



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



MARIANA OLIVEIRA DUARTE

**SEMENTES ABORTADAS OU ÓVULOS NÃO
FECUNDADOS?**

**INVESTIGAÇÃO DA POSSÍVEL OCORRÊNCIA DE DOIS SÍTIOS
DE AUTOINCOMPATIBILIDADE EM *ACIANTHERA*
(ORCHIDACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal.

BELO HORIZONTE – MG

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



MARIANA OLIVEIRA DUARTE

**SEMENTES ABORTADAS OU ÓVULOS NÃO
FECUNDADOS?**

**INVESTIGAÇÃO DA POSSÍVEL OCORRÊNCIA DE DOIS
SÍTIOS DE AUTOINCOMPATIBILIDADE EM *ACIANTHERA*
(ORCHIDACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientadora: Profa. Dra. Denise Maria Trombert Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE – MG

2020

043

Duarte, Mariana Oliveira.

Sementes abortadas ou óvulos não fecundados? Investigação da possível ocorrência de dois sítios de autoincompatibilidade em *Acianthera* (Orchidaceae) [manuscrito] / Mariana Oliveira Duarte. – 2020.

76 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba. Coorientadora: Profa. Dra. Denise Maria Trombert Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Morfologia vegetal. 2. Autoincompatibilidade em Angiospermas. 3. Tubo Polínico. I. Borba, Eduardo Leite. II. Oliveira, Denise Maria Trombert. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



UFMG

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
Universidade Federal de Minas Gerais
ICB - Departamento de Botânica

Tese defendida por Mariana Oliveira Duarte em 28 de fevereiro de 2020 e aprovada pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Dr. Eduardo Leite Borba (UFMG)

Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer (Universidade Estadual de Campinas)

Dra. Ana Paula de Souza Caetano (Universidade Federal de Mato Grosso)

Dra. Karina Proite (Pós doutora pela UFMG)

Dr. Adriano Valentin da Silva (Pós doutorando pela UFMG)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFMG, pela infraestrutura e apoio no desenvolvimento da tese.

À CAPES, pela bolsa concedida e ao CNPq, pelo financiamento do projeto de pesquisa (processo 430515/2016-2).

Ao meu orientador, prof. Dr. Eduardo L. Borba, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela confiança. Muito obrigada por todos os ensinamentos e valiosas discussões durante esses anos e, principalmente, por ter feito parte da minha formação acadêmica.

À minha coorientadora, profa. Dra. Denise M. T. Oliveira, por aceitar a parceria neste trabalho, por todo aprendizado, amizade e paciência. Agradeço as valiosas contribuições neste trabalho e na minha formação acadêmica.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG, pelo apoio técnico e de infraestrutura na realização das análises ultraestruturais.

Ao Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG, pelo empréstimo das coleções, e à Jacqueline Rodrigues, pelo auxílio e suporte.

Ao Instituto Estadual de Florestas, pela autorização das coletas (059/2018).

Aos membros da banca examinadora, por terem aceito o convite para colaborar com este trabalho.

À Cecília Fiorini e à Gabriela Lustre, pela amizade, companhia e ajuda no campo.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Botânica, especialmente aos professores Dr. Élder Paiva e Dr. João Batista, por todo aprendizado e exemplo de profissionalismo.

À Diana Sampaio e à Mariana Alves, amigas que me incentivaram a continuar na área acadêmica.

Aos amigos do Laboratório PlantSer: Adriano, Andrea, Camila, Carol, Gabriel,

Igor, Stéphanie e Victor, por terem me recebido com muito carinho e pela ótima convivência nesses quatro anos. Agradeço também aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal e de Sistemática Vegetal.

Aos amigos que fiz durante esse tempo em Belo Horizonte: Alberto, Alexandre, Cecília, David, Stéphanie, Daniela, Elaine, Gabriel, Igor, Ingrid, Jenny e Vagner, pela amizade e carinho. Em especial ao Igor e à Stéphanie por todo auxílio, ajuda e companhia.

Ao David Sanín, pelo companheirismo imprescindível e por sempre me motivar, deixando essa jornada mais leve.

Aos meus pais, Luciano e Maria Inês, e à minha irmã Carolina, por todo incentivo, por acreditarem nas minhas escolhas e pelo apoio incondicional. Dedico este trabalho a vocês.

