



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Filipe Alisson Ribeiro

**Sistema reprodutivo de *Couroupita guianensis* Aubl.
(Lecythidaceae): estudo sobre a causa da autoesterilidade**

São José do Rio Preto
2024

Filipe Alisson Ribeiro

**Sistema reprodutivo de *Couroupita guianensis* Aubl.
(Lecythidaceae): estudo sobre a causa da autoesterilidade**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Nelson Sabino Bittencourt

São José do Rio Preto
2024

R484s Ribeiro, Filipe Alisson
Sistema reprodutivo de *Couroupita guianensis* Aubl.
(Lecythidaceae): estudo sobre a causa da autoesterilidade /
Filipe Alisson Ribeiro. -- São José do Rio Preto, 2024
65 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas,
São José do Rio Preto
Orientador: Nelson Sabino Bittencourt Jr.

1. Sistema reprodutivo. 2. Autoincompatibilidade de ação
tardia. 3. Autoesterilidade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências
Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Filipe Alisson Ribeiro

**Sistema reprodutivo de *Couropita guianensis* Aubl.
(Lecythidaceae): estudo sobre a causa da autoesterilidade**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Nelson Sabino Bittencourt Jr.
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dra. Diana Salles Sampaio
UFU – Universidade Federal de Uberlândia

Prof^a. Dra. Edivani Villaron Franceschinelli
UFG – Universidade Federal de Goiás

São José do Rio Preto
05 de abril de 2024

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A espécie arbórea *Couroupita guianensis* Aubl. (Lecythidaceae) é nativa da região amazônica no Brasil, embora não endêmica. A árvore é conhecida pela beleza e agradável odor de suas flores reunidas em inflorescências caulifloras e por apresentar frutos lenhosos, grandes e esféricos, o que torna comum sua presença em diversas cidades brasileiras. O sistema reprodutivo de *C. guianensis* foi alvo de discussões, uma vez que foi identificado como autocompatível, contrariando o esperado para a família Lecythidaceae. Posteriormente, em um estudo de polinizações controladas, a autocompatibilidade foi questionada, embora as causas de sua autoesterilidade permanecessem desconhecidas. Este trabalho teve como objetivo investigar os eventos posteriores à polinização no gineceu, para elucidar as possíveis causas da autoesterilidade observada. Para isto, polinizações controladas e análise histológica dos pistilos/frutos foram realizadas em espécimes cultivados. Os pistilos autopolinizados apresentaram longevidade estendida em relação aos pistilos não polinizados. Nesses dois tratamentos, o aborto dos pistilos/frutos ocorreu de forma precoce e nenhum fruto derivado de autopolinização atingiu a maturidade. No momento do aborto, os pistilos autopolinizados apresentaram comprimento e largura significativamente maiores que os não polinizados. Os pistilos autopolinizados apresentaram muitos primórdios seminais penetrados por tubos polínicos e houve dupla fecundação, mas o zigoto não sofreu divisões (não houve desenvolvimento embrionário), embora os estádios iniciais de um desenvolvimento aparentemente normal do endosperma nuclear tenham sido verificados até o momento da abscisão do fruto. Nos quatro primeiros dias após a polinização, não houve diferença significativa na quantidade de sementes que apresentavam endosperma em desenvolvimento entre frutos iniciados por autopolinização vs. polinização cruzada. Os dados indicam a autoincompatibilidade de ação tardia como causa da autoesterilidade em *C. guianensis*.

Palavras-chave: Autoesterilidade. Autoincompatibilidade de ação tardia. Sistema reprodutivo.

ABSTRACT

Couroupita guianensis Aubl. (Lecythidaceae) is native to the Amazon region in Brazil, although not endemic. This tree is known for the beauty and pleasant scent of their flowers, as well as their peculiar spheric, big woody fruits, which makes the species presence relatively common in several Brazilian cities. The reproductive system of *C. guianensis* was the subject of discussions, since it was formerly treated as self-compatible, contrary to what was expected for the Lecythidaceae family. However, in a study on controlled pollinations, self-compatibility in this species was questioned, although the causes of its self-sterility remained unknown. This work aimed to investigate post-pollination events in the gynoecium/initiating fruit, to elucidate the possible causes of the observed self-sterility. For this, controlled pollinations and histological analysis of pistils/fruits were carried out on cultivated specimens. Self-pollinated pistils showed extended longevity compared to non-pollinated pistils. In these two treatments, the abortion of the pistils/fruits occurred early and no self-pollinated fruit reached maturity. At the time of abortion, self-pollinated pistils were significantly greater in length and width than non-pollinated ones. In self-pollinated pistils many ovules were penetrated by pollen tubes and double fertilization occurred. However, the zygote did not undergo divisions (there was no embryo formation), although the nuclear endosperm seemed to grow normally until the moment of fruit abscission. In the first four days after pollination, there was no difference in the number of seeds showing a developing endosperm in selfed vs. crossed pistils/initiating fruits. The data indicate late-acting self-incompatibility as the cause of the self-sterility in *C. guianensis*.

Key words: Self-sterility. Late-acting self-incompatibility. Breeding system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização dos espécimes de <i>C. guianensis</i> no Campus IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP	19
Figura 2 - Polinizações controladas	21
Figura 3 - Medidas de comprimento e largura dos pistilos e frutos coletados	23
Figura 4 - Crescimento em largura e comprimento dos pistilos não polinizados até o 21º dia após a antese	25
Figura 5 - Longevidade dos pistilos não polinizados	25
Figura 6 - Crescimento em largura e comprimento dos pistilos autopolinizados coletados até o 32º dia após a antese	26
Figura 7 - Longevidade dos pistilos autopolinizados	27
Figura 8 - Crescimento em largura e comprimento dos pistilos cruzados coletados até o 47º dia após a antese	28
Figura 9 - Longevidade dos pistilos cruzados	28
Figura 10 - Longevidade (primeiro dia de antese até abscisão) dos pistilos não polinizados, autopolinizados e cruzados	29
Figura 11 - Comprimento e largura dos pistilos/frutos ao abortarem	30
Figura 12 - Primórdio seminal de <i>C. guianensis</i> .	32
Figura 13 – Detalhe do primórdio seminal de <i>C. guianensis</i> .	33
Figura 14 - Saco embrionário de <i>C. guianensis</i> , em estágio de antese	34
Figura 15 - Saco embrionário de <i>C. guianensis</i> , em estágio de pré-antese	35
Figura 16 - Primórdios seminais de pistilos não polinizados em estádios posteriores à antese	37
Figura 17 - Aparelho oosférico em primórdio seminal, sete dias após a antese.	38
Figura 18 - Secção transversal na porção média do ovário de <i>C. guianensis</i> , em pistilos polinizados	39
Figura 19 - Secções longitudinais da região micropilar de primórdios seminais no primeiro e segundo dia após a polinização.	41
Figura 20 - Secções longitudinais da região micropilar de primórdios seminais no segundo dia após a polinização	42
Figura 21 - Secções oblíquas (400x) de primórdios seminais/sementes de <i>C. guianensis</i> , no segundo dia após a polinização	43

Figura 22 - Sementes de <i>C. guianensis</i> em estágio inicial de desenvolvimento (4 dias após a autopolinização)	44
Figura 23 - Zigoto em pistilos cruzados e autopolinizados	46
Figura 24 - Desenvolvimento do endosperma em sementes derivadas de polinização cruzada e autopolinização	47
Figura 25 - Endosperma celularizado em uma semente com 56 dias após a polinização cruzada	48
Figura 26 - Expansão e degeneração do tegumento interno e das camadas mais internas do tegumento externo em sementes derivadas de polinização cruzada	48
Figura 27 - Degeneração do endotélio em primórdios seminais sete dias após a polinização	49
Figura 28 - Endosperma de semente em degeneração, 20 dias após a autopolinização	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Desenvolvimento do endosperma em sementes derivadas de autopolinização e polinização cruzada	40
Tabela 2 - Quantidade de primórdios seminais e sementes degeneradas para cada tratamento realizado	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	17
2.1 Objetivos específicos	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Descrição da espécie	18
3.2 Procedimentos em campo	19
3.3 Procedimentos em laboratório	22
3.4 Análises estatísticas	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Longevidade e comparação do tamanho dos pistilos/frutos abortados	24
4.2 Caracterização do primórdio seminal	30
4.3 Pistilos não polinizados	35
4.4 Pistilos polinizados	38
5 DISCUSSÃO	51
5.1 Longevidade e crescimento dos pistilos e frutos	51
5.2 Eventos posteriores à antese e à polinização manual	53
5.3 Causa da autoesterilidade: autoincompatibilidade ou depressão endogâmica?	55
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A família Lecythidaceae, ordem Ericales, possui distribuição Pantropical (MORI et.al., 2017; SOUZA; LORENZI, 2019) e integra 3 subfamílias (HUANG; MORI; KELLY, 2015; MORI et.al., 2017): Barringtonioideae, encontrada na Ásia tropical, Malásia, norte da Austrália, Ilhas do Pacífico e Madagascar; Foetidioideae encontrada em Madagascar, Ilhas Maurício e leste da África; e Lecythidoideae que está restrita a região neotropical (MORI, 2004).

As flores da família recebem destaque devido, principalmente, ao androceu, local onde as adaptações para polinização sofreram maior seleção (MORI, 2004). Suas flores podem apresentar simetria actinomorfa ou zigomorfa, as primeiras ocorrendo nas subfamílias Foetidioideae, Barringtonioideae e representantes basais de Lecythidoideae (*Grias* L. e *Gustavia* L.) (PRANCE; MORI, 2004). *Gustavia superba* (Kunth) O. Berg (Lecythidoideae) é um exemplo característico de simetria actinomorfa, oferecendo como recompensa para os polinizadores pólen fértil, como tipicamente ocorre em flores com tal simetria. Diferentemente, as flores com simetria zigomorfa, presentes em todos os demais gêneros que constituem a subfamília Lecythidoideae (*Allantoma* Miers, *Bertholletia* Bonpl., *Cariniana* Casar., *Corythophora* R.Knuth, *Couratari* Aubl., *Couroupita* Aubl., *Eschweilera* Mart. ex DC. e *Lecythis* Loefl.), são consideradas como mais derivadas e costumam oferecer pólen estéril e néctar como recompensa para os visitantes florais. Os principais polinizadores em Lecythidaceae são diferentes gêneros de abelhas, com exceção de algumas espécies que são polinizadas por morcegos (MORI, 2004).

A família Lecythidaceae é reconhecida principalmente graças à castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), sendo apelidada de “*the Brazil nut family*”. A importância de *B. excelsa* advém do tecido de reserva das sementes, bastante apreciado na culinária (SOUZA; LORENZI, 2019; MORI, 2004). No Brasil ocorrem cerca de 10 gêneros e 120 espécies de Lecythidaceae, encontrados principalmente na Floresta Amazônica, todos pertencentes à subfamília Lecythidoideae (MORI, 2004; SOUZA; LORENZI, 2019; VARGAS; DICK, 2020).

Couropita guianensis Aublet é encontrada em toda região amazônica, não sendo endêmica do Brasil, e costuma estar associada às margens inundáveis de rios. Suas flores são caulifloras, dispostas em racemos, de cor rosa avermelhada e muito cheirosas (LORENZI, 1992), graças aos osmóforos localizados na corola e nos estaminódios. Estes últimos são muito numerosos, dispostos num aparato funcional constituído de estames e estaminódios conatos (androceu). Os estaminódios estão dispostos na parte superior do androceu e produzem pólen estéril, oferecido como recompensa para os visitantes florais. Devido a sua posição, a estrutura na qual os múltiplos estaminódios estão dispostos é tipicamente referida como capuz, uma vez que cobre o estigma e a parte inferior do androceu. Nessa última, se encontram múltiplos estames férteis, em uma estrutura que possui formato de anel, envolvendo a porção apical do gineceu e conectada de um dos lados ao capuz. Somente os estames do anel, como é tipicamente referida a parte inferior do androceu, produzem pólen viável (ORMOND et.al, 1981; YARSICK, 1986).

Em estudo baseado em experimentos de polinizações controladas, Ormond et al. (1981) reconheceram *C. guianensis* como uma espécie alógama, porém autocompatível. Isto porque, os autores observaram no local de estudo um único espécime florido e que posteriormente formou frutos. Ademais, observaram o crescimento “normal” dos pistilos autopolinizados em frutos, sendo que de 100 flores autopolinizadas, 2 frutos foram formados a partir do pólen próprio. Todavia, vale mencionar que não há menção no trabalho quanto ao monitoramento do desenvolvimento dos frutos até sua maturidade. Prance (1976), em um dos primeiros estudos sobre a biologia da polinização em Lecythidaceae, mencionou que *C. guianensis* e demais integrantes da família costumam ser autoincompatíveis e dependem de polinização cruzada para produzir frutos. No mesmo ano, Mori e Kallunki's (1976), relataram a autoincompatibilidade em *Gustavia superba*. Em função dos relatos de Prance sobre suposta autoesterilidade em *C. guianensis*, inferida com base em observações da ausência de frutificação em árvores cultivadas em condições de isolamento, Mori e Kallunki's (1976) sugeriram que devido ao fato de gêneros distantes filogeneticamente (*Gustavia* e *Couropita*) serem semelhantes quanto à impossibilidade de formar frutos por autopolinização, essa deveria ser a condição geral na família Lecythidaceae.

Entende-se autoincompatibilidade como a condição em que plantas (indivíduos) de uma dada espécie ou população são incapazes de se autofecundarem (i.e., terem seus primórdios seminais fertilizados por tubos polínicos oriundos de seu próprio pólen), situação em que se torna pouco provável ou impossível a formação de sementes por autopolinização (SEAVEY; BAWA, 1986; SAGE; BERTIN; WILLIAMS, 1994). Ao nível genético, pelo menos três tipos básicos de autoincompatibilidade são tradicionalmente bem conhecidos em espécies com flores completas (angiospermas homóicas), embora menos compreendidos quanto aos mecanismos moleculares que os governam. São eles: o Sistema Homomórfico Gametofítico, o Sistema Homomórfico Esporofítico e o Sistema Heteromórfico (GIBBS, 2014).

Segundo Gibbs (2014) o sistema homomórfico gametofítico foi relatado em 18 famílias. Tipicamente a reação de incompatibilidade é mediada por um único locus multialélico, denominado locus *S*. Em tal sistema, após o grão de pólen germinar e penetrar o estigma, o tubo polínico só irá alcançar o primórdio seminal caso o alelo *s* portado pelo gametófito masculino não esteja presente no genoma diploide do pistilo. Assim, se um grão de pólen *s1* é depositado no estigma de uma planta *s1s2*, a reação de incompatibilidade é desencadeada. E o mesmo acontece com o pólen *s2*. Contudo, um grão de pólen *s3*, é compatível com o pistilo de uma planta *s1s2* e o desenvolvimento do tubo polínico no tecido transmissor, a penetração e a fecundação do primórdio seminal ocorrem normalmente. Em outras palavras, na autoincompatibilidade gametofítica, a reação depende do genótipo haploide do gametófito masculino e a resposta de incompatibilidade (i.e., o bloqueio do desenvolvimento dos tubos polínicos incompatíveis) usualmente se expressa ao longo do estilete (SEAVEY; BAWA, 1986).

O sistema homomórfico esporofítico usualmente também é controlado por um único locus *S*, constituído por diversas formas alélicas. Entretanto, a reação de incompatibilidade neste sistema é desencadeada em virtude da ação de ambos os alelos *s* presentes no genótipo diploide do esporófito paterno, i.e., do indivíduo que originou os grãos de pólen. Se o esporófito paterno, por exemplo, for composto pelos alelos *s4s5*, todos os grãos de pólen produzidos (50% *s4* e 50% *s5*) serão incompatíveis com um pistilo portador de um ou ambos esses alelos. Dessa forma,

um grão de pólen que contém o alelo *s4* ou o *s5* em seu genótipo haploide, derivado de um esporófito cujo genótipo é *s4s5*, só é compatível com um indivíduo (esporófito) que não seja portador nem do alelo *s4*, nem do alelo *s5*. Vale frisar que pistilos com genótipo *s3s5*, *s1s5*, *s4s3*, *s2s4* serão todos incompatíveis com o pólen oriundo de um indivíduo *s4s5*, justamente por apresentarem identidade alélica com o esporófito doador de pólen. Daí o porquê deste sistema ser esporofítico, pois o genótipo do indivíduo formador do pólen é decisivo para a determinação da reação de incompatibilidade (GIBBS, 2014). Em plantas que apresentam tal sistema, a resposta de incompatibilidade normalmente é estigmática, pois os grãos de pólen incompatíveis são impedidos de germinar; ou estes germinam, mas têm o seu desenvolvimento bloqueado ainda no estigma (SEAVEY; BAWA, 1986).

No sistema heteromórfico, a reação de autoincompatibilidade também é esporofítica, isto porque seu desencadeamento é determinado pela constituição alélica do esporófito doador de pólen. Caracteristicamente, plantas com tal sistema de incompatibilidade apresentam formas florais distintas (heterostilia). A distília (quando na mesma população alguns indivíduos possuem flores com estilete longo, enquanto outros portam flores com estilete curto, com reciprocidade contrária em relação à altura dos estames) é a forma mais comum, seguida da tristília (indivíduos cujas flores apresentam três tamanhos distintos de estilete). Um caso clássico é o que acontece com o gênero *Primula*. Neste as espécies distílicas apresentam indivíduos com forma floral de estilete curto (brevistila), que são heterozigotos para o locus *S* (genótipo *Ss*), e outros indivíduos cujas flores possuem estilete longo (longistila) e são homozigotos recessivos *ss*. Os cruzamentos compatíveis são somente aqueles entre indivíduos com flores brevistilas (*Ss*) x longistilas (*ss*). Isto porque, o alelo *S* apresenta uma relação de dominância sobre o alelo *s*, determinando dessa forma que qualquer grão de pólen formado por um esporófito paterno *Ss*, seja compatível com um pistilo *ss*, a despeito do alelo *s* no genoma nuclear de metade dos grãos de pólen originados pelo primeiro. Se *S* fosse codominante com *s*, nenhum grão de pólen de um indivíduo com estilete longo (*ss*) seria compatível com um indivíduo de estilete curto (*Ss*), pois ambos apresentam o alelo *s* (GIBBS, 2014). Em plantas com o sistema heteromórfico, o local no pistilo onde se expressa a reação de incompatibilidade pode variar de espécie para

espécie, sendo que em alguns casos o pólen é incapaz de se reidratar e germinar na superfície estigmática, ao passo que em outros o pólen germina, penetra o estigma e a reação de incompatibilidade só ocorre na parte superior do estilete. Há casos ainda em que os tubos polínicos incompatíveis podem crescer prolificamente até a base do estilete, eventualmente alcançando o ovário e penetrando alguns primórdios seminais (GIBBS 1990).

Para além dos sistemas de incompatibilidade acima mencionados, Seavey e Bawa (1986) forneceram a primeira revisão de trabalhos que reportaram casos de autoincompatibilidade nos quais, em pistilos autopolinizados, os tubos polínicos crescem normalmente até atingir o ovário, contudo frutos não são gerados. Diante desse cenário os autores sugeriram uma nova categoria para esses achados: a Autoincompatibilidade de Ação Tardia. Baseado em Seavey & Bawa (1986) e Gibbs (2014), a autoincompatibilidade de ação tardia em geral é caracterizada por uma das seguintes três situações: (1) os primórdios seminais não chegam a ser penetrados pelos tubos polínicos, apesar destes apresentarem crescimento consistente pelo tecido transmissor até alcançar o ovário; (2) os tubos polínicos penetram os primórdios seminais, mas são retidos na micrópila ou então falham no ato de fecundação; (3) tanto a penetração dos primórdios seminais como sua fecundação ocorrem, porém os pistilos não se desenvolvem em frutos ou estes abortam nos estádios iniciais de seu desenvolvimento, caracterizando um presumível mecanismo de ação pós-zigótica na rejeição dos pistilos autopolinizados. Evidências da autoincompatibilidade de ação tardia foram encontradas em pelo menos 27 famílias e 16 ordens de angiospermas (GIBBS, 2014).

Contudo, conforme apontado por Sage et al. (1994) e Bianchi et al. (2021), alguns autores rechaçam a autoincompatibilidade de ação tardia, alegando que a não frutificação em caso de autopolinização é reflexo da expressão de alelos recessivos deletérios, uma vez que nesses casos também se espera o desenvolvimento normal dos tubos polínicos e a efetiva ocorrência da dupla fecundação. Ou seja, uma depressão endogâmica de ação precoce estaria mimetizando os efeitos de um sistema genético de autoincompatibilidade, causando o aborto dos pistilos autopolinizados ou dos frutos decorrentes de autopolinização.

Em relação a *C. guianensis*, conforme mencionado anteriormente, a autoincompatibilidade da espécie é controversa. As pesquisas realizadas até então sugerem que *C. guianensis*, assim como outros representantes da família Lecythidaceae já estudados, são plantas alógamas e autoincompatíveis (MORI; KALLUNKI'S, 1976; MORI, 2004; PRANCE, 1976). Porém, como explicar os resultados de Ormond e colaboradores (1981), que sugerem a autocompatibilidade da espécie? Em estudo sobre o sistema reprodutivo de *C. guianensis* previamente realizado, baseado em experimentos de polinizações controladas e análises da germinação do pólen e do desenvolvimento *in situ* dos tubos polínicos, o presente grupo de pesquisa chegou às seguintes conclusões: apesar de alguns pistilos autopolinizados iniciarem a formação de frutos, estes abortam em um período relativamente curto após a polinização, nunca atingindo a maturidade (Motta & Bittencourt 2016); aparentemente não há discrepâncias quanto à eficácia de germinação dos grãos de pólen no estigma, ao crescimento dos tubos polínicos ao longo do tecido transmissor e à penetração dos primórdios seminais entre flores submetidas à autopolinização e à polinização cruzada (MOTTA; BITTENCOURT 2017).

