reprodutivo envolvendo maior número de

indivíduos e de diferentes populações e localidades, incluindo também comunidades intactas, cujas populações de *T. chrysotricha* não tenham sofrido nenhuma alteração, seriam de grande valia para um entendimento mais abrangente do sistema reprodutivo deste taxon.

Tabebuia heptaphylla

Tal como em *T. chrysotricha*, os resultados indicam a ocorrência de variação na expressão do sistema reprodutivo de *T. heptaphylla*, uma vez que a árvore n^o 91 não formou frutos por autopolinização, ao passo que a árvore n^o 1 consistentemente formou frutos tanto por autopolinização como por polinização cruzada. Entretanto, ao contrário de *T. chrysotricha*, não houve poliembrião em sementes de *T. heptaphylla*. A ausência de poliembrião foi constatada também em *Tecoma stans*, uma espécie auto-compatível (Singh & Chauhan 1996, Dutra & Machado 2001). Tais resultados sugerem que a perda da auto-incompatibilidade em *Tabebuia*, ou em outros gêneros de Bignoniaceae, não está necessariamente associada à ocorrência de apomixia. Efetivamente, embora o número de indivíduos utilizados nos experimentos de polinizações controladas tenha sido pequeno e os resultados em um dos indivíduos investigados (árvore n^o 90) não sejam conclusivos, os presentes resultados sugerem que alguns indivíduos de *T. heptaphylla* são auto-incompatíveis, enquanto outros são auto-compatíveis, sendo que nestes últimos a formação de frutos e sementes viáveis por autopolinização pode estar indicando alguma alteração no controle genético da auto-incompatibilidade.

Tabebuia impetiginosa

Os resultados dos experimentos de polinizações manuais realizados com *T. impetiginosa* claramente indicaram ser esta espécie auto-incompatível (não houve formação de frutos a partir de 124 flores autopolinizadas em 4 indivíduos), confirmando resultados de investigações anteriores (Bullock 1985). O ligeiro crescimento do ovário em pistilos autopolinizados antes de sua abscisão, porém inferior ao crescimento do ovário em pistilos submetidos à polinização cruzada no mesmo período,

indica a ocorrência de um atraso no desenvolvimento posterior à polinização em pistilos autopolinizados, relativamente aos submetidos à polinização cruzada, e tal discrepância foi amplamente confirmada pela análise histológica dos eventos posteriores à polinização.

A maioria dos óvulos funcionais, tanto em pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada, foi penetrada e fecundada 72 horas após a polinização, e todos os óvulos funcionais em ambos os tratamentos foram penetrados e fecundados no intervalo de 120 horas. Estes resultados indicam a ocorrência de LSI em *T. impetiginosa*. Não apenas um atraso no desenvolvimento inicial do endosperma em pistilos autopolinizados, relativamente aos pistilos submetidos à polinização cruzada, tal como verificado em *Spathodea campanulata* (capítulo 5) e em *Jacaranda racemosa* (capítulo 3), mas também uma clara desaceleração do progresso de desenvolvimento endospermico em pistilos autopolinizados foi verificada em *T. impetiginosa*. Além disso, o aborto dos pistilos autopolinizados ocorreu num momento em que quase todos os óvulos funcionais apresentavam endospermas 8-celulares ou em estágio precedente, ao passo que 90% dos óvulos funcionais em pistilos submetidos à polinização cruzada encontravam-se no estágio 10-celular ou posterior, no mesmo intervalo após a polinização (figura 132I). A desaceleração do progresso de desenvolvimento endospermico em pistilos autopolinizados, claramente visível nos intervalos de 120-216 horas (figura 139), evidentemente é mais uma das manifestações do processo de rejeição dos pistilos autopolinizados, a qual só foi detectada devido ao tempo de persistência mais prolongado dos pistilos autopolinizados em *T. impetiginosa*, comparado ao curto período de persistência dos mesmos pistilos em *S. campanulata*. Em nenhum estágio até a abscisão dos pistilos autopolinizados foi encontrada qualquer indicação de malformação do endosperma ou do proembrião incipiente em óvulos funcionais. Portanto, não foram encontradas evidências que suportem a visão de que os pistilos autopolinizados sofram abscisão devido à ocorrência de malformações no embrião ou no endosperma, as quais seriam decorrentes dos efeitos de alelos recessivos deletérios.

Embora com as mesmas características estruturais do tubo proembriônico de *S. campanulata*, a formação de um tubo proembriônico em *T. impetiginosa* foi verificada tanto em pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada, provavelmente também devido ao maior tempo de persistência dos pistilos autopolinizados nesta espécie. Este resultado evidencia o caráter pós-zigótico da rejeição dos pistilos autopolinizados em *T. impetiginosa*. Embora ainda não existam estudos sobre filogenia de Bignoniaceae onde o taxon *Spathodea* tenha sido incluído, é pouco provável que *Tabebuia* e *Spathodea* sejam gêneros proximamente relacionados dentro da família. Portanto, a formação de um tubo proembriônico binucleado durante a embriogênese inicial parece ser um caráter conservado e de ampla ocorrência em Bignoniaceae.

A variação encontrada na incidência de óvulos imaturos no intervalo de 24 horas após a polinização, tanto em pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada, foi demasiado ampla, tal como atestam os desvios padrões dos resultados percentuais (figura 132A). Isto torna duvidosa a existência de uma real diferença entre pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada no que se refere à categoria "óvulos imaturos", à despeito do resultado estatisticamente significativo obtido com o teste do qui-quadrado. A análise de um maior número de pistilos de ambos os tratamentos seria necessária para uma avaliação estatística mais consistente dos valores encontrados para os óvulos da referida categoria⁴⁴. No entanto, admitindo-se que (1) os valores percentuais encontrados para os óvulos das categorias "imaturos", "receptivos não-penetrados", "receptivos penetrados" e "não-funcionais" correspondam às reais proporções destes mesmos óvulos em pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada, e que (2) o saco embrionário na maioria dos óvulos imaturos, observados no intervalo de 24 horas após a polinização, degenerou-se nos intervalos subseqüentes, os presentes resultados sugerem o processo de transformação dos óvulos apresentado na figura 141 (cf. Tabela 29). Em pistilos autopolinizados, uma determinada parcela dos

óvulos (o equivalente a 14% do total de óvulos por ovário), os quais, no intervalo de 24 horas, apresentavam saco embrionário imaturo, completaram o seu desenvolvimento e contribuíram para a formação dos \cong 65% de óvulos funcionais, verificados no intervalo de 216 horas. Já nos pistilos submetidos à polinização cruzada, o número de óvulos imaturos que contribuíram para os (também) \cong 65% de óvulos funcionais, observados no intervalo de 216 horas, foi o equivalente a apenas 1% do total de óvulos por ovário existentes no intervalo de 24 horas. O restante dos óvulos imaturos no intervalo de

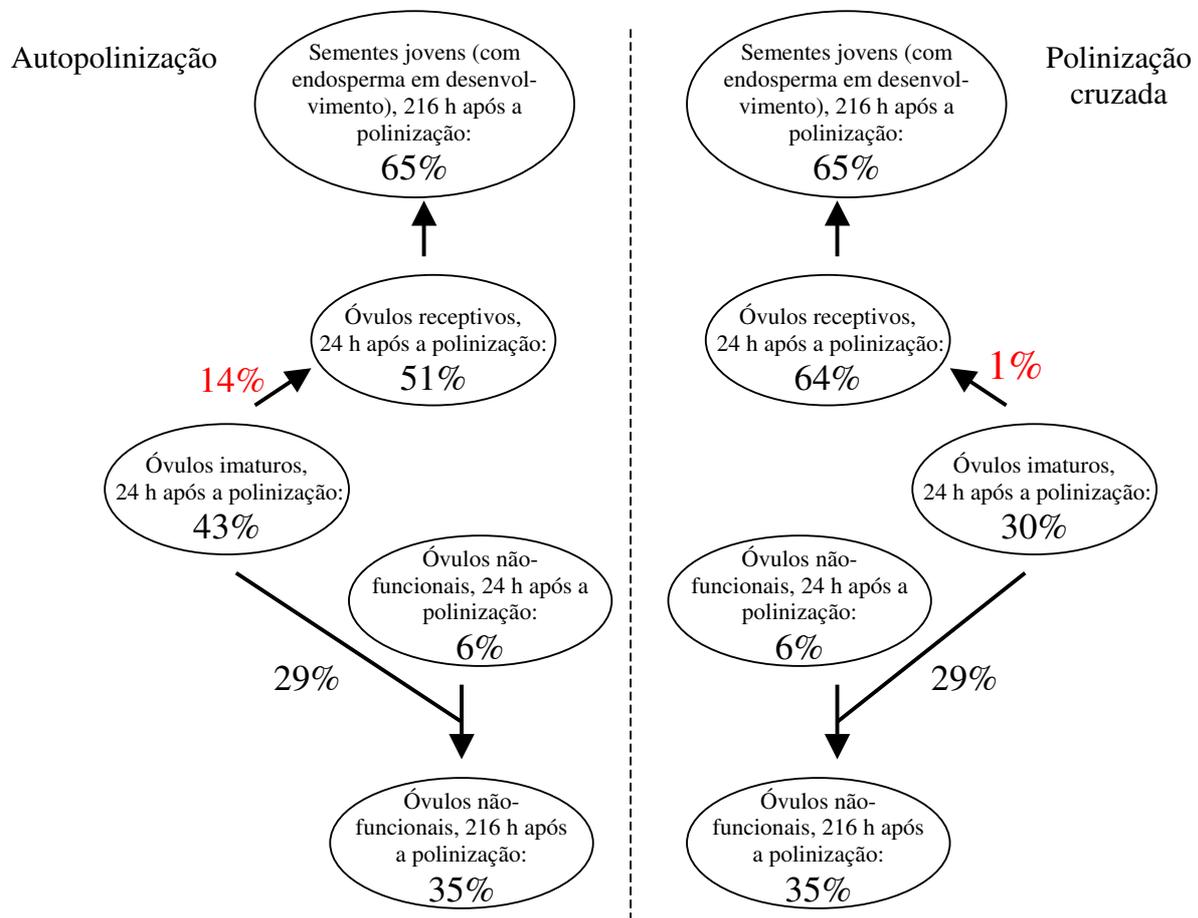


Figura 141: Transformação dos óvulos de *Tabebuia impetiginosa* em pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada, nos intervalos de 24 → 216 horas após a polinização.

