

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Isabella Caroline Meira Pereira

**POLIMORFISMO FLORAL E SISTEMA REPRODUTIVO DA ERVA-BALEEIRA
(*Varronia curassavica* Jacq.) EM BANCO DE GERMOPLASMA**

Montes Claros

2018

Isabella Caroline Meira Pereira

Polimorfismo Floral e Sistema Reprodutivo em da Erva-Baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) Banco de Germoplasma

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Ernane Ronie Martins

Coorientadora: Rúbia Santos Fonseca

Montes Claros
Fevereiro de 2018.

Pereira, Isabella Caroline Meira.

P436p Polimorfismo Floral e Sistema Reprodutivo da Erva Baleeira (*Varronia*
2018 *curassavica* Jacq.) em Banco de Germoplasma / Isabella Caroline Meira
Pereira Montes Claros, MG: Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2018.

42 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal de
Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias, 2018.

Orientador: Prof. Ernane Ronie Martins.

Banca examinadora: Maria Olívia Mercadante Simões, Messulan
Rodrigues Lima, Rúbia Santos Fonseca.

Referências: f: 17-19; 38-42.

1. Boraginaceae. 2. Plantas Medicinais. I. Martins, Ernane Ronie. II.
Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.
III. Título.

CDU: 633.88

ISABELLA CAROLINE MEIRA PEREIRA

POLIMORFISMO FLORAL E SISTEMA REPRODUTIVO DA ERVA-BALEEIRA
(*Varronia curassavica* Jacq.) EM BANCO DE GERMOPLASMA

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa.Dra.Rúbia Santos Fonseca
ICA/UFMG

Dra.Messulan Rodrigues Meira
ICA/UFMG

Profa. Dra.Maria Olívia Mercadante Simões
UNIMONTES/ Montes Claros

Prof. Dr. Ernane Ronie Martins
ICA/UFMG

Montes Claros, 27 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Enfim se concretiza mais uma conquista! Em todos estes anos, muitos aprendizados e amadurecimentos aconteceram, questões se tornaram mais significáveis e compreensíveis. Mas, ao final, valeu a pena e, para que tudo se concluísse, tive o apoio e a compreensão de inúmeras pessoas. Agradeço a cada uma, que, por menor que tenha sido a ajuda, colaborou para o desfecho e realização desta obra. Assim, queria agradecer:

A Deus, que me guiou até o fim desta etapa, estando sempre ao meu lado e nunca me desamparando.

Ao professor Ernane pela oportunidade, orientação e apoio.

À professora Rúbia que, acima de tudo, acreditou na possibilidade de execução deste trabalho e me ajudou em toda a execução.

À professora Olívia pela oportunidade de executar uma parte dos trabalhos no LAV.

Ao meu companheiro e amigo Júlio César, pelo apoio incondicional em todos estes anos de lutas, estresses e alegrias.

À minha filha Alice, que me acompanha nesta caminhada de estudos desde a barriga e que é a minha principal fonte de motivação.

Aos meus pais, irmão e família que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Ao pessoal do herbário e LAV pela amizade e ajuda.

Aos colegas do Mestrado pelas conversas, apoio e amizade.

À Universidade Federal de Minas Gerais e, especialmente, ao Instituto de Ciências Agrárias, pela oportunidade de concluir o Mestrado.

Polimorfismo Floral e Sistema Reprodutivo da Erva-Baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) em Banco de Germoplasma

RESUMO

Varronia curassavica Jacq. é um arbusto nativo, com uso medicinal e caracterizado pela presença de um polimorfismo floral. Diante disso, objetivou-se investigar a biologia floral, a morfometria floral e o sistema reprodutivo de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. Foi descrita a biologia floral, dinâmica das inflorescências, caracterização morfométrica, calculado o índice de reciprocidade das flores, quantificação do número de grãos de pólen por morfo e viabilidade desses grãos e definição do sistema reprodutivo. Foram realizados os testes de polinização: polinização natural (controle), autopolinização espontânea e manual, apomixia, polinização cruzada intermorfos (cruzamento legítimo) e polinização cruzada intramorfos (cruzamento ilegítimo). A análise morfométrica demonstrou a presença de quatro morfos distintos, divididos em duas categorias de tamanho: 1) Longistila Grande (LG), 2) Brevistila Grande (BG), 3) Longistila Pequena (LP) e 4) Brevistila Pequena (BP). Foi observada reciprocidade dentro das duas categorias de tamanho, confirmando a herostilia. O número de grãos de pólen foi menor nas flores LG (1627), em que se diferenciou significativamente das demais, enquanto a menor viabilidade polínica foi observada nas flores LP (82%), que se distinguiram das demais. A abertura floral se inicia pela manhã com maior receptividade estigmática até as 11 h. *V. curassavica* é não apomítica, alógama obrigatória e dependente de polinizadores para a frutificação para os morfos LG, LP e BP, no entanto o morfo floral BG rompeu as barreiras da autoincompatibilidade e incompatibilidade heteromórfica. O sucesso reprodutivo da polinização natural foi acima de 20% nas flores LG, BG, LP (21-27%), enquanto BP apresentou frutificação média de 11%. Na autopolinização manual, apenas o morfo BG (21%) apresentou frutificação. As polinizações legítimas formaram frutos com os morfos longistilo e brevistilo atuando como doador e receptor de pólen. Foi observada frutificação média de 23% nos morfos de categoria pequena (LPxBP e BPxLP) e 53% nos de categoria grande (LGxBG e BGxLG). No teste dos cruzamentos ilegítimos entre as categorias, foi observada formação de frutos apenas, quando os morfos de categoria grande atuaram como progenitor feminino e os pequenos como progenitor masculino (LGxLP 14%) e BGxBP (23%). Esses resultados mostram que há flexibilização da compatibilidade diferenciada entre morfos, permitindo a proposição de distintos cruzamentos entre populações de interesse.

Palavras-chave: Boraginaceae, distília, domesticação, incompatibilidade.

Floral polymorphism and Reproductive System of Weed Baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) in genebank

ABSTRACT

Varronia curassavica Jacq., is a native shrub with medicinal use and characterized by the presence of a floral polymorphism. The objective of this study was to investigate floral biology, floral morphometry and the reproductive system of *Varronia curassavica* Jacq. in a germplasm bank in the north of Minas Gerais. The floral biology, inflorescence dynamics, calculated morphometric characterization, reciprocity index of flowers, quantification of the number of pollen grains by morphology and viability of these grains, and definition of the reproductive system. Pollination tests were carried out: natural pollination (control), spontaneous and manual self-pollination, apomixia, intermorphs cross-pollination (legitimate crossing) and intra-morphic cross-pollination (illegitimate crossing). The morphometric analysis demonstrated the presence of four distinct morphs, divided into two size categories: 1) *Longistila Grande* (LG), 2) *Brevistila Grande* (BG), 3) *Longistila Pequena* (LP) and 4) *Brevistila Pequena* (BP). Reciprocity was observed within the two size categories, confirming herostilia. The number of pollen grains was lower in the LG flowers (1627), which differed significantly from the others, whereas the lower pollen viability was observed in the LP flowers (82%), which distinguished themselves from the others. The floral opening begins in the morning with greater receptivity stigmatic until 11 o'clock. *V. curassavica* is non apomic, allogama obligatory and dependent on pollinators for fruiting for morphos LG, LP and BP, however the floral morph BG broke the barriers of autoincompatibility and heteromorphic incompatibility. The reproductive success of natural pollination was over 20% in flowers LG, BG, LP (21-27%), while BP presented an average fruit yield of 11%. In manual self-pollination only the BG morph (21%) presented fruiting. The legitimate pollinations formed fruits with longistil and brevistilo morphs acting as donor and recipient of pollen. An average fruiting of 23% was observed in small-sized morphs (LPxBP and BPxLP) and 53% in the large category (LGxBG and BGxLG). In the test of the illegitimate crosses between the categories fruit formation was observed only when the large category morphs acted as the female progenitor and the small ones as the male progenitor (LGxLP 14%) and BGxBP (23%). These results show that there is flexibility in the differentiated compatibility among morphs, allowing the proposition of different crosses between populations of interest.

Keywords: Boraginaceae, distilia, domestication, incompatibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Altura dos órgãos reprodutivos das flores de diferentes morfos florais de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. LG – Longistila Grande, BG – Brevistila Grande, LP – Longistila Pequena, BP – Brevistila Pequena. A) Altura do gineceu e androceu dos morfos florais da categoria grande, B) Altura do gineceu e androceu dos morfos florais da categoria pequeno..28

Figura 2: Inflorescências de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas. A) Padrão de inflorescências no início de abertura das flores (1ª avaliação); B) Inflorescência do morfo Brevistila Grande (BG) na 7ª semana de avaliação; C) Padrão de inflorescências na última semana de avaliação.....29

Figura 3: Dinâmica do desenvolvimento da inflorescência de *Varronia curassavica* Jacq. a) Flores Longistilas Grandes (LG); b) Flores Brevistilas Grandes (BG); c) Flores Longistilas Pequenas (LP); d) Flores Brevistilas Pequenas (BP).....31

Figura 4: Porcentagem de frutificação nos diferentes testes de polinização em *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. A: Polinização natural (PN); B: Autopolinização espontânea (AE); C: Autopolinização manual (AM); D: Cruzamento legítimo na categoria (CLC); E: Cruzamento legítimo entre categorias (CLeC); F: Cruzamento ilegítimo entre categorias (CleC). BG - brevistila grande, BP - brevistila pequena, LG- longistila grande, LP- longistila pequena. Os testes de apomixia (AP) e cruzamento ilegítimo na categoria (CIC) não apresentaram frutificação para nenhum dos morfos, por isso, não foram apresentados (Tabela 2).....34

Figura 5: Porcentagem de frutificação nos testes de polinização em diferentes morfos florais de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. A: Longistilas Grandes (LG); B: Brevistilas Grandes (BG); C: Longistilas Pequenas (LP); D: Brevistilas Pequenas (BP). PN= polinização natural, AE= autopolinização espontânea, AP= apomixia, AM= autopolinização manual, CLC= cruzamentos legítimos na categoria, CLeC= cruzamento legítimo entre categorias, CIC= cruzamento ilegítimo na categoria, CleC= cruzamento ilegítimo entre categorias.....35

LISTA DE TABELAS

TABELA I Atributos florais de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. Médias (mm) e desvio padrão dos morfos florais. LG – Longistila Grande, BG – Brevistila Grande, LP – Longistila Pequena, BP – Brevistila Pequena.....27

TABELA II Reciprocidade entre os elementos sexuais de flores brevistilas e longistilas de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. LG – Longistila Grande, BG – Brevistila Grande, LP – Longistila Pequena, BP – Brevistila Pequena. RA: índice de reciprocidade de órgãos recíprocos altos; RB: índice de reciprocidade de órgãos recíprocos baixos.....27

TABELA III Médias e desvio padrão da viabilidade polínica, produção de grãos de pólen, número de óvulos e relação pólen óvulo nos morfos florais de *Varronia curassavica* Jacq em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. LG – Longistila Grande, BG – Brevistila Grande, LP – Longistila Pequena, BP – Brevistila Pequena.....32

TABELA IV Sistema reprodutivo em *Varronia curassavica* Jacq., em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. LG – Longistila Grande, BG – Brevistila Grande, LP – Longistila Pequena, BP – Brevistila Pequena.....33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Erva-baleeira	13
3.2 Polimorfismo Floral.....	14
3.3 Sistema Reprodutivo	15
3.4 REFERÊNCIAS	17
4 ARTIGO.....	19
RESUMO	22
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1 Área de estudo	23
2.2 Morfometria floral e Hercogamia recíproca	23
2.3 Dinâmica das Inflorescências.....	24
2.5 Produção e viabilidade dos grãos de pólen	24
2.7 Sistema reprodutivo.....	25
3 RESULTADOS.....	26
3.1 Morfometria floral e Hercogamia recíproca	26
3.2 Biologia Floral.....	28
3.3 Dinâmica da Inflorescência	29
3.5 Sistema Reprodutivo	32
4 DISCUSSÃO	35

5 CONCLUSÃO	38
6 REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Dentre as plantas medicinais nativas com atividade terapêutica comprovada está *Varronia curassavica* Jacq. (= *Cordia verbenacea* DC). Essa espécie é amplamente distribuída, nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (FLORA, 2018) e popularmente conhecida como erva-baleeira (LORENZI; MATOS, 2008). *V. curassavica*, pertence à família Boraginaceae, é um arbusto perene que pode atingir 2,5 metros de altura, de folhas ásperas com odor forte e persistente (LORENZI; MATOS, 2008) e que apresenta flores distílicas. Vários compostos são encontrados, nas partes aéreas dessa planta, incluindo taninos, flavonoides e óleos essenciais (FERNANDES *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, acentuou-se o interesse e a revalorização mundial pelas plantas medicinais. O valor intrínseco de uma planta medicinal está em seu efeito terapêutico, o qual, por sua vez, é em razão dos princípios ativos resultantes, em sua maioria, do metabolismo secundário das plantas (KHANNA; SHUKLA, 1991). O Brasil se configura como um dos países com a maior biodiversidade do mundo, cada ecossistema brasileiro tem potencial para fornecer bioativos em potencial por sua flora (MEDEIROS *et al.*, 2013). Para o amplo uso dos recursos da flora nativa, são necessários a domesticação e o melhoramento dessas espécies. Para iniciar o processo de domesticação de uma espécie, é indispensável compreender a sua biologia reprodutiva, envolvendo a fenologia, a morfologia, biologia da flor, interação planta polinizador e o seu sistema reprodutivo (BAWA, 1990; DAFNI *et al.*, 2005; TECHIO *et al.*, 2006).