A todos minha gratidão, por terem colaborado, direta ou indiretamente, para a realização desta tese.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	03
INTRODUÇÃO GERAL	05
Objetivo geral	08
Estrutura da tese e objetivos específicos.....	08
Referências.....	09
CAPÍTULO I - Ontogenesis of ovary and fruit of <i>Acianthera johannensis</i> (Pleurothallidinae, Orchidaceae) reveals a particular female embryology.....	13
Abstract.....	14
Introduction.....	14
Materials and methods	15
Results.....	15
Discussion.....	19
References.....	20
CAPÍTULO II - Ocorrência de dois sítios de autoincompatibilidade em <i>Acianthera</i> (Pleurothallidinae, Orchidaceae)	22
Resumo	24
Introdução	25
Material e métodos.....	28
Resultados.....	30
Discussão	33
Referências.....	36
Figuras	41
CAPÍTULO III - Evidências de óvulos abortados após a reação de autoincompatibilidade no ovário em <i>Acianthera</i> (Pleurothallidinae, Orchidaceae).....	49
Resumo	51
Introdução	52
Material e métodos.....	55
Resultados.....	57
Discussão	60
Referências.....	63
Tabela.....	69

Figuras	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

RESUMO

Pleurothallidinae (Orchidaceae) compreende *ca.* 4.100 espécies, caracterizadas por flores tipicamente miiófilas e autoincompatíveis. Nas espécies dessa subtribo, a reação de autoincompatibilidade ocorre principalmente no canal estilar, onde o crescimento dos tubos polínicos é interrompido. No entanto, em algumas espécies de *Acianthera*, em que a autoincompatibilidade é parcial, foram observados tubos polínicos irregulares e anômalos chegando ao ovário e presentes no fruto. Os frutos que chegaram à maturidade após autopolinizações continham elevada taxa de sementes sem embrião. Diante disso, foi sugerido que um sistema de autoincompatibilidade (SI), distinto daquele que opera na coluna, estaria atuando também no ovário dessas espécies de *Acianthera* com autoincompatibilidade parcial. Diante desse cenário, nosso objetivo foi investigar se um segundo sítio de reação estaria atuando no ovário e se esse mecanismo estaria relacionado ao elevado número de estruturas sem embrião encontrado em frutos resultantes de autopolinização em *Acianthera*. As espécies avaliadas foram *A. johannensis*, em que o SI atua parcialmente no ovário e, para se ter um referencial de uma espécie com SI forte, também analisamos *A. fabriobarrosii*. Os objetivos específicos deste estudo foram: caracterizar o desenvolvimento típico do ovário e fruto em *A. johannensis* após polinizações cruzadas (Capítulo I); investigar a ocorrência de reação de autoincompatibilidade no ovário em *A. johannensis* e comparar com *A. fabriobarrosii* (Capítulo II); e por fim, verificar se as estruturas sem embrião encontradas em frutos provenientes de autopolinização em *A. johannensis* são óvulos não fecundados ou sementes abortadas (Capítulo III). Conduzimos experimentos de polinizações cruzadas e autopolinizações, análises de microscopia de luz, epifluorescência e eletrônica de transmissão. Nossos resultados evidenciaram a presença de dois sítios de reações de autoincompatibilidade em *A. johannensis*, sendo mais comumente a reação na coluna, tal como foi observado em *A. fabriobarrosii*. Características morfológicas e citológicas dos tubos polínicos obstruídos na coluna indicaram a presença de um sistema de autoincompatibilidade gametofítico (GSI) nas duas espécies, sugerindo a presença de morte

celular programada nos tubos. Já o segundo sítio de reação ocorreu no ovário de alguns indivíduos semicompatíveis de *A. johannensis*. Os ovários resultantes de autopolinização em *A. johannensis* apresentaram menor proporção de óvulos fecundados quando comparados aos de polinização cruzada. No entanto, mais de 60% desses óvulos não fecundados estavam em processo de degeneração. De modo geral, nosso estudo demonstrou que a depressão endogâmica está associada ao elevado número de sementes sem embrião em frutos resultantes de autopolinizações em *A. johannensis* e que o GSI que atua no ovário está relacionado à maior proporção de óvulos não fecundados, devido à morte dos microgametófitos após a reação de autoincompatibilidade.

Palavras-chaves: depressão endogâmica, morte celular programada, óvulo degenerado, semente abortada, sistema de autoincompatibilidade gametofítico, ultraestrutura do tubo polínico.