⁴⁴ Entretanto, o aumento do número de pistilos a serem analisados entra em choque com a viabilidade de realização do trabalho, devido ao tempo necessário para a execução de todo o processo de preparação e análise do material botânico,

24 horas (29% do total de óvulos tanto em pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada) sofreram degeneração, contribuindo para a formação dos $\cong 35\%$ de óvulos não-funcionais verificados no último intervalo de fixação em ambos os tratamentos.

Por outro lado, se a diferença observada entre pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada quanto à incidência de óvulos imaturos no intervalo de 24 horas for realmente significativa, tal como indicado pelo teste do qui-quadrado, isto pode estar indicando que o crescimento dos tubos polínicos em pistilos submetidos à polinização cruzada induz os gametófitos femininos funcionais em óvulos imaturos a se desenvolver mais rapidamente do que em pistilos autopolinizados. Estes resultados até certo ponto seriam semelhantes aos obtidos por Sage *et al.* (1999), no estudo dos eventos posteriores à polinização realizados com *Narcissus triandrus*. Estes autores verificaram que o crescimento dos tubos polínicos no estilete de pistilos autopolinizados vs. pistilos submetidos à polinização cruzada exerceu diferentes efeitos sobre a maturação dos óvulos no ovário, evidenciando a possibilidade de que, em espécies com LSI, interações "negativas" entre os tubos polínicos e o estilete podem desencadear o processo de rejeição dos pistilos autopolinizados, embora os tubos polínicos alcancem o ovário e fecundem os óvulos. Todavia, análises mais detalhadas em *Tabebuia*, envolvendo não somente o emprego de um número maior de amostras (i.e. pistilos), como também observações dos óvulos em flores não-polinizadas, em antese de primeiro dia, tornam-se necessárias para se obter evidências mais consistentes quanto ao destino dos óvulos imaturos, porém funcionais.

À exemplo do que foi verificado em *S. campanulata* (capítulo 5), cerca de 1,7% do total de óvulos por ovário foi penetrado pelo tubo polínico, a despeito dos mesmos não conterem um saco embrionário funcional. Tal resultado contradiz a sugestão de que as sinérgides exerceriam importante função no direcionamento quimiotrópico do crescimento do tubo polínico (Huang & Russell 1992, Russell 1992,1993).

desde a realização das polinizações manuais até a investigação das secções seriadas.

Tabebuia umbellata

Os resultados dos experimentos de polinizações manuais obtidos com *T. umbellata* claramente indicam ser esta espécie 100% auto-incompatível (nenhum fruto formado em 182 flores autopolinizadas em 6 árvores). A rápida e concomitante abscisão dos pistilos autopolinizados e não-polinizados, sem ter ocorrido qualquer crescimento do ovário, é uma evidência de que a auto-esterilidade nesta espécie se deve a um mecanismo de auto-incompatibilidade, pois a abscisão dos pistilos em um *continuum* de estádios de desenvolvimento seria esperada caso a auto-esterilidade fosse decorrente dos efeitos da depressão endogâmica (Seavey & Bawa 1986, Sage *et al.* 1994).

Tabebuia vellosi

Tal como verificado em *T. impetiginosa* e *T. umbellata*, os resultados dos testes de polinizações controladas indicam que *T. vellosi* é totalmente auto-incompatível (nenhum fruto formado em 125 flores autopolinizadas em 8 indivíduos). Entretanto, esta auto-esterilidade se deve a algum tipo de LSI, não só porque centenas de tubos polínicos alcançaram o ovário no intervalo de 72 horas, penetrando muitos óvulos tanto em autopolinizações como em polinizações cruzadas, mas também porque os pistilos autopolinizados foram uniformemente abortados entre o 6^o e o 7^o dia após a polinização.

Embora a diferença entre o crescimento *in situ* dos tubos polínicos entre autopolinizações e polinizações cruzadas não tenha sido estatisticamente significativa, alguns óvulos penetrados foram verificados em pistilos submetidos à polinização cruzada no intervalo de 24 horas, ao passo que nenhum óvulo penetrado foi visto em pistilos autopolinizados no mesmo intervalo, sugerindo haver um ligeiro, mas detectável atraso dos tubos polínicos em pistilos autopolinizados. Esta menor eficácia dos tubos polínicos em alcançar e penetrar os óvulos em pistilos autopolinizados é congruente com a visão de que interações "negativas" entre o estilete e o tecido transmissor podem acionar um processo fisiológico que culmina com o aborto dos pistilos autopolinizados, a despeito dos óvulos serem penetrados e fecundados (Sears 1937, Seavey & Bawa 1986, Sage *et al.* 1994, 1999).

Os resultados das análises de crescimento dos ovários e dos óvulos após a polinização sugerem a iniciação do desenvolvimento endospermico (e talvez também do proembrião), tanto em óvulos de pistilos autopolinizados como em óvulos de pistilos submetidos à polinização cruzada, embora menores taxas de crescimento tenham sido verificadas em óvulos e ovários de pistilos autopolinizados. Quanto ao crescimento dos óvulos, semelhantes resultados foram obtidos por Bianchi & Gibbs 2000 no estudo da LSI em *Capparis retusa* (Capparaceae), e os autores concluíram que o atraso no desenvolvimento dos óvulos em pistilos autopolinizados tanto pode refletir a ação precoce de genes recessivos deletérios, como outros possíveis eventos que causariam o aborto dos pistilos autopolinizados. Dada a semelhança dos resultados obtidos no presente trabalho entre *T. vellosi* e *T. impetiginosa* quanto ao crescimento do ovário após autopolinização e polinização cruzada, e uma vez que não foram encontrados sinais de malformações do endosperma ou do tubo proembriônico em óvulos de pistilos autopolinizados em *T. impetiginosa*, é pouco provável que as menores taxas de crescimento verificadas nos óvulos e nos ovários de *T. vellosi* após autopolinização se devam aos efeitos da expressão de genes recessivos deletérios. Portanto, os presentes resultados sugerem que, em *Tabebuia*, os atrasos no crescimento dos óvulos e dos ovários em pistilos autopolinizados, são manifestações do processo de rejeição dos mesmos, inerentes ao mecanismo fisiológico da LSI.

Embora presentemente interpretado como decorrente da fecundação dos óvulos, o crescimento do ovário posterior à autopolinização pode também simplesmente ser estimulado pela deposição de grãos de pólen no estigma. Sabe-se que, pelo menos em algumas espécies com frutos carnosos, o pólen depositado no estigma pode atuar como fonte de hormônios que induzem a iniciação do fruto (Crane 1964, Biale 1978) e que a aplicação exógena de hormônios resulta em desenvolvimento do fruto na ausência da polinização (Verkerk 1957, Coombe 1960). Portanto, se a iniciação de frutos em pistilos autopolinizados de *Tabebuia* realmente é determinada pela fecundação dos óvulos, ou mediada por um estímulo hormonal decorrente da deposição de pólen no estigma, ou ainda por uma combinação de ambos os fatores, são questões abertas a investigações futuras.

Compatibilidade interespecífica em Tabebuia

Os resultados dos testes de polinizações interespecíficas indicam que *T. impetiginosa* e *T. heptaphylla* são bilateralmente inter-férteis, ao passo que a incompatibilidade unilateral (UI) é sugerida pelos cruzamentos entre *T. umbellata* e *T. chrysotricha*. Nas demais espécies só foram feitos cruzamentos unidirecionais; portanto os resultados permitem concluir apenas que a inter-fertilidade foi constatada entre as seguintes espécies: *T. umbellata* vs. *T. ochracea*, *T. chrysotricha* vs. *T. ochracea*, e *T. umbellata* vs. *T. impetiginosa*. Não houve formação de frutos quando flores de *T. chrysotricha* foram polinizadas com o pólen de *T. impetiginosa*; porém não foram realizados cruzamentos na direção contrária e, portanto, a possibilidade destas espécies também serem inter-férteis não pode ser excluída.

Embora reações de incompatibilidade unilaterais não ocorram exclusivamente em plantas com sistemas reprodutivos diferentes, a UI nas angiospermas usualmente se manifesta em cruzamentos onde uma espécie auto-incompatível é o parental pistilado, e uma espécie auto-compatível é o parental doador de pólen (Lewis & Crowe 1958, Hiscock & Dickinson 1993). Não obstante, a situação reversa foi observada nos cruzamentos entre *T. chrysotricha* e *T. umbellata*, pois a UI manifestou-se quando flores de *T. chrysotricha* (espécie presumivelmente auto-compatível, 55 flores utilizadas) foram polinizadas com o pólen de *T. umbellata* (espécie auto-incompatível).