O mecanismo clássico do sistema homomórfico esporofítico não é satisfatório para justificar os resultados obtidos até então em *C. guianensis*, pois em espécies com esse tipo de autoincompatibilidade não se esperaria a germinação dos grãos de pólen no estigma e/ou o desenvolvimento subsequente dos tubos polínicos nos pistilos autopolinizados. Da mesma forma, o tradicional mecanismo gametofítico também não é coerente com o fato de que, aparentemente, não há diferenças significativas quanto à eficácia do desenvolvimento dos tubos polínicos e da penetração dos primórdios seminais entre pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada. Portanto, diante dessa incongruência e dos estudos previamente realizados, o presente grupo de pesquisa sugeriu a autoincompatibilidade de ação tardia como hipótese para a autoesterilidade verificada em *C. guianensis* (MOTTA; BITTENCOURT 2016, 2017).

Porém, até o momento nada se sabe sobre os eventos que sucedem a penetração dos primórdios seminais em pistilos autopolinizados de *C. guianensis*, ou quanto aos eventos que precedem a rejeição dos frutos iniciados. São os primórdios

seminais (de pistilos autopolinizados em *C. guianensis*) efetivamente fecundados? Os desenvolvimentos endospermico e embrionário são iniciados nas sementes? Até que estágio progride o desenvolvimento dos embriões em sementes de frutos iniciados por autopolinização? O número de embriões iniciados em sementes de frutos decorrentes de autopolinização é equivalente ao número de embriões formados em frutos resultantes de polinização cruzada no mesmo período (i.e., até o aborto dos frutos decorrentes de autopolinização)? Análises histológicas sobre os eventos que se sucedem no gineceu após polinizações controladas têm contribuído para um melhor entendimento do sistema reprodutivo em táxons pertencentes a diversas famílias (SEAVEY; BAWA, 1986; SAGE *et.al.*, 1994; GIBBS, 2014), pois respostas para tais questões podem fornecer importantes indicações quanto à causa fundamental subjacente à autoesterilidade.

Sendo assim, buscando ampliar o entendimento do sistema reprodutivo desta espécie para além dos resultados já obtidos com experimentos de polinizações controladas e análises do desenvolvimento *in situ* dos tubos polínicos em pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada (MOTTA; BITTENCOURT 2016, 2017), realizamos no presente trabalho um estudo histológico dos eventos que sucedem o início da antese no gineceu, buscando comparar as alterações estruturais que se processam nos primórdios seminais entre pistilos não polinizados, autopolinizados e submetidos à polinização cruzada, bem como verificar se ocorre fecundação e o posterior desenvolvimento do endosperma e do embrião em primórdios seminais de pistilos autopolinizados, comparativamente aos eventos que se sucedem nos pistilos cruzados.

2 OBJETIVO

Investigar as possíveis causas da autoesterilidade verificada em *C. guianensis*.

2.1 Objetivos específicos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

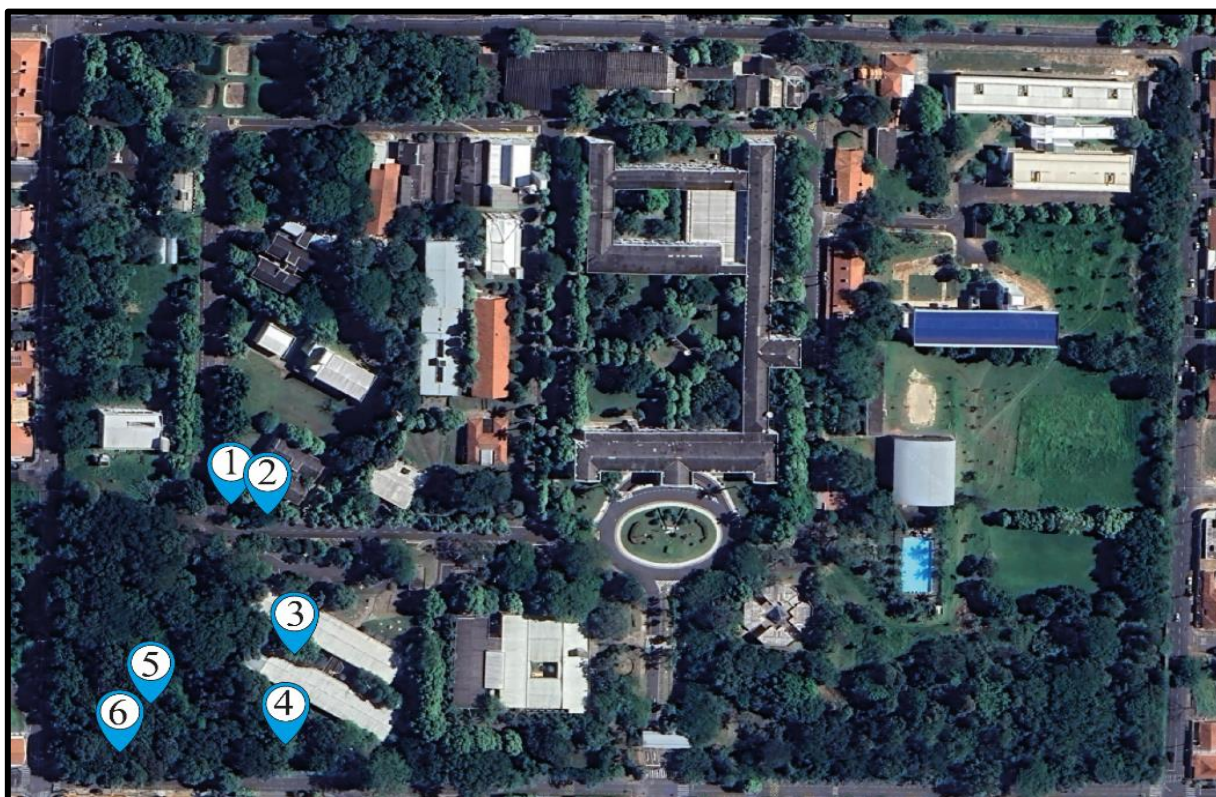
3.1 Descrição da espécie

Couroupita guianensis apresenta inflorescências caulifloras racemosas cujas flores iniciam a antese pela manhã; flores com simetria zigomorfa, com 5-6 cm de diâmetro (MORI; PRANCE, 1990); de 6-8 pétalas oblongas de coloração rosa avermelhada na face adaxial e amarela na face abaxial e 6-8 sépalas com formato triangular, arredondado no ápice (MORI; PRANCE, 1990; ORMOND et.al, 1981); anel estaminal com 600-700 estames com filete curto e grãos de pólen liberados em mônades; capuz com 180-220 estaminódios e grãos de pólen estéreis liberados em tétrades; anteras com deiscência longitudinal; presença de uma área livre de estames entre o anel e o capuz, denominada lígula (MORI; PRANCE, 1990). Androceu e pétalas sofrem abscisão no final da tarde do primeiro dia de antese (SCHOENBERG, 1983a). Flor perígina, com ovário semi-ínfero, adnato ao hipanto, 6-8 carpelos sincárpicos com placentação parietal e multilocular (6-8) no ápice; na porção média do ovário é unilocular e com placentação parietal, os carpelos apresentando formato de seta em corte transversal; na porção basal o ovário se torna novamente multilocular (6-8) com placentação axilar (MONTEIRO-SCANAVACCA, 1975; SCHOENBERG, 1983a). Estilete curto e reto, estigma em formato de estrela (ORMOND et.al, 1981). Primórdio seminal oblongo, anátropo, tenuinucelado, bitegumentado; nucele totalmente consumido durante a maturação do ginófito; saco embrionário do tipo *Polygonum* com antípodas efêmeras e núcleos polares se fundindo na maturidade do ginófito (TSOU, 1994). Segundo Schoenberg (1983a; 1983b) o endosperma é do tipo nuclear, sendo completamente consumido durante o desenvolvimento do embrião (semente exendospérmica) e o embrião inicia seu desenvolvimento tardiamente, por volta do 7º mês após a fecundação. Fruto com pericarpo lenhoso, piriforme quando jovem e posteriormente globular, diâmetro transversal 12-23,6 cm, diâmetro longitudinal 12-23,4 cm, indeiscente, podendo conter de 82 a 295 sementes lenticulares com cotilédones foliáceos (SCHOENBERG, 1983a; MORI; PRANCE, 1990).

3.2 Procedimentos em campo

Seis espécimes localizados no Campus IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP, foram utilizados para esta pesquisa. Para cada árvore foi atribuído um número de 1 a 6 (Figura 1). As inflorescências com botões florais imaturos foram envolvidas em sacos de organza para evitar visitantes florais e foram monitoradas diariamente até a antese (Figura 2A). Nas primeiras horas após abertura dos botões, uma parte das flores foi submetida a polinizações manuais. Dessa forma, formou-se um grupo com flores autopolinizadas (autogamia) e outro com polinização cruzada (alogamia). A outra parte das flores recém-abertas foi utilizada para compor um terceiro grupo, no qual as flores não sofreram polinização, i.e., os pistilos foram mantidos intactos.

Figura 1 - Localização dos espécimes de *C. guianensis* no Campus IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP



Árvore 1: 20°47'11"S 49°21'39"W; Árvore 2: 20°47'11"S 49°21'39"W; Árvore 3: 20°47'12"S 49°21'36"W; Árvore 4: 20°47'13"S 49°21'35"W; Árvore 5: 20°47'14"S 49°21'37"W; Árvore 6: 20°47'14"S 49°21'37"W. Fonte: Google Earth.

Para obtenção dos pistilos autopolinizados, o pólen foi transferido da antera para o estigma da mesma flor, ou de outras flores do mesmo indivíduo. Para isto,

estames do anel foram retirados das flores e suas anteras deiscentes foram suavemente friccionadas no estigma. A deposição de pólen foi sempre confirmada por observação a olho nu, ou com ajuda de uma lupa de mão. A identificação do tratamento foi feita com cola plástica vermelha, depositada junto às sépalas, e com uma etiqueta adesiva plástica junto ao pedicelo, impressa com um rotulador eletrônico e contendo a data da antese (Figura 2B). Para a obtenção dos pistilos cruzados, as flores de um indivíduo foram polinizadas tal como mencionado anteriormente, porém utilizando pólen de outro indivíduo, sendo em seguida etiquetadas e marcadas com cola plástica amarela (Figura 2B). Os pistilos mantidos intactos foram somente marcados com cola plástica verde e etiquetados (Figura 2B). Após cada tratamento, a inflorescência era reensacada. Desta forma, 100 flores foram tratadas para cada grupo, sendo dividido o número de amostras entre as 6 árvores que compuseram a população estudada. Vale mencionar que a hercogamia floral impede a autodeposição de pólen, garantindo a integridade do tratamento.

Figura 2 - Polinizações controladas



a) Inflorescência parcialmente ensacada para evitar a ação dos visitantes florais; b) Marcações realizadas para identificar cada tratamento. Uma gota de cola plástica colorida em duas ou três sépalas da flor e uma etiqueta adesiva plástica fixada ao pedicelo. Verde = pistilo não polinizado; Amarelo = Pistilo cruzado; Vermelho = Pistilo autopolinizado. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Concluídos os tratamentos das flores de cada inflorescência, esta permaneceu ensacada e foi monitorada diariamente até o momento que se constatava a abscisão de cada pistilo. Retido no interior do saco de organza ao se desprender do ramo, a longevidade alcançada por cada pistilo/fruto (da antese até a abscisão) foi registrada. Uma parte do material foi coletada e submetida ao processamento para montagem de lâminas histológicas. Os frutos derivados de polinização cruzada que não abortaram foram monitorados até a maturidade. Durante o trabalho de campo constatou-se que, eventualmente, alguns pistilos ou frutos jovens abortavam, mas não sofriam abscisão, permanecendo ligados ao pedicelo e se decompondo nos dias subsequentes. Estes foram desconsiderados na amostragem devido à dificuldade em se determinar com precisão sua longevidade.

Outra parte dos pistilos tratados foi coletada em intervalos padronizados com base na longevidade dos pistilos/frutos. Para os pistilos/frutos com até 12 dias de longevidade, foram coletadas amostras para cada dia. De outra forma, para os pistilos/frutos com mais de 12 dias de longevidade, foram coletadas amostras com

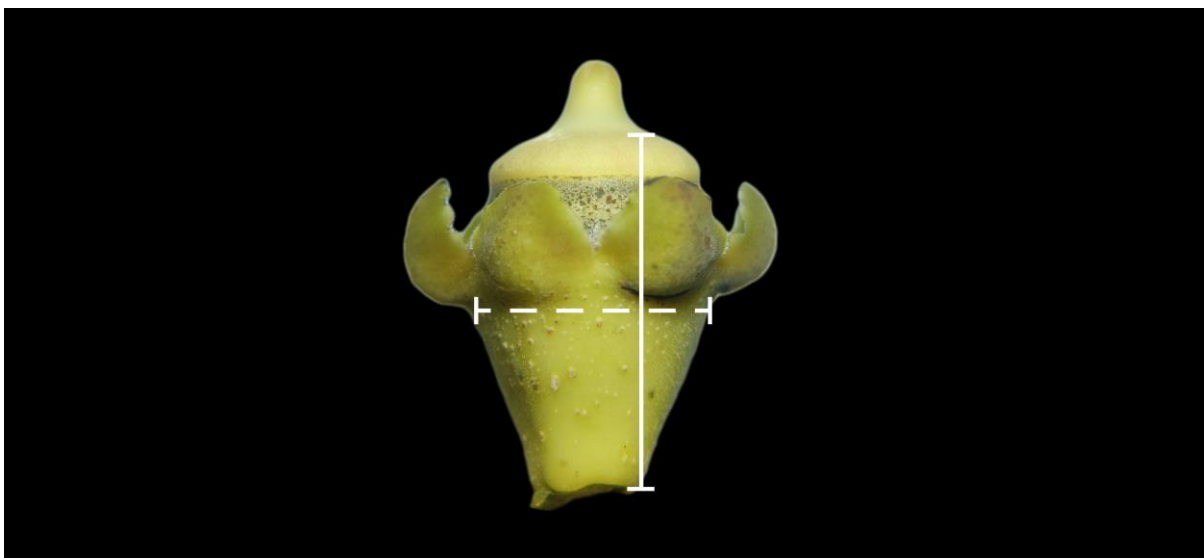
14 dias (48h em relação ao anterior), 17 dias (72h), 21 dias (96h) e assim por diante, até abscisão. Para cada intervalo, no mínimo três amostras provenientes de árvores distintas foram colhidas e processadas.

Foram também coletados botões florais em pré-antese, flores em antese de primeiro dia e pistilos não polinizados (os últimos em diversos intervalos entre o fim da antese e sua abscisão) para processamento e montagem de lâminas histológicas. O propósito desse procedimento foi analisar a organização geral do primórdio seminal nos estádios mais precoces, bem como as alterações histológicas que se processam no mesmo até o aborto do pistilo. Por fim, frutos derivados de polinização cruzada com cerca de 5 e 7 meses após a polinização foram coletados para o exame das sementes, a fim de verificar a presença e o estágio de desenvolvimento do embrião.

3.3 Procedimentos em laboratório

Primeiramente, os pistilos e frutos jovens coletados foram medidos com um paquímetro digital. O comprimento de cada peça foi medido da base do estilete até a linha de abscisão pedicelo-receptacular, ao passo que sua largura máxima foi obtida posicionando-se o paquímetro imediatamente abaixo da inserção das sépalas no hipanto (Figura 3). Logo após, as amostras ainda frescas foram dissecadas para a remoção do excesso de tecidos do hipanto até restar somente uma fina camada tecidual ao redor dos primórdios seminais ou das jovens sementes. Em seguida, o material foi fixado em uma solução fixadora contendo paraformaldeído 4%, glutaraldeído 1% e tampão fosfato pH 7,2 0,1M (McDowell e Trump 1976). Peças grandes (frutos iniciados) foram fracionadas em partes menores antes da sua imersão na solução fixadora. Posteriormente, o material fixado foi desidratado em série etílica e infiltrado em historesina Leica para obtenção de secções histológicas seriadas (transversais e longitudinais) de 4 μ m de espessura, em micrótomo rotatório Leica RM2255, utilizando-se navalhas de vidro. As secções foram coradas com Azul-de-Toluidina O, e as lâminas seladas com resina *Permunt*. As lâminas permanentes foram analisadas em microscópio de luz e as fotomicrografias foram obtidas utilizando-se o microscópio Olympus modelo BX51, equipado com câmera fotográfica digital Olympus Q-Color 5.

Figura 3 - Medidas de comprimento e largura dos pistilos e frutos coletados



As linhas representam o posicionamento do paquímetro digital para obter as medidas do pistilo ou fruto iniciado. As linhas contínua/vertical e tracejada/horizontal correspondem ao comprimento e à largura, respectivamente. Fonte: Elaborada pelo autor (2024)

3.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares IBM SPSS Statistics 29.0.2.0 (20) e BioEstat 5.3. Para verificar a normalidade dos dados de longevidade, comprimento e largura dos pistilos/frutos, número de sementes com endosperma e quantidade de primórdios seminais e sementes sadias, o teste de Shapiro-Wilk e Kolgomorov-Smirnov foi executado no *software* IBM SPSS. Os demais testes foram executados no *software* BioEstat. A análise da diferença de longevidade entre pistilos não polinizados e autopolinizados foi verificada através do teste de Mann-Whitney, uma vez que os dados eram não paramétricos e compostos por dois grupos independentes. Para a comparação das medidas dos pistilos/frutos no momento da abscisão, foram descartados os dados das amostras que abortaram abaixo do 6º dia em todos os tratamentos. A Análise de Variância (ANOVA) foi executada, tendo em vista dados paramétricos e três grupos independentes. Por fim, o teste do Qui-Quadrado foi utilizado para comparar o número de sementes apresentando endosperma em desenvolvimento no 2º, 3º e 4º dia após a autopolinização vs. polinização cruzada. Foram utilizados 3 frutos escolhidos aleatoriamente para cada dia mencionado e verificado a presença ou ausência do

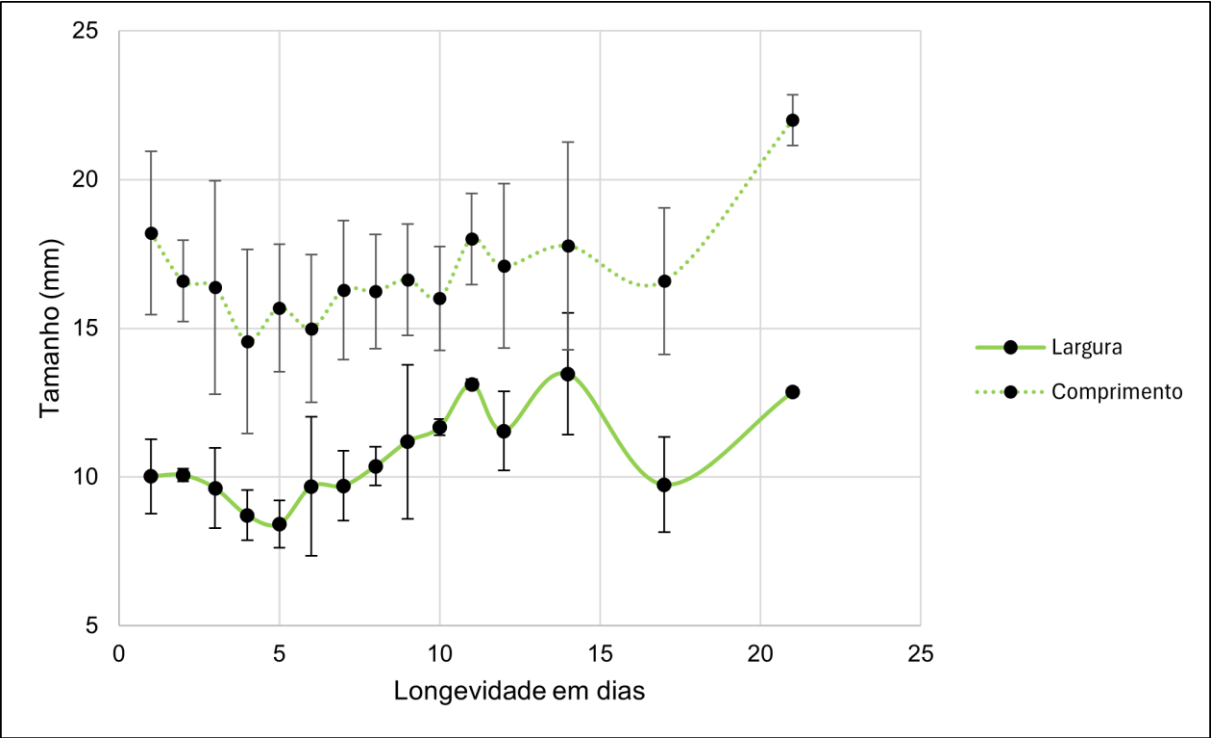
endosperma na totalidade das sementes para cada amostra. O mesmo teste foi aplicado, para comparar pistilos não polinizados e polinizados com relação à degeneração dos primórdios seminais e sementes. Para isto, 3 amostras autopolinizadas, cruzadas e não polinizadas, com longevidade de 7, 14 e 20 dias após a antese, foram escolhidas aleatoriamente e contabilizado todos os primórdios seminais sadios e em degeneração/degenerado. Foram considerados sadios aqueles primórdios seminais que não apresentavam sinais de degeneração, conforme apresentado na seção “Resultados”, subseções 4.3 e 4.4.