Dentre os principais determinantes do sucesso da polinização estão o período de receptividade estigmática, que é definido pela capacidade do estigma de garantir a germinação do grão de pólen e a viabilidade do grão de pólen (TECHIO *et al.*, 2006; FONSECA *et al.* 2013). As flores podem exibir mecanismos estruturais mais complexos de separação das funções sexuais para promover a polinização cruzada e o fluxo gênico, tais como a heterostilia (BARRETT, 1992).

Heterostilia é um polimorfismo floral genético, dessa forma, as populações são compostas por dois (distílica) ou três (tristílica) morfos que diferem reciprocamente nas alturas de estigmas e anteras (BARRETT, 1992). Espécies distílicas possuem indivíduos com flores de estilete longo e filetes curtos, conhecidos como longistilas, e indivíduos com flores de estilete curto e filetes longos, denominados brevistilas (BAHADUR, 1968). Os morfos florais diferem na altura dos estames e estigmas e têm reciprocidade entre as peças reprodutivas que apresentam incompatibilidade auto e intramorfo (SÁ *et al.*, 2016).

A heterostilia pode envolver um complexo de caracteres tanto morfológicos quanto fisiológicos e, comumente, mas não exclusivamente, a distílica está associada com o mecanismo de autoincompatibilidade (JUNG-MENDAÇOLLI *et al.*, 1995). Além das características morfológicas, a heterostilia apresenta mecanismo de incompatibilidade nos cruzamentos entre indivíduos do mesmo morfo que pode ser total ou parcial (LOPES *et al.*, 2005). Assim, as flores brevistilas e longistilas são compatíveis entre si, mas a polinização entre plantas da mesma forma é incompatível, isto é, grãos de pólen de plantas brevistilas são compatíveis com estigma das longistilas e vice-versa (GANDERS, 1979).

A importância medicinal, econômica e ecológica de espécies nativas brasileiras tem motivado o estudo, visando à preservação, à domesticação e ao uso racional. Todavia, qualquer estudo de

domesticação exige informações básicas sobre seus órgãos de reprodução, principalmente, sua morfologia, estrutura e funcionamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a biologia floral, a morfometria floral e o sistema reprodutivo de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfometricamente os diferentes morfos florais.
- Conhecer a viabilidade polínica dos morfos florais.
- Compreender a funcionalidade de cada morfo floral.
- Determinar a expressão do sistema de incompatibilidade heteromórfico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Erva-baleeira

Em meio às plantas medicinais com potencial para estudo, podemos destacar a erva baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.), uma das 71 espécies presentes na lista das plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2009). A família Boraginaceae abrange os gêneros *Coldenia* L., *Cordia* L. e *Varronia* P. Br., sendo nativas no Brasil somente espécies de *Cordia* L. e *Varronia* P. Br. (MILLER; GOTTSCHLING, 2007; GASPARINO; BARROS, 2009). A classificação botânica da erva baleeira é bem controversa, pela grande variação morfológica apresentada pelas espécies do gênero *Cordia* e *Varronia* (MILLER; GOTTSCHLING, 2007, MONTANARI JUNIOR, 2011). Atualmente, propõe-se nova classificação da espécie, saindo do gênero *Cordia* (*Cordia verbenacea* DC) para *Varronia* (*Varronia curassavica* Jacq).

Varronia curassavica é amplamente utilizada na medicina popular por possuir propriedades antirreumáticas, anti-inflamatórias, analgésicas e curativas (SERTIÉ *et al.*, 2005; PASSOS *et al.*, 2007). A espécie possui outros nomes populares, o que atesta seu emprego como planta medicinal por diversas populações, sendo erva-preta, maria-milagrosa, maria preta, camarinha e camaroneira do brejo (MONTANARI JUNIOR, 2011). Essa espécie é encontrada, naturalmente em quase todo o Brasil, sendo registrada para todas as regiões do país (REFLORA, 2018). Na mesorregião do Norte e Vale Jequitinhonha do estado de Minas Gerais há ocorrência da espécie em alguns municípios, inseridos no Cerrado e na Mata Atlântica (MENDES *et al.*, 2015). *V. curassavica* é tolerante a terrenos arenosos e úmidos, tendo preferência por áreas abertas e ensolaradas, mas é capaz de tolerar sombreamento (LORENZI; MATOS, 2008; MONTANARI JÚNIOR, 2011).

Aplicações do óleo essencial de *V. curassavica* vêm sendo amplamente pesquisadas. Estudos verificaram propriedades antigástricas (ROLDÃO *et al.* 2008), anti-inflamatórias (FERNANDES *et al.* 2007), antialérgicas (PASSOS *et al.* 2007) e antitumorais (PARISOTTO *et al.*, 2012). Além disso, o óleo essencial apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (MICHIELIN *et al.*, 2009) e fungicida contra *Candida albicans* e *Candida krusei* (RODRIGUES *etal.*, 2012). Em 2005, a empresa Aché Laboratórios Farmacêuticos lançou no mercado o primeiro medicamento com pesquisa e desenvolvimento inteiramente realizados no Brasil, o Acheflan®, droga anti-inflamatória produzida com o óleo essencial das folhas de *V. curassavica*, que contém entre 2,3 a 2,9% de α -humuleno e é indicada para o tratamento de tendinites crônicas e dores miofaciais (BRANDÃO *et al.*, 2006; QUISPE-CONDORI *et al.*, 2008). No Brasil, o produto é líder de prescrição médica para tendinites crônicas e dores musculares (DUTRA, 2016).

V. curassavica é um arbusto muito ramificado, atingindo 2,0 m de altura, com as extremidades dos ramos pendentes. Possui folhas simples, alternas, coriáceas, aromáticas, de 5 a 9 cm de comprimento (LORENZI; MATOS, 2008). Seu óleo essencial é biossintetizado e armazenado em tricomas glandulares globulares presentes nas folhas (VENTRELLA; MARINHO, 2008). As flores são brancas, dispostas em inflorescências tipo espiga, com florescimento e frutificação irregulares dentro da mesma inflorescência. (MONTANARI JÚNIOR, 2000). As flores são muito visitadas por insetos das ordens Coleoptera,

Hemiptera, Diptera e Hymenoptera (BRANDÃO *et al.*, 2015). Os frutos são drupas esféricas (LORENZI; MATOS, 2008), pequenos e avermelhados, comestíveis e muito procurados por pássaros de diversas espécies, que fazem a dispersão das sementes (MONTANARI JÚNIOR, 2011).

A erva-baleeira pode florescer em qualquer época do ano e seu florescimento e frutificação são irregulares, obtendo baixa frutificação (MONTANARI JÚNIOR, 2000). Essa espécie, nas restingas de Santa Catarina, apresentou no florescimento e frutificação com picos em fevereiro e março e entre agosto e novembro (HOELTGEBAUM; REIS, 2017). *V. curassavica* é hermafrodita e apresenta mecanismos de prevenção a autofecundação (TAISMA; WOLFGANG, 2005). A heterostilia presente na espécie torna necessária a polinização cruzada, demandando a ação de vetores de pólen à frutificação (BARRETT, 1992). Em pesquisas com populações nativas, essa espécie caracterizou-se como autotetraploide, com alta variabilidade genética, baixa divergência e sem índices de fixação significativos, indicando a ausência ou redução da endogamia (HOELTGEBAUM; REIS, 2017). Na determinação do sistema reprodutivo da erva baleeira, BRANDÃO *et al.*, (2015), com o uso da relação pólen/óvulo, classificou-a como alógama facultativa.

3.2 Polimorfismo Floral

Heterostilia é um polimorfismo floral controlado geneticamente, no qual as flores diferem reciprocamente nos comprimentos de estiletos e estames. Dentro da heterostilia, existem duas formas de manifestação desse polimorfismo, a tristilia e a distilia, sendo esta última a mais comum (26 famílias dentre as 28) (BARRETT, 2000). São chamadas de flores brevistilas aquelas que possuem, em geral, estilete curto, filetes longos, grãos de pólen grandes e papilas estigmáticas curtas, ao passo que flores longistilas são aquelas com estilete longo, filetes curtos, pólen de menor tamanho e papilas estigmáticas longas (BARRETT, 1992). Em uma população heterostílica, no geral, há ocorrência de proporção equilibrada de indivíduos dos morfos brevistilo e longistilo, isoplelia (BAHADUR, 1968; SÁ, 2016), pois o morfo brevistilo, comumente, apresenta o genótipo heterozigoto "Ss" e o morfo longistilo o genótipo homozigoto recessivo "ss", resultando assim em progênie "Ss" e "ss" (GANDERS, 1979).

Uma estratégia peculiar das plantas heterostílicas é a morfologia floral comum, com flores actinomórficas, pétalas abertas e a presença de um tubo floral restritivo com néctar na base (GANDERS, 1979). Os tubos florais podem desempenhar papel importante na garantia de polinização cruzada eficiente entre os morfos, afetando diretamente a deposição de pólen no corpo do polinizador (LLOYD; WEBB, 1992). Outras características secundárias podem ser identificadas, como tamanho e produção de grãos de pólen, tamanho da flor, tamanho do estigma, tamanho das papilas estigmáticas (VUILLEUMIER, 1967; DULBERGER, 1992; GASPARINO e BARROS, 2009) que influenciam a função reprodutiva das flores (DUARTE-SILVA *et al.*, 2010).

A caracterização detalhada do dimorfismo floral da espécie, assim como o comportamento reprodutivo dos morfos, faz-se necessária na definição de estratégias de seleção para realização de cruzamentos intra e interpopulacionais (FACANALI *et al.*, 2009) e intra e intermorfos, uma vez que a pressão seletiva do ambiente pode promover funcionalidade distinta dos morfos florais.

Dentre os fatores mais importantes, para o sucesso dos programas de melhoramento genético, destacam-se a seleção de genótipos e os cruzamentos. Compreender a biologia reprodutiva, que envolve a fenologia, a morfologia e a biologia da flor e o sistema reprodutivo da espécie em estudo se faz necessária para a sua domesticação e o melhoramento genético (DAFNI *et al.* 2005). A eficácia dos cruzamentos, tanto entre variedades e cultivares de uma espécie como entre espécies, depende diretamente da viabilidade do pólen, horário de polinização, receptividade do estigma e compatibilidade da flor (TECHIO *et al.* 2006).

Plantas não domesticadas apresentam ampla variabilidade genética, a qual se expressa produzindo plantas com teores variáveis de princípios ativos (MONTANARI JUNIOR, 2011), dessa forma, por meio da domesticação, é possível gerar variedades com diferentes teores de princípios ativos, além de criar um padrão entre os indivíduos, permitindo assim o uso racional das espécies medicinais.

3.3 Sistema Reprodutivo

A reprodução sexuada nas plantas aumenta a recombinação gênica, resultando em uma progênie superior; evita a homozigose e a expressão de genes recessivos deletérios e permite a divisão na alocação de recursos entre os indivíduos envolvidos no processo (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2014). Por outro lado, na reprodução sexuada, a mesma variabilidade gênica que gera indivíduos superiores pode, também, gerar aqueles inferiores; há dependência de agentes externos para polinização e gastos estruturais e fisiológicos, para otimizar este processo, envolve alternância de gerações, sendo um processo complexo e lento comparado à reprodução assexuada e apenas metade dos genes de cada parceiro será transmitida para a progênie (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2014).

A heterostilia pode envolver um complexo de caracteres morfológicos e fisiológicos e, comumente, a distília, que está associada com o mecanismo de autoincompatibilidade (JUNG-MENDAÇOLLI *et al.*, 1995). Essa incompatibilidade ocorre nos cruzamentos entre indivíduos do mesmo morfo, podendo ser total ou parcial (LOPES *et al.*, 2005). Desse modo, as flores brevistilas e longistilas são compatíveis entre si, mas a polinização entre plantas da mesma forma floral é incompatível, isto é, grãos de pólen de flores brevistilas são compatíveis com estigma das longistilas e vice-versa (GANDERS, 1979). A incompatibilidade heteromórfica opera por meio da incapacidade de cada classe de pólen (legítimo ou ilegítimo), para crescer em um tipo particular de estilete, permitindo o crescimento somente se a polinização cruzada for legítima, isto é entre morfos distintos (FERRERO *et al.*, 2011).