Os percentuais de frutos formados em polinizações interespecíficas parecem ser, de um modo geral, superiores aos percentuais de frutos formados por polinizações cruzadas intraespecíficas. Porém estes resultados devem ser interpretados com cuidado, em razão do número relativamente pequeno de flores empregadas nos testes de polinizações interespecíficas, bem como porque estes testes foram realizados empregando-se apenas um ou dois indivíduos de cada espécie. Contudo os resultados obtidos claramente evidenciam altos níveis de inter-fertilidade operando entre as espécies de *Tabebuia*, indicando portanto serem tênues as barreiras genéticas que separam as espécies deste gênero, ou mesmo totalmente inexistentes, e que fatores ecológicos devem prevalecer no isolamento entre as espécies. Tais constatações são congruentes com a possível ocorrência de hibridizações naturais e

introgressão entre as espécies de *Tabebuia*, principalmente em relação a cruzamentos entre *T. chrysotricha* vs. *T. ochracea* e *T. impetiginosa* vs. *T. heptaphylla*, o que explicaria as formas intermediárias comumente encontradas entre tais espécies.

7.6. Literatura Citada

- AMARAL, M. E. C. 1992. **Ecologia Floral de Dez Espécies da Tribo Bignoniaceae (Bignoniaceae), em uma Floresta Semidecídua no Município de Campinas, SP.** Campinas: UNICAMP. 189 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Departamento de Ecologia, Universidade Estadual de Campinas.
- ANTUNES, F. Z. 1986. Caracterização climática do Estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte 138:** 9-13.
- BARROS, M. G. 2001. Pollination ecology of *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. and *T. ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae) in Central Brazil cerrado vegetation. **Revista Brasileira de Botânica 24:** 255-261.
- BARROWS, E. M. 1977. Floral maturation and insect visitors of *Pachytera hymenaea* (Bignoniaceae). **Biotropica 9:** 133-134.
- BAWA, K. S. 1973. Chromosome numbers of tree species of lowland community. **Journal of the Arnold Arboretum 54:** 422-434.
- BAWA, K. S. 1974. Breeding systems of tree species of lowland tropical community. **Evolution 28:** 85-92.
- BAWA, K. S. & WEBB, C. J. 1984. Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: Implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. **American Journal of Botany 71:** 736-751.
- BIALE, J. B. 1978. On the interface of horticulture and plant physiology. **Annual Review of Plant Physiology 29:** 1-23.

- BIANCHI, M. B. & GIBBS, P. E. 2000. Late-acting self-incompatibility in *Capparis retusa* (Capparaceae), a species of Chaco woodland in NE Argentina. **Revista Brasileira de Botânica 23**: 393-398.
- BITTENCOURT, J. A. R. 1981. **Alguns Aspectos da Fenologia e Polinização de *Jacaranda macrantha* Cham.** Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- BITTENCOURT Jr., N. S. 1992. **Anatomia Floral de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae): Histologia, Vascularização e Ontogenia com Especial Referência ao Desenvolvimento do Óvulo e da Antera.** Monografia de Graduação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BITTENCOURT Jr, N. S. & MARIATH, J. E. A. 2002. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): embryo sac development. **Revista Brasileira de Botânica 25**: 117-127.
- BORCHERT, R. 1983. Phenology and control of flowering in tropical trees. **Biotropica 15(2)**: 81-89.
- BORCHERT, R. 1992. Computer simulation of tree growth periodicity and climatic hydroperiodicity in tropical forests. **Biotropica 24(3)**: 385-395.
- BORCHERT, R. 1994. Induction of rehydration and bud break by irrigation of rain in deciduous trees of a tropical dry forest in Costa Rica. **Trees 8**: 198-204.
- BORRERO H., J. I. 1972. Explotacion de las flores de Guayacan (*Tabebuia chrysantha*) por varias espécies de aves e insetos. **Biotropica 4**: 28-31.
- BOWDEN, W. M. 1945. A list of chromosome numbers in higher plants. I. Acanthaceae to Myrtaceae. **American Journal of Botany 32**: 81-92.
- BULLOCK, S. H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. **Biotropica 17**: 287-301.
- CHITTKA, L. & WASER, N. M. 1997. Why red flowers are not invisible to bees. **Israel Journal of Sciences 45**: 169-183.

- COOMBE, B. G. 1976. The development of fleshy fruits. **Annual Review of Plant Physiology** **27**: 207-228.
- COPE, F. W. 1962. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. **Heredity** **17**: 157-182.
- COSTA, M. E. & SAMPAIO, D. S. 2001. Quantificação da poliembrionia em sementes de *Tabebuia chrysotricha* (Martius ex DC.) Standley e *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). In **52^o Congresso Nacional de Botânica**. João Pessoa, Paraíba. Resumos, p. 125.
- COSTA, M. E.; SARTORI, A. A. P. & SAMPAIO, D. S. 2000. Morfo-anatomia da semente e aspectos da germinação e da plântula de *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). In **51^o Congresso Nacional de Botânica**. Brasília, DF. Resumos, p. 138-139.
- COSTA, C. M. R.; HERRMANN, G.; MARTINS, C. S.; LINS, L. V. & LAMAS, I. R. (orgs.) 1998. **Biodiversidade em Minas Gerais: Um Atlas para sua Conservação**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.
- CRANE, J. C. 1964. Growth substances in fruit setting and development. **Annual Review of Plant Physiology** **15**: 303-326.
- CRUDEN, R. W. 1976. Intraspecific variation in pollen-ovule ratios and nectar secretion - preliminary evidence of ecotypic adaptation. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **63**: 277-289.
- DUTRA, J. C. S. & MACHADO, V. L. L. 2001. Entomofauna visitante de *Stenolobium stans* (Juss.) Seem (Bignoniaceae), durante seu período de floração. **Neotropical Entomology** **30**: 43-53.
- FAEGRI, K. & PIJL, L. van der 1979. **The Principles of Pollination Ecology**. 3th ed. Oxford: Pergamon Press.
- FIGUEIROA, P. G. & FOURNIER O, L. A. 1996. Fenología y ecofisiología de dos poblaciones de *Tabebuia rosea* ("Roble de Sabana") em Costa Rica (Bignoniaceae). **Revista de Biología Tropical** **44**: 61-70.

- GENTRY, A. H. 1973. Bignoniaceae. *In* Flora do Panama. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **60**: 781-997.
- GENTRY, A. H. 1974a. Coevolutionary patterns in Central American Bignoniaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **61**: 728-759.
- GENTRY, A. H. 1974b. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. **Biotropica** **6(1)**: 64-68.
- GENTRY, A. H. 1976. Bignoniaceae of southern Central America: Distribution and ecological specificity. **Biotropica** **8**: 117-131.
- GENTRY, A. H. 1978. Anti-pollinators for mass-flowering plants? **Biotropica** **10**: 68-69.
- GENTRY, A. H. 1990. Evolutionary patterns in neotropical Bignoniaceae. **Memories of the New York Botanical Garden** **55**: 118-129.
- GENTRY, A. H. 1992. Bignoniaceae - Part II (Tribe Tecomeae). **Flora Neotropica: Monograph 25 (II)**. Organization for Flora Neotropica, New York.
- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta** **106**: 64-71.
- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1999. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany** **84**: 449-457.
- GOLDBLATT, P. & GENTRY, A. H. 1979. Cytology of Bignoniaceae. **Botaniska Notiser** **132**: 475-482.
- GORI, D. F. 1983. Post-pollination phenomena and adaptive floral changes. *In* **Handbook of Experimental Pollination Biology** (C. E. Jones, & R. J. Little, eds.). New York: Scientific and Academic Press. p. 31-49.
- JANZEN, D. H. 1967. Synchronization of sexual reproduction of trees within the dry season in Central America. **Evolution** **21**: 620-637.

- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill.
- JULLIER, S. 1989. Cromosomas mitóticos de *Dolychandra cynanchoides* y *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). **Kurtziana 20**: 215-217.
- HEINRICH, B. 1975. Energetics of pollination. **Annual Review of Ecology and Systematics 6**: 139-179.
- HISCOCK, S. J. & DICKINSON, H. G. 1993. Unilateral incompatibility within the Brassicaceae: further evidence for the involvement of the self-incompatibility (*S*)-locus. **Theoretical and Applied Genetics 86**: 744-753.
- HUANG, B.-Q. & RUSSELL, S. D. 1992. Female germ unit: Organization, isolation, and function. **International Review of Cytology 140**: 332-293.
- KEVAN, P. G. 1983. Floral colors through the insect eye: what they are and what they mean. *In* **Handbook of Experimental Pollination Biology** (C. E. Jones, & R. J. Little, eds.). New York: Scientific and Academic Press. p.3-30.
- KEVAN, P.G. & BAKER, H. G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. **Annual Review of Entomology 28**: 407-453.
- KLEKOWSKI JR., E. J. 1988. **Mutation, Developmental Selection, and Plant Evolution**. New York: Columbia University Press.
- KNUTH, P. 1905. **Handbuch der Blütenbiologie III**. Leipzig: Engelmann, p. 132-143.
- LEWIS, D. & CROWE, L. M. 1958. Unilateral interespecific incompatibility in flowering plants. **Heredity 12**: 233-256.
- LIPOW, S. R. & WYATT, R. 2000. Single gene control of postzygotic self-incompatibility in poke milkweed, *Asclepias exaltata* L. **Genetics 154**: 893-907.
- MARTIN, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes by means of fluorescence. **Stain Technology. 34**: 125-128.