4 RESULTADOS

4.1 Longevidade e comparação do tamanho dos pistilos/frutos abortados

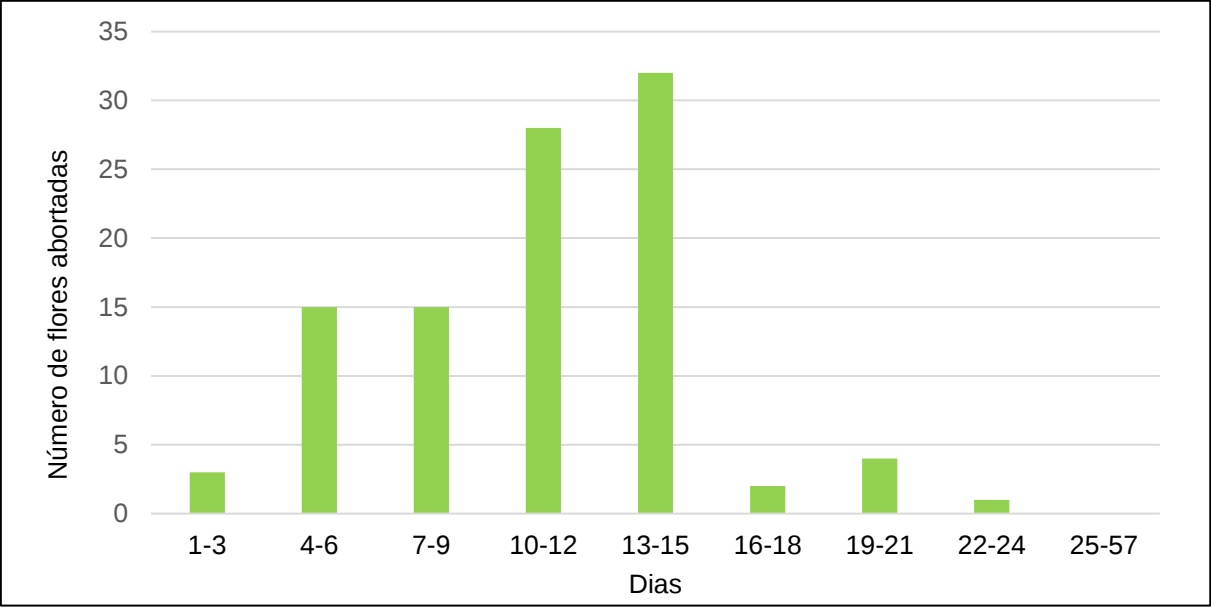
Os pistilos mantidos intactos (não polinizados) nunca se desenvolveram em frutos, embora tenha-se verificado algum crescimento dos mesmos antes de sua abscisão (Figura 4). A abscisão dos pistilos não polinizados ocorreu em um *continuum* entre o 3º e 22º dia, sendo que das 100 flores tratadas, 86 pistilos sofreram abscisão do 6º ao 14º dia (Figura 5). Eventualmente, os pistilos permaneceram no ramo com sinais evidentes de decomposição (a desidratação e o escurecimento desses pistilos sinalizaram seu aborto), sobretudo aqueles com longevidade superior a 15 dias. Quando permaneceram no ramo, a desidratação completa ocorreu por volta do 30º dia. Estes pistilos que não sofreram abscisão foram desconsiderados da amostragem, pois todos aqueles que apresentavam as referidas características externas foram dissecados e, de fato, estavam em estádios avançados de decomposição dos tecidos internos.

Figura 4 - Crescimento em largura e comprimento dos pistilos não polinizados até o 21º dia após a antese



Os círculos pretos representam as médias; as barras verticais indicam o desvio padrão. Somente foram plotados os pistilos coletados antes de sofrerem abscisão. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 5 - Longevidade dos pistilos não polinizados

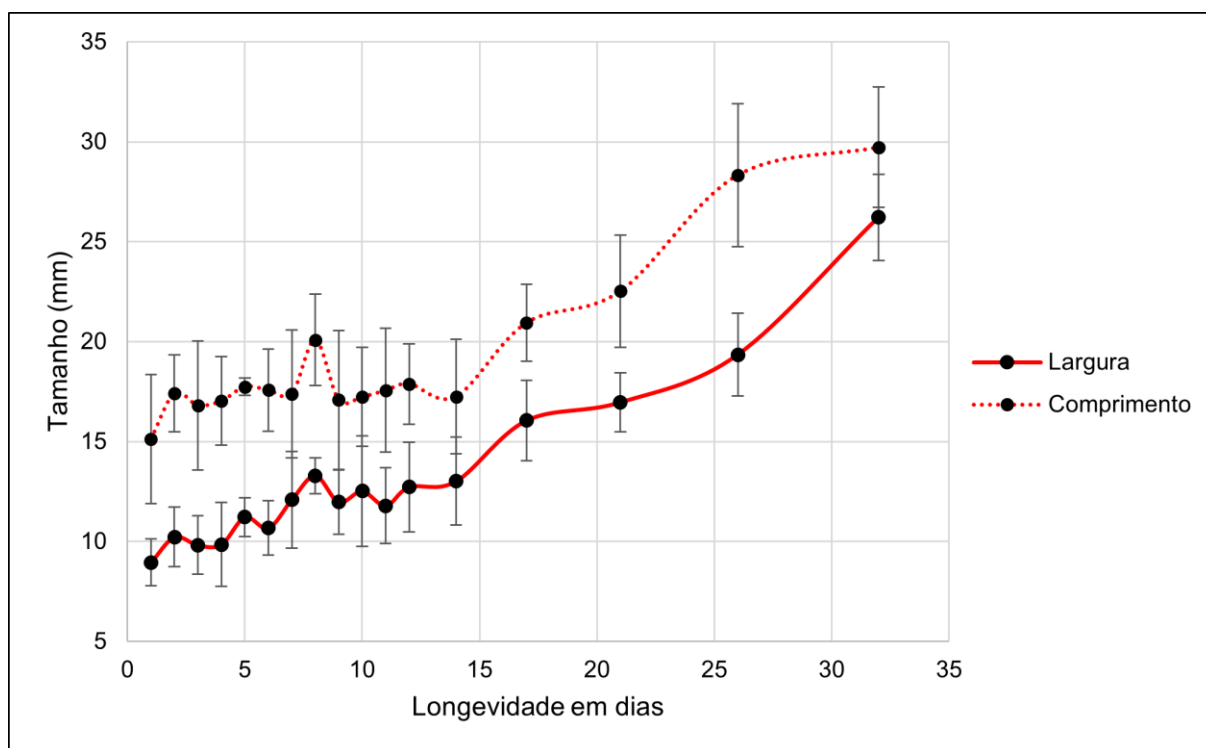


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Por sua vez, os pistilos autopolinizados apresentaram crescimento mais evidente no período entre a antese e a abscisão (Figura 6), chegando a iniciar frutos

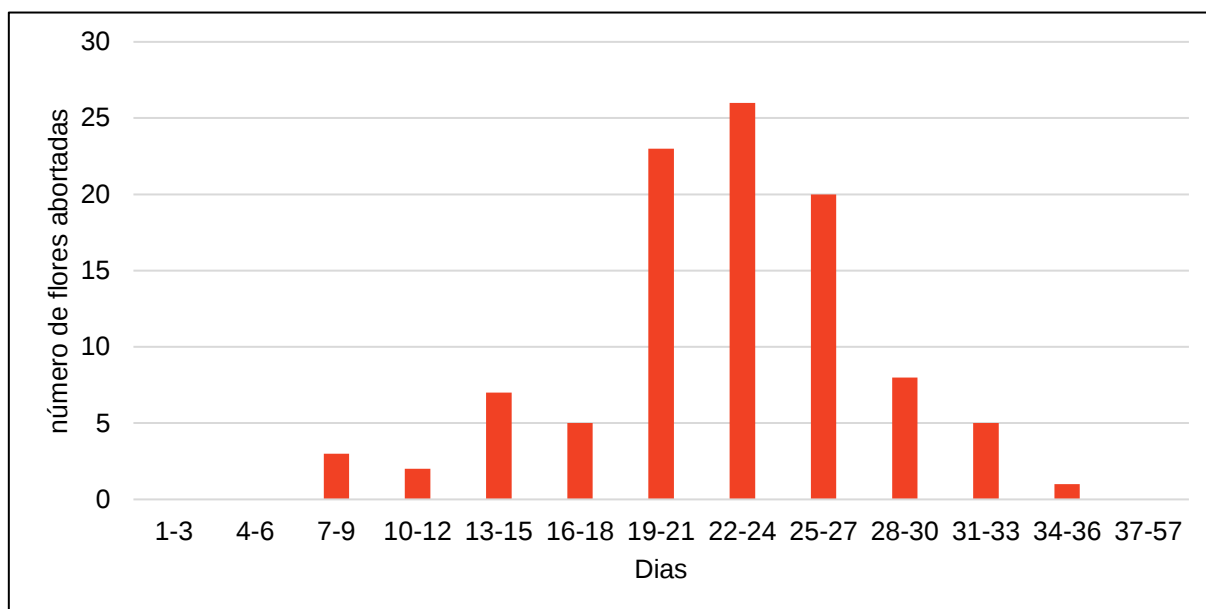
que abortaram em estádios iniciais de desenvolvimento, nunca atingindo a maturidade. A abscisão de tais pistilos/frutos ocorreu entre o 9º ao 34º dia após a antese, sendo que 71 frutos (de 100 flores tratadas) sofreram abscisão entre o 20º ao 26º dia (Figura 7). Eventualmente, frutos abortados não sofreram abscisão, ultrapassando 35 dias de longevidade. O aborto destes foi constatado pela estagnação de seu crescimento, bem como por sua dissecação ter revelado primórdios seminais completamente desidratados e os tecidos circundantes em decomposição. Externamente, a desidratação do tecido ocorre, porém é menos evidente, uma vez que a formação de periderme impede a rápida desidratação, como a que se observa nos pistilos não polinizados. Por volta de 45 dias após a antese, tornou-se evidente a desidratação externa do fruto com este apresentando um aspecto murcho.

Figura 6 - Crescimento em largura e comprimento dos pistilos autopolinizados coletados até o 32º dia após a antese



Os círculos pretos representam as médias; as barras verticais indicam o desvio padrão. Somente foram plotados os pistilos coletados antes de sofrerem abscisão. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 7 - Longevidade dos pistilos autopolinizados



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

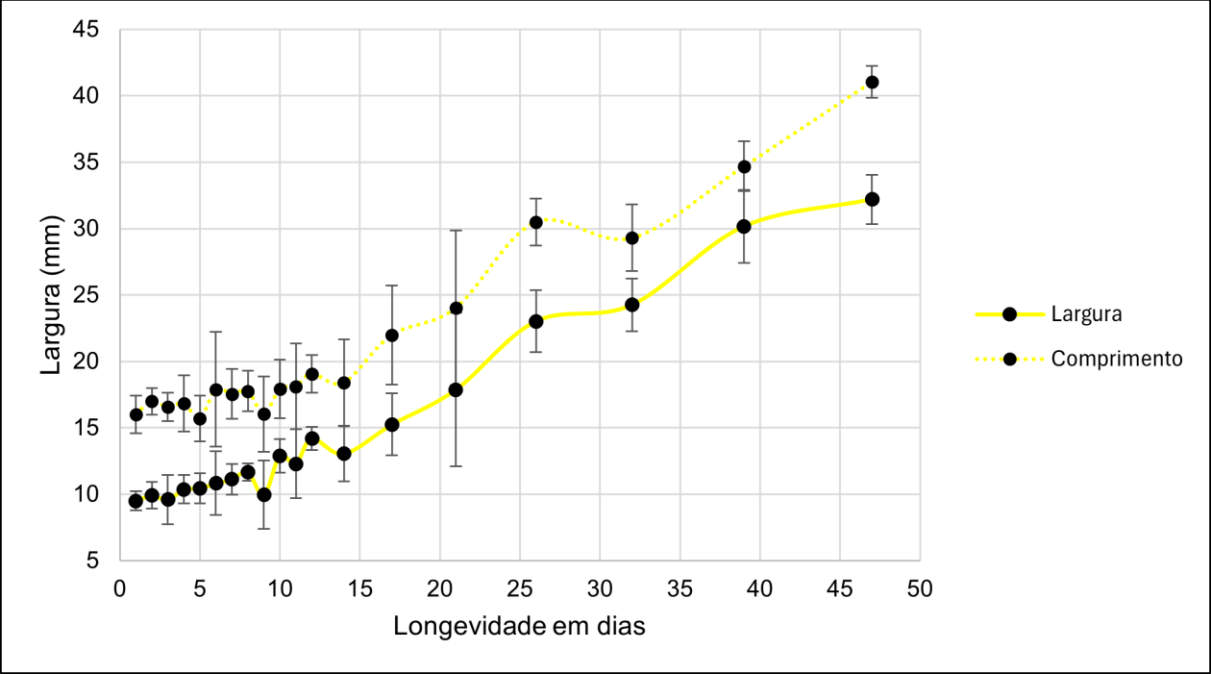
Somente frutos derivados de polinização cruzada atingiram a maturidade por volta do 12º mês após a antese. Porém, nem todas as flores submetidas à polinização cruzada geraram frutos viáveis, ainda que apresentasse certa taxa de crescimento em largura e comprimento (Figura 8). Das 100 flores tratadas, a abscisão de 60 pistilos e frutos ocorreu do 4º ao 56º dia após a antese, sendo que a maior parte das abscisões (50 pistilos/frutos) ocorreu antes do 30º dia (Figura 9, somente os que sofreram abscisão). Os frutos que ultrapassaram dois meses de desenvolvimento atingiram a maturidade (25 frutos), com exceção daqueles que foram intensamente atacados por fungos, cochonilhas ou hemípteros fitófagos e pereceram (15 frutos).

A

Figura 10 apresenta a comparação dos dados de longevidade dos pistilos que sofreram abscisão nos três tratamentos. Os pistilos autopolinizados foram mais longevos que os não polinizados, embora nenhum destes tratamentos tenha gerado frutos viáveis. Em relação à abscisão dos pistilos/frutos autopolinizados vs. cruzados, o teste estatístico não indicou diferença significativa quanto ao intervalo

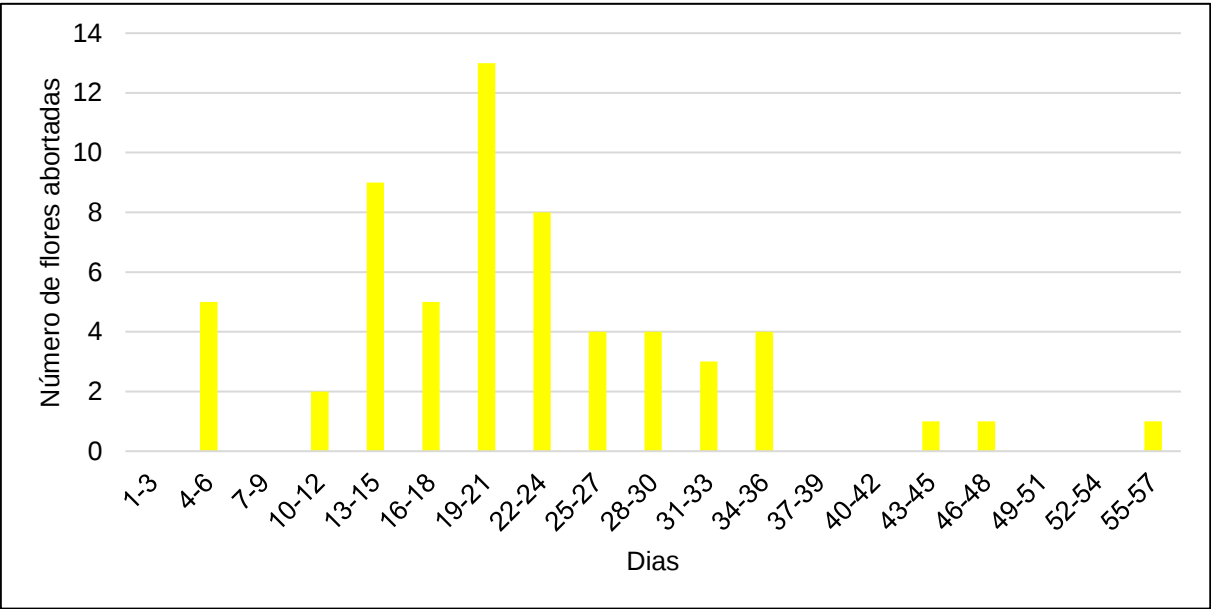
observado entre a polinização e a abscisão, ainda que os frutos iniciados por polinização cruzada (porém inviáveis) tenham abortado até o segundo mês após a polinização.

Figura 8 - Crescimento em largura e comprimento dos pistilos cruzados coletados até o 47º dia após a antese



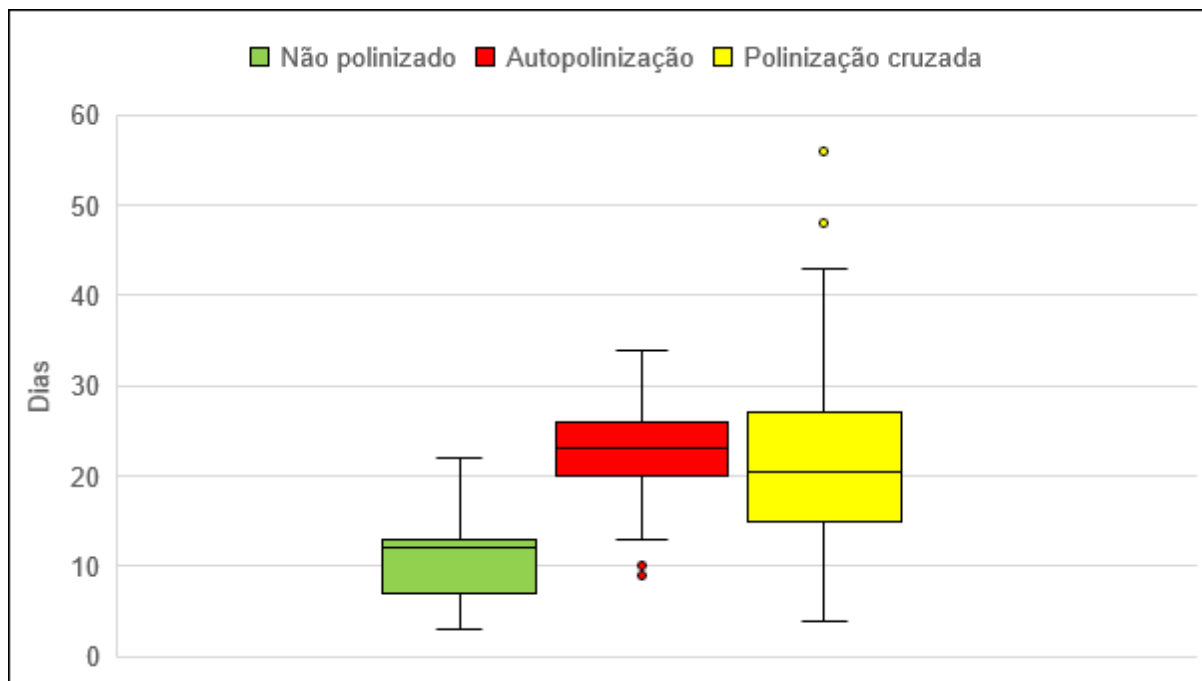
Os círculos pretos representam as médias; as barras verticais indicam o desvio padrão. Somente foram plotados os pistilos coletados antes de sofrerem abscisão. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 9 - Longevidade dos pistilos cruzados



Foram plotados os dados de longevidade somente dos pistilos/frutos que sofreram abscisão. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

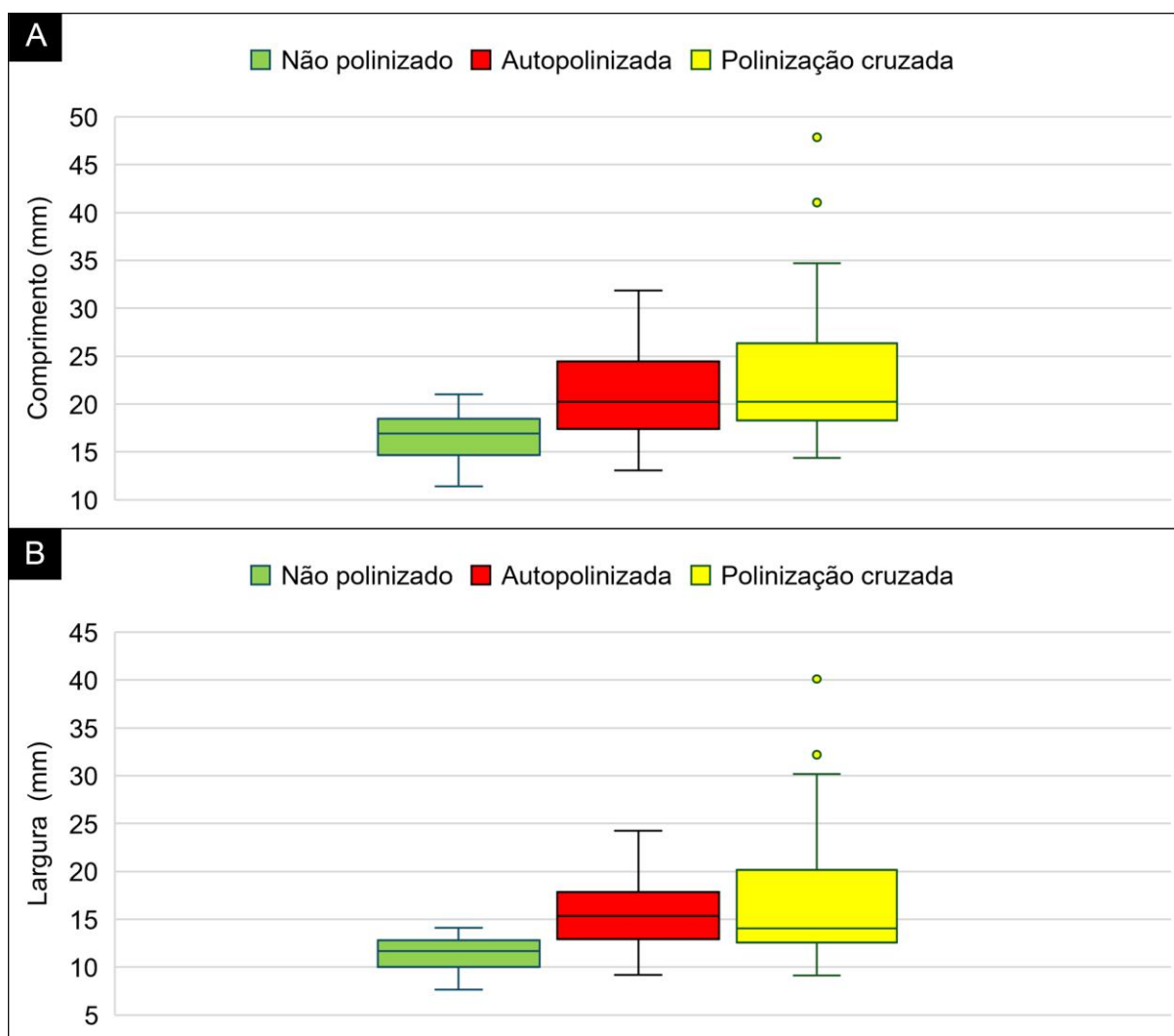
Figura 10 - Longevidade (primeiro dia de antese até abscisão) dos pistilos não polinizados, autopolinizados e cruzados



Barras horizontais indicam medianas; caixas indicam quartis superior e inferior, totalizando 50% dos dados. Barras verticais indicam a dispersão dos dados entre os valores mínimo e máximo. Os círculos representam os valores discrepantes (*outliers*). O teste de Mann-Whitney indicou diferença significativa entre a longevidade de pistilos não polinizados e autopolinizados ($p < 0.0001$). Para os pistilos polinizados, o mesmo teste não apresentou diferença significativa ($p = 0,1445$). Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Por fim, ao abortarem, os pistilos não polinizados apresentaram valores de comprimento e largura, significativamente menores que os de pistilos polinizados. Já os pistilos autopolinizados e cruzados, ao abortarem, não apresentaram diferenças significativas em relação ao comprimento e largura (Figura 11).