Um dos mecanismos pelos quais espécies heterostílicas aumentam a taxa de reprodução cruzada é a hercogamia entre as partes sexuais, ou seja, a distância entre anteras e estigma dentro da mesma flor. Em indivíduos distílicos espera-se encontrar flores com estiletos altos (longistilas) e flores com estiletos baixos (brevistilas) e posicionamento recíproco das anteras e estigmas entre morfos, em que flores longistilas têm anteras baixas e flores brevistilas têm anteras altas (WEBB; LLOYD 1986; COELHO, 2013). Essa hercogamia entre as peças reprodutivas dentro da flor pode se apresentar em diferentes graus, mas espera-se a reciprocidade entre os morfos (SÁNCHEZ *et al.*, 2008). A reciprocidade perfeita, em uma população, é alcançada quando as anteras de um morfo estão posicionadas ao mesmo nível que os estigmas do outro. Tradicionalmente, a hercogamia recíproca

entre os morfos foi considerada como a condição necessária e suficiente para caracterizar a planta como heterostílica (SÁNCHEZ *et al.*, 2008). É esperado que a reciprocidade, na altura dos elementos florais de cada um dos níveis, favoreça a dispersão direcional de grãos de pólen das anteras de um morfo para os estigmas do outro (GANDERS, 1979; BARRETT *et al.*, 1998) (FERRERO *et al.*, 2011). A prevenção da autopolinização e a maximização da polinização legítima são as principais forças seletivas responsáveis pela reciprocidade na posição dos órgãos sexuais (LLOYD; WEBB, 1992; SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

3.4 REFERÊNCIAS

- BAHADUR, B. Pollen dimorphism in three heterostyled Rubiaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 7, p. 233-239, 1968.
- BARRETT, S.C.H. The evolution of mating strategies in flowering plants. **Trends in Plant Science**, v.3, p.335-341, 1998.
- BARRETT, S.C. H.; JESSON, L.K.; BAKER, A.M. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. **Annals of Botany**, v.85, p.253-265, 2000.
- BARRETT, S.C.H. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: BARRETT, S.C.H. (Ed.). **Evolution and function of heterostyly**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 1-24.
- BAWA, K. S. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. **Annual review of Ecology and Systematics**, v. 21, n. 1, p. 399-422, 1990.
- BRANDÃO, D. C. *et al.* Estudo fase III, duplo-cego, aleatório, comparativo para avaliar a eficácia e tolerabilidade da *Cordia verbenaceae* do diclofenacodietilamônio em pacientes portadores de contusões, entorses, traumas e lesões musculares, com início inferior a 24 horas. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 63, p. 408-415, 2006.
- BRANDÃO, D. S. *et al.* Biologia floral e sistema reprodutivo da erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 562-569, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Básica. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Brasília, DF, 2012. 151 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). (Cadernos de Atenção Básica, n. 31). Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/miolo_CAP_31.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2018.
- COELHO, C. P. **Sistema reprodutivo, distília e graus de reciprocidade em Rubiaceae arbustivas do sub-bosque de formações florestais do cerrado**. 2013. 175 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/13274/1/SistemaReprodutivoDistilia.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- DAFNI, A.; KEVAN, P.G.; HUSBAND, B.C. **Practical pollination biology**. Cambridge: Enviroquest, 2005. 590 p.
- DUARTE-SILVA, E. *et al.* Floral polymorphism in *Valeria nescandens* L.(Valerianaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 871-876, 2010.
- DULBERGER, R. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: BARRETT S.C. H. (Ed.). **Evolution and function of heterostyly**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 41-84.
- DUTRA, R.C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- FACANALI, R. *et al.* Biologia reprodutiva de populações de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p.141-146, 2009.
- FERNANDES, E. S. *et al.* Antiinflammatory effects of compounds alpha-humulene and trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v.569, n.3, p.228–236, 2007.
- FERRERO, V. *et al.* Unusual heterostyly: style dimorphism and self-incompatibility are not tightly associated in *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). **Annals of Botany**, v. 109, n. 3, p. 655-665, 2011.

FLORA do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 27 jan. 2018.

FONSECA, R. S.; CAMPOS, L. A. de O.; VIEIRA, M. F. Melittophily and ornithochory in *Tilesiabaccata* (Lf) Pruski: an Asteraceae of the Atlantic Forest understory with fleshy fruits. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 208, n. 5-6, p. 370-380, 2013.

GANDERS, F. R. The biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany**, v. 17, n. 4, p. 607-635, 1979.

GASPARINO, E. C.; BARROS, M. A. V. C. Palynotaxonomy of Cordiaceae (Boraginales) from São Paulo state. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, n. 1, p. 33-55, 2009.

HOELTGEBAUM, M. P.; REIS, M.S. dos. Genetic diversity and population structure of *Varronia curassavica*: a medicinal polyploid species in a threatened ecosystem. **Journal of Heredity**, v. 108, n. 4, p. 415-423, 2017.

JUNG-MENDAÇOLLI, S.L.; MELHEM, T.S. Grãos de pólen de espécies heterostílicas de Rubiaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 18, p. 61-63, 1995.

KHANNA, K. R.; SHUKLA, S. Genetics of secondary plant products and breeding for their improved content and modified quality. In: KHANNA, K. R. **Biochemical aspects of crop improvement**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 283-323.

LLOYD, D. G.; WEBB, C. J. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. **New Zealand Journal of Botany**, v. 24, n. 1, p. 135-162, 1986.

LLOYD, D.; WEBB, C. Evolution and function of heterostyly. In: Barrett, S. C. H. (ed.). **Evolution and function of heterostyly**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 151-178.

LOPES, L.E. BUZATO, S. Biologia reprodutiva de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) e a abordagem de escalas ecológicas para a fenologia de floração e frutificação. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 4, p. 785-795, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. Erva baleeira. In: LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. p. 188.

MEDEIROS, P. M.de; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: amacro-scale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 729-746, 2013.

MENDES, A. D. R. *et al.* Ecogeografia de populações de erva-baleeira (*Varronia curassavica*) no Norte e Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 418-424, 2015.

MICHIELIN, E. M. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6615–6623, 2009.

MILLER, J. S.; GOTTSCHLING, M. Generic classification in the Cordiaceae (Boraginales): resurrection of the genus *Varronia* P. Br. **Táxon**, v. 56, n. 1, p. 163-169, 2007.

MONTANARI JUNIOR, I. Aspectos do cultivo comercial de erva baleeira. **Revista Agroecologia Hoje**, v. 3, n. 2, p. 14-15, 2000.

MONTANARI JÚNIOR, I. **Variabilidade genética em uma população de *Cordiaverbenacea* DC. para características agronômicas e fitoquímicas**. 2011. 77 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103292>>. Acesso em: 26 jan. 2018.

OLIVEIRA, P. E.; MARUYAMA, P. K. Sistemas Reprodutivos. In: RECH *et al.* **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Ceres Belchior, 2014, p.71-92.

- PARISOTTO, E. B. **Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto e supercrítico de *Cordia verbenacea***. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2010. Disponível em: <<http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/93837>>. Acesso em: 16 jan. 2018.
- PASSOS, G. F. *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, n. 2, p. 323-333, 2007.
- QUISPE-CONDORI, S. *et al.* Obtaining β -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, n. 1, p. 27-32, 2008.
- RODRIGUES, F. F.G.*et al.* Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 3, p. 161-165, 2012.
- ROLDÃO, E. F. *et al.* Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, n. 119, p. 94-98, 2008.
- SÁ, T. *et al.* Floral biology, reciprocal herkogamy and breeding system in four *Psychotria* species (Rubiaceae) in Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 182, p.689-707, 2016.
- SÁNCHEZ, J.M.; FERRERO, V.; NAVARRO, L. A new approach to the quantification of degree of reciprocity in distylous (sensulato) plant populations. **Annals of Botany**, v. 102, n. 3, p. 463-472, 2008.
- SERTIÉ J.A. A.*et al.* Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 338-344, 2005.
- TAISMA, M. A.; WOLFANG, V.C. Sistema de compatibilidaden la especie distílica *Cordia curassavica* (Jacq.) R&S (Boraginaceae). **Interciencia**, v.30, n. 7, p.431-435, 2005.
- TECHIO, V. H. *et al.* Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, n. 1, 2006.
- VENTRELLA, M. C.; MARINHO, C. R. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC.(Boraginaceae) leaves. **Brazilian Journal of Botany**, v. 31, n. 3, p. 457-467, 2008.
- VUILLEUMIER, B. S. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. **Evolution**, v. 21, n. 2, p. 210-226, 1967.

4 ARTIGO

ESTE ARTIGO FOI ELABORADO CONFORME AS NORMAS DO PERIÓDICO “ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS”.

**Polimorfismo Floral e Sistema Reprodutivo da Erva-Baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) em
banco de germoplasma**

**ISABELLA CAROLINE MEIRA PEREIRA¹, RÚBIA SANTOS FONSECA¹, MARIA OLÍVIA
MERCADANTES SIMÕES², ERNANE RONIE MARTINS¹**

¹ Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Universitária, Universitário, 1000, Montes Claros, MG, Brasil.

² Universidade Estadual de Montes Claros, Avenida Dr. Ruy Braga, S/N - Vila Mauriceia, Montes Claros - MG, Brasil.

Palavras-chave: Boraginaceae, distília, incompatibilidade, sucesso reprodutivo.

Polimorfismo Floral e Sistema Reprodutivo da Erva-Baleeira

Ciências Agrárias

Isabella Caroline Meira Pereira, Av. Universitária, Universitário, 1000, Montes Claros, MG, Brasil.

isabella.carol@hotmail.com

RESUMO

A distília é um polimorfismo floral caracterizado pela presença de dois tipos florais, que dependem da polinização com pólen de morfos distintos para a frutificação. Nas espécies distílicas, são observados morfos brevistilo e longistilo. *Varronia curassavica* Jacq. é um arbusto nativo com grande potencial medicinal. Diante disso, objetivou-se investigar o polimorfismo floral e o sistema reprodutivo de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. Foi descrita a biologia floral, dinâmica das inflorescências, caracterização morfométrica, calculado o índice de reciprocidade das flores, quantificação do número de grãos de pólen por morfo e a viabilidade desses grãos e definição do sistema reprodutivo. Foram realizados os testes de polinização: polinização natural (controle), autopolinização espontânea e manual, apomixia, polinização cruzada intermorfos (cruzamento legítimo) e polinização cruzada intramorfos (cruzamento ilegítimo). A análise morfométrica demonstrou a presença de quatro morfos distintos, divididos em duas categorias de tamanho: 1) Longistila Grande (LG), 2) Brevistila Grande (BG), 3) Longistila Pequena (LP) e 4) Brevistila Pequena (BP). Foi observada reciprocidade dentro das duas categorias de tamanho, confirmando a heterostilia. O número de grãos de pólen foi menor nas flores LG (1627), o qual se diferenciou significativamente das demais, enquanto a menor viabilidade polínica foi observada nas flores LP (82%), as quais se distinguiram das demais. A abertura floral se inicia pela manhã com maior receptividade estigmática até as 11 h. *V. curassavica* é não apomítica, alógama obrigatória e dependente de polinizadores para a frutificação para os morfos LG, LP e BP, no entanto o morfo floral BG rompeu as barreiras da autoincompatibilidade e incompatibilidade heteromórfica. O sucesso reprodutivo da polinização natural foi acima de 20% nas flores LG, BG, LP (21-27%), enquanto BP apresentou frutificação média de 11%. Na autopolinização manual, apenas o morfo BG (21%) apresentou frutificação. As polinizações legítimas formaram frutos com os morfos longistilo e brevistilo atuando como doador e receptor de pólen. Foi observada frutificação média de 23% nos morfos de categoria pequena (LPxBP e BPxLP) e 53% nos de categoria grande (LGxBG e BGxLG). No teste dos cruzamentos ilegítimos entre as categorias, foi observada formação de frutos apenas quando os morfos de categoria grande atuaram como mães e os pequenos como pais (LGxLP 14%) e BGxBP (23%). Esses resultados confirmam a flexibilização da compatibilidade diferenciada entre morfos, permitindo a proposição de distintos cruzamentos entre populações de interesse.

Palavras-chave: Boraginaceae, distília, incompatibilidade, sucesso reprodutivo.