- MATOS, E. C. 2003. **Poliploidia em duas espécies poliembriônicas de ipê-amarelo: *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley e *Tabebuia chrysotricha* (Martius ex DC) Standley (Bignoniaceae).** Monografia de graduação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- NETTANCOURT, D. de 1977. **Incompatibility Systems in Angiosperms.** Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- NIC LUGHADHA, E. 1998. Preferential outcrossing in *Gomidesia* (Myrtaceae) is maintained by a post-zygotic mechanism. *In Reproductive Biology in Systematics, Conservation and Economic Botany.* (S. J. Owens, & P. J. Rudall, eds.) London: Royal Botanic Gardens, Kew, p. 363-379.
- OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E.; BARBOSA, A. A. & TALAVERA, S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of Brazilian cerrados. **Plant Systematics and Evolution 179:** 207-219.
- OLMSTEAD, R. G. 1989. The origin and function of self-incompatibility in flowering plants. **Sexual Plant Reproduction 2:** 127-136.
- OPLER, P. A. 1983. Nectar production in a tropical ecosystem. *In The Biology of Nectaries* (B. Bentley & T. Elias, eds.). New York: Columbia University Press, p. 30-79.
- PETERSEN, C.; BROWN, J. H. & KODRIC-BROWN, A. 1982. An experimental study of floral display and fruit set in *Chilopsis linearis* (Bignoniaceae). **Oecologia 55:** 7-11.
- PIAZZANO, M. 1998. Números cromosômicos em Bignoniaceae de Argentina. **Kurtziana 26:** 179-189.
- REICH, P. B. & BORCHERT, R. 1982. Phenology and ecophysiology of tropical tree, *Tabebuia neochrysantha* (Bignoniaceae). **Ecology 63:** 294-299.
- RICHARDS, A. J. 1997. **Plant Breeding Systems.** London: George Allen & Unwin.
- ROESER, K. R. 1972. Die Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos 61:** 33-36.
- RUSSELL, S. D. 1992. Double fertilization. **International Review of Cytology 140:** 357-388.

- RUSSELL, S. D. 1993. The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. **The Plant Cell** **5**: 1349-1359.
- SAGE, T. L.; BERTIN, R. J. & WILLIAMS, E. G. 1994. Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. *In* **Genetic Control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants**. (E. G. Williams; A. E. Clarke & R. B. Knox, eds.). Kluwer Academic, Dordrecht, p.116-140.
- SAGE, T. L.; STRUMAS, F.; COLE, W. W. & BARRETT, S. C. 1999. Differential ovule development following self- and cross-pollination: The basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). **American Journal of Botany** **86**: 855-870.
- SALOMÃO, A. N. & ALLEM, A. C. 2001. Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian cerrado and caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica** **15**: 369-378.
- SAMPAIO, D. S. 2002. **Ontogenia da Semente, Poliembriõnia e Aspectos da Embriogênese se *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae)**. Monografia de graduação, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SAMPAIO, D. S.; COSTA, M. E.; LEITE, S. C. A. L. & PAOLI, A. A. S. 2002. Origem da poliembriõnia em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). *In* **53^o Congresso Nacional de Botânica**. Recife, PE. Resumos, p. 144.
- SAMPAIO, D. S.; QUEIROZ, C. G. S. & COSTA, M. E. 2000. Germinação de sementes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standley (Bignoniaceae). *In* **51^o Congresso Nacional de Botânica**. Brasília, DF. Resumos, p. 62.
- SCHEMSKE, D. & LANDE, R. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. **Evolution** **34**: 41-52.
- SEARS, E. R. 1937. Cytological phenomena connected with self-sterility in the flowering plants. **Genetics** **22**: 130-181.

- SEAVEY, S. R. & BAWA, K. S. 1986. Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. **The Botanical Review** **52**:195-219.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. & GOTTSBERGER, G. 1988. A polinização de plantas do cerrado. **Revista Brasileira de Biologia** **48**: 651-663.
- SINGH, J. & CHAUHAN, S. V. S. 1994. Floral polymorphism and establishment of self incompatibility in *Tecoma stans* L. **Journal of Tree Science** **13**: 57-60.
- SPANGLER, R. E. & OLMSTEAD, R. G. 1999. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences rbcL and ndhF. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **86**: 33-46.
- STEPHENSON, A. G. & THOMAS, W. W. 1977. Diurnal and Nocturnal pollination of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae). **Systematic Botany** **2**: 191-198.
- STEVENS, ALBERT-DIETER 1991. **Zur Reproduktionsbiologie einiger Bignoniaceen im Cerrado Brasiliens**. Justus-Liebig-Universität Gießen. Gießen.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1992. Structure and biology of nectaries in *Tabebuia serratifolia* Nichols (Bignoniaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **109**: 395-400.
- VENKATASUBBAN, K. R. 1945. Cytological studies in Bignoniaceae. IV. The cytology of *Dolichandrone reedii* Seem. and allied genera. **Proceedings of the Indian Academy of Science B** **21**: 77-92.
- VERKERK, K. 1957. The pollination of tomatoes. **Netherlands Journal of Agricultural Sciences** **5**: 37-54.
- VIEIRA, M. F.; MEIRA, R. M. S. A.; QUEIROZ, L. P. & MEIRA NETO, J. A. A. 1992. Polinização e reprodução de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. (Bignoniaceae) em área de Cerrado do Sudeste Brasileiro. **Anais do 8º. Congresso da SBPC**, 13-19.
- VITALI, M. J. & MACHADO, V. L. L. 1995. Entomofauna visitante das flores de *Tabebuia chrysotricha* (Mart.) Standley (Bignoniaceae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **24**: 77-88.

- VOGEL, S. 1983. Ecophysiology of zoophilic pollination. In **Physiological Plant Ecology. III.** (O. L. Langle, P. S. Nobel, C. B. Osmond & H. Ziegler, eds.). Encyclopedia of Plant Physiology, N. S. 12C. Berlin: Springer-Verlag, p. 559-624.
- WIENS, D. 1984. Ovule survivorship, brood size, life history, breeding systems, and reproductive success in plants. **Oecologia 64:** 47-53.
- YANAGIZAWA, Y. 1983. **Aspectos da Biologia Floral de Espécies de Arrabidaea e Jacaranda, no Município de Botucatu, SP.** Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- YANAGIZAWA, Y. & GOTTSBERGER, G. 1983. Competição entre *Distictella elongata* (Bignoniaceae) e *Crotalaria anagyroides* (Fabaceae) com relação as abelhas polinizadoras no cerrado de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Portugaliae Acta Biologica (A) 18:** 149-166.

8. Sistemas Reprodutivos em Bignoniaceae

As flores na maioria das espécies polinizadas por abelhas da família Bignoniaceae, inclusive das espécies melitófilas estudadas no presente trabalho, compartilham características morfológicas que as tornam altamente especializadas na polinização por abelhas de médio e grande porte. Dentre estas características, uma das mais importantes é o estreitamento basal em uma corola tubular, o qual, salvo no caso de abelhas que apresentam peças bucais adaptadas à pilhagem primária do néctar (e.g. *Oxaea* e *Xylocopa*), restringe o acesso ao néctar às abelhas de língua longa (Percival 1965, Proctor & Yeo 1975, Faegri & van der Pijl 1979) e previne o aumento da concentração do néctar, o qual pode ser induzido pela evaporação em flores dialipétalas (Corbet 1978). Além disso, as flores das espécies melitófilas de Bignoniaceae apresentam várias características morfológicas que normatizam o comportamento de visita destas abelhas (e.g. os vários tipos de indicadores de néctar e os padrões de mudança de cor da corola durante a antese), ou otimizam o contato dos órgãos reprodutivos com uma só região do corpo do visitante (e.g. o posicionamento das anteras e do estigma junto ao "teto" do tubo corolino, favorecendo a polinização nototrófica). Em se tratando de um grupo predominantemente auto-incompatível, tais adaptações são de vital importância no sentido de aumentar a eficácia da transferência de pólen entre os indivíduos de uma população. Neste contexto, o fato da melitofilia ser a síndrome predominante em Bignoniaceae (Gentry 1990) não surpreende.

A presença de um estigma sensível é um caráter comum em plantas com corola tubular e que produzem muitas sementes por fruto (Bertin 1982). O fechamento do estigma em espécies com estigma sensível está associado à redução da autopolinização, à formação de um micro-ambiente mais favorável à germinação dos grãos de pólen (Newcombe 1922), ou à prevenção da remoção do pólen já depositado no estigma (Thieret 1976). Embora a reabertura temporária do estigma após a deposição de pólen no mesmo tenha sido relatada em algumas espécies com estigmas sensíveis (Newcombe 1922, 1924), o fechamento do estigma após a polinização foi permanente em todas as espécies presentemente estudadas, tal como verificado em *Spathodea campanulata* e *Tecoma radicans* (= *Campsis radicans*)

(Newcombe 1922, 1924), em *Catalpa speciosa* (Stephenson & Thomas 1977) e em *Tecoma stans* (Singh & Chauhan 1996). Sabe-se que, em plantas com LSI, as polinizações mistas, situação prevalente em se tratando de polinizações naturais, podem favorecer a formação de sementes viáveis por autofecundação (Bertin & Sullivan 1988), permitindo portanto a expressão de eventuais alelos recessivos deletérios. Portanto, o fechamento permanente do estigma após a deposição de uma carga apropriada de grãos polínicos poderia conferir uma vantagem adaptativa em espécies com LSI e que apresentam várias flores receptivas ao mesmo tempo (e.g. *Tabebuia*), pois uma vez que nestas circunstâncias a polinização geitonogâmica é favorecida, a probabilidade do estigma receber pólen de outras flores do mesmo indivíduo tornar-se-ia maior se sua superfície receptiva fosse contatada em múltiplas visitas de polinizadores.