Figura 11 - Comprimento e largura dos pistilos/frutos ao abortarem



A diferença no comprimento e largura dos pistilos não polinizados ao abortarem, é significativa em relação aos pistilos polinizados. a) Para comprimento: $F = 14.22$ ($p = < 0.0001$). Turkey: Autopolinização vs. Cruzada (p) = não significativo; Autopolinização vs. Não polinizada (p) = $< 0,01$; Cruzada vs. Não polinizada (p) = $< 0,01$. b) Para Largura: $F = 22.88$ ($p = < 0.0001$). Turkey: Autopolinização vs. Cruzada (p) = não significativo; Autopolinização vs. Não polinizada (p) = $< 0,01$; Cruzada vs. Não polinizada (p) = $< 0,01$. Elaborado pelo autor (2024).

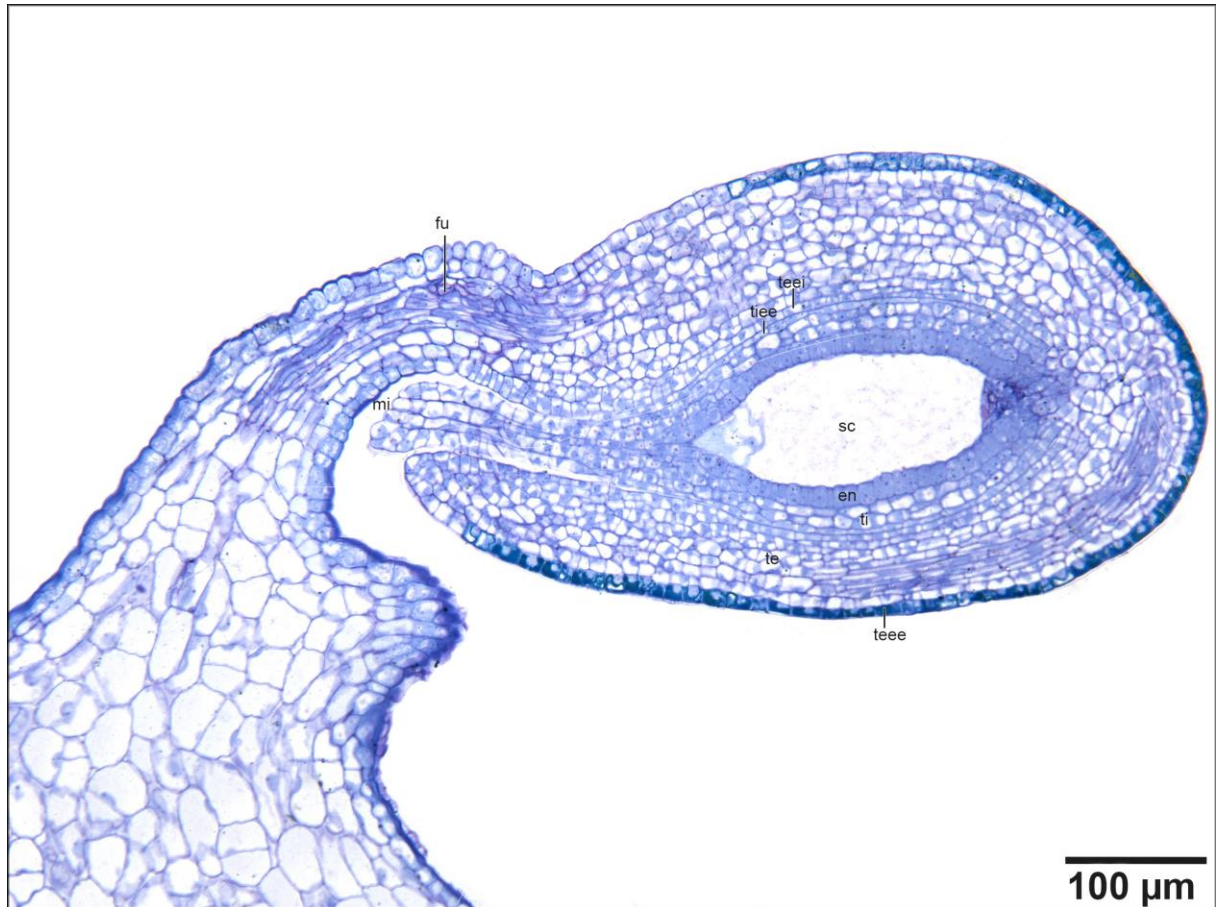
4.2 Caracterização do primórdio seminal

As Figura 12 e Figura 13 mostram o primórdio seminal no primeiro dia de antese, em secção longitudinal. O primórdio seminal é anátropo e se liga à placenta por um funículo alongado. O tegumento externo é formado por 6-8 camadas de células. A epiderme externa é composta por células pavimentosas (anticlinalmente achatadas), apresentando compostos fenólicos, evidenciados pela coloração esverdeada. Logo abaixo, 4-6 camadas de células com formato poligonal e mais ou menos isodiamétricas, protoplasto vacuolado e núcleo excêntrico, formam a maior

porção do tegumento externo. Mais internamente, uma camada de células retangulares, periclinalmente achatadas, compõe a epiderme interna. O tegumento interno é formado por 4-5 camadas de células que, com exceção das que compõem o endotélio, apresentam formato poligonal e em geral são um pouco mais achatadas anticlinalmente e ligeiramente menos vacuolados que as do tegumento externo. A micrópila é endostômica, i.e., com o tegumento interno prolongando-se para além da borda do tegumento externo, e as células dessa região são mais estreitas (periclinalmente alongadas) do que aquelas ao redor do endotélio. Compreendendo parte da epiderme interna do tegumento interno, o endotélio delimita a cavidade onde se aloja o saco embrionário, e é caracterizado por uma camada de células colunares (i.e., anticlinalmente alongadas), apresentando citoplasma denso, pouco vacuolado e núcleo centralmente posicionado. As células da epiderme externa desse tegumento apresentam formato semelhante (i.e., retangulares, periclinalmente achatadas) e são contíguas àquelas da epiderme interna do tegumento externo.

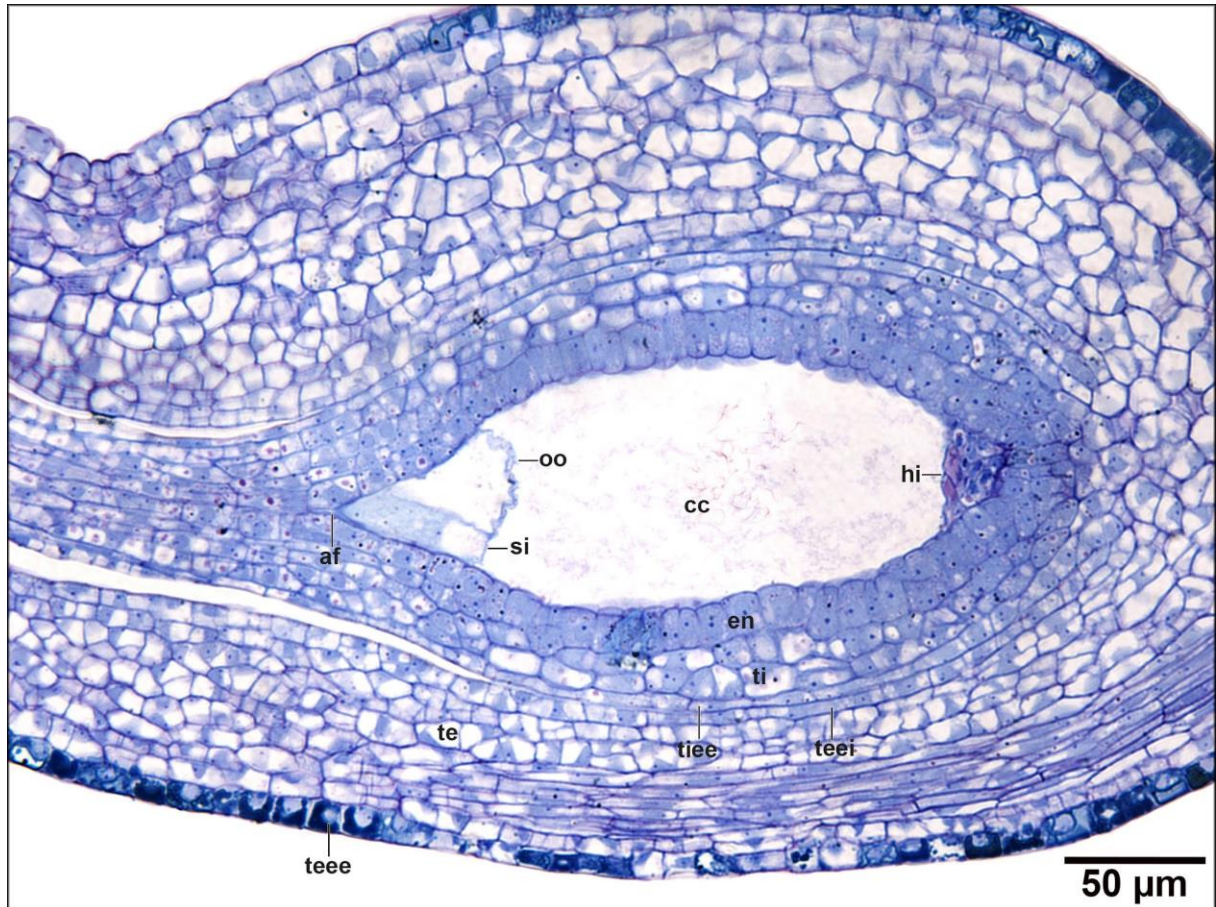
Em secção longitudinal, o ginófito (saco embrionário) tem formato elíptico, com a extremidade micropilar afunilada (Figura 13), e em seu polo micropilar se observa o aparelho oosférico, cujas sinérgides, usualmente piriformes e alongadas, estão dispostas lado a lado apresentando aparelho filiforme em suas extremidades mais agudas, voltadas para a abertura interna do canal micropilar (Figura 14A). Cada sinérgide conta com um grande vacúolo voltado para o polo calazal, ao passo que o núcleo e a maior parte do citosol ficam voltados para o polo micropilar (Figura 14A, B). A oosfera é amplamente vacuolada e possui o núcleo voltado para o polo calazal, sendo este do mesmo tamanho daqueles das sinérgides (Figura 14B, D). Nos botões florais em pré-antese foram visualizados os núcleos polares, usualmente no interior de um cordão citoplasmático e próximos ao centro do saco embrionário (Figura 15A).

Figura 12 - Primórdio seminal de *C. guianensis*.



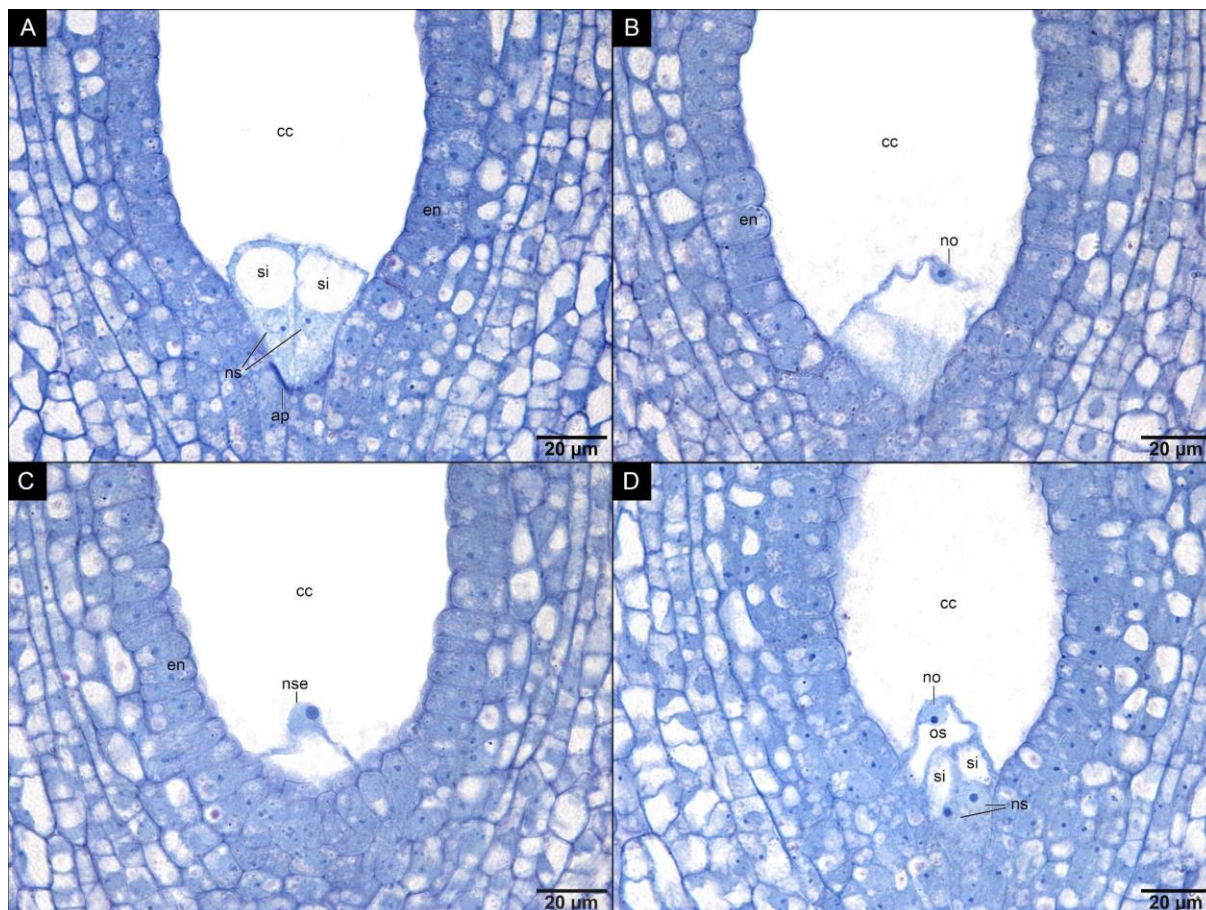
Aspecto geral da secção longitudinal do primórdio seminal, no estágio de antese (200x). *fu* funículo; *mi* micrópila; *te* tegumento externo; *teee* tegumento externo epiderme externa; *teei* tegumento externo epiderme interna; *ti* tegumento interno; *tiee* tegumento interno epiderme externa; *en* endotélio; *sc* saco embrionário. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 13 – Detalhe do primórdio seminal de *C. guianensis*.



Secção longitudinal do primórdio seminal mostrando o saco embrionário (ginófito) no estágio de antese (400x). cc célula central; af aparelho filiforme; en endotélio; hi hipóstase com células parcialmente colapsadas; oo oosfera; si sinérgide; te tegumento externo; teee tegumento externo epiderme externa; teei tegumento externo epiderme interna; ti tegumento interno; tiee tegumento interno epiderme externa. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

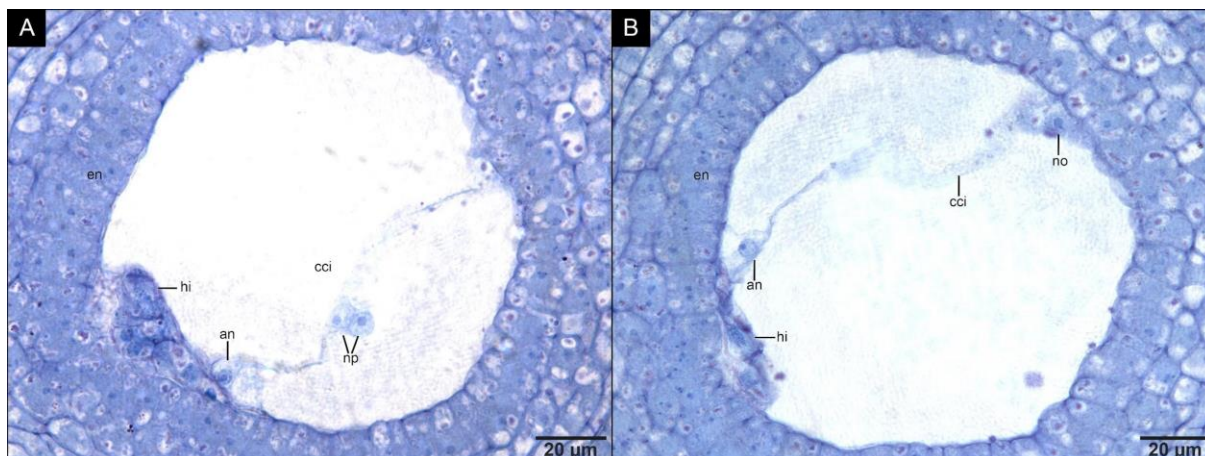
Figura 14 - Saco embrionário de *C. guianensis*, em estágio de antese



a-c) Secções longitudinais (1000x) em série de um mesmo primórdio seminal, mostrando o aparelho oosférico (polo micropilar do saco embrionário). a) Sinérgides lado a lado; b) oosfera ao lado de uma das sinérgides; c) núcleo secundário junto ao polo calazal da oosfera; d) aparelho oosférico completo (duas sinérgides e oosfera). *ap* aparelho filiforme; *cc* célula central; *en* endotélio; *no* núcleo da oosfera; *ns* núcleos das sinérgides; *nse* núcleo secundário; *os* oosfera; *si* sinérgides. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Entretanto, na maior parte dos primórdios seminais observados, a fusão dos núcleos polares já havia ocorrido. Na antese, o núcleo secundário foi visualizado em todos os ginófitos examinados, indicando que os núcleos polares se fundem na maturidade do saco embrionário. O núcleo secundário é mais conspícuo que os núcleos das demais células que compõem o ginófito e é deslocado para o polo micropilar, posicionando-se próximo à oosfera (Figura 14C). O vacúolo da célula central ocupa a maior parte do ginófito. As antípodas foram visualizadas somente em botões florais (Figura 15A, B), uma vez que essas se degeneram antes do ginófito alcançar a maturidade.