1 INTRODUÇÃO

A distília é uma estratégia reprodutiva apresentada por 26 famílias de angiospermas (Barrett, 2002), definido por polimorfismo floral controlado geneticamente (Ganders, 1979), caracterizado pela separação espacial (hercogamia) entre a altura do estigma e das anteras das flores e a posição recíproca entre os diferentes morfos florais (Hamilton, 1990). Dessa forma, há plantas que produzem flores de estilete longo e filetes curtos, denominadas longistilas, e as que produzem flores de estilete curto e filetes longos, denominadas brevistilas (Bahadur, 1968). As espécies distílicas, geralmente, possuem sistema de incompatibilidade heteromórfica, com formação de frutos restrita aos cruzamentos intermorfos (Passos *et al.*, 1995; Barrett, 2002). A hercogamia recíproca pode promover fluxo direcional de pólen entre indivíduos de morfos diferentes, em função do local de deposição do grão de pólen no corpo do polinizador (Ferrero *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm gerado informações, a respeito da biologia reprodutiva de espécies heterostílicas, como os estudos com a família Boraginaceae (Ganders, 1976, 1979a; Cohen *et al.*, 2011, 2012, 2016; Ferrero *et al.*, 2009, 2011, Zang *et al.*, 2014; Jacquemy *et al.*, 2018). A compreensão da biologia reprodutiva, que envolve a morfologia, biologia floral e o sistema reprodutivo das espécies é indispensável para a seleção de indivíduos, o melhoramento e a domesticação da espécie (Dafni *et al.*, 2005; Techio *et al.*, 2006). Em razão do arranjo morfológico das flores de espécies distílicas, algumas

características entre os morfos florais (denominadas secundárias), frequentemente, podem ser observadas, quais sejam, o comprimento da corola e a produção polínica, o tamanho dos grãos de pólen, além de caracteres como arquitetura da exina desses grãos, morfologia do estigma e das papilas estigmáticas (Barrett, 1992; Gasparino e Barros, 2009), características que podem influenciar na funcionalidade dessas flores (Duarte-Silva *et al.*, 2010).

Dentre as plantas medicinais com atividade terapêutica comprovada, está *Varronia curassavica* Jacq. (Boraginaceae), espécie nativa do Brasil, amplamente distribuída nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Flora, 2018) e popularmente conhecida como erva-baleeira (Smith *et al.*, Dados não publicados). A espécie possui grande importância por apresentar várias classes de compostos químicos de interesse medicinal, como taninos, flavonoides e óleos essenciais (Fernandes *et al.*, 2007). É hermafrodita e heterostílica (Taisma e Wolfgang, 2005), mecanismo comum para diferentes gêneros de Boraginaceae (Opler *et al.*, 1975) e alógama facultativa (Brandão *et al.*, 2015).

O banco de germoplasma do ICA/UFMG, inicialmente, foi estabelecido com os acessos nativos de municípios de Minas Gerais, visto que, nesse período, não se observava frutificação nos acessos da coleção. Após alguns anos com a introdução dos acessos oriundos de São Paulo, foi observada a formação de frutos nos acessos de Minas Gerais. Em observações preliminares no banco de germoplasma, foi constatada a existência de flores com diferentes categorias de tamanho, caracterizando quatro morfos distintos. Os morfos de categoria de tamanho grande (Longistila Grande-LG e Brevistila Grande-BG) foram observados em plantas provenientes de São Paulo; os morfos de categoria de tamanho pequeno (Longistila Pequena-LP e Brevistila Pequena-BP) são procedentes de populações naturais de diferentes municípios de Minas Gerais. Diante disso, objetivou-se investigar o polimorfismo floral e o sistema reprodutivo de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O estudo foi conduzido na coleção de germoplasma de erva-baleeira do Horto Medicinal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), em Montes Claros - MG. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Aw, tropical quente úmido, com duas estações bem definidas, com verão quente e chuvoso e inverno frio e seco (Antunes, 1994).

Os indivíduos foram cultivados em fileiras com espaçamento de 1,00 m x 0,50 m entre plantas. Os acessos são provenientes dos municípios de Minas Gerais e de São Paulo. Os acessos nativos de São Paulo foram pré-selecionados e apresentavam flores de tamanho grande, as plantas nativas de Minas apresentam flores pequenas.

2.2 Morfometria floral e Hercogamia recíproca

Os caracteres florais foram avaliados em 25 flores de cada morfo. Foram medidas as variáveis: comprimento da flor fechada, do cálice, do gineceu, do estame, diâmetro e abertura da corola. Esses dados foram submetidos a testes de normalidade, transformações de dados e, posteriormente, à análise de variância, ANOVA ou Kruskal-Wallis, usando o software BioEstat 3.0.

Para o índice de reciprocidade (IR), foram efetuadas as medidas de altura de estilete de um morfo e a altura dos estames de outro morfo. Para o cálculo, foi usada a equação (Richards e Koptur, 1993):

$$IR = \frac{\text{altura das anteras de um morfo} - \text{altura do estigma do morfo oposto}}{\text{altura das anteras de um morfo} + \text{altura do estigma do morfo oposto}}$$

2.3 Dinâmica das Inflorescências

No período de outubro a dezembro, dez inflorescências de cada morfo floral foram acompanhadas, semanalmente, ao longo do período de produção de flores e frutos. Foram avaliados quantidade de botões, flores abertas, frutos imaturos e maduros por inflorescência.

2.4 Biologia Floral

Para a caracterização da biologia floral, foram acompanhados 10 botões florais de cada morfo da pré-antese à senescência das flores. Nesses botões, foram registrados o horário de abertura floral, definido pela separação dos lobos da corola; liberação de grãos de pólen, observação direta das anteras e visualização de pólen; coloração e abertura dos ramos dos estigmas e senescência floral, avaliadas pelas características de cor, brilho e turgidez da corola.

A receptividade estigmática foi verificada em 10 flores de cada morfo floral, após a abertura, com o uso do peróxido de hidrogênio a 6% a cada hora e observação do borbulhamento sobre a superfície estigmática (Kearns e Inouye, 1993).

2.5 Produção e viabilidade dos grãos de pólen

O número de grãos de pólen produzido foi quantificado em 50 flores por morfo, obtidas de 20 indivíduos distintos. Em cada flor, uma antera foi macerada sobre a lâmina e os grãos de pólen quantificados. O número de grãos de pólen por flor foi estimado multiplicando-se pelo número de anteras dessa flor.

Para a análise da viabilidade polínica, foram utilizados cinco botões florais provenientes de cinco indivíduos, totalizando vinte e cinco botões florais por morfo. Os botões florais foram estocados em etanol 70%. As lâminas foram confeccionadas, macerando-se as anteras em gota de carmim-acético (Rardfordet *al.*, 1974), seguida da contagem de 300 grãos de pólen por lâmina em microscópio ótico. Desta contagem, foi calculada a proporção de grãos de pólen viáveis em relação ao total. Os grãos de

pólen foram considerados viáveis quando totalmente corados e esféricos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias de cada morfo foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade utilizando o software BioEstat 3.0.

2.6 Razão pólen/óvulo

A razão pólen óvulo foi estimada com o uso de 25 flores de cada morfofloral. Nessas flores, foram contados os óvulos, por meio da dissecação do ovário em estereomicroscópio. A quantificação dos grãos de pólen foi realizada, em uma antera de cada flor, a partir da contagem direta do número de grãos de pólen por antera. A razão pólen/óvulo (Cruden, 1977) foi obtida a partir da equação:

$$\text{Relação P/O} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de grãos de pólen em uma antera} \times \text{n}^\circ \text{ de anteras}}{\text{n}^\circ \text{ de óvulos}}$$

2.7 Sistema reprodutivo

O sistema reprodutivo foi determinado por meio de testes de polinizações controladas. Para tanto, inflorescências, com flores receptoras de grãos de pólen, foram isoladas e identificadas. As inflorescências com as flores doadoras de pólen foram retiradas antes de iniciar a abertura das flores e mantidas em água durante a manhã da polinização. Foram realizados os testes (*sensu* Dafniet *al.*, 2005): 1) Autopolinização espontânea (AE - botões florais isolados da pré-antese à senescência); 2) Polinização aberta (PA- botões florais marcados e deixados expostos aos polinizadores); 3) Apomixia (AP - o ápice da botão floral foi cortado, removendo as anteras e o estigma - *sensu* Richards 1997-, seguido do isolamento das estruturas); 4) Autopolinização manual (AM - botões florais isolados e, no momento da antese flor polinizada com grãos de pólen provenientes do mesmo indivíduo) e 5) Polinização Cruzada.

A polinização cruzada foi realizada entre diferentes morfos e categorias de tamanho. Para todas as flores usadas nesse teste, no momento da pré-antese, foi realizada a remoção da corola e anteras, isolando o pistilo, a fim de evitar autopolinização. Essas flores foram isoladas e, posteriormente, polinizadas com pólen proveniente de diferentes plantas. Procedeu-se a 16 cruzamentos distintos, sendo realizados cruzamentos intermorfos (legítimos) e intramorfos (ilegítimos), os quais foram: Cruzamentos legítimos na categoria de tamanho (CLC) (1- LGxBG, 2- BGxLG, 3- LPxBP, 4- BPxLP); Cruzamentos legítimos entre categorias de tamanho (CLeC) (5- LGxBP, 6- BPxLG, 7- LPxBG, 8- BGxLP); Cruzamentos ilegítimos na categoria de tamanho (CIC) (9-LGxLG, 10- BGxBG, 11-LPxLP, 12- BPxBP); e Cruzamentos ilegítimos entre categorias de tamanho (CleC) (13-LGxLP, 14- LPxLG; 15- BGxBP, 16- BPxBG). Na expressão dos cruzamentos, o primeiro se trata do indivíduo receptor de pólen e o segundo do doador.

Foi calculado o "Índice de autoincompatibilidade" (IAI) pela divisão do percentual de frutificações provenientes de autopolinizações pelo percentual de frutificações oriundas de polinizações cruzadas (Bullock, 1985). Segundo esse índice, a autocompatibilidade é indicada para valores maiores ou iguais a 0,25.

Os dados dos cruzamentos foram submetidos ao teste de normalidade, os que seguiram essa premissa foram analisados com a ANOVA e teste post-hoc de Tukey. Os dados não paramétricos foram transformados, os que não seguiram a normalidade, após a transformação, foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis e teste post-hoc Student-Newman-Keuls, usando o software BioEstat 3.0.

3 RESULTADOS

3.1 Morfometria floral e Hercogamia recíproca

A análise morfométrica confirmou a existência de duas categorias de morfos, os grandes e pequenos, culminando em quatro morfos florais distintos: Longistila Grande (LG), Brevistila Grande (BG), Longistila Pequena (LP) e Brevistila Pequena (BP) (Tabela I).

Nos morfos da categoria grande, foram registradas as maiores médias nas variáveis analisadas, com exceção do comprimento do cálice, no qual LG e LP foram similares. A flor longistila grande apresentou maior comprimento total, comprimento do gineceu, diâmetro e abertura da corola. Nos morfos florais do mesmo tipo floral, mas categorias diferentes (LG e LP, BG e BP), constatou-se distinção significativa na corola e similaridade nos verticilos reprodutivos. Os maiores comprimentos do gineceu foram dos tipos florais longistilas, podendo observar que ocorreram diferenças nos morfos florais LG e LP e nos BG e BP. As maiores médias de comprimento do androceu foram dos tipos florais brevistilos. O morfo floral LP se destacou com o maior comprimento do cálice, diferenciando-se do morfo LG. As maiores médias de abertura da corola foram observadas entre os morfos florais de categoria grande e foram observadas diferenças significativas entre os mesmos tipos florais LG e LP e os BG e BP. Quanto ao diâmetro da corola, morfos da categoria grande apresentaram as maiores médias, tendo LG o maior diâmetro (Tabela I).

O cálculo do Índice de reciprocidade (IR) apontou menor valor na relação entre o estigma da flor longistila e as anteras da brevistila (IRA) do que entre estigma da brevistila e as anteras da longistila (IRB) para as duas categorias de tamanho. Os morfos florais de categoria grande obtiveram as menores médias (próximas de zero) constatando uma hercogamia perfeita. No morfo de categoria pequena, o IRB foi o maior valor observado (IRB= 0,10), porém próximo de zero, indicando presença de hercogamia recíproca (Tabela II).

TABELA I

Atributos florais de *Varroniacurassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. Médias (mm) e desvio padrão dos morfos florais. LG – Longistila Grande, BG – Brevistila Grande, LP – Longistila Pequena, BP – Brevistila Pequena.

Atributos Florais	Morfos Florais			
	LG** (mm)	BG (mm)	LP (mm)	BP (mm)
Comprimento da flor*	6,47±0,63a	6,07±0,63b	5,86±0,40bc	5,50±0,36c
Comprimento do gineceu**	5,33±0,77a	3,45±0,44b	4,53±0,61a	3,03±0,36b
Comprimento do estame**	3,99±0,52a	5,35±0,41b	3,99±0,46a	5,05±0,17b
Comprimento do cálice**	2,87±0,35a	3,06±0,47ab	3,18±0,37b	2,82±0,40a
Diâmetro da corola**	8,62±0,14a	8,39±0,87a	7,32±0,66b	7,27±0,60b
Abertura interna da corola**	2,00±0,21ab	2,10±0,23a	1,86±0,09b	1,58±0,14c

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa no Anova, seguido pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

**Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa no Kruskal Wallis, seguido pelo Teste de Dunn ($P < 0,05$).

TABELA II

Reciprocidade entre os elementos sexuais de flores brevistilas e longistilas de *Varroniacurassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. LG – Longistila Grande, BG – Brevistila Grande, LP – Longistila Pequena, BP – Brevistila Pequena. RA: índice de reciprocidade de órgãos recíprocos altos; RB: índice de reciprocidade de órgãos recíprocos baixos.