Com exceção de *T. chrysotricha* e *T. heptaphylla*, todas as espécies investigadas no presente trabalho são auto-incompatíveis. Somados aos dados disponíveis na literatura, os presentes resultados elevam para 37 o número de espécies de Bignoniaceae investigadas quanto ao sistema reprodutivo, das quais pelo menos 32 (86%) são auto-incompatíveis. Embora o número de indivíduos investigados em *T. heptaphylla* tenha sido limitado, a variação observada na expressão do sistema reprodutivo, tanto nesta espécie como em *T. chrysotricha*, sugere a quebra do sistema de incompatibilidade. Uma vez que a formação de frutos por autopolinização não está necessariamente associada à ocorrência de poliembrião (e.g. *Tecoma stans*, *Tabebuia heptaphylla*, etc.), a auto-incompatibilidade e a capacidade de gerar embriões apomíticos parecem ser fenômenos independentes em Bignoniaceae, podendo a perda da auto-incompatibilidade em *T. chrysotricha* ter precedido a emergência da poliembrião, ou vice-versa. Porém a poliembrião verificada em *T. chrysotricha* também pode estar indicando que, pelo menos nesta espécie, uma pseudogamia favorecida pelas peculiaridades fisiológicas da LSI seria responsável pelo desenvolvimento bem-sucedido de frutos por autopolinização. Simplesmente porque a planta-mãe poderia interpretar os sinais químicos gerados pelo desenvolvimento de um embrião zigótico e vários embriões apomíticos, em cada semente resultante de autopolinização, como idênticos

aos sinais gerados pelo desenvolvimento de embriões zigóticos e/ou endospermas mais robustos, resultantes de polinização cruzada.

As taxas de frutificação natural relativamente baixas, verificadas nas espécies presentemente estudadas (exceto *Jacaranda racemosa*), são comparáveis às encontradas em outras espécies de Bignoniaceae (Yanagizawa 1983, Amaral 1992, Stephenson 1979, Bertin 1982). A proporção de flores que originam frutos maduros varia de zero à 100% entre diferentes espécies (Lloyd 1980, Stephenson 1981, Bawa & Webb 1984) e, numa mesma espécie, a diferença entre o número de flores em antese e o de frutos produzidos pode variar entre populações, entre indivíduos de uma mesma população, e de ano para ano (Stephenson 1981). Vários fatores podem limitar a produção de frutos, relativamente ao número de flores em antese produzidas, tais como o número de flores polinizadas, o número de óvulos fecundados, a predação de flores/frutos/sementes, as condições do tempo, o custo da produção dos frutos e a capacidade do parental materno em prover os recursos necessários ao desenvolvimento de frutos e sementes (Stephenson 1981, Wiens 1984, Ehrlén 1991). Porém, o baixo número frutos em relação ao de flores freqüentemente é também um fenômeno adaptativo, não só porque as plantas competem entre si para polinizar o maior número possível de indivíduos da mesma espécie ("male competition") - o que gera pressões seletivas no sentido de aumentar a produção e a eficácia de dispersão de grãos de pólen -, como também devido ao aborto seletivo de frutos contendo sementes com menor potencial de desenvolvimento ("female choice") - o que resulta em pressões seletivas responsáveis pela formação de um número excedente de ovários, relativamente ao número de frutos que alcançam a maturidade (Stephenson 1981, Stephenson & Bertin 1983, Bawa & Webb 1984). Conseqüentemente, em plantas homóicas, ambos os tipos de pressões seletivas favorecem a produção de um excesso de flores em relação ao número de frutos que alcançam a maturidade. Embora em *Catalpa speciosa* a maior proporção de flores em relação a frutos aparentemente seja resultado do comprometimento entre fatores adaptativos antagônicos, que por um lado aumentam e por outro limitam a produção de frutos (Stephenson 1979), estudos sobre a frutificação em Bignoniaceae são

muito escassos, e as interações entre os fatores que determinam a proporção de flores, relativamente à de frutos, permanecem pouco compreendidas.

Auto-Incompatibilidade de ação tardia em Bignoniaceae

Os resultados das análises histológicas de eventos posteriores à polinização indicam que a rejeição dos pistilos autopolinizados em Bignoniaceae é pós-zigótica, tendo ocorrido inclusive o início do desenvolvimento do tubo proembriônico em *T. impetiginosa*. Porém em todas as espécies auto-incompatíveis nas quais foi realizada a contagem de óvulos penetrados, observou-se um atraso dos tubos polínicos em penetrar os óvulos nos pistilos autopolinizados, o que sugere um mecanismo de reconhecimento e rejeição destes tubos polínicos e, portanto, a atuação de um sistema de incompatibilidade. Apesar desta menor eficácia dos tubos polínicos, todos ou a maior parte dos óvulos em pistilos autopolinizados foram penetrados, o que claramente é um indicativo da LSI.

O presente estudo eleva para 24 o número de espécies de Bignoniaceae onde a LSI foi constatada, ou seja, todas as espécies auto-incompatíveis da família Bignoniaceae nas quais o estudo do sítio de reação de incompatibilidade foi realizado. Uma vez que as demais espécies auto-incompatíveis não foram estudadas quanto aos eventos posteriores à polinização, é provável que a LSI esteja presente também em algumas outras, senão em todas as espécies auto-incompatíveis de Bignoniaceae. Estes dados corroboram a sugestão de que a LSI está agrupada em determinadas famílias, em vez de distribuída fortuitamente nas diversas famílias de angiospermas (Gibbs & Bianchi 1999).

Os resultados também indicam que os pistilos autopolinizados nas espécies auto-incompatíveis de Bignoniaceae apresentam um tipo de LSI no qual o progresso do desenvolvimento em diferentes estádios após a penetração dos óvulos, da fecundação do saco embrionário até os estádios iniciais do desenvolvimento do endosperma, é atrasado relativamente ao progresso de desenvolvimento em pistilos submetidos à polinização cruzada, porém sem outros sinais de anormalidade. Não foram encontrados sinais de malformação do proembrião ou do endosperma em pistilos autopolinizados.

Além disso, o aborto dos pistilos autopolinizados foi sempre uniforme, ocorrendo numa estreita faixa de desenvolvimento, poucos dias após a polinização, o que não seria esperado se o aborto destes mesmos pistilos fosse decorrente da expressão de genes recessivos deletérios após a fecundação dos óvulos. Portanto, no presente estudo, não foram encontradas evidências de que a auto-esterilidade em Bignoniaceae se deva aos efeitos da depressão endogâmica.

Estudos anteriores realizados em *Nicotiana glauca* (Lush & Clarke 1997) e *Petunia hybrida* (Herrero & Dickinson 1980) (Solanaceae), reconhecidamente, plantas com GSI, demonstraram que o crescimento dos tubos polínicos incompatíveis não é totalmente suprimido pela resposta de incompatibilidade, pois estes tubos polínicos continuam se desenvolvendo no estilete, embora numa taxa de crescimento muito mais lenta do que a dos tubos polínicos em pistilos submetidos à polinização cruzada, até a flor senescer. Os resultados do presente estudo parecem indicar que a inibição dos tubos polínicos incompatíveis em Bignoniaceae simplesmente é menos severa do que em espécies com GSI, pois os tubos polínicos chegam a fecundar os óvulos e desencadear o desenvolvimento inicial do endosperma e, em alguns casos, até mesmo do proembrião. Porém, a esta altura dos acontecimentos, o desenvolvimento dos pistilos autopolinizados já está comprometido pela resposta de incompatibilidade e os mesmos terminam por abortar. Portanto, pode ser que haja um gradiente de supressão dos tubos polínicos incompatíveis entre plantas com GSI e plantas com LSI.

Outra inferência derivada dos resultados obtidos no presente estudo é a de que o atraso na penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados, presumivelmente decorrente do reconhecimento dos tubos polínicos, de algum modo está envolvido com a abscisão destes mesmos pistilos. Parece ser bastante plausível que as diferenças observadas entre autopolinizações vs. polinizações cruzadas, quanto ao progresso de desenvolvimento pós-zigótico, sejam conseqüências de um processo de abortação, já instaurado nos pistilos autopolinizados. Porém a questão de ser a menor eficácia dos tubos polínicos em penetrar os óvulos a causa, ou simplesmente uma conseqüência do processo de abortação dos pistilos autopolinizados permanece aberta à futuras investigações. Neste contexto, análises

histológicas envolvendo a determinação do momento em que ocorre a formação da zona de abscisão pedicelo-receptacular em pistilos autopolinizados, aliadas ao estudo dos eventos posteriores à polinização, poderiam fornecer pistas quanto a abscisão ser iniciada antes ou após a penetração dos óvulos.

9. Literatura citada (apenas os trabalhos citados nos capítulos 1 e 8)

- AMARAL, M. E. C. 1992. **Ecologia Floral de Dez Espécies da Tribo Bignonieae (Bignoniaceae), em uma Floresta Semidecídua no Município de Campinas, SP.** Campinas: UNICAMP. 189 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Departamento de Ecologia, Universidade Estadual de Campinas.
- BAKER, H. G. & HARRIS, B. J. 1957. The pollination of *Parkia* by bats and its attendant evolutionary problems. **Evolution 11:** 449-460.
- BARROS, M. G. 2001. Pollination ecology of *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. and *T. ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae) in Central Brazil cerrado vegetation. **Revista Brasileira de Botânica 24:** 255-261.
- BARROWS, E. M. 1977. Floral maturation and insect visitors of *Pachytera hymenaea* (Bignoniaceae). **Biotropica 9:** 133-134.
- BATEMAN, A. J. 1956. Cryptic self-incompatibility in the wallflower; *Cheiranthus cheiri* L. **Heredity 10:** 257-261.
- BAWA, K. S. 1974. Breeding systems of tree species of lowland tropical community. **Evolution 28:** 85-92.
- BAWA, K. S. & WEBB, C. J. 1984. Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: Implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. **American Journal of Botany 71:** 736-751.