Figura 15 - Saco embrionário de *C. guianensis*, em estágio de pré-antese



a-b) Secções oblíquas em série de um primórdio seminal (1000x) evidenciando os núcleos polares antes da fusão (em a), antípodas e células da hipóstase. *na* antípoda; *cci* cordão citoplasmático; *hi* hipóstase; *no* núcleo oosfera; *np* núcleos polares. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.3 Pistilos não polinizados

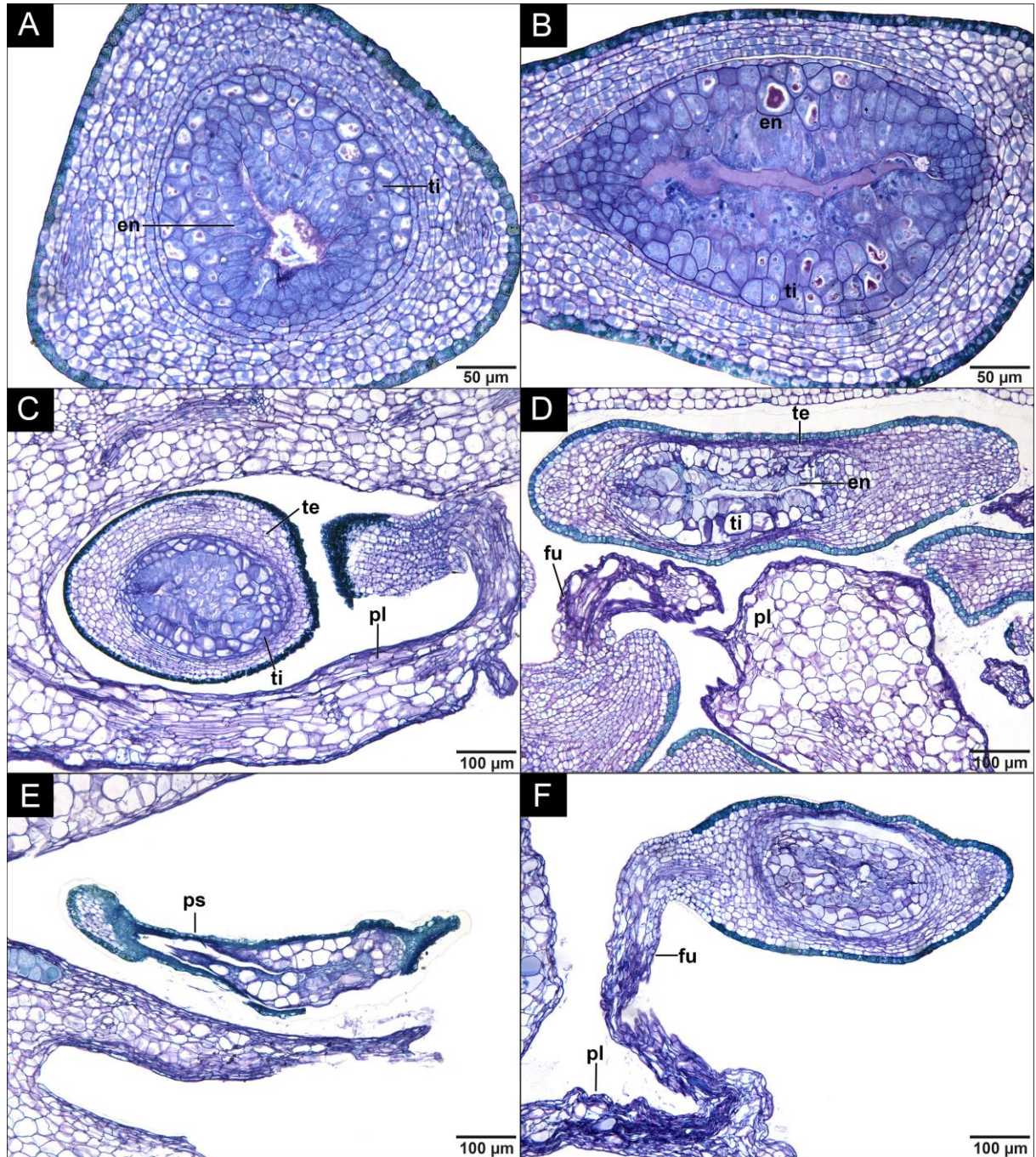
Nos pistilos não polinizados, a partir do sexto dia, observou-se o progressivo aumento das células do endotélio, que se alongaram anticlinalmente a ponto de estreitar a cavidade onde se aloja o saco embrionário. Ao mesmo tempo, as células do tegumento interno subjacentes ao endotélio se expandiram e suas paredes sofreram discreto espessamento, corando-se de púrpura pelo Azul de Toluidina, ao passo que o citoplasma se tornou mais denso, acumulando conteúdo granuloso e de coloração rosada no vacúolo (Figura 16A, B). No tegumento externo, não foi observado alterações significativas até o momento da abscisão dos pistilos.

A partir do sétimo dia, observou-se o início da degeneração de alguns primórdios seminais, caracterizado pela lise das células do endotélio, que passaram a corar-se fortemente e apresentar aspecto deformado (Figura 16B), embora em alguns primórdios seminais a degeneração do tegumento externo tenha precedido a do endotélio (não mostrado nas figuras). Vale mencionar que, desde o primeiro dia após a antese, alguns primórdios seminais apresentando endotélio em lise foram verificados; entretanto é somente a partir da primeira semana que o processo se torna mais comum e acelerado. Progressivamente, as células dos tegumentos, calaza e funículo sofrem lise e tornam-se colapsadas (Figura 16C, D), até o ponto no qual restam apenas vestígios dos primórdios seminais, i.e., células remanescentes

da epiderme externa do tegumento externo e do tegumento interno, que ainda não haviam se degenerado completamente (Figura 16E). A degeneração dos carpelos se inicia na placenta, ocorrendo sobretudo nos pistilos mais longevos (Figura 16F). Nos pistilos não abortados com longevidade superior a 14 dias, a maior parte dos primórdios seminais apresentaram os mencionados sinais de degeneração. No momento da abscisão do pistilo, parte dos primórdios seminais ainda se encontravam sadios (i.e., com estruturação normal de seus componentes) e parte em degeneração ou completamente degenerados, variando conforme a longevidade do pistilo. Não foi notada diferença no grau de degeneração dos primórdios seminais e carpelos entre os pistilos abortados e os coletados antes do aborto, com longevidade semelhante.

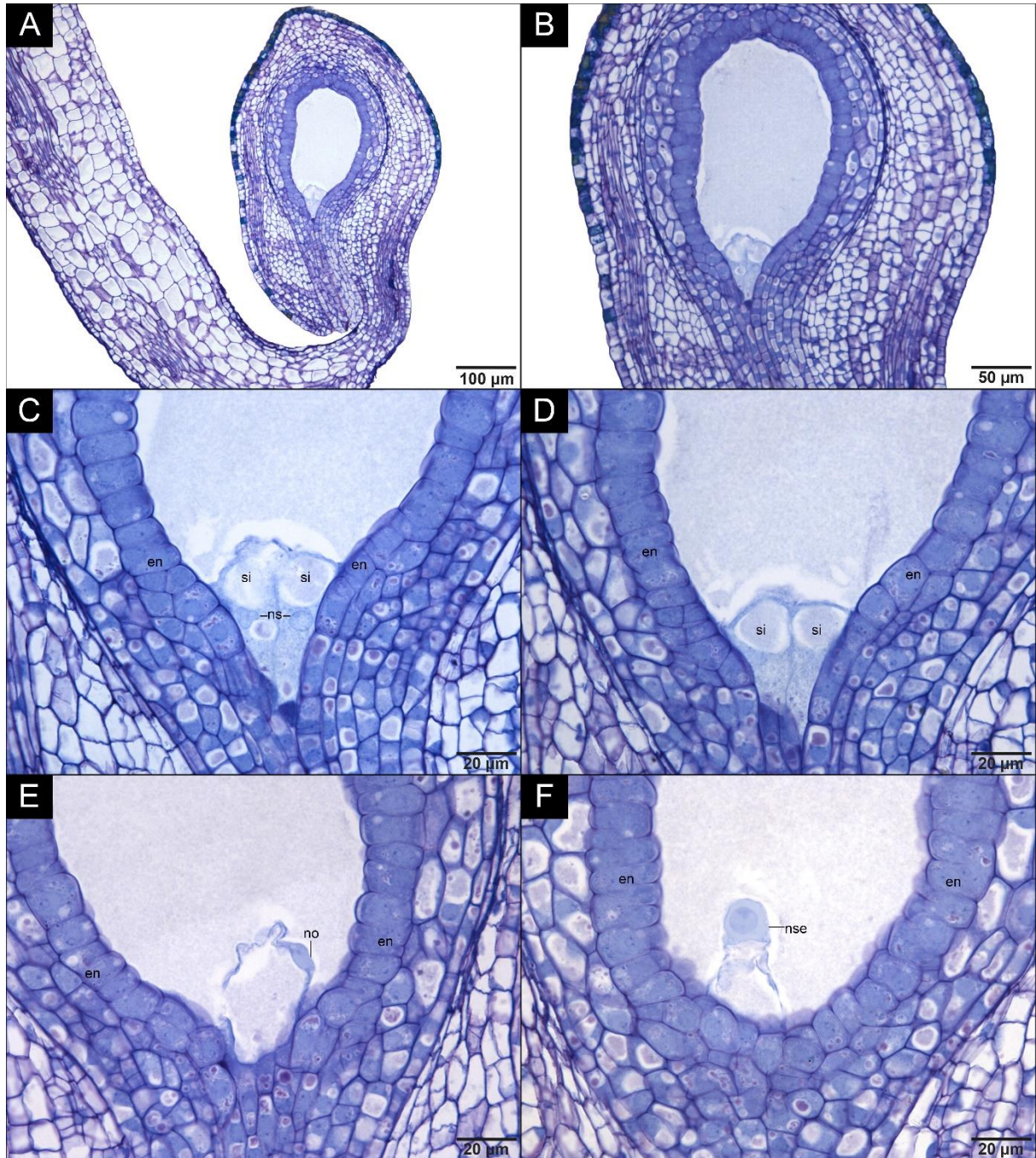
Por fim, não houve sinais de desenvolvimento do endosperma e do embrião no referido tratamento. A degeneração do ginófito variou conforme o início da lise das células do endotélio. Nos casos em que o endotélio não apresentava sinais de degeneração, embora já ultrapassada a longevidade na qual, geralmente, a lise se inicia (sete dias), foi observado o aparelho oosférico e o núcleo secundário intactos, conforme representado na Figura 17. A partir do 10º dia, o colapso do saco embrionário foi constatado devido a lise completa da maioria das células do endotélio, ou então, em virtude do acentuado grau de expansão das células do endotélio e camadas subjacentes do tegumento interno. (Figura 16).

Figura 16 - Primórdios seminais de pistilos não polinizados em estádios posteriores à antese



a) Secção transversal (400x), 7 dias. Tegumento interno e endotélio expandido. Esse último em estágio inicial de degeneração; b) Secções longitudinal (400x), 9 dias. Progresso da expansão e degeneração do endotélio; c) Secção transversal (200x), 11 dias. Tegumento externo, interno, endotélio e placenta em degeneração; d) Secção transversal (200x), 12 dias. Funículo, placenta e primórdio seminal em degeneração; e) Secção longitudinal (200x), 15 dias. Primórdio seminal em estágio avançado de degeneração; f) Secção longitudinal (200x), 16 dias. Placenta e funículo degenerados. *en* endotélio; *ti* tegumento interno; *te* tegumento externo; *pl* placenta; *fu* funículo; *ps* primórdio seminal. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 17 - Aparelho oosférico em primórdio seminal, sete dias após a antese.



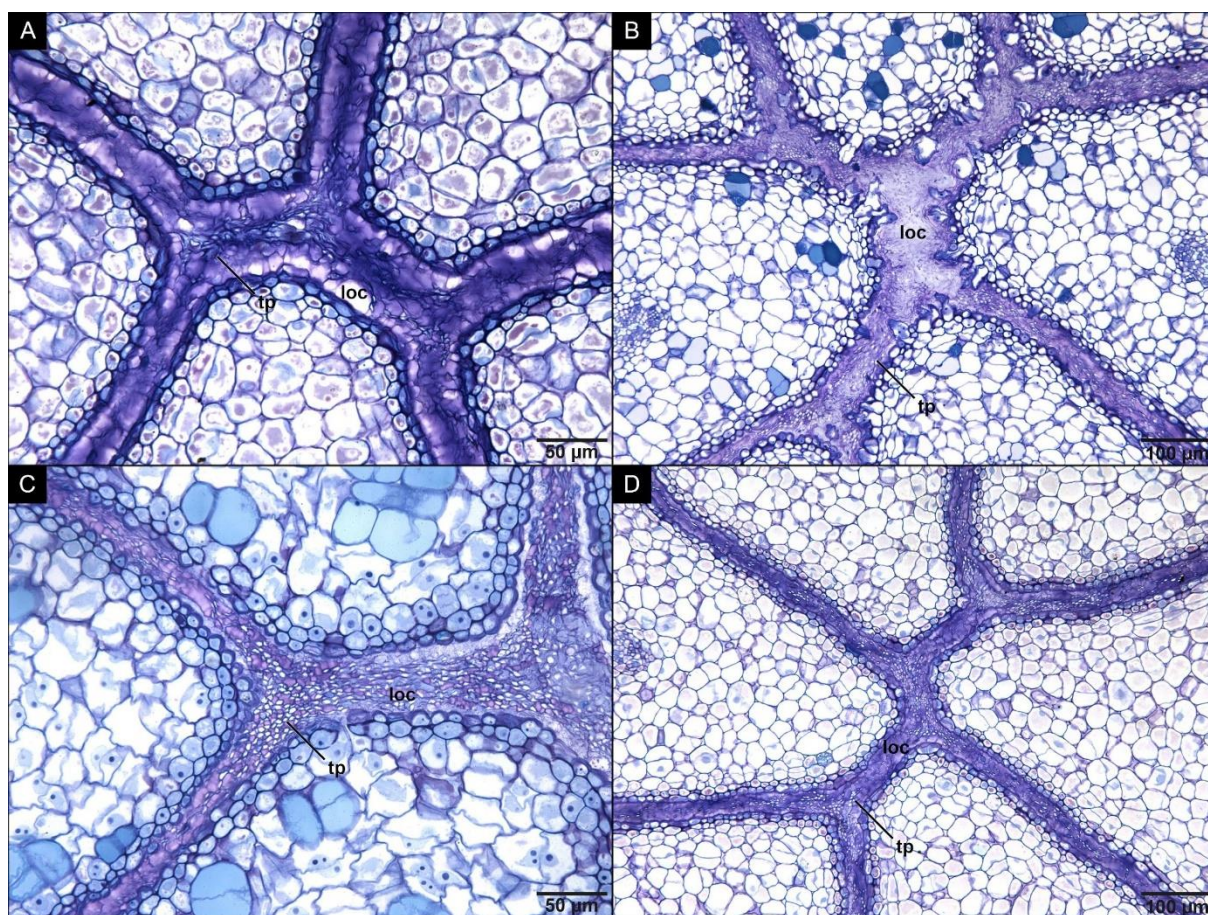
a-f) secções longitudinais seriadas de um primórdio seminal. a) visão geral do primórdio seminal ligado a placenta (200x); b) destaque no saco embrionário (400x); c-e) aparelho oosférico (1000x); e) núcleo secundário. *en* endotélion *ns* núcleo sinérgide *no* núcleo oosfera *nse* núcleo secundário *si* sinérgide. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.4 Pistilos polinizados

Tanto nos pistilos autopolinizados como nos submetidos à polinização cruzada, foram verificados inúmeros tubos polínicos no interior do lóculo do ovário

(Figura 18). A partir do primeiro dia após a antese, em primórdios seminais penetrados pelo tubo polínico, uma das sinérgides apresentou-se fortemente corada (Figura 19) e em grande parte dos primórdios seminais, a sinérgide penetrada apresentou uma alça citoplasmática ao redor do polo calazal da oosfera (Figura 20). Em estádios subsequentes, as sinérgides sofreram colapso e foram absorvidas.

Figura 18 - Secção transversal na porção média do ovário de *C. guianensis*, em pistilos polinizados



Numerosos tubos polínicos (tp) preenchem a cavidade locular. a) pistilo cruzado com 5 dias; b) pistilo cruzado com 7 dias; c) pistilo autopolinizado com 3 dias; d) pistilo autopolinizado com 5 dias. Aumento de 200x (b-d); 400x (a-c). *loc* lóculo; *tp* tubo polínico. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Observou-se também o desenvolvimento do endosperma no interior dos primórdios seminais. As primeiras divisões nucleares do endosperma ocorreram a partir do segundo dia após o início da antese (Figura 21). Com quatro dias já se observava o endosperma com vários núcleos, formando um cenócito amplamente vacuolado, com os núcleos periféricamente posicionados (Figura 22). Internamente, o amplo vacúolo do endosperma muitas vezes apresentou conteúdo granuloso que

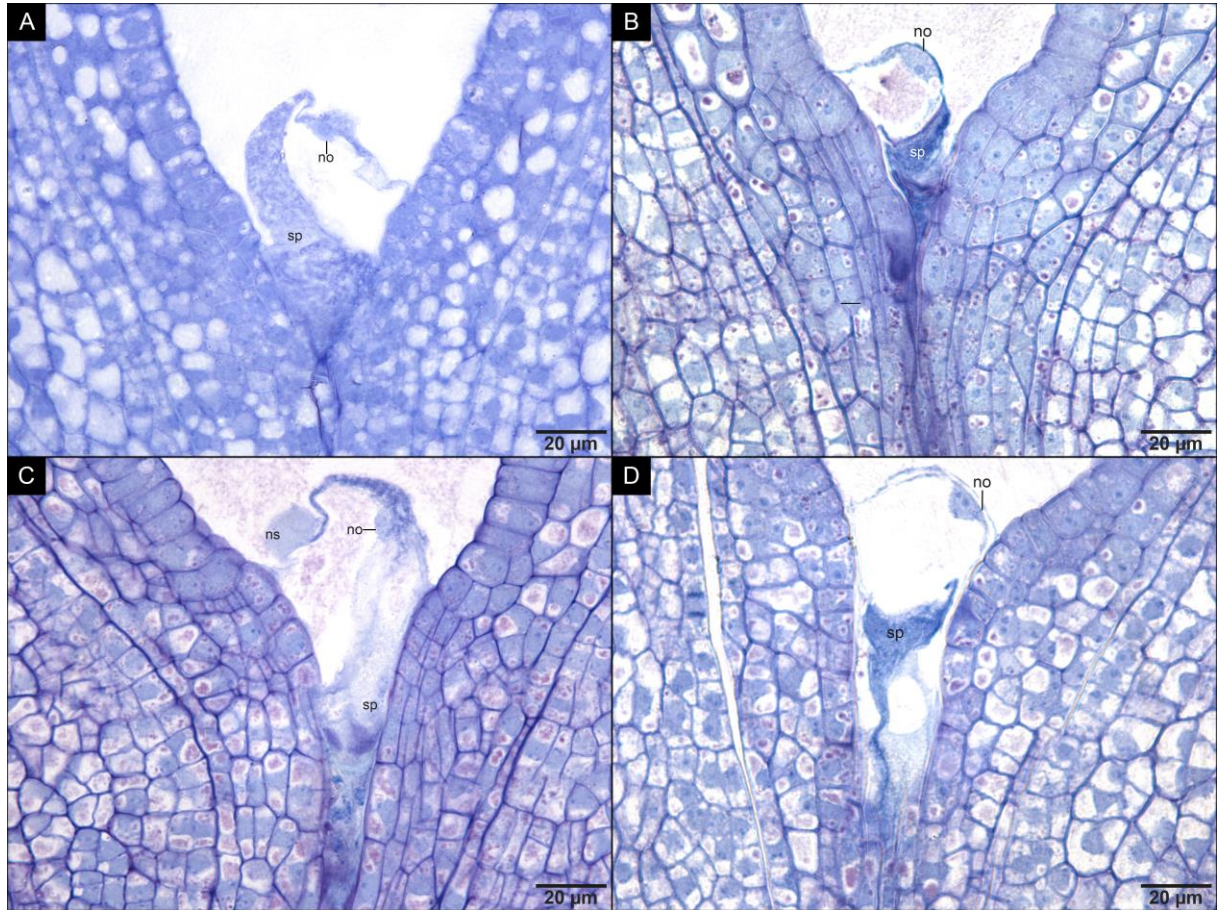
se corou em tom rosado (Figura 23A, D). O endosperma nos frutos iniciados por autopolinização não apresentou variações estruturais em relação ao de frutos formados por polinização cruzada. As semelhanças se dão tanto em relação ao tamanho quanto ao formato. A título de comparação, a Figura 24 mostra a visão geral do endosperma considerado sadio em sementes derivadas de polinização cruzada e autopolinização. A Tabela 1 evidencia que a quantidade de sementes com endosperma em desenvolvimento nos frutos derivadas de autopolinização, não variou significativamente em relação aos frutos derivados de polinização cruzada.