ABSTRACT

Pleurothallidinae (Orchidaceae) with *ca.* 4.100 species, characterized by typically myophyllous and self-incompatible flowers. In the species of this subtribe, the self-incompatibility reaction occurs mainly in the stilar canal, where the growth of pollen tubes is interrupted. However, some species of *Acianthera* with partial self-incompatibility irregular and anomalous pollen tubes were observed reaching the ovary and in the fruit. The fruit that get maturity after self-pollination contained a high rate of seeds without embryos. Therefore, it has been suggested that a self-incompatibility system (SI), different from that operating in the column, would also be acting on the ovary of *Acianthera*'s species with partial self-incompatibility. In this scenario, our objective was to investigate if a second reaction site would be acting on the ovary and if this mechanism would be related to the high number of structures without embryos found in the fruit after self-pollination in *Acianthera*. The evaluated species were *A. johannensis*, in which SI acts partially on the ovary and, to have a reference for a species with strong SI, we also analyzed *A. fabriobarrosii*. The specific objectives of this study were: to characterize the typical development of the ovary and fruit in *A. johannensis* after cross-pollination (Chapter I); to investigate the occurrence of a self-incompatibility reaction in the ovary in *A. johannensis*, and compare with *A. fabriobarrosii* (Chapter II); and finally, to verify if structures without embryo found in fruits from self-pollination in *A. johannensis* are unfertilized ovules or aborted seeds (Chapter III). We conducted cross-pollination and self-pollination experiments, analysis of light microscopy, epifluorescence and transmission electronics. Our results evidenced the presence of two sites of self-incompatibility reactions in *A. johannensis*, most commonly observed the reaction in the column, as was observed in *A. fabriobarrosii*. Morphological and cytological characteristics of pollen tubes obstructed in the column indicated the presence of gametophytic self-incompatibility system (GSI) in both species, suggesting the presence of programmed cell death in the tubes. The second reaction site occurred in the ovary of some semicompatible individuals of *A. johannensis*. The ovaries resulting from self-pollination in *A. johanensis* presented low

proportion of fecundated ovules when compared with cross-pollination. However, more than 60% of unfertilized ovules were in the process of degeneration after self-pollination. Altogether, our study demonstrated that inbreeding depression is associated with the high number of seeds without embryos in fruit after self-pollination in *A. johannensis*, and that the GSI that acts on the ovary is related to a higher proportion of unfertilized ovule, due to the death of microgametophytes after the self-incompatibility reaction.

Keywords: aborted seed, degenerated ovule, gametophytic self-incompatibility system, inbreeding depression, pollen tube ultrastructure, programmed cell death.

INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae, uma das maiores famílias de angiospermas (*ca.* 20.000 espécies), apresenta alta diversidade na morfologia floral, a qual é altamente capaz de atrair diferentes polinizadores (van der Pijl & Dodsopn 1966; Dressler 1981, 1993; Catling & Catling 1991). Além disso, uma das características peculiares das orquídeas é a ocorrência do desenvolvimento dos óvulos somente após a polinização, uma vez que o ovário é rudimentar e a placenta não está diferenciada durante a antese (Swamy 1949; Clements 1999; Endress 2011; Kodahl *et al.* 2015), com raras exceções (Arekal & Karanth 1981; Wang *et al.* 2016). Após a polinização, o crescimento dos tubos polínicos no canal estilar induz a produção de auxina e etileno que estimulam a proliferação de células da placenta, diferenciação dos óvulos e desenvolvimento do pericarpo (Arditti 1979; Zhang & O'Neill 1993; Avadhani *et al.* 1994; Novak *et al.* 2014). Com isso, o período entre a polinização e o desenvolvimento das sementes pode ocorrer em um intervalo de tempo prolongado, o qual varia entre as espécies (Swamy 1949; Clements 1999; Mayer *et al.* 2011; Lee & Yeung 2012). Na subfamília Epidendroideae, por exemplo, o desenvolvimento de óvulos pode ocorrer entre 20 a 50 dias após a polinização, e a maturação do fruto pode levar até quatro meses (Stort 1972; Lee *et al.* 2008; Mayer *et al.* 2011).

Em relação ao sistema reprodutivo, as espécies de Orchidaceae são comumente autocompatíveis (Dressler 1981), entretanto a alogamia é comumente favorecida devido à presença de mecanismos que evitam a autopolinização, tais como barreiras morfológicas e comportamentais (Dressler 1981, 1993; Catling & Catling 1991; Borba & Semir 1999). No entanto, a depressão endogâmica é frequentemente registrada em casos de endogamia, em orquídeas autocompatíveis (Stort & Martins 1979; Borba & Braga 2003; Silva-Pereira *et al.* 2007; São Leão *et al.* 2019), levando ao aborto de zigotos e embriões devido à expressão de alelos recessivos deletérios em homozigose (Richards 1997). Embora a presença de barreiras pós-polinização, como o sistema de autoincompatibilidade (SI), seja menos frequente em Orchidaceae, este mecanismo tem sido relatado em espécies de Epidendroideae, sendo o sistema

reprodutivo predominante na subtribo Pleurothallidinae (Borba *et al.* 2001, 2011; Barbosa *et al.* 2009; Gontijo *et al.* 2010; Melo *et al.* 2011).