Reciprocidade	Morfos florais	
	Categoria Grande (LG/BG)	Categoria Pequena (LP/BP)
RA	0,0076	0,0718
RB	0,0495	0,1003

Os morfos da categoria grande detêm as maiores alturas dos órgãos sexuais das flores de *V. curassavica* (Figura 3). As flores de tipo floral longistila possuem a maior altura do gineceu com o morfo LG sobressaindo com 5,53 mm de altura. Por outro lado, os maiores comprimentos do androceu foram encontrados nas flores de tipo floral brevistilas com o morfo BG tendo a maior altura, 5,28 mm (Figura 1).

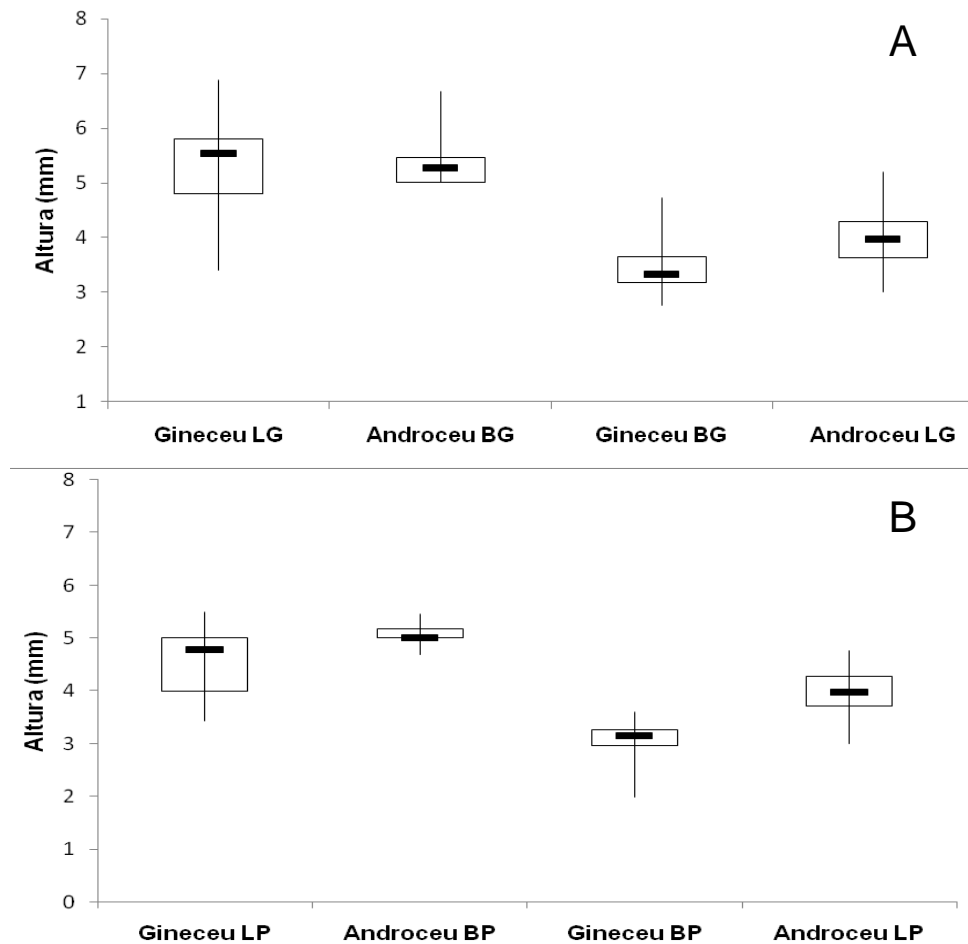


Figura 1 Altura dos órgãos reprodutivos das flores de diferentes morfos florais de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. LG – Longistila Grande, BG – Brevistila Grande, LP – Longistila Pequena, BP – Brevistila Pequena. A) Altura do gineceu e androceu dos morfos florais da categoria grande, B) Altura do gineceu e androceu dos morfos florais da categoria pequena.

3.2 Biologia Floral

As flores dos quatro morfos florais têm antese diurna, abrem-se entre 8h e 9h. No momento da abertura das flores, os ramos do estigma encontraram-se reunidos, centralizados e orientados para cima, nos morfos florais LG, BG e BP, a partir das 9h30min, os ramos começaram a se separar, maximizando a exposição da área estigmática. No morfo LP, os ramos se separam no momento da abertura floral.

Nas flores BG e LG, a corola permaneceu com coloração branca até as 16h, quando começou a apresentar tonalidade amarelada; a partir das 17h30min, a corola começou a murchar e apresentou aspecto senescente. Nas flores do morfo floral de categoria pequena, o amarelecimento da corola aconteceu previamente; a partir das 15h30min, foi possível visualizar flores amareladas e sem brilho, apresentando aspecto senescente às 17h. Após o murcharamento, a corola começou a desprender-se com facilidade. Com o anoitecer, a corola encontrou-se amarronzada.

As anteras dos quatro morfos florais se tornaram deiscentes, a partir da abertura das flores, com abundante liberação de pólen. A partir das 11h30min, as anteras começaram a amarelar, às 17h se

encontraram murchas e sem grãos de pólen. As anteras das flores do morfos de categoria pequena se encontraram murchas, a partir das 13h30min, adquirindo coloração marrom.

Não houve alteração de coloração na região estigmática ou no gineceu, que permaneceram esbranquiçados durante toda a antese. As flores dos quatro morfos apresentaram longevidade de um dia. No teste de receptividade estigmática, foi observado maior borbulhamento entre 9h e 11h, reduzindo após as 12 h.

3.3 Dinâmica da Inflorescência

Após a abertura das primeiras flores, as inflorescências apresentam tempo e vida de 7 a 8 semanas. Foi possível observar, ao longo do desenvolvimento da inflorescência, a presença simultânea de botões florais, flores abertas, frutos imaturos e maduros (Figura 1).

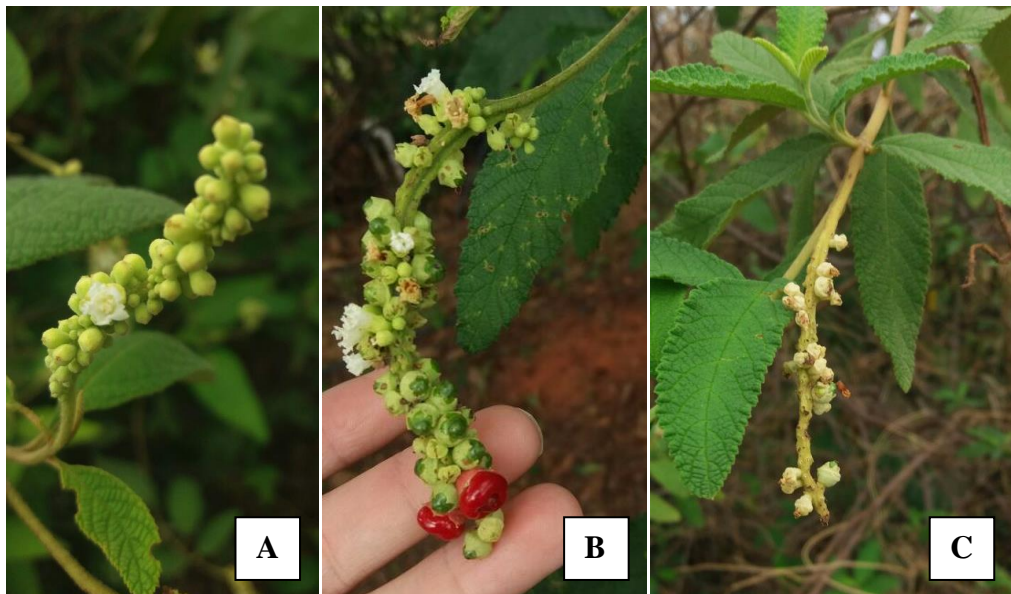


Figura 2: Inflorescências de *Varronia curassavica* Jacq. em banco de germoplasma no Norte de Minas. A) Padrão de inflorescência no início de abertura das flores (1ª avaliação); B) Inflorescência do morfo Brevistila Grande (BG) na 7ª semana de avaliação; C) Padrão de inflorescência na última semana de avaliação.

A quantidade de botões florais foi maior nas 1ª e 2ª semanas de avaliação para todos os morfos florais; os morfos LP e BP apresentaram maior número de botões simultaneamente, 187 e 139, respectivamente. Após a 3ª semana, ocorreu queda no número de botões florais, estendendo-se até o final das avaliações; os morfos brevistilos têm maior duração de botões, estendendo até a 7ª semana (Figura 2).

Com o início da abertura das primeiras flores (1ª semana), morfos florais LP e BP apresentaram a maior média de flores. O pico de flores abertas ocorreu na 4ª semana, a média diária de flores abertas foi nove em LP e oito em BP. Nos morfos LG e BG, o pico de flores ocorreu na 3ª semana, sendo a média de flores abertas por dia, sete e quatro, respectivamente. A abertura de flores foi verificada até a

6ª semana de avaliação nos morfos LG, BP e LP; no morfo BG, foram registradas flores até a 7ª semana (Figura 3).

A frutificação foi registrada, a partir da 2ª semana, indivíduos com morfos florais LG e BG apresentaram a maior média de frutos produzidos simultaneamente, 48 e 36, respectivamente. O pico de frutificação nos morfos LG e BG ocorreu na 5ª e 4ª semana, respectivamente. Nos morfos de categoria pequena, a média de frutos produzidos foi de 27 em LP e 21 em BP, com pequena variação de frutos no decorrer das semanas e pico de frutificação na 6ª semana (Figura 3).

Frutos maduros foram visualizados em poucas inflorescências; nos morfos longistilo foi observada maior média de frutos maduros, com dois frutos em LG e um fruto em LP. Nas plantas de morfo floral grande, já se visualizavam frutos maduros, na 6ª semana, enquanto, nos morfos pequenos, os frutos maduros foram observados na 8ª semana (Figura 3).

Com o decorrer das semanas, algumas inflorescências dispersaram frutos. Nas inflorescências de categoria grande, isso ocorreu, a partir da 6ª semana, com redução de 40% dos frutos e 60% na 7ª semana. Nos morfos florais da categoria pequena, a dispersão ocorreu, na 7ª semana, com redução de 30% dos frutos e, na 8ª, com redução de 40% (Figura 3).

3.4 Produção, Viabilidade do Grão de Pólen e Relação Pólen/Óvulo

O número médio de grãos de pólen por flor para a espécie foi 2471, no entanto a produção de grãos de pólen foi distinta entre os morfos florais ($F=11,70$, $p<0,001$). A menor média de grãos de pólen produzidos foi observada no morfo LG, no qual foi registrada a flor com o menor número de grãos de pólen, isto é, 480; enquanto a maior produtividade média foi registrada no morfo BG, que apresentou a flor com maior número de grãos de pólen, isto é, 5460. Ao analisar as categorias de tamanho, as flores grandes foram distintas entre si, enquanto as pequenas apresentaram número de grãos de pólen semelhantes. Dentro de cada tipo morfológico, foram observadas produtividades distintas entre as flores longistilas (LG e LP) e brevistilas (BG e BP) (Tabela III).

A viabilidade polínica média da espécie foi 89,21%, sendo observadas diferenças significativas entre morfos florais ($F=17,71$, $p<0,0001$). A maior viabilidade polínica foi observada nas flores BP e a menor nas LP. A flor que apresentou maior viabilidade foi pertencente ao morfo LG, com 99%, enquanto a menor viabilidade foi observada em flores LP, com 70% dos grãos corados. As viabilidades polínicas dos morfos LG, BG e BP foram semelhantes e se distinguiram significativamente do morfo LP (Tabela III). A relação pólen/óvulo sugere a xenogamia facultativa como sistema reprodutivo para todos os morfos-florais (Tabela III).