Tabela 1 - Desenvolvimento do endosperma em sementes derivadas de autopolinização e polinização cruzada

	Tempo após polinização					
	48 h		72 h		96 h	
	Auto (%)	Cruzada (%)	Auto (%)	Cruzada (%)	Auto (%)	Cruzada (%)
Endosperma presente	128 (5,78)	91 (4,52)	196 (9,30)	237 (10,20)	429 (20,27)	387 (18,86)
Endosperma ausente	2087 (94,22)	1923 (95,48)	1911 (90,70)	2086 (89,8)	1687 (79,73)	1665 (81,14)
Total observado	2215 (100)	2014 (100)	2107 (100)	2323 (100)	2116 (100)	2052 (100)
Valor (p)	0.0754		0.3387		0.2664	

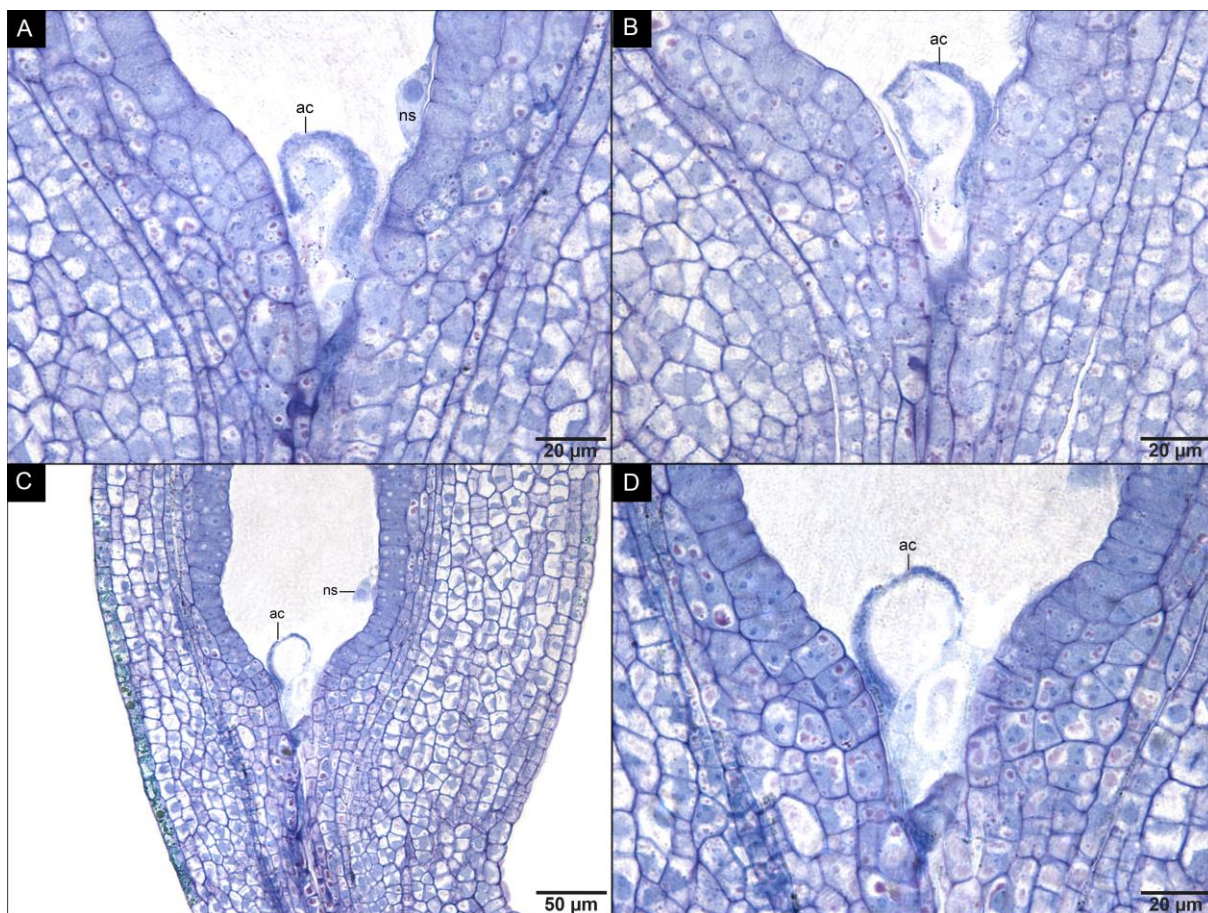
Para cada coluna, foram analisados três frutos escolhidos aleatoriamente. A diferença de sementes com endosperma em desenvolvimento entre pistilos autopolinizados e cruzados, no segundo, terceiro e quarto dia após a polinização, não é significativa. 48h $\chi^2 = 3.413$, g.l.= 1 (p) 0.0754; 72h $\chi^2 = 1.015$, g.l.=1, (p) 0.3387; $\chi^2 = 1.324$, g.l.= 1, (p) 0.2664. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 19 - Secções longitudinais da região micropilar de primórdios seminais no primeiro e segundo dia após a polinização.



a-b) Polinização cruzada. c-d) Autopolinização. 1000x. *no* núcleo oosfera; *sp* sinérgide penetrada *ns* núcleo secundário. Fonte: elaborado pelo autor (2024).

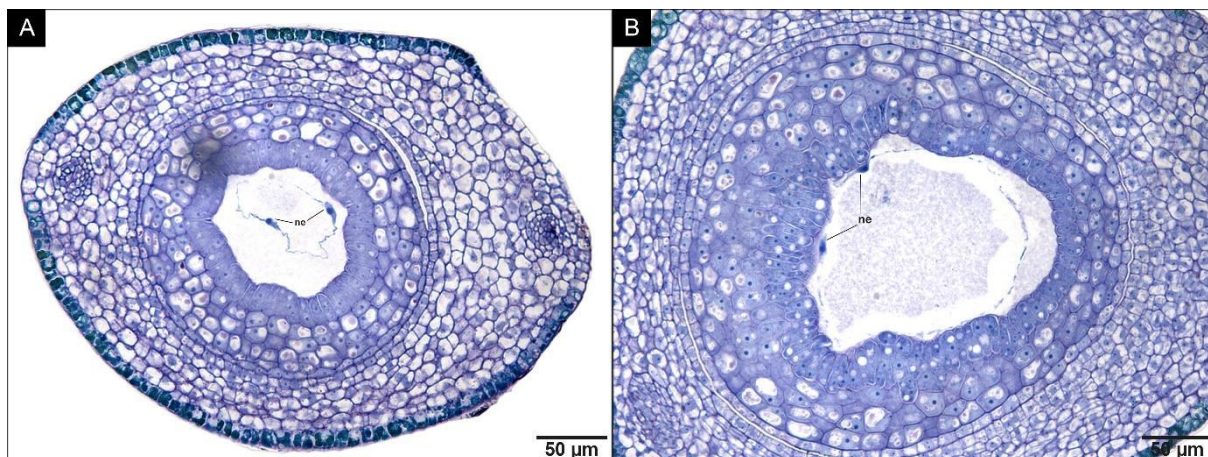
Figura 20 - Secções longitudinais da região micropilar de primórdios seminiais no segundo dia após a polinização



a-b) polinização cruzada. c-f) autopolinização. (a,b,d) 1000x; (c) 400x. ac sinérgide penetrada apresentando alça citoplasmática ao redor do polo calazal da oosfera; ns núcleo secundário. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A celularização do endosperma foi observada somente em sementes derivadas de polinização cruzada com mais de 50 dias (Figura 25). Em relação aos frutos derivados de autopolinização, como esses abortam antes do mencionado período, somente foi observado o estágio nuclear do endosperma nas sementes examinadas, conforme representado nas Figura 21B, Figura 22, Figura 23D, E, Figura 24B, D e Figura 28.

Figura 21 - Secções oblíquas (400x) de primórdios seminais/seedes de *C. guianensis*, no segundo dia após a polinização

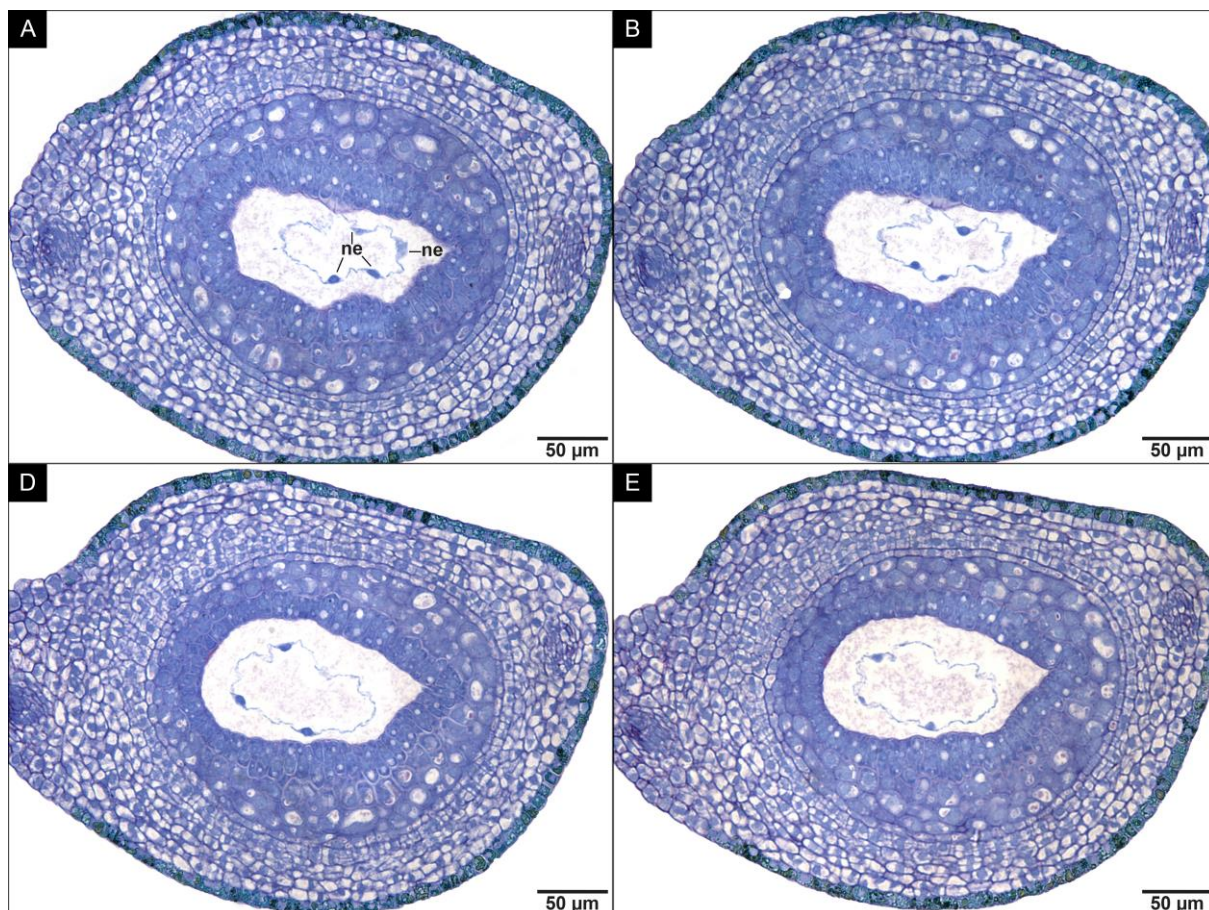


a) polinização cruzada; b) autopolinização. *ne* núcleos do endosperma. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A formação do zigoto foi verificada em primórdios seminais de ambos os tratamentos de polinização (Figura 23). O zigoto em geral possui um formato ovalado e um amplo vacúolo ocupa a maior parte de seu volume interno. O núcleo e a maior parte do citosol localizam-se no polo calazal do zigoto, voltados para o endosperma. Nos frutos derivados de polinização cruzada com até dois meses de longevidade, a análise histológica das sementes não apresentou sinais do início da formação do embrião, sendo possível observar somente o zigoto dormente. Dissecções de frutos coletados com 5 e 7 meses de desenvolvimento revelaram sementes com embrião e cotilédones visíveis ao olho nu, em estágio avançado do desenvolvimento. Efetivamente, nos frutos iniciados por autopolinização, o zigoto permaneceu dormente e não sofreu divisões até o estágio de abscisão.

Se tratando das mudanças observadas no endotélio e tegumentos ao longo do período pós-polinização, as variações correlacionaram-se com a presença ou ausência do endosperma. Para os primórdios seminais nos quais não foram observados o desenvolvimento do endosperma, as modificações no endotélio e tegumento interno foram semelhantes às dos pistilos não polinizados, i.e., alongamento anticlinal do endotélio e expansão do volume das células do tegumento interno.

Figura 22 - Sementes de *C. guianensis* em estágio inicial de desenvolvimento (4 dias após a autopolinização)



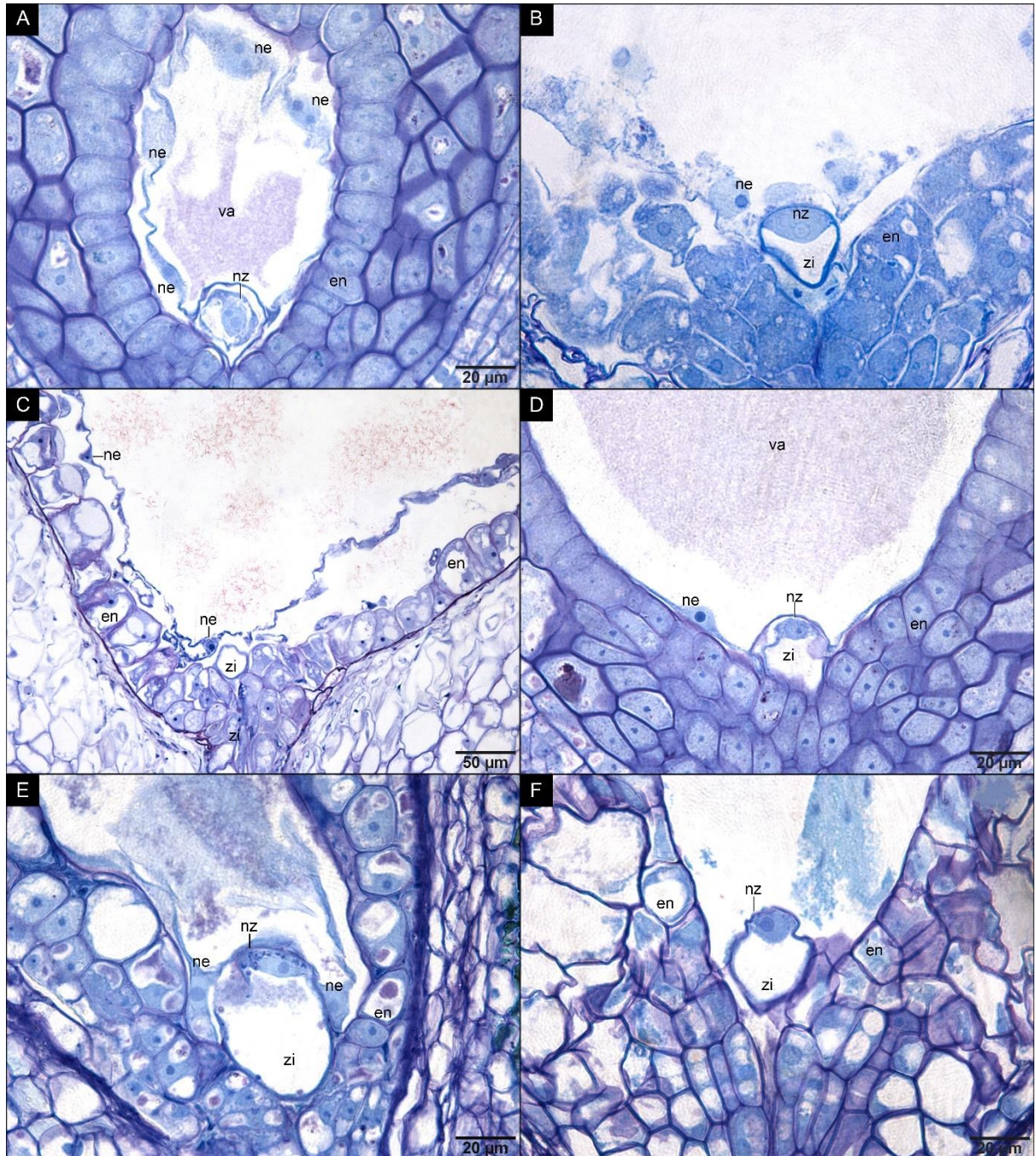
a-e) Secções transversais em série (400x) de uma mesma semente contendo endosperma cenocítico multinucleado. *ne* núcleo endosperma. Elaborado pelo autor (2024).

Nos primórdios seminais com o endosperma em desenvolvimento, as mencionadas mudanças no tegumento interno foram menos expressivas. Neste caso, as alterações mais consideráveis nos primórdios seminais ocorrem por volta do 17º dia, quando algumas camadas de células do tegumento externo, localizadas ao redor do tegumento interno, passaram a apresentar citoplasma ligeiramente mais denso que nos estádios precedentes e sofreram considerável expansão (Figura 26A, B). No geral, a partir do 30º dia, a degeneração dessas células se inicia (Figura 26C, D), atingindo um estágio avançado no estágio de celularização do endosperma (a partir do 50º dia, Figura 26E, F). Verificou-se uma nítida diferença no aspecto dessas células em relação às camadas mais externas de células do tegumento externo, as quais permaneceram intactas (Figura 26C, D, E, F). A degeneração das células remanescentes do tegumento interno também se iniciou por volta do 30º dia (Figura

26C, D) e o colapso dessas células ocorreu concomitantemente à degeneração das células das camadas mais internas do tegumento externo (Figura 26E, F). O endotélio não permaneceu intacto, pois suas células, que antes eram colunares (i.e., anticlinalmente achatadas), se expandiram tendendo a tornar-se abauladas (Figura 26C, D) e se desorganizam em estádios subsequentes (Figura 26 E, F).

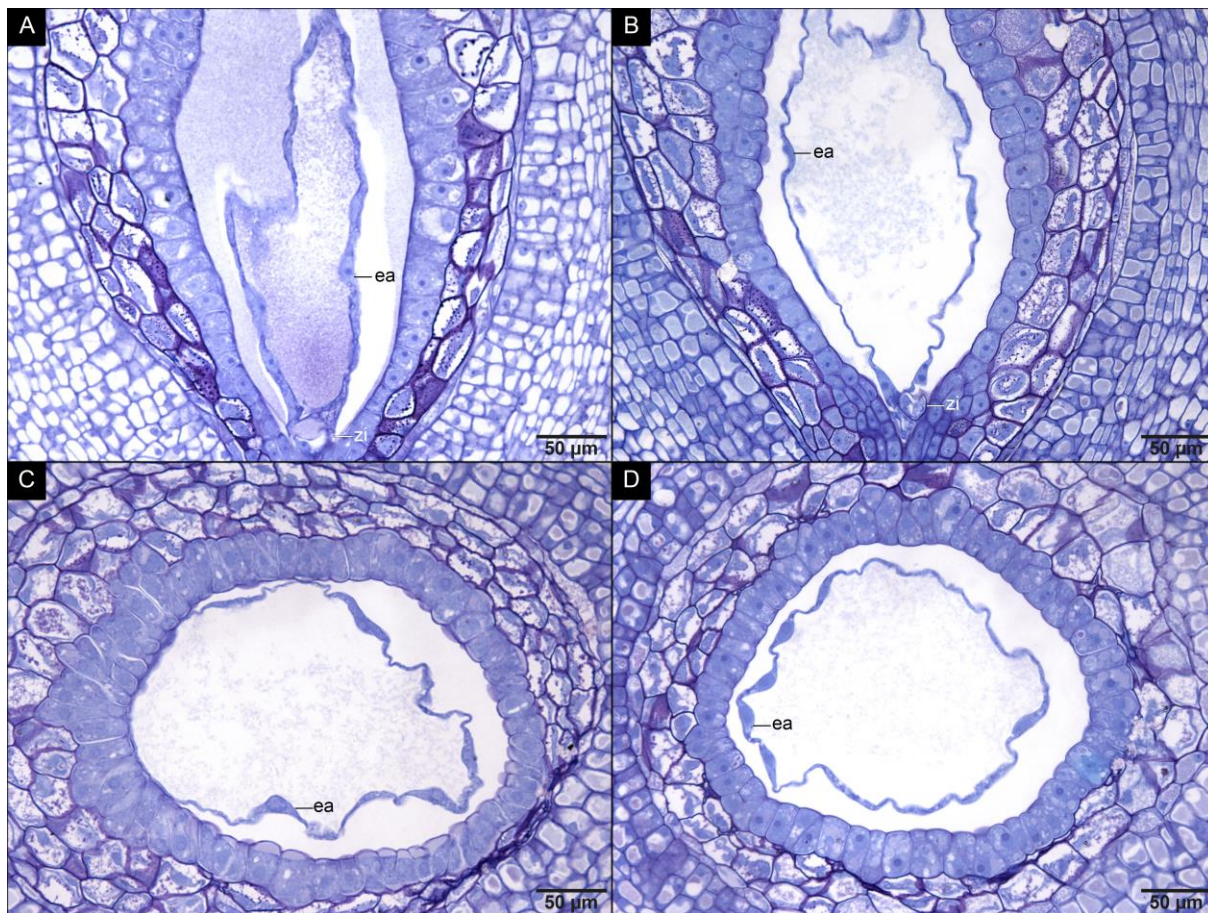
O aborto dos primórdios seminais/jovens sementes foi marcado pela degeneração celular em todos os tecidos, de forma semelhante ao observado nos pistilos não polinizados. A partir do sétimo dia, o início da lise do endotélio se inicia e é sucedida da degeneração dos demais tecidos dos primórdios seminais/jovens sementes (Figura 27). A Tabela 2, compara a quantidade de primórdios seminais e sementes degeneradas em pistilos não polinizados, autopolinizados e com polinização cruzada. Vale notar que, nos pistilos polinizados, verificou-se um atraso na degeneração das sementes em relação aos primórdios seminais de pistilos não polinizados. Ao se comparar os frutos que espontaneamente sofreram abscisão com aqueles retirados manualmente das inflorescências, de mesma longevidade, não foram observadas variações significativas quanto à degeneração das sementes. Por fim, embora não seja comum, foram observadas algumas sementes com endosperma multinucleado, mas em estádios avançados de degeneração, i.e., apresentando a maioria das células dos tegumentos, calaza e funículo colapsadas (Figura 28).