A subtribo Neotropical Pleurothallidinae (Epidendroideae) compreende aproximadamente 4.100 espécies, sendo caracterizadas por uma articulação entre o ovário e o pedicelo, e por flores tipicamente miiófilas (Luer 1986; Dressler 1981, 1993; Borba *et al.* 2011; Bogarín *et al.* 2018) e autoincompatíveis (Borba *et al.* 2011; Melo *et al.* 2011), exceto por um pequeno clado incluído em uma circunscrição expandida da subtribo (Pridgeon & Chase 2001). Embora o SI não tenha sido caracterizado geneticamente em nenhuma das espécies desta subtribo (ou mesmo na família), aspectos morfológicos e do desenvolvimento de grãos de pólen e tubos polínicos após autopolinizações foram utilizados para inferir o sistema de autoincompatibilidade atuando nessas espécies (Borba *et al.* 2001, 2011; Barbosa *et al.* 2009; Gontijo *et al.* 2010; Melo *et al.* 2011). Distintos sítios de ocorrência das reações de autoincompatibilidade foram indicados nas espécies de Pleurothallidinae: no estigma, com ausência de germinação dos grãos de pólen (similar ao observado no sistema de autoincompatibilidade esporofítico), no canal estilar, com morte dos tubos polínicos na coluna (similar ao sistema de autoincompatibilidade gametofítico) (Borba *et al.* 2011) e, raramente, no ovário (Borba *et al.* 2011; Millner *et al.*, 2015). Além disso, o sistema de autoincompatibilidade nesse grupo pode variar de completo a parcial, como observado em espécies de *Acianthera* (Borba *et al.* 2011).

O gênero *Acianthera* possui cerca de 200 espécies distribuídas por toda América do Sul (Pridgeon *et al.* 2005). Suas flores apresentam antese diurna e, frequentemente, odor desagradável, sendo polinizadas por espécies de Diptera (Borba & Semir 2001; Borba *et al.* 2011; Melo *et al.* 2011). Dentre as 11 espécies de *Acianthera* autoincompatíveis, cinco apresentaram autoincompatibilidade parcial, sendo registrada a média de 13% de frutificação após autopolinização (contra 44% em polinização cruzada) (Borba *et al.* 2001, 2011).

A reação de autoincompatibilidade em *Acianthera* ocorre comumente na coluna, onde os

tubos polínicos são interrompidos e apresentam morfologia anômala e irregular, elevada deposição de tampões de calose e intumescimento e rompimento do ápice, com liberação do citoplasma (Borba *et al.* 2001, 2011; Melo *et al.* 2011). Entretanto, em frutos maduros ou abortados provenientes de autopolinização em espécies com autoincompatibilidade parcial foi observado crescimento normal dos tubos polínicos ao longo da coluna, porém ao entrar no ovário eles tornavam-se irregulares e anômalos (Borba *et al.* 2001). Esses frutos apresentaram alta taxa de sementes sem embrião, comumente sugerida pela ação da depressão endogâmica (Borba *et al.* 2001, 2011).

Por outro lado, algum mecanismo de autoincompatibilidade que atua tardiamente no ovário poderia estar relacionado a esse baixo número de sementes com embrião, como sugerido por Borba *et al.* (2001). Conseqüentemente, as estruturas encontradas em frutos oriundos de autopolinização em *Acianthera* que não apresentam embrião desenvolvido poderiam ser apenas tegumentos de óvulos maduros que não foram fecundados, devido à morte dos microgametófitos. A distinção entre óvulos não fecundados e sementes abortadas pode ser de difícil detecção (Harder *et al.* 2012), uma vez que a diferenciação dos tegumentos de óvulos pode ser induzido pela ação de hormônios durante o desenvolvimento do fruto, como demonstrado experimentalmente para outras espécies de Orchidaceae (Arditti 1979; Avadhani *et al.* 1994) e de outras famílias (van Overbeek *et al.* 1941; Seavey *et al.* 2000).

Sendo assim, testamos a hipótese de que o elevado número de estruturas consideradas na literatura como sementes sem embrião em frutos após autopolinizações é devido à ocorrência de um sistema de autoincompatibilidade atuando tardiamente no ovário dessas espécies.