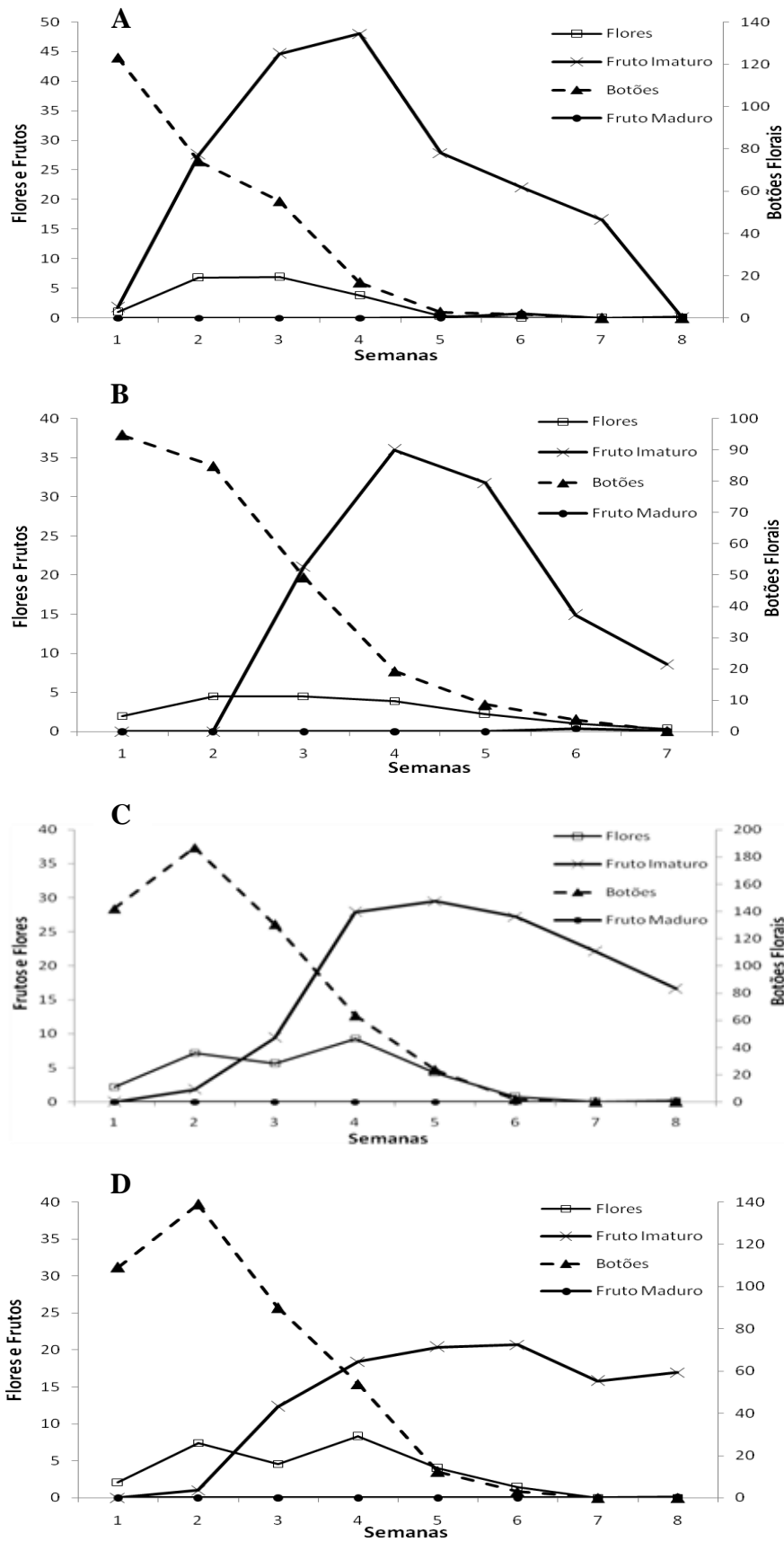


Figura 3: Dinâmica do desenvolvimento da inflorescência de *Varronia curassavica* Jacq. a) Flores Longistilas Grandes (LG); b) Flores Brevistilas Grandes (BG); c) Flores Longistilas Pequenas (LP); d) Flores Brevistilas Pequenas (BP).

TABELA III

Médias e desvio padrão da viabilidade polínica, produção de grãos de pólen, número de óvulos e relação pólen óvulo nos morfos florais de *Varronia curassavica* Jacq em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. LG – Longistila Grande, BG – Brevistila Grande, LP – Longistila Pequena, BP – Brevistila Pequena.

Morfos Florais	Produção grãos pólen	Viabilidade polínica (%)	Relação Pólen/óvulo
LG	1627,4 ± 890,0 a	91,2 ± 6,1 a	406,85
BG	3097,0 ± 1160,3 b	91,3 ± 4,7 a	774,25
LP	2794,0 ± 921,4 bc	82,0 ± 5,5 b	698,50
BP	2365,4 ± 694,7 c	92,2 ± 4,6 a	591,35

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os morfos florais. Para a produção de pólen, foi realizada Anova, seguido do Teste de Tukey, para a viabilidade polínica, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Teste de Dunn.

3.5 Sistema Reprodutivo

Varronia curassavica Jacq é não apomítica, predominantemente autoincompatível (IAI média=0,097), com hercogamia funcional confirmada pela baixa frutificação na autopolinização espontânea (Tabela IV, Figura 4). As elevadas frutificações nos cruzamentos legítimos, dentro da mesma categoria, em relação à apomixia, autopolinização espontânea e manual, demonstram a dependência de agentes polinizadores e da presença de morfos distintos para a manutenção da reprodução sexuada nas populações. Os tratamentos de autopolinização espontânea, apomixia, autopolinização manual e cruzamentos ilegítimos, dentro da mesma categoria, não se distinguiram entre os morfos, todos apresentando valores próximos de zero, confirmando o sistema de incompatibilidade heteromórfica para cada categoria de tamanho. No entanto foram observadas diferenças no sucesso reprodutivo para os demais tratamentos entre os morfos florais. O maior sucesso na polinização natural foi observado nos morfos longistilos, enquanto a menor frutificação ocorreu no morfo BP, que se diferenciou dos demais. Nos cruzamentos legítimos dentro da mesma categoria, foi observada frutificação cerca de duas vezes maior nos morfos de categoria grande em relação aos pequenos, com maior frutificação no morfo BG, que se distinguiu dos demais. Em relação aos cruzamentos legítimos entre categorias, foi observada maior produção de frutos nos morfos grandes, destacando-se o LG, enquanto a menor frutificação foi observada no BP, que se diferenciou dos demais morfos. Os cruzamentos ilegítimos foram distintos entre categorias, com frutificação ocorrendo apenas nos morfos grandes, demonstrando o rompimento a autoincompatibilidade intramorfo entre categorias pelos morfos LG e BG (Tabela IV, Figura 4).

Os morfos florais apresentaram respostas distintas em relação aos testes de polinização (Tabela IV, Figura 5). No geral, os morfos grandes apresentaram maior sucesso reprodutivo e compatibilidade com diferentes fontes de pólen que os morfos pequenos; o morfo BG apresentou os maiores valores e frutificação em maior número de testes. As distinções estão relacionadas à compatibilidade com pólen dos morfos grandes com pólen ilegítimo entre categorias de tamanho, além da autocompatibilidade. Em

relação ao IAI, os morfos LG, LP e BP são definidos como incompatíveis e, portanto, obrigatoriamente xenógamos, enquanto o morfo BG é autocompatível, com sistema reprodutivo misto, com frutos provenientes de autopolinizações e, predominantemente, polinizações cruzadas. Esses resultados demonstram o complexo sistema reprodutivo da erva-baleeira, com variações funcionais intramorfo.

TABELA IV

Sistema reprodutivo em *Varronia curassavica* Jacq., em banco de germoplasma no norte de Minas Gerais. LG – Longistila Grande, BG – Brevistila Grande, LP – Longistila Pequena, BP – Brevistila Pequena.

Testes de Polinização	Morfos florais: Porcentagem de frutificação (número de botões ou flores)				Valor do teste e significância
	LG**	BG	LP	BP	
Polinização Natural *	30,37 (1788) aA	20,84 (1514)aA	26,84 (2333)aA	11,64 (2133) bAC	H=11,26 P=0,01
Autopolinização Espontânea	0,82 (1902) aBC	1,21 (2143) aBD	0,29 (2196)aBC	0,36 (2245)aB	H=1,57 P=0,66
Apomixia	0,00 (71)B	0,00 (65)B	0,00 (77) BC	0,00 (71)B	Não houve frutificação
Autopolinização manual	1,81 (56)aBC	21,11 (53)aAD	1,25 (51)aBC	0,00 (56)aB	H= 3,28 P=0,34
Cruzamentos legítimos dentro da mesma categoria de tamanho (dados dispostos no morfo receptor de pólen) (LGXBG; BGXLG; LPxBP; BPxLP)	45,10 (51)abA	70,01 (57)bc	22,01 (55)aA	28,43 (59)aC	F=6,24 P=0,02
Cruzamentos legítimos entre categorias de tamanho (dados dispostos no morfo receptor de pólen) (dados dispostos no morfo receptor de pólen) (LGXBP; BGXLP; LPXBG; BPXLG)	54,74 (55)aA	22,56 (52)bA	10,21 (57)bcAC	1,58 (55)cAB	H=14,71 P=0,02
Cruzamentos ilegítimos dentro da mesma categoria (LGXLG; BGXBG; LPXLP; BPXBP)	0,00 (55)B	0,00 (53)B	0,00 (54) BC	0,00 (53)B	Não houve frutificação
Cruzamentos ilegítimos entre categorias (LGXLP; BGXBP; LPXLG; BPXBG)	15,57 (50) aAC	21,82(55)aA	0,00 (57) bBC	0,00 (52)bB	H=10,84 P=0,013
Valor do teste e significância	H= 59,80 P=0,00	H= 53,04 P=0,000	H= 38,11 P=0,000	H=19,21 P=0,007	IAI médio
Índice de autoincompatibilidade (IAI)	0,04	0,30	0,05	0,00	0,09

*Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas na frutificação de um teste de polinização entre os morfos florais ($p \leq 0,05$).

**Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas na frutificação entre os diferentes testes de polinização em um morfo floral.

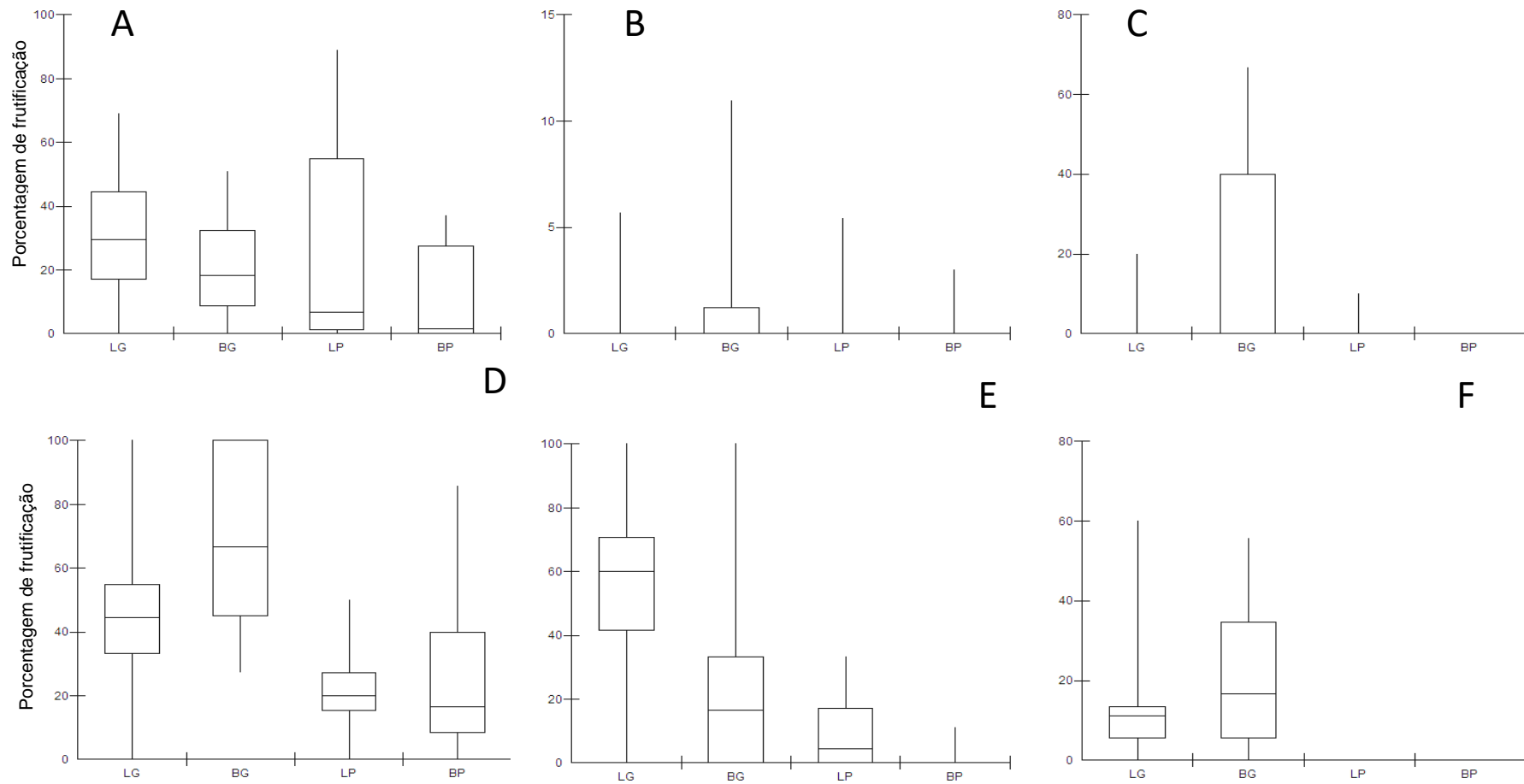


Figura 4: Porcentagem de frutificação nos diferentes testes de polinização em *Varronia curassavica* Jacq., em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. A: Polinização natural (PN); B: Autopolinização espontânea (AE); C: Autopolinização manual (AM); D: Cruzamento legítimo na categoria (CLC); E: Cruzamento legítimo entre categorias (CLeC); F: Cruzamento ilegítimo entre categorias (CleC). BG - brevistila grande, BP - brevistila pequena, LG- longistila grande, LP- longistila pequena. Os testes de apomixia (AP) e cruzamento ilegítimo na categoria (CIC) não apresentaram frutificação para nenhum dos morfos, por isso, não foram apresentados (Tabela 2).