- BERTIN, R. I. 1982. Floral biology, hummingbird pollination and fruit production of trumper creeper (*Campsis radicans*, Bignoniaceae). **American Journal of Botany** **69**: 122-134.
- BERTIN, R. I. & SULLIVAN, M. 1988. Pollen interference and cryptic self-fertility in *Campsis radicans*. **American Journal of Botany** **75**: 1140-1147.
- BERTIN, R. I.; BARNES, C. & GUTTMAN, S. I. 1989. Self-sterility and cryptic self-fertility in *Campsis radicans* (Bignoniaceae). **Botanical Gazette** **150**: 397-403.
- BITTENCOURT, J. A. R. 1981. **Alguns Aspectos da Fenologia e Polinização de *Jacaranda macrantha* Cham.** Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- BORRERO H., J. I. 1972. Explotacion de las flores de Guayacan (*Tabebuia chrysantha*) por varias especies de aves e insetos. **Biotropica** **4**: 28-31.
- BORRERO H., J. I.; PALTA, J. A. & SALGUERO, G. 1979. Las flores del tulipan africano (*Spathodea campanulata* Beauvois) y su significado para los insectos y las aves. **Boletin de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales** **34**: 207-222.
- BOWMAN, R. 1987. Cryptic self-incompatibility and the breeding system of *Clarkia unguiculata*. (Onagraceae). **American Journal of Botany** **74**: 471-476.
- BRANHAM, P. E. & OWENS, S. J. 1978. The genetic control of self-incompatibility in the genus *Gasteria* (Liliaceae). **Heredity** **40**: 165-169.
- BRANTJES, N. B. M. 1979. Samen delen en wedde op twee paarden bij de bestuiving van Bignoniaceae. **Vakbl. Biol.** **5**: 72.
- BREWBAKER, J. L. & GORREZ, D. D. 1967. Genetics of self-incompatibility in the monocot genera *Ananas* (pineapple) and *Gasteria*. **American Journal of Botany** **54**: 611-616.
- BRINK, R. A. & COOPER, D. C. 1938. Partial self-incompatibility in *Medicago sativa*. **Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.** **24**: 497-499.
- BROCK, R. D. 1954. Fertility in *Lilium* hybrids. **Heredity** **8**: 409-420.

- BROWN, N. & CROWDEN, R. K. 1984. Evidence of heterostyly in *Epacris impressa* Labill. (Epacridaceae). *In* **Pollination 1984 - Proceedings of a Symposium held at Plant Cell Biology Research Center, University of Melbourne.** (G. E. Williams & R. B. Knox. eds.). Melbourne: University Press. p. 187-193.
- BULLOCK, S. H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. **Biotropica 17:** 287-301.
- CAMARGO, J. M. F.; GOTTSBERGER, G. & SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. 1983. On the phenology and flower visiting behaviour of *Oxaea flavescens* (Klug) (Oxaeinae, Andrenidae, Hymenoptera) in São Paulo, Brazil. **Beiträge zur Biologie der Pflanzen 59:** 159-179.
- CARVALHO, C. T. 1960. Das visitas de morcegos às flôres (Mammalia, Chiroptera). **Anais da Academia Brasileira de Ciências 32:** 359-377.
- CERTAL, A. C.; ALMEIDA, R. B.; BOSKOVIC, R. OLIVEIRA, M. M. & FEIJÓ, J. A. 2002. Structural and molecular analysis of self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). **Sexual Plant Reproduction 15:** 13-20.
- CHARLESWORTH, D. 1985. Distribution of dioecy and self-incompatibility in angiosperms. *In* **Evolution: Essays in Honour of John Maynard Smith.** (P. J. Greenwood & M. Slatkin, eds.). Cambridge: Cambridge University Press. p. 237-268.
- COOPER, D. C. & BRINK, R. A. 1940. Partial self-incompatibility and the collapse of fertile ovules as factors affecting seed formation in alfalfa. **Journal of Agricultural Research 60:** 453-472.
- COPE, F. W. 1962a. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. **Heredity 17:** 157-182.
- COPE, F. W. 1962b. The effects of incompatibility and compatibility on genotype proportions in populations of *Theobroma cacao* L. **Heredity 17:** 183-195.
- CORBET, S. A. 1978. Bees and the nectar of *Echium vulgare*. **Linnean Society of London, Symposium, Series 6:** 21-30.

- CRUDEN, R. W. & LLOYD, R. M. 1995. Embryophytes have equivalent sexual phenotypes and breeding systems: Why not a common terminology to describe them? **American Journal of Botany** **82**: 816-825.
- DARWIN, C. 1877. **The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species**. London: John Murray.
- DICKINSON, H. G. 1994. Self-pollination. Simply a social disease? **Nature (London)** **367**: 517-518.
- DICKINSON, H. G. & LEWIS, D. 1973. Cytochemical and ultrastructural differences between intra-specific compatible and incompatible pollinations in *Ranunculus*. **Proceedings of the Royal Society of London, Ser. B, Biological Sciences** **183**: 21-28.
- DOBROFSKY, S. & GRANT, W. F. 1979. Electrophoretic evidence supporting self-incompatibility in *Lotus corniculatus*. **Canadian Journal of Botany** **58**: 712-716.
- DOWRICK, V. P. 1956. Heterostyly and homostyly in *Primula obconica*. **Heredity** **10**: 219-236.
- DUTRA, J. C. S. & MACHADO, V. L. L. 2001. Entomofauna visitante de *Stenolobium stans* (Juss.) Seem (Bignoniaceae), durante seu período de floração. **Neotropical Entomology** **30**: 43-53.
- ELIAS, T. S. & GELBAND, H. 1976. Morphology and anatomy of floral and extrafloral nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). **American Journal of Botany** **63(10)**: 1349-1353.
- EHRLÉN, J. 1991. Why do plants produce surplus flowers? A reserve-ovary model. **The American Naturalist** **138**: 918-933.
- FAEGRI, K. & PIJL, L. van der 1979. **The Principles of Pollination Ecology**. 3th ed. Oxford: Pergamon Press.
- FIGUEIROA, P. G. & FOURNIER O, L. A. 1996. Fenología y ecofisiología de dos poblaciones de *Tabebuia rosea* ("Roble de Sabana") em Costa Rica (Bignoniaceae). **Revista de Biología Tropical** **44**: 61-70.
- FOOTE, H. C. C.; RIDE, J. P.; FRANKLIN-TONG, V. E.; WALKER, E. A. LAWRENCE, M. J. & FRANKLIN, F. C. H. 1994. Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S-)

- gene from *Papaver rhoeas* L. **Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.** **91**: 2265-2269.
- FRANKLIN, F. C. H.; LAWRENCE, M. J. & FRANKLIN-TONG, V. E. 1995. Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. **International Journal of Cytology** **158**: 1-64.
- FRANKLIN-TONG, V. E.; ATWAL, K. K.; HOWELL, E. C.; LAWRENCE, M. J. & FRANKLIN, F. C. H. 1991. Self-incompatibility in *Papaver rhoeas* L.: There is no evidence form the involvement of stigmatic ribonuclease activity. **Plant, Cellular Environment** **14**: 423-429.
- FRANKLIN-TONG, V. E.; RIDE, J. P.; READ, N. D.; TREWAVAS, A. J. & FRANKLIN, F. C. H. 1993. The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. **The Plant Journal** **4**: 163-177.
- GALETTO, L. 1995. Nectary structure and nectar characteristics in some Bignoniaceae. **Plant Systematic and Evolution** **196**: 99-121.
- GALETTO, L.; BERNARDELLO, L. M. & JULIANI, H. R. 1994. Characteristics of secretion of nectar in *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl.) Miers (Bignoniaceae). **New Phytologist** **127**: 465-471.
- GANDERS, F. R. 1979. The biology of heterostyly. **New Zeland Journal of Botany** **17**: 607-635.
- GENTRY, A. H. 1973. Bignoniaceae. *In* Flora do Panama. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **60**: 781-997.
- GENTRY, A. H. 1974a. Coevolutionary patterns in Central American Bignoniaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **61**: 728-759.
- GENTRY, A. H. 1974b. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. **Biotropica** **6(1)**: 64-68.
- GENTRY, A. H. 1976. Bignoniaceae of southern Central America: Distribution and ecological specificity. **Biotropica** **8**: 117-131.
- GENTRY, A. H. 1978. Anti-pollinators of mass-flowering plants? **Biotropica** **10(1)**: 68-69.

- GENTRY, A. H. 1988. Changes in plant community diversity and floristic composition environmental and geographical gradients. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **75**: 1-34.
- GENTRY, A. H. 1989. An overview of the geography, taxonomy and evolution of lianas. *In* **The Biology of the Climbing Plants**. (F. Putz, S. Bullock & H. Mooney, eds.). Cambridge: Cambridge University Press.
- GENTRY, A. H. 1990. Evolutionary patterns in neotropical Bignoniaceae. **Memories of the New York Botanical Garden** **55**: 118-129.
- GIBBS, P. E. 1986. Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism? *Plant Systematics and Evolution* **154**: 285-323.
- GIBBS, P. E. 1990. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revista Brasileira de Botânica** **13**: 125-136.
- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta** **106**: 64-71.
- GIBBS, P. E. & BIANCHI, M. 1999. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cyananchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany** **84**: 449-457.
- GOBATTO-RODRIGUES, A. A. & STORT, M. N. S. 1992. Biologia floral e reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **15**: 37-41.
- HERRERO, M. & DICKINSON, H. G. 1980. Pollen tube growth following compatible and incompatible intraspecific pollination in *Petunia hybrida*. **Planta** **148**: 217-221.
- HESLOP-HARRISON, Y. 1981. Stigma characteristics and angiosperm taxonomy. **Nordic Journal of Botany** **1**: 401-420.
- HESSING, M. B. 1989. Differential pollen tube success in *Geranium caespitosum*. **Botanical Gazette** **150**: 404-410.