As predições relativas a esta hipótese são que:

(1) a presença de tubos polínicos irregulares e anômalos encontrados no ovário de algumas espécies de *Acianthera* após autopolinização é devida à reação tardia de um mecanismo de autoincompatibilidade;

(2) ocorre mais de um tipo de mecanismo de autoincompatibilidade nessas espécies;

(3) a morfologia dos tubos polínicos no ovário após autopolinização é diferente dos tubos polínicos que cessam o crescimento ainda no interior do canal estilar;

(4) as estruturas abortadas observadas em frutos de autopolinização são óvulos que não foram fecundados e não sementes abortadas;

(5) o desenvolvimento dos óvulos em flores autopolinizadas é diferente daqueles de flores em que houveram polinizações cruzadas.

Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de um sistema de autoincompatibilidade atuando no ovário e qual o seu papel no desenvolvimento dos frutos e sementes em *Acianthera*. Para isto investigamos *A. johannensis*, devido à presença da autoincompatibilidade parcial e maior frutificação em autopolinizações quando comparada com outras espécies (Borba *et al.* 2001, 2011). Além disso, analisamos os mesmos processos em *A. fabiobarrosii*, uma espécie com autoincompatibilidade forte (Borba *et al.* 2001, 2011), a fim de se ter um referencial do desenvolvimento típico dos tubos polínicos e desenvolvimento embrionário após polinizações experimentais.

Estrutura da tese e objetivos específicos

A tese está estruturada em três capítulos, os quais abordaram o objetivo geral e seus respectivos objetivos específicos. No primeiro capítulo caracterizamos o desenvolvimento dos óvulos e descrevemos o desenvolvimento do pericarpo e sementes em *Acianthera johannensis*, determinando o tempo entre a polinização e a formação da semente após polinizações cruzadas. No segundo capítulo investigamos a ocorrência de reação de autoincompatibilidade no ovário em flores autopolinizadas de *A. johannensis* e analisamos o desenvolvimento e a morfologia de tubos polínicos obstruídos na coluna e no ovário desta espécie, comparando com os tubos polínicos de *A. fabiobarrosii* após polinizações experimentais. No terceiro capítulo verificamos

se as estruturas consideradas sementes sem embrião de frutos resultantes de autopolinizações seriam óvulos não fecundados em *A. johannensis*, e avaliamos o sucesso de fecundação dos óvulos entre os tratamentos de polinizações. Além disso, analisamos o desenvolvimento do ovário e fruto após autopolinizações nesta espécie e comparamos aos de polinizações cruzadas de *A. fabriobarrosii*.

REFERÊNCIAS

- Arditti J. 1979. Aspects of the physiology of orchids. *Advances in Botanical Research* 7: 421–655.
- Arekal GD, Karanth A. 1981. The embryology of *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 138: 1–7.
- Avadhani PN, Nair H, Arditti J, Hew CS. 1994. Physiology of orchid flower. In: Arditti J. ed. *Orchid biology, review and perspectives VI*. Wiley-Interscience, New York, USA, pp 189–362.
- Barbosa AR, Melo MC, Borba EL. 2009. Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Systematics and Evolution* 283: 1–8.
- Bogarín D, Fernández M, Borkent A, Heemskerk A, Pupulin F, Ramírez S, Smets E, Gravendeel B. 2018. Pollination of *Trichosalpinx* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 186: 510–543.
- Borba EL, Semir J. 1999. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution* 217: 197–204.
- Borba EL, Braga PIS. 2003. Reproductive biology of *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melittophily and self-compatibility in a basal Laeliinae. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 541–549.
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* 88: 89–

- Borba EL, Semir J. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: A multiple population approach. *Annals of Botany* 88: 75–88.
- Borba EL, Barbosa AR, Melo MC, Gontijo SL, Oliveira HO. 2011. Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): Evolutionary and systematic implications. *Lankesteriana* 11: 207–221.
- Catling PM, Catling VR. 1991. A synopsis of breeding systems and pollination in north american orchids. *Lindleyana* 6:187–210.
- Clements MA. 1999. Embryology. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. eds. *Genera Orchidacearum- General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae*. Vol. I, Oxford University Press, Oxford, UK, pp 38–58.
- Dressler RL. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Dressler RL. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, Oregon, USA.
- Endress PK. 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany* 107: 1465–1489.
- Gontijo SL, Barbosa AR, Melo MC, Borba EL. 2010. Occurrence of different sites of self-incompatibility reaction in four *Anathallis* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Species Biology* 25: 129–135.
- Harder LD, Hobbhahn N, Richards SA. 2012. How depressed? Estimates of inbreeding effects during seed development depend on reproductive conditions. *Evolution* 66: 1375–1386.
- Kodahl N, Johansen BB, Rasmussen FN. 2015. The embryo sac of *Vanilla imperialis* (Orchidaceae) is six-nucleate, and double fertilization and formation of endosperm are not observed. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 202–213.
- Lee YI, Yeung EC, Lee N, Chung MC. 2008. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: Embryo development. *Botanical Studies* 49: 139–146.