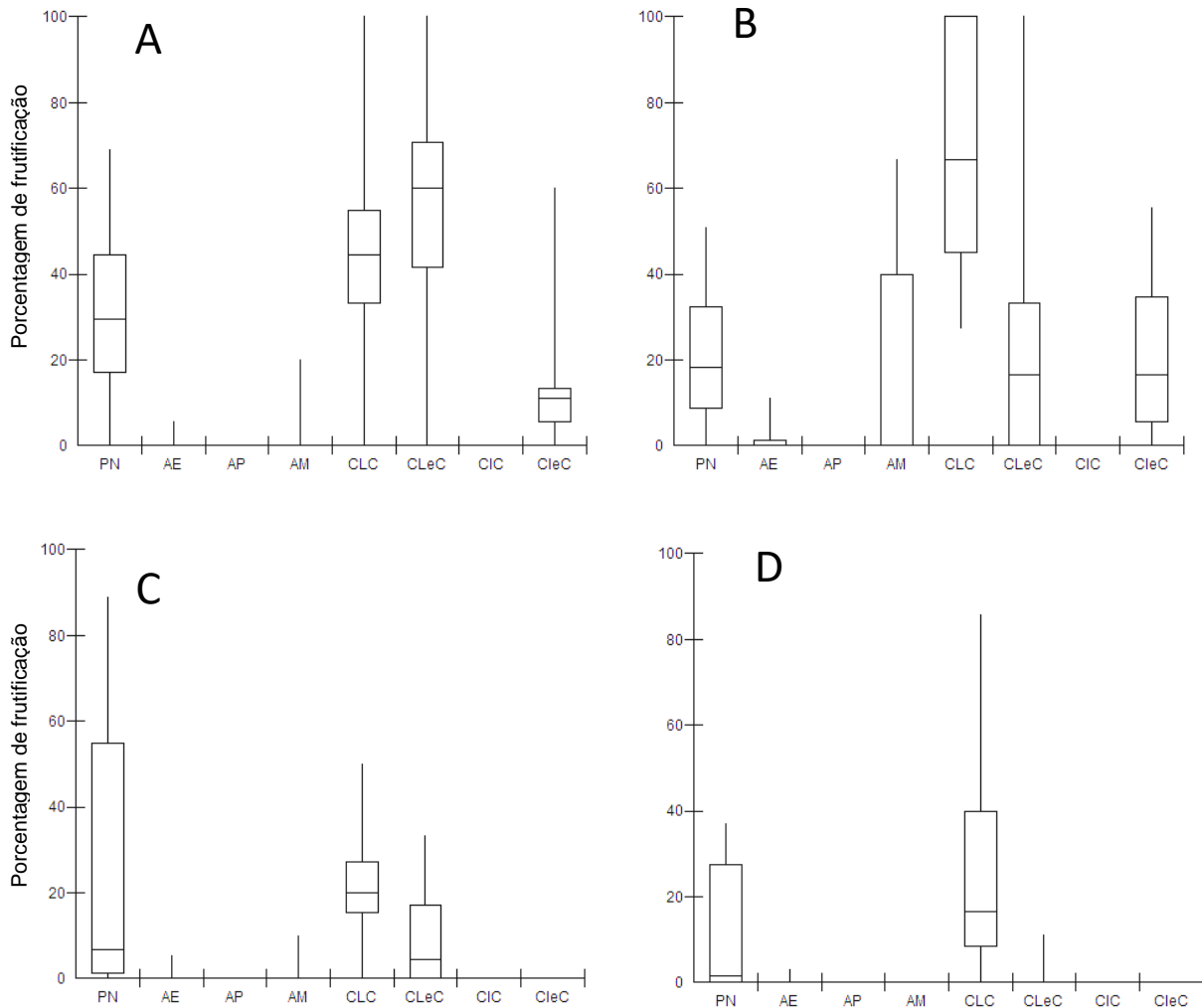


Figura 5: Porcentagem de frutificação nos testes de polinização em diferentes morfos florais de *Varronia curassavica* Jacq., em banco de germoplasma no Norte de Minas Gerais. A: Longistilas Grandes (LG); B: Brevistilas Grandes (BG); C: Longistilas Pequenas (LP); D: Brevistilas Pequenas (BP). PN= polinização natural, AE= autopolinização espontânea, AP= apomixia, AM= autopolinização manual, CLC= cruzamentos legítimos na categoria, CLeC= cruzamento legítimo entre categorias, CIC= cruzamento ilegítimo na categoria, CleC= cruzamento ilegítimo entre categorias.

4 DISCUSSÃO

Os dados das características morfológicas demonstram que as flores dos acessos da erva-baleeira, no banco de germoplasma, apresentam os polimorfismos básicos de espécies distílicas típicas, como o morfo longistila que tem a maior altura do órgão sexual feminino e o morfo brevistila possui a maior altura do órgão sexual masculino, além de variação no tamanho da abertura da corola e no tamanho do cálice. Estes resultados corroboram com os de Zang *et al.* (2014) com a espécie *Arnebia szechenyi* (Boraginaceae), os quais observaram que a altura do gineceu e a altura da androceu diferiram significativamente entre os morfos brevistilos e longistilos. Teixeira *et al.* (2004), em estudos da morfometria de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae), constataram diferença significativa em relação ao comprimento do estilete das flores brevistilas e a altura das anteras das flores longistilas, entretanto a relação entre o comprimento do estilete das flores longistilas e a altura das anteras das flores brevistilas apresentou diferença significativa. Novo *et al.* (2018), em estudo com a espécie *Guettarda*

platypoda (Rubiaceae), verificaram que dois morfos florais na população apresentaram diferença significativa na altura do estigma e posição similar de anteras em altura, indicando que o mecanismo presente é o dimorfismo estilar. Em espécies com dimorfismo estilar, as anteras permanecem, aproximadamente, na mesma altura em ambos os morfos e, em espécies distílicas, a altura da antera tende a ser recíproca para a do estigma do morfo oposto (Ferrero *et al.*, 2009, 2011).

O horário de abertura dos quatro morfo florais, isto é, entre as 8h e 9h, a senescência floral e a longevidade, observadas no presente estudo, já foram registradas para outras populações de erva-baleeira (Brandão *et al.* 2015; Hoeltgebaum, 2017) e são comuns para flores de Boraginaceae (Machado *et al.*, 2010). O horário de maior borbulhamento coincidiu com a elevada presença de visitantes florais e de disponibilidade de pólen. Dessa forma, recomenda-se que a polinização seja realizada, durante o período da manhã, entre 9 e 11h, nas semanas em que haja maior floração da planta. A realização de cruzamentos artificiais, sem o conhecimento da biologia floral, pode promover resultados incorretos quanto à capacidade de frutificação dos indivíduos (Fonseca *et al.*, 2013).

Quando se considera o maior número de botões florais de brevistilas, na inflorescência, com o número de frutos, constata-se que houve baixa frutificação. Brandão (2015) verificou que as inflorescências de *V. curassavica* apresentaram florescimento irregular e baixa frutificação, corroborando com os dados deste estudo. De acordo com (Smith *et al.*, Dados não publicados), a espécie pode florescer e frutificar em qualquer época do ano e de forma irregular.

O morfo BP apresentou porcentagem de frutificação menor que 30%, provavelmente, em razão da menor eficiência do agente polinizador em acessar o estigma, que se encontra no interior do tubo da corola, além disso, esse morfo apresenta a menor abertura da corola. A eficiência da transferência de pólen entre os morfos pode ser diferente pela interação entre a forma floral e o contato do polinizador com os órgãos reprodutivos (BARRET, 2004). Como a maioria das plantas heterostílicas, a espécie é adaptada para polinização, por agentes polinizadores de aparelho bucal tipo sugador e lambedor (principalmente, abelhas e borboletas), por possuir flores tubulares e actinomorfas (Sánchez *et al.*, 2008; Ferrero *et al.*, 2011), a limitação destes polinizadores pode ser um dos fatores que contribui para o elevado aborto de frutos observado no morfo BP. Diferenças na eficiência do polinizador e a conseqüente limitação de pólen, para um dos morfos, diminuem sua fecundidade (Eckert e Barrett, 1994; Arroyo e Dafni, 1995).

V. curassavica exibiu precisamente a correspondência recíproca na posição do estigma e antera, para as duas categorias de tamanho, que é a síndrome morfológica típica em espécies distílicas. Logo as flores possuem distília, com variação nas alturas de pistilos e estames entre os indivíduos dos diferentes morfos, sugerindo que a hercogamia recíproca é perfeita. Para Barrett (2004), a principal função da hercogamia recíproca é reduzir a interferência física entre anteras e estigmas, melhorando a fertilidade masculina. No geral, espécies distílicas e hercogâmicas apresentam sistema de polinização eficiente na troca de pólen intermorfo (Maruyama *et al.*, 2010; Novo, *et al.*, 2018). Essa reciprocidade de estigmas e anteras, como um dispositivo mecânico, para promover polinizações legítimas mediadas por insetos, reduziria o desperdício de pólen decorrente de polinizações ilegítimas ineficientes (Barrett, 1992).

A menor produtividade de pólen, nas flores LG (1627 grãos por flor), vai de encontro às observações de Zang *et al.* (2014), em estudo do polimorfismo floral de *Arnebia szechenyi*

(Boraginaceae), em que flores longistilas produziram, significativamente, mais grãos de pólen do que flores brevistilas. Por outro lado, nos morfos de categoria pequena, a maior quantidade de grãos de pólen foi observada no morfo LP. Com exceção do presente trabalho, algumas espécies de Boraginaceae, como *Amsinckia douglasiana* (Ganders, 1976), *Lithospermum californicum* (Dulberger, 1992) e *Pulmonaria obscura* (Olesen, 1979) têm flores de morfo floral longistilo, produzindo significativamente mais grãos de pólen do que flores do morfo brevistilo.

Segundo Franklin *et al.* (1995), a viabilidade polínica é fundamental para a análise da fertilidade do pólen, podendo auxiliar no desenvolvimento de programas de melhoramento genético (Dafni, 2005). No presente estudo, a viabilidade polínica de *V. curassavica* foi considerada alta (acima de 80%), sendo este, portanto um fator importante para a frutificação. Gasparino e Barros (2009), em estudos polínicos da família Boraginaceae, constataram que os grãos de pólen de flores brevistilas e longistilas são morfológicamente similares, porém flores brevistilas apresentam maior número de grãos de pólen inviáveis, divergindo dos resultados observados no presente trabalho, em que LP apresentou a maior porcentagem de grãos inviáveis (28%). Novo *et al.* (2018) observaram resultados similares, em que uma espécie distílica da família Rubiaceae apresentou viabilidade menor para as longistilas (80,4%). Coelho *et al.* (2004) verificaram alta viabilidade dos grãos de pólen (96%) em ambos os morfos florais de *Psychotria poeppigiana*. Teixeira *et al.* (2004), em espécies distílicas da família Rubiaceae, observaram produção e viabilidade de grãos de pólen de 98% e 97%, para flores brevistilas e longistilas, respectivamente. Os testes com corantes, tal como o realizado no presente estudo e na maior parte das pesquisas, embora sejam técnicas muito atrativas pela simplicidade e rapidez, mascaram ou superestimam a viabilidade polínica, sugerindo a realização de avaliações mais apuradas, como germinação *in vitro* para a aferição da vitalidade do grão de pólen (Munhoz *et al.* 2008).

A relação pólen/óvulo classificou a espécie como xenogâmica facultativa. Esse resultado corrobora com os encontrados por Hoeltgebaum (2017) e Brandão *et al.* (2015) para a mesma espécie. No entanto confronta os resultados do sistema reprodutivo que demonstram que apenas o morfo BG é xenogâmico facultativo, ou misto, enquanto os morfos LG, LP e BP apresentam sistema xenogamo obrigatório. O conflito entre os índices demonstram que diferentes métricas devem ser usadas na compreensão das estratégias reprodutivas das espécies de interesse.