- HISCOCK, S. J. & DICKINSON, H. G. 1993. Unilateral incompatibility within the Brassicaceae: further evidence for the involvement of the self-incompatibility (*S*)-locus. **Theoretical and Applied Genetics** **86**: 744-753.
- JAEGER, P. 1954. Les aspects actuelles du problème de la chéuriptérogamie. **Bulletin de L'Institut Français D'Afrique Noire, Serie A** **16**: 796-821.
- JANZEN, D. H. 1967. Synchronization of sexual reproduction of trees within the dry season in Central America. **Evolution** **21**: 620-637.
- JANZEN, D. H. 1971. Eoglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. **Science** **171**: 203-205.
- JAMES, E. A. & KNOX, R. B. 1993. Reproductive biology of the Australian species of the genus *Pandorea* (Bignoniaceae). **Australian Journal of Botany** **41**: 611-626.
- KENRICK, J.; KAUL, V. & WILLIAMS, E. G. 1986. Self-incompatibility in *Acacia retinoides*: Site of pollen-tube arrest is the nucellus. **Planta** **169**: 245-250.
- KLEKOWSKI JR., E. J. 1988. **Mutation, Developmental Selection, and Plant Evolution**. Columbia University Press, New York.
- KLEKOWSKI JR., E. J. & GODFREY, P. J. 1989. Ageing and mutation in plants. **Nature** **340**: 389-391.
- KNOX, R. B. & KENRICK, J. 1983. Polyad function in relation to the breeding system of *Acacia*. In **Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding**. (D. Mulcahy & E Ottaviano, eds.) New York: Elsevier. p. 411-417.
- KNUTH, P. 1905. **Handbuch der Blütenbiologie III**. Leipzig: Engelmann, p. 132-143.
- KOWYAMA, Y.; SHIMANO, N. & KAWASE, T. 1980. Genetic analysis of incompatibility in the diploid *Ipomoea* species closely related to the sweet potato. **Theoretical and Applied Genetics** **58**: 149-155.

- KREBS, S. L. & HANCOCK, J. F. 1991. Embryonic genetic load in the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). **American Journal of Botany** **78**: 1427-1437.
- LEVIN, D. A. 1984. Inbreeding depression and proximity-dependent crossing success in *Plox drummondii*. **Evolution** **38**: 116-127.
- LEWIS, 1943. The physiology of incompatibility in plants II. *Linum grandiflorum*. **Annals of Botany** **7**: 115-122.
- LINSKENS F. H. 1965. Biochemistry of incompatibility. Proceedings of the 11th International Congress of Genetic, The Hague 1963. *In Genetics Today*. (S. J. Geerts, ed.). **3**: 621-636.
- LIPOW, S. R. & WYATT, R. 2000. Single gene control of postzygotic self-incompatibility in poke milkweed, *Asclepias exaltata* L. **Genetics** **154**: 893-907.
- LLOYD, D. G. 1980. Sexual strategies in plants. I. An hypothesis of investment during one reproductive session. **New Phytologist** **86**: 69-79.
- LOHMANN, L. G. 2002. Bignoniaceae. In: Flowering Plant Families of Tropical America (A. Henderson & S. Mori, eds.). New York: New York Botanical Garden Press (in press).z
- LOHMANN, L. G. & PIRANI, J. R. 1998. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Bignoniaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **17**: 127-153.
- LUSH, W. M. & CLARKE, A. E. 1997. Observations of pollen tube growth in *Nicotiana glauca* and their implications for the mechanism of self-incompatibility. **Sexual Plant Reproduction** **10**: 27-35.
- LUNDQVIST, A. 1955. The genetics of self-incompatibility in *Festuca pratensis* Huds. **Hereditas** **40**: 278-294.
- LUNDQVIST, A. 1956. Self-incompatibility in rye. I. Genetic control in the diploid. **Hereditas** **42**: 293-348.
- LUNDQVIST, A. 1979. One-locus sporophytic self-incompatibility in the Carnation family, Caryophyllaceae. **Hereditas** **91**: 307.

- LUNDQVIST, A. 1991. Four-*locus* S-gene control of self-incompatibility made probable in *Lilium martagon*. *Hereditas* 114: 57-63.
- LUNDQVIST, A.; ØSTERBYE, U.; LARSEN, K. & LINDE-LAUSEN, I. 1973. Complex self-incompatibility systems in *Ranunculus acris* and *Beta vulgaris*. **Hereditas** 74: 161-168.
- MACHADO, S. R.; GREGORIO, E. A.; YANAGIZAWA, Y. & CARMELLO, S. M. 1995. Ultrastructural aspects of the peltate glandular trichomes of the gynoecium in *Zeyheria digitalis* (Vell.) Hoehne (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 18: 197-205.
- MANASSE, R. S. & PINNEY, K. 1991. Limits to reproductive success in a partially self-incompatible herb: fecundity depression at serial life cycle stages. **Evolution** 45: 712-720.
- MARTIN, F. N. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology** 34: 25.
- MASCARENHAS, J. P. 1993. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. **The Plant Cell** 5: 1303-1314.
- MATHER, K. 1950. The genetical architecture of heterosyly in *Primula sinensis*. **Evolution** 4: 340-352.
- MAYO, D. & HAYMANN, D. L. 1973. The stability of systems of gametophytically determined self-incompatibility. **Incompatibility Newsletter** 2: 15-18.
- McKAY, J. W. 1942. Self-sterility in the Chinese chestnut (*Castanea mollissima*). **Journal of the American Society of Horticultural Science** 41: 156-160.
- MIRI, R. K. & BUBAR, J. S. 1966. Self-incompatibility as an outcrossing mechanism in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). **Canadian Journal of Plant Science** 46: 411-418.
- MORAWETZ, w. 1982. **Morphologisch-ökologische differenzierung biologische, systematische und evolution der neotropischen gattung *Jacaranda* (Bignoniaceae)**. Springer Verlag, Wien. 184p.
- NASRALLAH, J. B. 2002. Recognition and rejection of self in plant reproduction. *Science* 296: 305-308.

- NETTANCOURT, D. de 1977. **Incompatibility Systems in Angiosperms**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- NETTANCOURT, D. de 1997. Incompatibility in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction 10**: 185-199.
- NETTANCOURT, D. de 1999. Homomorphic self-incompatibility in flowering plants. *In* **Fertilization in Higher Plants. Molecular and Cytological Aspects**. (M. Cresti; G. Cai & A Moscatelli, eds.). Springer, Berlin, p. 101-112.
- NETTANCOURT, D. de 2001. **Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants**. Berlin: Springer.
- NEWBIGIN, E.; ANDERSON, M. A. & CLARKE, A. E. 1993. Gametophytic self-incompatibility systems. **The Plant Cell 5**: 1315-1324.
- NEWCOMBE, F. C. 1922. Significance of the behavior of sensitive stigmas. **American Journal of Botany 9**: 99-120.
- NEWCOMBE, F. C. 1924. Significance of the behavior of sensitive stigmas II. **American Journal of Botany 11**: 85-93.
- NISHIO, T. HANATA, K. 1982. Comparative studies on S-glycoproteins purified from different S-genotypes in self-incompatible *Brassica* species. I. Purification and chemical properties. **Genetics 100**: 641-647.
- OLIVEIRA, R. M.; GIANNOTTI, E. & MACHADO, V. L. L. 1991. Visitantes florais de *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae). **Bioikos 5**: 7-30.
- ØSTERBYE, U. 1975. Self-incompatibility in *Ranunculus acris* L. Genetic interpretation and evolutionary aspects. **Hereditas 80**: 91-112.
- PANDEY, K. K. 1958. Time of S-allele action. **Nature 181**: 1220-1221.
- PERCIVAL, M. S. 1965. **Floral Biology**. London: Pergamon Press.

- PETERSEN, C.; BROWN, J. H. & KODRIC-BROWN, A. 1982. An experimental study of floral display and fruit set in *Chilopsis linearis* (Bignoniaceae). **Oecologia 55**: 7-11.
- PIJL, L. van der 1954. *Xylocopa* and flowers in the tropics. I. **Proceedings of the Koninklijke Neerlandese Akademie van Wetenschappen, Series C 57**: 413-423.
- PORCH, O. *Crescentia*, eine Fledermaublume. **Österreichischen Botanischen Zeitschrift 80**: 31-44.
- PROCTOR, M. & YEO, P. 1975. **The Pollination of Flowers**. London: Collins.
- REICH, P. B. & BORCHERT, R. 1982. Phenology and ecophysiology of tropical tree, *Tabebuia neochrysantha* (Bignoniaceae). **Ecology 63**: 294-299.
- RICHARDS, A. J. & IBRAHIM, H. 1982. The breeding system of *Primula veris* L. II. Pollen tube growth and seed set. **New Phytologist 90**: 305-314.
- SAGE, T. L.; BERTIN, R. J. & WILLIAMS, E. G. 1994. Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. **In Genetic Control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants**. (E. G. Williams; A. E. Clarke & R. B. Knox, eds.). Kluwer Academic, Dordrecht, p.116-140.
- SAGE, T. L.; STRUMAS, F.; COLE, W. W. & BARRETT, S. C. 1999. Differential ovule development following self- and cross-pollination: The basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). **American Journal of Botany 86**: 855-870.
- SAGE, T. L. & WILLIAMS, E. G. 1991. Self-incompatibility in *Asclepias*. **Plant Cell Incompatibility Newsletter 23**: 55-57.
- SAMPAIO, E. S. 1991. **Padrão de floração e Aspectos da Biologia de Reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker) Miers (Bignoniaceae) na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná**. Tese de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- SANDERS, L. C. & LORD, E. M. 1989. Directed movement of latex particles in the gynoeceia of three species of flowering plants. **Science 243**: 1606-1608.