- Lee YI, Yeung EC. 2012. Embryology of the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*: Ovule development. *Botanical Studies* 53: 97–104.
- Luer CA. 1986. Icones Pleurothallidarum I. Systematics of Pleurothallidinae. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 15: 1–81.
- Mayer JLS, Carmello-Guerreiro SM, Appezzato-da-Glória B. 2011. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Flora* 206: 601–609.
- Melo MC, Taucce PPG, Borba EL. 2011. Reproductive biology and isolation mechanisms in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 293: 161–176.
- Millner HJ, McCrea AR, Baldwin TC. 2015. An investigation of self-incompatibility within the genus *Restrepia*. *American Journal of Botany* 102: 487–494.
- Novak SD, Luna LJ, Gamage RN. 2014. Role of auxin in orchid development. *Plant Signaling & Behavior* 9: 10 e972277.
- Pridgeon AM, Chase MW. 2001. A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana* 16: 235–271.
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. 2005. Genera Orchidacearum, Epidendroideae (part one). Vol 4. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Richards AJ. 1997. Plant breeding systems. Chapman & Hall, London, UK.
- São Leão LC, Sá-Haiad B, Rodarte ATA, de Araujo Pimentel RR, Benevides CR, Santiago-Fernandes LDR, Lima HA. 2019. Reproductive biology of two synchronopatric neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). *Flora* 251: 95–104.
- Seavey SR, Mangels SK, Chappel NJ. 2000. Unfertilized ovules of *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) continue to grow in developing fruits. *American Journal of Botany* 87: 1765–1768.
- Silva-Pereira V, Camargo E, Smidt E, Borba EL. 2007. Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Systematic and Evolution* 269: 171–182.

- Stort MNS. 1972. Ovule development after pollination in *Eulophidium* Orchids. American Orchid Society Bulletin 23–28.
- Stort MNS, Martins PS. 1979. Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). *Ciência & Cultura* 38: 1080–1083.
- Swamy BGL. 1949. Embryological studies in the Orchidaceae II. Embryogeny. *The American Midland Naturalist* 41: 202–232.
- van der Pijl L, Dodson CH. 1966. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables, Florida, USA.
- van Overbeek J, Concklin ME, Blakelee AF. 1941. Chemical stimulation of ovule development and its possible relation to parthenogenesis. *American Journal of Botany* 28: 647–656.
- Wang LH, Tsay JS, Chi HS. 2016. Embryological studies on *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames. *Flora* 224: 191–202.
- Zhang XS, O'Neill SD. 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *Plant Cell* 5: 403–418.

CAPÍTULO I

Ontogenesis of ovary and fruit of *Acianthera johannensis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae) reveals a particular female embryology

Artigo publicado no periódico *Flora*, volume 259: 151462, ano 2019.



Ontogenesis of ovary and fruit of *Acianthera johannensis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae) reveals a particular female embryology

Mariana Oliveira Duarte*, Denise Maria Trombert Oliveira, Eduardo Leite Borba

Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Edited by Alessio Papini

Keywords:

Incomplete meiosis
Megasporogenesis
Megagametogenesis
Monosporic megagametophyte
Pericarp anatomy

ABSTRACT

We carried out an investigation on the female ontogenesis of *Acianthera johannensis*, a species with partial self-incompatibility, aiming to report the typical development of ovule and seed. We describe here the development of ovary and fruit after cross-pollination and record the time between pollination and seed formation. In this species, we verify the formation of triads of megaspores and five-nucleate megagametophytes, a very rare association in orchids. The species presents anatropous, tenuinucellate and bitegmic ovules, characters recorded for most of the orchids. Fertilization occurred 40 days after pollination, however some ovules were observed in early stages of development even in fully developed fruits. Our data indicate that unfertilized ovule can be found in mature fruits, reinforcing the hypothesis that these could be the structures often referred in the literature as seeds without embryos. This information is important to the following studies that aim to clarify the mechanism involved in the formation of structures without embryo observed in fruits developed after self-pollination and the nature of the complex mechanism of self-incompatibility in *Acianthera*.