Figura 23 - Zigoto em pistilos cruzados e autopolinizados



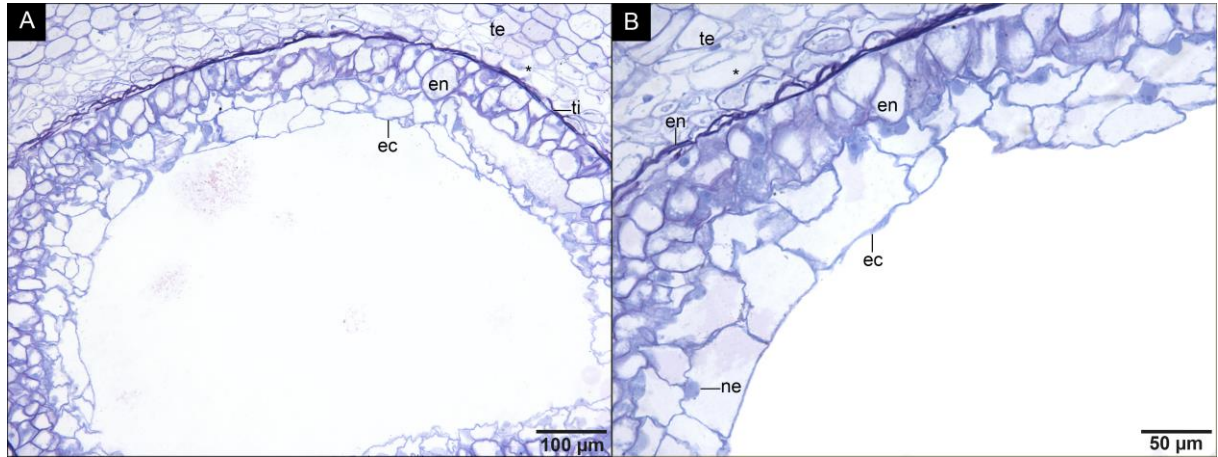
a-c) polinização cruzada; corte longitudinal (a-b 1000x), (c 400x); a) semente 7 dias após a polinização; b) semente 36 dias após a polinização; c) semente 56 dias após a polinização; d-f) autopolinização; corte longitudinal (1000x) d) primórdio seminal 8 dias após a autopolinização; e) semente 22 dias após a autopolinização; f) semente 17 dias após a autopolinização. zi zigoto; nz núcleo do zigoto; en endotélio; en endotélio ne núcleo do endosperma; va vacúolo do endosperma corado em rosa. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 24 - Desenvolvimento do endosperma em sementes derivadas de polinização cruzada e autopolinização



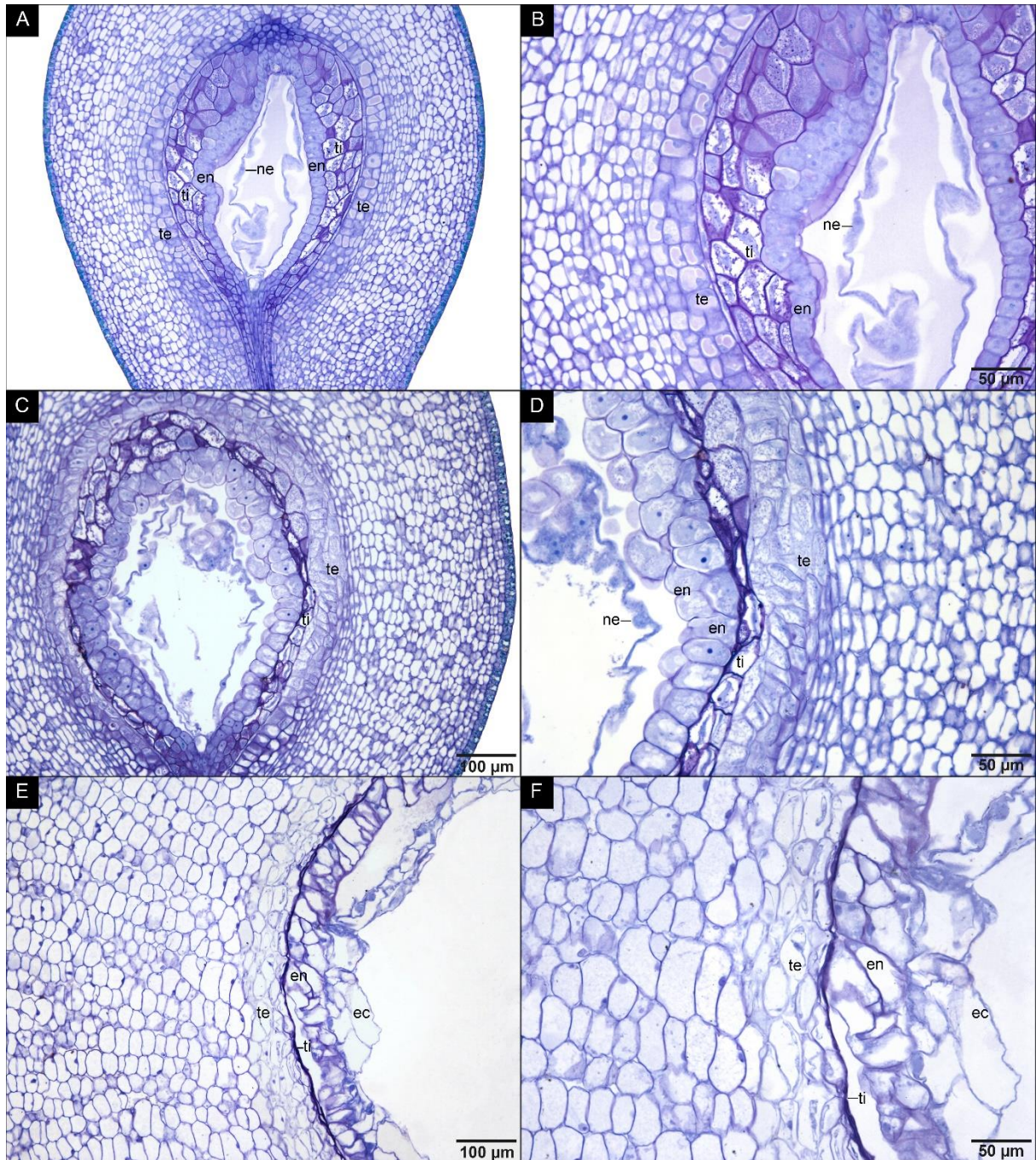
a) semente derivada de polinização cruzada com endosperma e zigoto; b) semente derivada de autopolinização com endosperma e zigoto; a-b 17 dias após polinização; corte longitudinal (400x); c) semente derivada de polinização cruzada com endosperma; d) semente derivada de autopolinização com endosperma; c-d) 21 dias após a polinização; corte transversal (40x). ea endosperma Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 25 - Endosperma celularizado em uma semente com 56 dias após a polinização cruzada



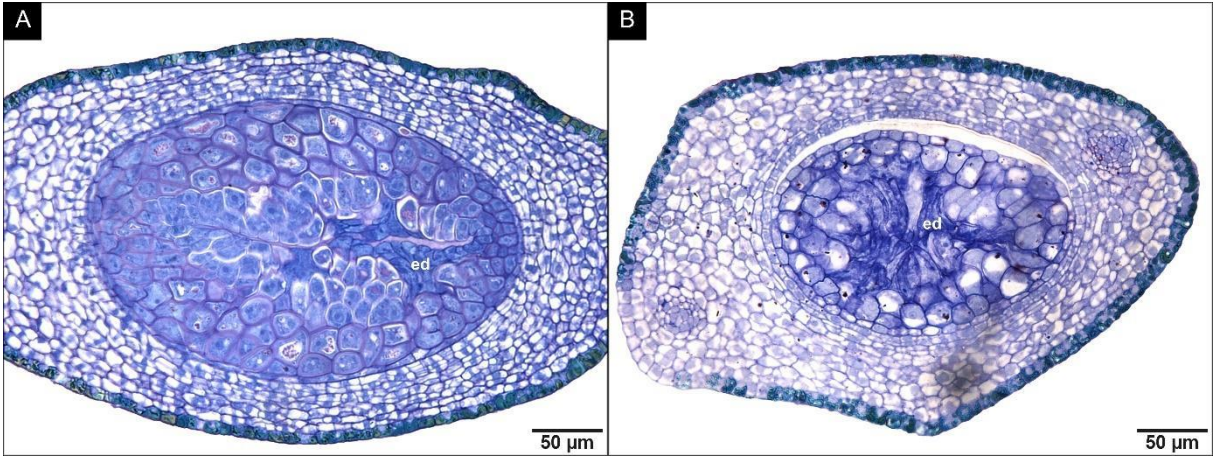
a) visão geral do endosperma celularizado e das células deformadas do tegumento interno que delimitam o saco embrionário, na ausência do endotélio já colapsado; corte longitudinal (200x); b) detalhes do endosperma e tegumento interno; corte longitudinal (400x); *ec* endosperma *en* endotélio celularizado *ne* núcleo do endosperma *te* tegumento externo *ti* tegumento interno * degeneração das camadas mais internas do tegumento externo. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 26 - Expansão e degeneração do tegumento interno e das camadas mais internas do tegumento externo em sementes derivadas de polinização cruzada



a-b) semente 17 dias após a polinização. a) visão geral da semente (200x); b) detalhe evidenciando o citoplasma denso e expansão das células das camadas mais internas do tegumento externo, ao redor do tegumento interno (400x). c-d) semente 32 dias após a polinização. c) visão geral da semente (200x); d) detalhe evidenciando o início da degeneração das camadas mais internas do tegumento, tegumento interno colapsado (salvo o endotélio) e endotélio amplamente vacuolado. (400x). e-f) semente com 56 dias após a polinização. e) visão geral da semente (200x); f) detalhe das camadas mais internas do tegumento externo degeneradas, endotélio em degeneração, tegumento interno apresentando todas as células colapsadas e endosperma celularizado (400x). ec endosperma celularizado en endotélio ne núcleo do endosperma te tegumento externo ti tegumento interno. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 27 - Degeneração do endotélio em primórdios seminais sete dias após a polinização



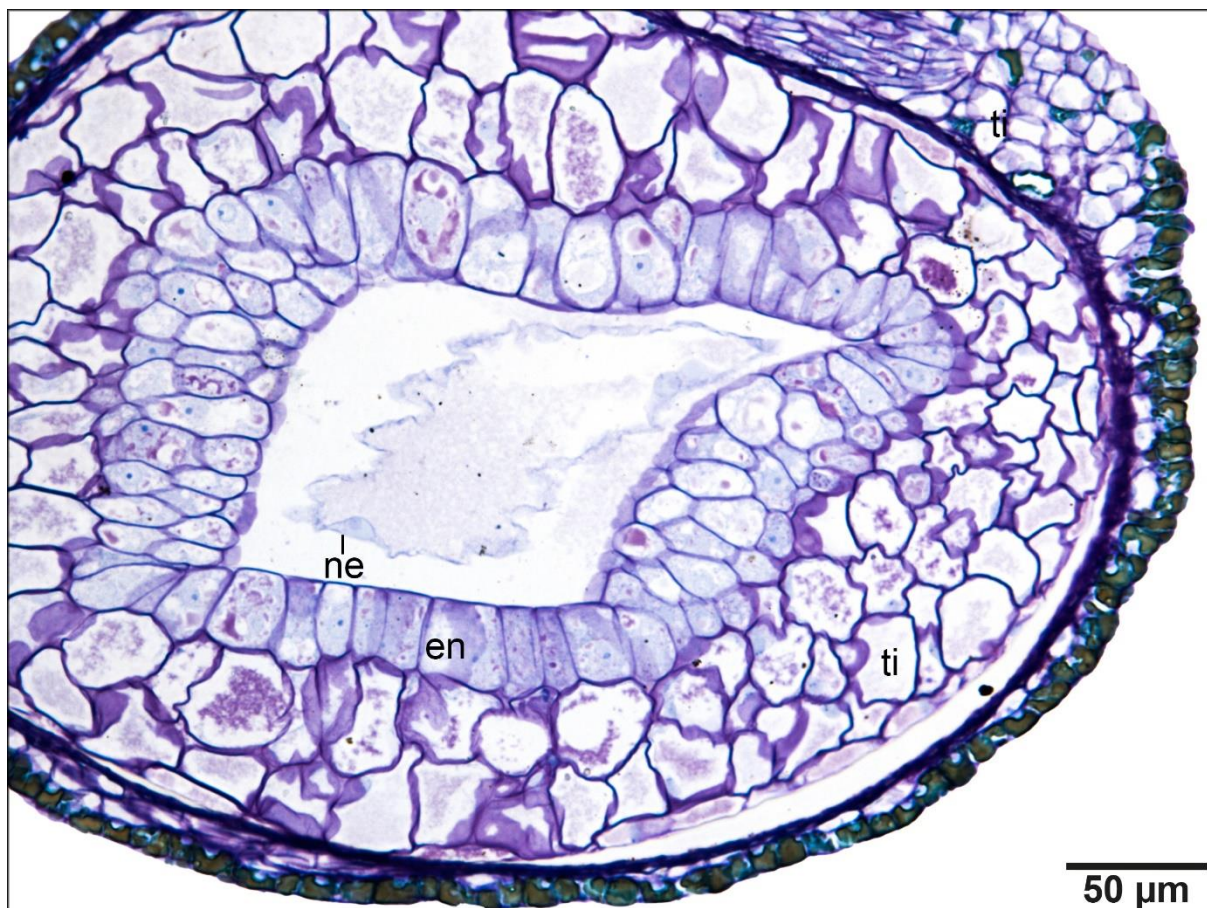
a) autopolinizado; b) polinização cruzada. Corte tangencial (400x). *ed* endosperma degenerado. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 2 - Quantidade de primórdios seminais e sementes degeneradas para cada tratamento realizado

	Tempo após polinização								
	7 dias			14 dias			20 dias		
	Auto (%)	Cruzado (%)	Não polinizado (%)	Auto (%)	Cruzado (%)	Não polinizado (%)	Auto (%)	Cruzado (%)	Não polinizado (%)
Sadios	637 (88,97)	732 (91,84)	559 (69,7)	502 (83,13)	532 (74,09)	278 (40,35)	555 (73,12)	478 (75,16)	63 (9,78)
Degenerados	79 (11,03)	65 (8,16)	248 (30,3)	138 (21,56)	186 (25,91)	411 (59,65)	204 (36,76)	158 (33,05)	581 (90,22)
Total observado	716 (100)	797 (100)	807 (100)	640 (100)	718 (100)	689 (100)	759 (100)	636 (100)	644 (100)

Para cada coluna, foram analisados três frutos escolhidos aleatoriamente. O teste de independência do Qui-Quadrado apontou diferença significativa. A partição em três conjuntos de dados (7, 14 e 20 dias após a polinização) foi realizada para registrar a diferença significativa para cada período examinado. Pistilos autopolinizados e cruzados não apresentam diferença estatística: 7 dias $\chi^2 = 2.2247$, g.l= 1, (p) 0.1358; 14 dias $\chi^2 = 2.7730$, g.l.=1, (p) 0.0959; 20 dias $\chi^2 = 0.5763$, g.l.= 2, (p) 0.4478. Entretanto, pistilos não polinizados apresentam diferença estática em relação aos polinizados, conforme os seguintes resultados: 7 dias $\chi^2 = 168.6691$, g.l= 1, (p) < 0.0001; 14 dias $\chi^2 = 254.4563$, g.l.=1, (p) < 0.0001; 20 dias $\chi^2 = 732.0468$, g.l.= 1, (p) < 0.0001. Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Figura 28 - Endosperma de semente em degeneração, 20 dias após a autopolinização



Corte transversal (400x). *ed* endosperma *ne* núcleo endosperma *ti* tegumento interno. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5 DISCUSSÃO

5.1 Longevidade e crescimento dos pistilos e frutos

Neste trabalho foi constatado que os frutos derivados de autopolinização permanecem por mais tempo no ramo em relação aos pistilos não polinizados. Entretanto, tendo em vista que os frutos derivados de polinização cruzada atingiram a maturidade por volta do 12º mês após a antese, os frutos iniciados por autopolinização abortaram muito precocemente, uma vez que se desenvolveram no máximo 9,3% (34 dias) do tempo total necessário para maturação (cerca de 365 dias). Em comparação, os pistilos não polinizados atingiram no máximo 6% (22 dias) do tempo completo de desenvolvimento de um fruto viável. Normalmente, os pistilos não polinizados abortam em até 2 semanas (de 100 pistilos monitorados somente 10 ultrapassaram esta marca), sendo que os pistilos mais longevos apresentam taxas

de degeneração dos primórdios seminiais e dos carpelos significativamente maiores que nos pistilos polinizados. Tal situação divergiu dos autopolinizados, que em geral ultrapassaram a marca de 14 dias, continuam a crescer em proporções semelhantes aos frutos derivados de polinização cruzada, mas sofreram abscisão por volta da 3ª semana após a polinização, apresentando sementes contendo endosperma, claramente indicando a iniciação de frutos.

A longevidade estendida dos frutos derivados de autopolinização em relação aos pistilos não polinizados, em espécies autoincompatíveis, foi relatada em trabalhos com polinizações manuais controladas. Gibbs *et al.* (2004) trabalhou com polinizações manuais em duas espécies do gênero *Ceiba* Mill. (*C. chodatii* (Hassl.) Ravenna e *C. speciosa* (A.St.-Hil., A.Juss. & Cambess.) Ravenna, Malvaceae Juss.) e observou que a longevidade de pistilos autopolinizados é prolongada em cerca de três dias em relação aos pistilos não polinizados. Primo e Machado (2009) relataram que no geral pistilos autopolinizados possuem uma longevidade de três a sete dias a mais que aqueles não polinizados em *Neocalyptrocalyx longifolium* (Mart.) Cornejo & Iltis (Capparaceae A.Juss.). Gandolphi e Bittencourt (2010), Bittencourt *et.al* (2011) e Bittencourt (2017) trabalharam com espécies autoincompatíveis da família Bignoniaceae Juss. (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith; *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart.; *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, respectivamente), e relataram que a longevidade dos pistilos autopolinizados é superior à dos pistilos não polinizados, ainda que ambos abortem de forma precoce. Outro fator observado nos referidos trabalhos com a família Bignoniaceae, diz respeito ao tamanho dos pistilos no momento da abscisão. Autopolinizados apresentaram um ligeiro crescimento antes de sofrerem abscisão, porém significativamente maior que aqueles pistilos não polinizados.

Bittencourt (2017), Gandolphi e Bittencourt (2010), Gibbs *et al.* (2004) e Gibbs (2014) apontam que a longevidade estendida dos pistilos autopolinizados parece estar relacionada aos casos de espécies com autoincompatibilidade de ação tardia, devido a algum tipo de interação entre os grãos de pólen/tubos polínicos próprios e o gineceu, atrasando o aborto dos pistilos, embora em alguns casos a abscisão ocorra em um intervalo semelhante aos pistilos não polinizados (GIBBS,

2014). Ao menos para três famílias, em três ordens distintas (Bignoniaceae – Lamiales; Capparaceae – Brassicales; Malvaceae – Malvales), há trabalhos que compararam a longevidade dos pistilos/frutos em polinizações cruzadas, autopolinizações e flores não polinizadas em espécies autoincompatíveis e relatam um significativo atraso na abscisão dos pistilos autopolinizados, relativamente aos não polinizados. Com os resultados expostos neste trabalho, adiciona-se Lecythidaceae, ordem Ericales a esse grupo.

O presente estudo mostrou que os frutos derivados de autopolinização possuem longevidade superior aos pistilos não polinizados, porém são inviáveis. O aborto de frutos derivados de autopolinização ocorre em período relativamente curto comparativamente ao tempo de maturação de frutos viáveis induzidos por polinização cruzada. Esses dados divergem do estudo realizado por Ormond *et. al.* (1981) no qual os autores alegaram a formação de frutos por autopolinização. Uma vez que os autores não deixam claro o acompanhamento dos frutos derivados por autopolinização até a sua maturidade, é possível que os pistilos autopolinizados somente tenham sido monitorados até cerca do 1º mês após a autopolinização. Como exposto no presente trabalho, no período de 30 dias após a polinização, os pistilos autopolinizados crescem em largura e comprimento sem diferença significativa em relação aos pistilos polinizados de forma cruzada. Desta forma, é imprescindível o monitoramento dos frutos derivados de autopolinização até a abscisão ou maturidade. Diante do exposto, conclui-se que *C. guianensis* é autoestéril, e que a aparente autocompatibilidade da espécie se deve ao mecanismo de autoincompatibilidade de ação tardia com rejeição pós zigótica, como será discutido nas seções seguintes.

5.2 Eventos posteriores à antese e à polinização manual

A observação de uma grande quantidade de tubos polínicos no interior do ovário e penetrando a micrópila em primórdios seminais de pistilos autopolinizados confirma análises de microscopia de fluorescência realizadas por Motta e Bittencourt (2017) e Ormond *et. al.* (1981), nas quais os autores verificaram a germinação do grão de pólen, o crescimento do tubo polínico ao longo do tecido transmissor até o ovário e a penetração dos primórdios seminais. Vale mencionar que, em ambos os

trabalhos, não foram encontradas diferenças na germinação do grão de pólen e no crescimento do tubo polínico entre pistilos cruzados e autopolinizados.