- SANDERS, L. C.; WANG, C. S.; WALLING, L. L. & LORD, E. M. 1991. A homologue of the substrate adhesion molecules vitronectin occurs in four species of flowering plants. **The Plant Cell** **3**: 629-635.
- SASSA, H.; HIRANO, H.; HISHIO, T. & KOBAYASHI, T. 1997. Self-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). **The Plant Journal** **12**: 223-227.
- SAYERS, E. R. & MURPHY, R. P. 1966. Seed set in alfalfa as related to pollen tube growth, fertilization frequency, and post-fertilization ovule abortion. **Crop Science** **6**: 365-368.
- SCHMITT, D. & PERRY, T. O. 1964. Self-sterility in sweetgum. **Forest Science** **10**: 302-3-5.
- SCHOU, O. & PHILLIP, M. 1983. An unusual heteromorphic incompatibility system. 2. Pollen within *Anchusa officinalis*. L. (Boraginaceae). In Pollen: **Biology and Implications for Plant Breeding**. (D. Mulcahy & E. Ottaviano, eds.). New York: Elsevier. p. 219-227.
- SEARS, E. R. 1937. Cytological phenomena connected with self-sterility in the flowering plants. **Genetics** **22**: 130-181.
- SEAVEY, S. R. & BAWA, K. S. 1986. Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. **The Botanical Review** **52**:195-219.
- SEAVEY, S. R. & CARTER, S. K. 1994. Self-sterility in *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) **American Journal of Botany** **81**: 331-338.
- SEAVEY, S. R.; MANGELS, S. K. & CHAPPEL, N. J. 2000. Unfertilized ovules of *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) continue to grow in developing fruits. **American Journal of Botany** **87**: 1765-1768.
- SEMIR, J. 1991. **Revisão Taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaeae: Compositae)**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

- SHIVANNA, K. R.; HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. 1981. Heterostyly in *Primula*. 2. Sites of pollen inhibition, and effects of pistil components on compatible and incompatible pollen-tube growth. **Protoplasma** **107**: 319-337.
- SHIVANNA, K. R.; HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. 1983. Heterostyly in *Primula*. 3. Pollen water economy: a factor in the intramorph-incompatibility response. **Protoplasma** **117**: 175-184.
- SINGH, J. & CHAUHAN, S. V. S. 1996. Floral polymorphism and establishment of self incompatibility in *Tecoma stans* L. **Journal of Tree Science** **13**: 57-60.
- SPANGLER, R. E. & OLMSTEAD, R. G. 1999. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences *rbcL* and *ndhF*. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **86**: 33-46.
- STEPHENSON, A. G. 1979. An evolutionary examination of the floral display of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae). **Evolution** **33**: 1200-1209.
- STEPHENSON, A. G. 1981. Flower and fruit abortion: Proximate causes and ultimate functions. **Annual Review of Ecology and Systematics** **12**: 253-279.
- STEPHENSON, A. G. & BERTIN, R. I. 1983. Male competition, female choice and sexual selection in plants. In **Pollination Biology** (L. A. REAL, ed.). New York: Academic Press, p. 109-149.
- STEPHENSON, A. G. & THOMAS, W. W. 1977. Diurnal and Nocturnal pollination of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae). **Systematic Botany** **2**: 191-198.
- STEVENS, ALBERT-DIETER 1991. **Zur Reproduktionsbiologie einiger Bignoniaceen im Cerrado Brasiliens**. Justus-Liebig-Universität Gießen. Gießen.
- STOUT, A. B. & CHANDLET, C. 1933. Pollen-tube behavior in *Hemerocallis* with special reference to incompatibilities. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** **60**: 397-416.
- SUBRAMANIAN, R. B. & INAMDAR, J. A. 1985. Occurrence, structure, ontogeny and biology of nectaries in *Kigelia pinnata* DC. **Botanical Magazine of Tokyo** **98**: 67-73.

- SUBRAMANIAN, R. B. & INAMDAR, J. A. 1986. Nectaries in *Bignonia illicium* L. - Ontogeny, structure and functions. **Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Science)** **96**: 135-140.
- SUBRAMANIAN, R. B. & INAMDAR, J. A. 1989. The structure, secretion and biology of nectaries in *Tecomaria capensis* Thunb (Bignoniaceae). **Phytomorphology** **39**: 69-74.
- TALAVERA, S.; GIBBS, P. E.; FERNÁNDEZ-PIEDRA, P. & ORTIZ-HERRERA, M. A. 2001. Genetic control of self-incompatibility in *Anagallis monelli* (Primulaceae: Myrsinaceae). **Heredity** **87**: 589-597.
- THIERET, J. W. 1976. Floral biology of *Proboscidea louisianica* (Martyniaceae). **Rhodora** **78**: 169-179.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1992. Structure and biology of nectaries in *Tabebuia serratifolia* Nichols (Bignoniaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **109**: 395-400.
- THOMPSON, M. M. 1979a. Genetics of incompatibility in *Corylus avellana* L. **Theoretical and Applied Genetics** **54**: 113-116.
- THOMPSON, M. M. 1979b. Incompatibility alleles in *Corylus avellana* L. cultivars. **Theoretical and Applied Genetics** **55**: 29-33.
- TILTON, V. R. & HORNER Jr., H. T. 1980. Stigma, style, and obturator of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in the reproductive process. **American Journal of Botany** **67**: 1113-1131.
- VERMA, S. C.; MALIK, R. & DHIR, I. 1977. Genetics of the incompatibility systems in the crucifer *Eruca sativa* L. **Proceedings of the Royal Society of London Ser. B** **196**: 131-159.
- VIEIRA, M. F.; MEIRA, R. M. S. A.; QUEIROZ, L. P. & MEIRA NETO, J. A. A. 1992. Polinização e reprodução de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. (Bignoniaceae) em área de Cerrado do Sudeste Brasileiro. **Anais do 8º. Congresso da SBPC**, 13-19.
- VISSER, T. & MARCUCCI, M. C. 1984. The interaction between compatible and self-incompatible pollen of apple and pear as influenced by their ratio in the pollen cloud. **Euphytica** **33**: 699-704.

- VITALI, M. J. & MACHADO, V. L. L. 1995. Entomofauna visitante das flores de *Tabebuia chrysotricha* (Mart.) Sandl. (Bignoniaceae). **Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil 24**: 77-87.
- VOGEL, N. M. 1958. Fledermausblumen in südamerika. **Österreichischen Botanischen Zeitschrift 104**: 491-530.
- VOGEL, N. M. 1969. Chiropterophilie in der neotropischen Flora. Neue Mitteilungen II. **Flora 158**: 185-222.
- VUILLEUMIER, B. S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in angiosperms. **Evolution 21**: 210-226.
- WASER, N. M. & PRICE, M. V. 1991. Reproductive costs of self pollination in *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae): are ovules usurped? **American Journal of Botany 78**: 1036-1043.
- WEBER, A. & VOGEL, S. 1986. The pollination syndrome of *Deplanchea tetraphylla* (Bignoniaceae). **Plant Systematic and Evolution 154**: 237-250.
- WHITHAM, T. G. 1977. Coevolution of foraging in *Bombus* and nectar dispensing in *Chilopsis*: A last dreg theory. **Science 197**: 593-596.
- WIENS, D. 1984. Ovule survivorship, brood size, life history, breeding systems, and reproductive success in plants. **Oecologia 64**: 47-53.
- WIENS, D.; CAVIN, C. L.; WILSON, C. A.; DAVERN, C. I.; FRANK, D. & SEAVEY, S. R. 1987. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. **Oecologia 71**: 501-509.
- WILLIAMS, E. G.; KAUL, V.; ROUSE, J. L. & KNOX, R. B. 1984. Apparent self-incompatibility in *Rhododendron ellipticum*, *R. championae* and *R. amamiense*: A post-zygotic mechanism. **Incompatibility Newsletter 16**: 10-11.

- WOJCIECHOWSKA, B. 1963. Embryological studies in the genus *Lotus*. Part I. Fertilization and seed development following open- and self-pollination in *Lotus corniculatus* L. **Genetica Polonica 4**: 53-63.
- WYATT, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. *In* **Pollination Biology** (L. A. Real, ed.). Academic Press, New York, p. 51-95.
- YANAGIZAWA, Y. 1980. Melitofilia em *Stenolobium stans* (Bignoniaceae). *In* **Anais da 32^a Reunião Anual da SBPC**, Rio de Janeiro. p. 815.
- YANAGIZAWA, Y. 1983. **Aspectos da Biologia Floral de Espécies de Arrabidaea e Jacaranda, no Município de Botucatu, SP.** Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- YANAGIZAWA, Y. & GOTTSBERGER, G. 1983. Competição entre *Distictella elongata* (Bignoniaceae) e *Crotalaria anagyroides* (Fabaceae) com relação as abelhas polinizadoras no cerrado de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Portugaliae Acta Biologica (A) 18**: 149-166.
- YANAGIZAWA, Y.; MAIMONI-RODELLA, R. C. S.; AMARAL, A. Jr. & RODELLA, R. A. 1982. Biologia floral de *Zeyheria digitalis* (Vell.) Hoehne (Bignoniaceae) na região de Botucatu, SP., Brasil. *In*: **34^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para Progresso da Ciência**. Campinas, SP., Resumos p. 827.