1. Introduction

Flowers of Orchidaceae require pollination for the induction of ovule development since they are not yet differentiated during anthesis and only ovule primordia are present (Swamy, 1949a; Dressler, 1981; Clements, 1999; Endress, 2011; Kodahl et al., 2015), although some rare exceptions were recorded (Arekal and Karanth, 1981; Wang et al., 2016). This reproductive strategy guarantees the investment of energy in the differentiation of millions of ovules only in pollinated flowers (Swamy, 1949a). After pollination, pollen tubes grow along the stylar canal, producing auxin and ethylene, which stimulate placental cell proliferation and ovule differentiation and induce pericarp development (Wirth and Withner, 1959; Arditti, 1979; Zhang and O'Neill, 1993; Avadhani et al., 1994; Novak et al., 2014). In this way, the maturation of ovules and their subsequent fertilization take place after some weeks of fruit development have already occurred. The absence of endosperm at maturity is a typical feature of seeds of Orchidaceae (Swamy, 1949a; Arditti, 1979; Clements, 1999; Lee et al., 2008; Mayer et al., 2011; Yang and Lee, 2014; Kodahl et al., 2015; Chen et al., 2018).

Megasporogenesis and megagametogenesis in Orchidaceae exhibit some variation in the development of the megagametophyte, in which five to eight nuclei can be found at the end of the process (Swamy, 1949a; Abe, 1972a, 1972b; Johri et al., 1992). The most widely

reported type of megagametophyte development among orchids is the monosporic *Polygonum* type (Sharp, 1912; Swamy, 1949a; Abe, 1972a, 1977; Sood, 1988; Fredrikson, 1992; Johri et al., 1992; Mayer et al., 2011). This development involves the formation of megaspore tetrads and only the chalazal megaspore originates the eight-nucleated megagametophyte (Johri et al., 1992). In addition, the development of megaspore triads and a six-nucleated megagametophyte were observed in various species of the family (Swamy, 1949a; Maheshwari and Narayanaswamy, 1951; Law and Yeung, 1989; Gurudeva, 2011; Kodahl et al., 2015; Li et al., 2016). However, megagametophytes with five or seven nuclei have also been observed, albeit less frequently (Carlson, 1945; Swamy, 1949a; Abe, 1972a, 1972b, 1976). These variants are related to the reduction in the number of chalazal nuclei of the megagametophyte, either by their fusion or reabsorption, or by the suppression of mitotic divisions (Swamy, 1949a; Johri et al., 1992; Kodahl et al., 2015). This in turn alters the formation of antipodal cells during megagametophyte maturation.

Taking into account the number of species in the family (about 30,000 spp.), studies involving female ontogenesis in Orchidaceae are relatively few (about 95 studied species). Most of these are concentrated in the subfamily Epidendroideae (about 75%), scattered among species of different tribes, but especially Vandaeae and Cymbideae (Swamy, 1949a, 1949b; Abe, 1972a; Arekal and Karanth,

* Corresponding author.

E-mail addresses: marioliveiraduarte@gmail.com (M.O. Duarte), dmtoliveira@icb.ufmg.br (D.M.T. Oliveira), elborba@ufmg.br (E.L. Borba).

<https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.151462>

Received 28 February 2019; Received in revised form 15 July 2019; Accepted 26 July 2019

Available online 04 September 2019

0367-2530/© 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1981; Fredrikson, 1992; Zhang and O'Neill, 1993; Mayer et al., 2011; Li et al., 2016). The tribe Epidendreae encompasses approximately 25% of the species of Orchidaceae (Pridgeon et al., 2005), yet megagametogenesis has been characterized for only eight species belonging to the subtribes Laeliinae and Bletinae (Sharp, 1912; Cocucci and Jensen, 1969). Nothing is known about the embryology of Pleurothallidinae (Epidendreae), the largest subtribe of the family with approximately 4100 species.

Species of Pleurothallidinae are typically myophilous (pollinated by Diptera; Dressler, 1981; Christensen, 1994) and self-incompatible (Borba et al., 2001, 2011; Barbosa et al., 2009; Gontijo et al., 2010; Melo et al., 2011). These features are rare among orchids, which are predominantly mellitophilic and self-compatible (van der Pijl and Dodson, 1966; Dressler, 1981). The degree of self-incompatibility in this group can vary from complete (no fruit developed from self-pollination) to partial, as observed in some species of *Acianthera* with an average of about 10–15% of fruit set from self-pollination versus 40–60% in cross-pollination (Borba et al., 2011). In these species, the site of reaction of the self-incompatibility system is usually near the base of the column, where incompatible pollen tubes cease their development before penetrating the ovary (Borba et al., 2011). These characteristics are usually associated to gametophytic self-incompatibility (Richards, 1997). The eventual fruits originating from self-pollination, aborted or mature, possess a high percentage of seeds without a developed embryo (70–85% on average), which has often been explained as the result of inbreeding depression (Borba et al., 2001, 2011). However, Borba et al. (2001) noticed that the morphology of pollen tubes inside these fruits is different from that observed in fruits developed from cross-pollinations, and similar to pollen tubes in aborted self-pollinated flowers. From these observations, Borba et al. (2001) suggested that aborted fruits and the low number of seeds with embryos in mature selfed fruits could be the result of a self-incompatibility mechanism acting late in the ovary. Thus, the structures reported as seeds without embryos would be characterized as unfertilized ovules. In this case, the development of ovules could be stimulated by the action of auxins during the growth of pollen tubes (Arditti, 1979; Avadhani et al., 1994).