A descarga do conteúdo do tubo polínico numa das sinérgides após a penetração do ginófito foi evidenciada pela forte coloração do citoplasma adquirida pela sinérgide penetrada, tal como verificado em outros estudos (e.g., BITTENCOURT, 2017). A observação de primórdios seminais com um dia após a polinização (autopolinização e polinização cruzada) já apresentando sinérgides penetradas é congruente com os estudos de Motta e Bittencourt (2017) e Ormond *et al.* (1981), que visualizaram grande parte dos primórdios seminais penetrados por tubos polínicos (tanto em pistilos cruzados como autopolinizados) 24 horas após a polinização. A alça citoplasmática da sinérgide penetrada ao redor do polo calazal da oosfera, verificada em diversos primórdios seminais em ambos os tratamentos de polinização, sinaliza a transferência dos gametas masculinos para a oosfera e para a célula central (YE *et al.*, 2002; BITTENCOURT, 2017), evidenciando indiretamente a ocorrência da dupla fecundação em pistilos autopolinizados e de polinização cruzada.

Outro fator que corrobora a fecundação, especialmente dos pistilos autopolinizados, é a formação do zigoto e o desenvolvimento inicial do endosperma nesses pistilos, que por sua vez estão ausentes nos pistilos não polinizados. Motta e Bittencourt (2016) decapitaram o estigma de 35 flores de *C. guianensis*, em um teste para agamospermia. Os autores relataram que nenhum fruto foi formado dessa forma. Através das análises histológicas do 1º ao 22º dia após a antese em pistilos não polinizados no presente estudo, foi constatado que de fato não há formação, mesmo que incipiente, de sementes apomíticas. No presente estudo, o início do desenvolvimento do embrião não foi verificado. Schoenberg (1983b) relatou o início das divisões do zigoto por volta do 7º mês após a polinização cruzada. Todavia, os resultados deste trabalho permitem discordar da referida autora, uma vez que à verificação de frutos derivados de polinização cruzada com 5 e 7 meses de longevidade, apresentou sementes com embrião em estágio avançado do desenvolvimento.

Trabalhos com espécies autoincompatíveis da família Bignoniaceae revelaram discrepâncias nos eventos após a polinização, entre pistilos autopolinizados e cruzados. O atraso na penetração dos primórdios seminais de pistilos autopolinizados em relação aos cruzados foi verificado nos estudos realizados por Gibbs e Bianchi (1999), Bittencourt e Semir (2004) e Bittencourt *et.al.* (2011). De forma semelhante, Bittencourt, Gibbs e Semir (2003), Bittencourt e Semir (2005) e Bittencourt e Semir (2006), observaram, um atraso na penetração dos primórdios seminais, na fecundação e nas fases iniciais do desenvolvimento do endosperma em pistilos autopolinizados, comparados aos pistilos cruzados. Nesses casos, parece haver algum mecanismo de reconhecimento do pólen e/ou tubo polínico em autopolinizações, porém com a rejeição do pistilo operando tardiamente (i.e., após a dupla fecundação).

No presente trabalho, a quantificação dos primórdios seminais penetrados e fecundados não foi realizada. Da mesma forma, o acompanhamento e comparação do progresso do desenvolvimento do endosperma em pistilos autopolinizados vs. cruzados não foi possível devido à natureza nuclear do endosperma. Todavia, o exame quantitativo das jovens sementes em *C. guianensis*, apresentando endosperma em desenvolvimento nos pistilos autopolinizados vs. cruzados, evidenciou que, em ambos os tratamentos, a proporção de sementes apresentando o tecido de reserva são semelhantes, do segundo ao quarto dia após a polinização. Desta forma, verifica-se que a autopolinização é capaz de iniciar o desenvolvimento de sementes em proporções semelhantes (pelo menos até o quarto dia após a polinização) aos pistilos cruzados, embora o desenvolvimento das sementes derivadas de autopolinização nunca ultrapasse pouco mais que 30 dias.

5.3 Causa da autoesterilidade: autoincompatibilidade ou depressão endogâmica?

Seavey e Bawa, 1986 e Sage *et.al.*, 1994 abordaram quatro critérios indiretos para distinguir espécies com autoincompatibilidade de ação tardia ou depressão endogâmica como causa da autoesterilidade em casos nos quais a dupla fecundação ocorre, mas nenhuma ou um número reduzido de sementes maduras são formadas. Dentre eles, dois foram testados nesta pesquisa: (1) avaliação do

tempo no qual o aborto ocorre – nos casos em que o aborto de diversas sementes ocorre de modo homogêneo, i.e., numa faixa restrita de desenvolvimento do zigoto, embrião ou endosperma, a autoincompatibilidade de ação tardia é apontada como causa da inviabilidade das sementes; por outro lado, o aborto em várias faixas do desenvolvimento, indica a atuação de genes deletérios –; (2) variabilidade na quantidade de sementes produzidas por autopolinização em uma população – nenhuma ou quase nenhuma semente formada entre indivíduos de uma população geneticamente variável é indicação de um sistema de autoincompatibilidade, ao passo que variações no número de sementes maduras decorrentes de autofecundação são relacionadas à depressão endogâmica.

Dos 100 pistilos autopolinizados em 6 árvores e acompanhados até a abscisão, foi constatado que o desenvolvimento destes foi efêmero e o aborto ocorreu de forma precoce (cerca de 1 mês), se comparados com o tempo total necessário para maturação e queda natural do fruto (cerca de 12 meses). Após a autopolinização, o aborto dos frutos ocorreu, sem exceções, na fase de zigoto dormente, isto é, o embrião nunca iniciou seu desenvolvimento, restringindo a possibilidade de que o aborto dos pistilos/frutos iniciados por autopolinização tenha decorrido da expressão de genes recessivos deletérios (BITTENCOURT, 2017; GIBBS, 2014). Situação semelhante foi relatada por Bittencourt *et.al.* (2003), Bittencourt *et.al.* (2011), Bittencourt e Semir (2005), Gandolphi e Bittencourt (2010), Gibbs e Bianchi (1993) e Sage e Sampson (2003), estudos nos quais o aborto dos pistilos autopolinizados ou frutos iniciados por autopolinização em geral ocorreu na fase zigótica, durante as primeiras etapas desenvolvimento do endosperma. Ademais, nos frutos derivados de autopolinização de *C. guianensis*, a completa ausência de sementes que ultrapassam estádios muito precoces do desenvolvimento, jamais alcançando a maturidade, concilia-se com casos de espécies onde um sistema de autoincompatibilidade é operante, pois em cruzamentos endogâmicos seriam esperadas taxas de segregação claras, resultando em casos com sementes viáveis, ao passo que, em outra parte dos indivíduos, o desenvolvimento das sementes se tornaria inviável, devido à elevada carga de genes recessivos deletérios (SEAVEY; BAWA, 1986).

Por outro lado, Gibbs e Sasaki (1998) realizaram polinizações controladas em *Dalbergia miscolobium* Benth. e monitoraram os frutos até a maturidade. Grande parte dos pistilos autopolinizados sofreram abscisão entre 5-10 dias após a polinização, embora a queda dos frutos tenha se estendido para além de 30-60 dias ou mais. Alguns frutos derivados de autopolinização atingiram a maturidade (menos de 4%) e a taxa de autofertilidade variou entre os espécimes estudados. A partir do quarto dia, os autores observaram, tanto em frutos derivados de autopolinização como de polinização cruzada, o desenvolvimento do endosperma e do embrião, até o estágio globular. Valtueña *et al.* (2010) observou em duas espécies de *Cytisus* Desf. o aborto das sementes derivadas de autofecundação em diferentes fases do desenvolvimento. Em *C. striatus* (Hill) Rothm. o aborto ocorreu em todos os estádios do desenvolvimento do embrião, embora mais frequentemente na fase de proembrião. Já em *Cytisus multiflorus* Sweet, o aborto ocorreu no fim do estágio de proembrião e no início do estágio globular. Por fim, Hao *et al.* (2012), verificou em sementes derivadas de autofecundação de *Aconitum kusnezoffii* Rchb. o aborto em diferentes estádios do desenvolvimento. Os autores verificaram sementes de 1 a 3 dias após a polinização e constataram o início do desenvolvimento do embrião.

Em todos os trabalhos mencionados acima, os autores concluíram que a causa do aborto dos frutos derivados de autopolinização é devido a ação de alelos recessivos deletérios. Ressalta-se o início do desenvolvimento do embrião em um curto período após a polinização e seu progressivo crescimento até o aborto em variados momentos. Situação divergente de *C. guianensis*, no qual o embrião permanece dormente (sem exceções) durante todo o período de desenvolvimento da semente até a inevitável abscisão do fruto derivado de autopolinização, embora o desenvolvimento inicial do endosperma, sem sinais de más formações, tenha sido verificado. Tal situação é congruente com a ação de um mecanismo de autoincompatibilidade de ação tardia em *C. guianensis*, com rejeição pós-zigótica dos pistilos autopolinizados.

Entretanto, a possibilidade de a autoesterilidade de *C. guianensis* ser decorrente da expressão de alelos deletérios recessivos agindo muito precocemente no desenvolvimento de sementes derivadas de pistilos autopolinizados (i.e., no

zigoto ou mesmo no endosperma) não pode ser totalmente descartada. Sage *et.al.*, 1994 pontua levantamentos feitos por Klekowski (1988), nos quais o autor argumenta que não é possível fazer previsões quanto ao tempo do aborto dos embriões gerados por autopolinização, presumivelmente referindo-se a um possível (embora pouco provável) efeito da expressão de genes recessivos deletérios já no estágio de zigoto.

6 CONCLUSÃO

Uma forte autoesteridade foi observada em *C. guianensis*, uma vez todos os frutos derivados de autopolinização abortam precocemente (cerca de 1 mês). Foi verificada a ocorrência da dupla fecundação em pistilos autopolinizados (tubo polínicos no interior da micrópila, penetração de uma das sinérgides, evidências indiretas da transferência dos gametas masculinos para a oosfera e para a célula central, formação do zigoto e desenvolvimento inicial do endosperma). No momento de abscisão dos frutos derivados de autopolinização, o zigoto se encontra dormente, restringindo a possibilidade de expressão de alelos recessivos deletérios. Já o endosperma nesses frutos sofre divisões nucleares, sem sinais de malformação, ao passo que, em pistilos não polinizados, não há sinais de endospermogênese, assim como da formação do zigoto. Os dados indicam a autoincompatibilidade de ação tardia como a causa da autoesterilidade em *C. guianensis*, uma vez que em caso de depressão endogâmica de ação precoce se esperaria o aborto do fruto ao longo de todas as etapas do desenvolvimento (ou seja, ao longo de 12 meses), com algumas sementes derivadas de autofecundação eventualmente alcançando a maturidade.

REFERÊNCIAS

BIANCHI, Marta B; MEAGHER, Thomas R; GIBBS, Peter e. Do s genes or deleterious recessives control late-acting self-incompatibility in *Handroanthus heptaphyllus* (Bignoniaceae)? A diallel study with four full-sib progeny arrays. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 127, n. 6, p. 723-736, 23 fev. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcab031>.

BITTENCOURT jr., Nelson Sabino. Evidence for post-zygotic self-incompatibility in *Handroanthus impetiginosus* (Bignoniaceae). **Plant Reproduction**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 69-79, 16 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00497-017-0300-7>.

BITTENCOURT Jr., Nelson Sabino; SEMIR, João. Late-Acting Self-Incompatibility and Other Breeding Systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal Of Plant Sciences**, [S.L.], v. 166, n. 3, p. 493-506, maio 2005. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1086/428758>.

BITTENCOURT jr., Nelson Sabino; SEMIR, João. Floral biology and late-acting self-incompatibility in *Jacaranda racemosa* (Bignoniaceae). **Australian Journal Of Botany**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 315, 2006. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/bt04221>.

BITTENCOURT jr., Nelson Sabino; SEMIR, João. Pollination biology and breeding system of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae). **Plant Systematics And Evolution**, [S.L.], v. 247, n. 3-4, p. 241-254, 27 maio 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-004-0142-2>.

BITTENCOURT jr., Nelson Sabino; GIBBS, Peter E.; SEMIR, João. Histological Study of Post-pollination Events in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), a Species with Late-acting Self-incompatibility. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 91, n. 7, p. 827-834, 28 mar. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcg088>.

BITTENCOURT jr., Nelson Sabino; MORAES, Camila Ismael Giorgi. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae): a histological study of postpollination events. **Plant Systematics And Evolution**, [S.L.], v. 288, n. 1-2, p. 59-76, 4 jul. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-010-0313-2>.

BITTENCOURT jr., Nelson Sabino; PEREIRA, Eduardo João; SÃO-THIAGO, Paula de Souza; SEMIR, João. The reproductive biology of *Cybistax antisyphilitica* (Bignoniaceae), a characteristic tree of the South American savannah-like “Cerrado” vegetation. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology Of Plants**, [S.L.], v. 206, n. 10, p. 872-886, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2011.05.004>.

BITTENCOURT jr., Nelson Sabino; PEREIRA, Eduardo João; SÃO-THIAGO, Paula de Souza; SEMIR, João. The reproductive biology of *Cybistax antisyphilitica* (Bignoniaceae), a characteristic tree of the South American savannah-like “Cerrado” vegetation. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology Of Plants**,

[S.L.], v. 206, n. 10, p. 872-886, out. 2011. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2011.05.004>.

GANDOLPHI, Gabriel; BITTENCOURT, Nelson Sabino. Sistema reprodutivo do Ipê-Branco – *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 840-851, 2010.

GIBBS, Peter E. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, p. 125-136. 1990.

GIBBS, Peter E.; BIANCHI, Marta. Post-pollination Events in Species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with Late-acting Self-incompatibility. **Botanica Acta**, [S.L.], v. 106, n. 1, p. 64-71, fev. 1993. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1438-8677.1993.tb00339.x>.

GIBBS, P; BIANCHI, Marta B. Does Late-acting Self-incompatibility (LSI) Show Family Clustering? Two More Species of Bignoniaceae with LSI: *dolichandra cynanchoides* and *tabebuia nodosa*. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 84, n. 4, p. 449-457, out. 1999. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1999.0933>.

GIBBS, Peter E.; BIANCHI, M. B.; TARODA RANGA, N.. Effects of Self-, Chase and Mixed Self/Cross-pollinations on Pistil Longevity and Fruit Set in *Ceiba* Species (Bombacaceae) with Late-acting Self-incompatibility. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 94, n. 2, p. 305-310, 1 ago. 2004. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mch141>.

GIBBS, Peter E. Late-acting self-incompatibility – the pariah breeding system in flowering plants. **New Phytologist**, [S.L.], v. 203, n. 3, p. 717-734, 6 jun. 2014. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/nph.12874>.

GIBBS, Peter E.; SASSAKI, Regina. Reproductive Biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae-Papilionoideae) in SE Brazil: the effects of pistillate sorting on fruit-set. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 81, n. 6, p. 735-740, jun. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1998.0623>.

HAO, Yi-Qi *et al.* The Role of Late-Acting Self-Incompatibility and Early-Acting Inbreeding Depression in Governing Female Fertility in Monkshood, *Aconitum kusnezoffii*. **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 10, e47034, 9 out. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047034>.

HUANG, Ya-Yi; MORI, Scott A.; KELLY, Lawrence M.. Toward a phylogenetic-based Generic Classification of Neotropical Lecythidaceae—I. Status of *Bertholletia*, *Corythophora*, *Eschweilera* and *Lecythis*. **Phytotaxa**, [S.L.], v. 203, n. 2, p. 85, 23 mar. 2015. Magnolia Press. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.203.2.1>.

MCDOWELL, Emily M; TRUMP, Benjamin F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives Of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, n. 8, p. 405-414, 1976.

MONTEIRO-SCANAVACCA, Walkyria Rossi. Estudo de Placentação em Lecythidaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, [s. l.], v. 3, p. 75-85, 1975.

MORI, Scott Alan., E.A. KIERNAN, N.P. SMITH, L.M. KELLEY, Y-Y. HUANG, G.T. PRANCE & B. THIERS. Observations on the phytogeography of the Lecythidaceae clade (Brazil nut family). **Phytoneuron**, [S. l.], v. 2017, n. 30, p. 1-85, 2017.

MORI, Scott Alan. Lecythidaceae. In: BURLEY, Jeffery (ed.). **Encyclopedia of Forest Sciences**. [S. l.]: Elsevier, 2004. p. 1745-1752.

MORI, Scott Allan; PRANCE, Ghilleen T.; ZEEUW, Carl H. de. Lecythidaceae, Part 2. The Zygomorphic-Flowered New World Genera (*Couroupita*, *Corythophora*, *Bertholletia*, *Couratari*, *Eschweilera*, & *Lecythis*), With a Study of Secondary Xylem of Neotropical Lecythidaceae. **Flora Neotropica**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 1-373, 10 abr. 1990.

MORI, Scott Alan.; KALLUNKI, Jacquelyn A. Phenology and Floral Biology of *Gustavia superba* (Lecythidaceae) in Central Panama. **Biotropica**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 184, set. 1976. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2989684>.

MORI, Scott A.; TSOU, Chi-Hua; WU, Chi-Chih; CRONHOLM, Bodil; ANDERBERG, Arne A.. Evolution of Lecythidaceae with an Emphasis on the Circumscription of Neotropical Genera: Information from Combined ndhF and trnL-F Sequence Data. **American Journal Of Botany**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 289-301, mar. 2007.

MOTTA, Ana Carolina Isepan; BITTENCOURT, Nelson Sabino. Análise do desenvolvimento in situ de tubos polínicos em indivíduos autoestéreis de *Couroupita guianensis* Aubl. (Lecythidoideae, Lecythidaceae). In: 68º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA XXXVI JORNADA FLUMINENSE DE BOTÂNICA, 68., 2017, Rio de Janeiro. **Livro de resumos e programação**. Rio de Janeiro: Sociedade Botânica do Brasil, 2018. p. 80. Disponível em: <https://www.botanica.org.br/wp-content/uploads/Anais68CNBot.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2024.

MOTTA, Ana Carolina Isepan; BITTENCOURT, Nelson Sabino. *Couroupita guianensis* Aublet. (Lecythidoideae, Lecythidaceae): uma espécie autocompatível? In: XXVIII CIC - CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 28., 2016, São José do Rio Preto. **Anais do Congresso de Iniciação Científica da UNESP**. 2016. Disponível em: https://prope.unesp.br/cic_isbn/index.php?slcg=38&mn=1. Acesso em: 20 abr. 2024.

ORMOND, Wilma T.; PINHEIRO, Maria Celia B.; CASTELLS, Alicia R. Cortella de. A Contribution to the Floral Biology and Reproductive System of *Couroupita guianensis* Aubl. (Lecythidaceae). **Annals Of the Missouri Botanical Garden**, [S.L.], v. 68, n. 4, p. 514, 1981. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2398885>.

PRANCE, Ghilleen Tolmie; MORI, Scott Alan. Lecythidaceae. In: KUBITZKI, Klaus (ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants**: volume VI flowering plants dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. [S. L.]: Springer Nature, 2004. p. 221-231.

PRIMO, Luis Miguel; MACHADO, Isabel Cristina. A new case of late-acting self-incompatibility in Capparis L. (Brassicaceae): *C. jacobinae* Moric. ex Eichler, an endemic andromonoecious species of the caatinga, Pernambuco state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 764-768, set. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062009000300016>.

SAGE, Tammy L.; BERTIN, Robert I.; WILLIAMS, Elizabeth G.. Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. In: WILLIAMS, Elizabeth G.; CLARKE, Adrienne E.; KNOX, R. Bruce (ed.). **Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants**. [S. L.]: Advances In Cellular And Molecular Biology Of Plants, 1994. p. 116-140.

SAGE, Tammy L.; SAMPSON, F. Bruce. Evidence for Ovarian Self-incompatibility as a Cause of Self-sterility in the Relictual Woody Angiosperm, *Pseudowintera axillaris* (Winteraceae). **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 91, n. 7, p. 807-816, 3 abr. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcg085>.

SCHOENBERG, Maria Miranda. Carpologia de *Couroupita guianensis* Aublet (Lecythidaceae) I - Morfologia e classificação. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 12, n. 6, p. 43-77, 1983.

SCHOENBERG, Maria Miranda. Carpologia de *Couroupita guianensis* Aublet (Lecythidaceae) II - Anatomia. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 12, n. 6, p. 79-123, 1983.

SOUZA, Vinicius Castro; LORENZI, Harri. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG IV. 4. ed. Nova Odessa: Jardim Botânico Plantarum, 2019. 768 p.

STEEGE, Hans Ter *et al.* Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora. **Science**, [S.I.], v. 342, n. 6156, p. 325-342, 18 out. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1243092>.

SEAVEY, Steven R.; BAWA, Kamaljit S.. Late-Acting Self-Incompatibility in Angiosperms. **Botanical Review**, Bronx, v. 52, n. 2, p. 195-2019, abr-jun. 1986.

TSOU, Chih-Hua. The embryology, reproductive morphology, and systematics of Lecythidaceae. **Memoirs Of The New York Botanical Garden**, New York, v. 71, p. 11-110, 11 mar. 1994.

VALTUEÑA, Francisco J. *et al.* Self-sterility in two *Cytisus* species (Leguminosae, Papilionoideae) due to early-acting inbreeding depression. **American Journal Of Botany**, [S.L.], v. 97, n. 1, p. 123-135, jan. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.0800332>.

VARGAS, Oscar M.; DICK, Christopher W. Diversification History of Neotropical Lecythidaceae, an Ecologically Dominant Tree Family of Amazon Rain Forest. **Neotropical Diversification: Patterns and Processes**, [S.L.], p. 791-809, 2020. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-31167-4_29.

YE, Xiu-Lin; YEUNG, Edward; ZEE, Sze-Yong. Sperm movement during double fertilization of a flowering plant, *Phaius tankervilleae*. **Planta**, [S.L.], v. 215, n. 1, p. 60-66, 1 maio 2002. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00425-002-0736-2>.