O maior sucesso reprodutivo nas polinizações manuais intermorfos do tipo floral brevistila, em relação à polinização natural, pode ser explicado pela maior dificuldade de acesso do estigma desse morfo ao polinizador. A transferência de pólen de anteras mais altas (Brevistila), para estigmas mais altos (Longistila), é favorecida pela facilidade no contato por uma gama muito grande de visitantes, enquanto o contrário é dificultado, muitas vezes, pela morfologia floral (Pailler e Thompson, 1997). Um estudo de Keller *et al.* (2014) sobre transferência de pólen pode explicar esse fato. Ele constatou que as anteras brevistilas exportaram quase todo o pólen, para estigmas compatíveis (longistilas) e apenas pequena fração de pólen para estigmas incompatíveis (brevistila). As anteras longistilas, no entanto exportaram grande fração de pólen para estigmas incompatíveis (longistilas), assim, o pólen de flores brevistilas teve probabilidade maior de atingir um estigma recíproco (longistila) do que o pólen de flores longistilas.

A ausência ou baixa frutificação, nos testes de apomixia, autopolinização e polinização intramorfo, demonstram a dependência da atuação dos polinizadores para a reprodução sexuada. As flores de *V.*

curassavica são muito visitadas por insetos das ordens Coleoptera, Hemiptera, Diptera e Hymenoptera (Brandão *et al.*, 2015). Essa polinização generalista garante a frutificação, em ambiente de cultivo, como o local do presente estudo.

A compatibilidade observada, na autopolinização e nos cruzamentos ilegítimos no morfo BG, corrobora com os resultados de Taisma e Wolfgang (2005) que observaram na erva-baleeira formação de fruto no morfo brevistila (19%, $p < 0,01$) em polinizações intramorfos. No morfo floral BG, o índice de autoincompatibilidade (IAI) foi superior a 0,25 e, de acordo com Bullock (1985), o limite para se considerar uma espécie autoincompatível seria 0,25; assim, esse dado indica ocorrência de quebra de incompatibilidade heteromórfica para as plantas de morfo BG. O resultado do experimento de polinização com *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae) de Bryset *al.* (2008) revelou que, nos estigmas de ambos os morfos, quase 60% do pólen ilegítimo depositado conseguiram germinar, mostrando a quebra de incompatibilidade da espécie distílica. Resultados semelhantes com baixa formação de frutos em autopolinização e polinização cruzada ilegítima foram encontrados para outras espécies heterostílicas (Coelho, 2004; Sá, 2016). O sistema de incompatibilidade, nas espécies da família Boraginaceae, não é muito rigoroso (Olesen 1979; Richards e Mitchell 1990; Bryset *al.* 2008), apresentando flexibilidade diante de pressões ambientais, fato que pode estar ocorrendo com plantas de flores BG de *V. curassavica*.

Em *V. curassavica*, os padrões de cruzamentos foram desarmônicos, apesar da forte reciprocidade de estigmas e anteras. A quebra do mecanismo de incompatibilidade heteromórfica vem sendo associada a vários fatores, tais como ausência de polinizadores (Santos, 2002), desvios na proporção de morfos (Ganders, 1979) e ampliação da distribuição geográfica (Sobrevila *et al.* 1983).

5 CONCLUSÃO

- No banco de germoplasma de *V. curassavica* do ICA-UFMG, foi confirmada a distílica, com quatro morfos florais distintos, divididos nas categorias de tamanho grande e pequeno.
- As flores da erva-baleeira apresentaram longevidade de um dia, com maior liberação de grãos de pólen e receptividade estigmática pela manhã, horário sugerido para a realização das polinizações manuais.
- Os indivíduos do tipo floral brevistila exibiram maior porcentagem de grãos de pólen viáveis.
- *Varronia curassavica* exibe a hercogamia recíproca, favorecendo o cruzamento entre morfos da mesma categoria de tamanho.
- A espécie é não apomítica, classificada como xenógama facultativa, no entanto o morfo floral BG rompeu as barreiras da autoincompatibilidade e incompatibilidade heteromórfica.

6 REFERÊNCIAS

- ANTUNES FZ. 1994. Caracterização climática. Informe Agropecuário 17: p.15-19.
- ARROYO J, DAFNI A. 1995. Variations in habitat, season, flower traits and pollinators in dimorphic *Narcissus tazetta* L.(Amaryllidaceae) in Israel. New Phytol 129: 135-145.

- BAHADUR B. 1968. Pollen dimorphism in three heterostyled Rubiaceae. *Rev Palaeobot Palynol* 7: 233-239.
- BARRETT S. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. *Evolution and function of heterostyly* 1-29.
- BARRETT SC, RICHARDS JH. 1990. Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 35-61.
- BARRETT SCH, HARDER LD. 2004. The evolution of polymorphic sexual systems in daffodils (*Narcissus*). *New Phytol* 165:45-53.
- BARRETT SCH. 2002. Evolution of sex: The evolution of plant sexual diversity. *Nat Rev Genet* 3:274.
- BRANDÃO DS, MENDES ADR, SANTOS, RR, ROCHA SMG, LEITE GLD, MARTINS ER. 2015. Biologia floral e sistema reprodutivo da erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.). *Rev Bras PI Med* 17: 562-569.
- BRYNS R, JACQUEMYN H, HERMY M, BEECKMAN TOM. 2008. Pollen deposition rates and the functioning of distyly in the perennial *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Syst Evol.* 273:1-2.
- BULLOCK SH. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 17:287-301.
- COELHO CP, BARBOSA AAA. 2004. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. *Acta Bot Bras* 18: 481-489.
- COHEN JI, LITT A, DAVIS JI. 2012. Comparative floral development in *Lithospermum* (Boraginaceae) and implications for the evolution and development of heterostyly. *Am J Bot* 99:797-805.
- COHEN JI. 2011. A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of *Lithospermum* L. (Boraginaceae) and related taxa: evolutionary relationships and character evolution. *Cladistics* 27:559-580.
- COHEN JI. 2016. Floral evolution in *Lithospermum* (Boraginaceae): independent origins of similar flower types. *Bot J Linn Soc* 180:213-228.
- CRUDEN RW. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- DAFNI A, KEVAN, PG, HUSBAND BC. 2005. *Practical pollination biology*.
- DUARTE-SILVA E, VIEIRA MF, BITTENCOURT JR NS, GARCIA F C P. 2010. Floral polymorphism in *Valeriana scandens* L. (Valerianaceae). *Act Bot Bras* 24:871-876.
- DULBERGER R. 1992. Floral Polymorphisms and Their Functional Significance in the Heterostylous Syndrome. In: Barrett SCH (ed) *Evolution and Function of Heterostyly* p. 41-84.
- ECKERT CG, BARRETT SC. 1994. Inbreeding depression in partially self-fertilizing *Decodon verticillatus* (Lythraceae): population-genetic and experimental analyses. *Evolution* 48: 952-964.
- FAEGRI K, PIJL VDL. 1980. *The principles of pollination ecology*. 3.ed. New York: Pergamon Press, p. 244.
- FERNANDES ES, PASSOS GF, MEDEIROS R, DA CUNHA FM, FERREIRA J, CAMPOS M M, PIANOWSKI LF, CALIXTO JB. 2007. Antiinflammatory effects of compounds alpha-humulene and trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur J Pharmacol* 569:228-236.
- FERRERO V, ARROYO J, CASTRO S, NAVARRO L. 2011. Unusual heterostyly: style dimorphism and self-incompatibility are not tightly associated in *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Ann Bot* 109:655-665.

- FERRERO V, ARROYO J, VARGAS P, THOMPSON JD, NAVARRO L. 2009. Evolutionary transitions of style polymorphisms in *Lithodora* (Boraginaceae). *Perspect. Plant Ecol Evol Syst* 11:111-125.
- FLANKLIN FHC, LAWRENCE MJ, FLANKLIN-TONG VE. 1995. Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int Rev Cytol* 158:1-62.
- FLORA do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- FONSECA RS, DE OLIVEIRA CAMPOS L A, VIEIRA MF. 2013. Melittophily and ornithochory in *Tilesiabaccata* (Lf) Pruski: An Asteraceae of the Atlantic Forest understory with fleshy fruits. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 208: 370-380.
- GANDERS FR. 1976. Pollen flow in distylous populations of *Amsinckia* (Boraginaceae). *Can J Bot* 54: 2530-2535.
- GANDERS FR. 1979. The biology of heterostyly. *New Zel J Bot* 17: 607-635,
- GANDERS FR. 1979a. Heterostyly in *Lithospermum cobrense* (Boraginaceae). *Am. J. Bot.*:746-748.
- GASPARINO EC, BARROS MAVDC. 2009. Palynotaxonomy of Cordiaceae (Boraginales) from São Paulo state. *Braz J Bot* 55: 32-33.
- HAMILTON CW. 1990. Variation on a distylous Theme in Mesoamerican *Psychotria subgenus* *Psychotria* (Rubiaceae). *Mem. N. Y. Bot Gard* 55: 62-75.
- HOELTGEBAUM MP, REIS MF. 2017. Genetic Diversity and Population Structure of *Varronia curassavica*: A Medicinal Polyploid Species in a Threatened Ecosystem. *J Hered* 108:415-423.
- JACQUEMYN H, GIELEN M, BRYN R. 2018. Is sexual organ reciprocity related to legitimate pollen deposition in distylous *Pulmonaria* (Boraginaceae)? *Oikos*.
- KEARNS CA, INOUE DW. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado.
- KELLER B, THOMPSON JD, CONTI E. 2014. Heterostyly promotes disassortative pollination and reduces sexual interference in Darwin's primroses: evidence from experimental studies. *Funct Ecol* 28:1413-1425.
- MACHADO IC, LOPES AV, SAZIMA M. 2010. Contrasting bee pollination in two co-occurring distylic species of *Cordia* (Cordiaceae, Boraginales) in the Brazilian semi-arid Caatinga: generalist in *C. globosa* vs. specialist in *C. leucocephala*. *An Acad Bras Ciênc* 82:881-891.
- MARUYAMA PK, AMORIM FW, OLIVEIRA PE. 2010. Night and day service: Distyly and mixed pollination system in *Faramea cyanea* (Rubiaceae). *Flora* 205: 818–824.
- MUNHOZ M, LUZ CFP, MEISSNER FILHO PE, BARTH OM, REINERT F. 2008. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. *Rev Bras Bot* 31: 209-214.
- NOVO RR, CONSOLARO H, ALMEIDA NM, CASTRO CC. 2018. Floral biology of the velvet seed *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae): Atypical distyly or style dimorphism? *Flora* 239:62-70.
- OLESEN J M.1979. Floral morphology and pollen flow in the heterostylous species *Pulmonaria obscura* Dumort (Boraginaceae). *New Phytol* 82: 757-767.
- OPLER, PA, BAKER HG, FRANKIE, GW. 1975. Reproductive biology of some Costa Rican *Cordia* species (Boraginaceae). *Biotropica* 234-247.
- PAILLER T, THOMPSON JD. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertne ravaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *Am J Bot* 84: 315-327.
- PASSOS L, SAZIMA M. 1995. Reproductive biology of the distylous *Manettialuteo-rubra* (Rubiaceae).

Plant Biol 108:309-313.

RADFORD AE, DICKINSON WC, MASSEY JR, BELL CR. 1974. Vascular plant systematics. Harper & Row Publishers. New York.

RICHARDS AJ. 1997. Plant breeding systems. Allen and Unwin, London.

RICHARDS J H, KOPTUR S. 1993. Floral variation and distyly in *Guettardascabra* (Rubiaceae). Am J Bot 31-40.

SÁ T, FURTADO, MT, FERRERO V, PÉREZ-BARRALES R, RODRIGUES EB, SANTOS IG, CONSOLARO H. 2016. Floral biology, reciprocal herkogamy and breeding system in four *Psychotria* species (Rubiaceae) in Brazil. Bot J Linn Soc 182:689-707.

SÁNCHEZ JM, FERRERO V, NAVARRO L. 2008. A New Approach to the Quantification of Degree of Reciprocity in Distylous (*sensu lato*) Plant Populations. Ann Bot 102:463-472.

SANTOS IA dos. 2002. Flower-visiting bees and the breakdown of the tristylous breeding system of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). Biol J Linn Soc 77: 499-507.

SOBREVILA C, RAMIREZ N, ENRECH NX. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *P. petiolares* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. Biotropica 15:161-169.

TAISMA M A, WOLFANG VC. 2005. Sistema de compatibilidade da espécie distílica *Cordia curassavica* (Jacq.) R&S (Boraginaceae). Interciencia 30: 431-435.

TECHIO VH, CHAMMA DAVIDE L, PEDROZO CÂ, VANDER PEREIRA A. 2006. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). Acta Sci Biol 28.

TEIXEIRA LAG, MACHADO IC. 2004. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). Acta Bot Bras 18: 853-862.

ZHANG C, WANG L-L, LAN D, YANG Y-P, DUAN Y-W. 2014. Pollination Ecology of *Arnebia szechenyi* (Boraginaceae), a Chinese Endemic Perennial Characterized by Distyly and Heteromorphic Self-Incompatibility. Ann Bot Fenn 5:297-304.