Given the complex framework of orchid embryology, in particular for self-incompatible species, prior characterization of embryology is necessary in order to understand the typical development of ovules and seeds in these species. Thus, we aimed to characterize the development of the ovary and fruit of *Acianthera johannensis* (Barb.Rodr.) Pridgeon & M.W.Chase (Pleurothallidinae), and determine the time that elapses between pollination and seed formation.

2. Materials and methods

Acianthera johannensis grows on rocky outcrops in campos rupestres in the state of Minas Gerais in southeastern Brazil (Borba and Semir, 2001). It flowers during the wet season from November to January (Borba and Semir, 2001). The flowers possess a 4-mm long inferior ovary (Fig. 1A–B). The fruits ripen three months after pollination at ca. 12 mm in length (Fig. 1C). The column possesses a stigmatic cavity, a rostellum and a pollinaria (Fig. 1D–E) with two pollinia (Fig. 1F). The species exhibits partial self-incompatibility with an average of 12% fruiting after self-pollination (versus 59% in cross-pollination). These selfed fruits have on average 20% (ranging 0% to 62%) of viable seed (versus 90% in cross-pollination) (Borba et al., 2001, 2011).

Fifty individual plants were collected from natural populations in the municipalities of Tiradentes, Carrancas and São Tomé das Letras in the state of Minas Gerais, Brazil. The plants were then cultivated in the greenhouse of the Departamento de Botânica at Universidade Federal de Minas Gerais to document flowering and perform experimental pollinations. A voucher specimen is deposited in the herbarium of the Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB) under number series E. L. Borba et al. 2230.

We performed experimental cross-pollinations in flowers during the first day of anthesis. Pollinia were obtained from flowers of different individuals of the same or different populations for deposition on the stigma ($n = 273$). The flowers were then monitored and collected after different intervals of days after pollination (DAP). In addition, some non-pollinated flowers were collected for analysis of the ovary prior to pollination. Flowers and fruits were collected at 7, 9, 15, 20 to 50, 52, 55, 58, 60, 70, and 90 DAP for analysis of ovule and ovary development. These intervals were based on previous observations to determine the time for seed development.

Samples were fixed in 37% formaldehyde, glacial acetic acid and 50% ethanol, 1:1:18 v/v (Johansen, 1940) for 48 h and then stored in 50% ethanol. The samples were then dehydrated in an ethanol series and embedded in (2-hydroxyethyl)-methacrylate Leica. We prepared longitudinal and transversal 4–5 μm thick sections using disposable blades and a Zeiss Hyrax M40 rotary microtome. The sections were stained with 0.05% toluidine blue in acetate buffer pH 4.7, staining that indicates lignification of the walls by a blue-green color (O'Brien et al., 1964; modified). The slides were then mounted with Entellan or distilled water, analyzed using an Olympus CX 41 light microscope and photographed with a digital camera. Histochemical tests for the detection of protein granules and neutral polysaccharides were performed for some fruits at 20 and 40 DAP using bromophenol blue (Mazia et al., 1953) and periodic acid Schiff (PAS) (O'Brien and McCully, 1981), respectively.

3. Results

3.1. Ovary prior to pollination

The ovary has three carpels composed of three fertile valves located in the ventral and placenta regions, and three sterile valves located in the dorsal region (Fig. 2A). The outer epidermis is uniseriate and with thin-walled cells (Fig. 2B) over multiple layers of polyhedral parenchyma cells in the mesophyll. The mesophyll has larger cells with intercellular spaces in the median portion and near the outer epidermis, and smaller juxtaposed cells near the inner epidermis (Fig. 2B–C). The number of cell layers in the mesophyll varies among the valves since there are more cell layers in fertile valves than in sterile valves due to the invagination of the placenta (Fig. 2B–E). Each valve has one vascular bundle located in the ovarian mesophyll (Fig. 2A–D), while there is no vasculature near the placenta (Fig. 2D). The inner epidermis comprises a single layer of small juxtaposed cells with thin walls (Fig. 2C–E). At this time the placenta has only ovule primordia (Fig. 2F).

3.2. Ovule development after pollination

After pollination the pollen tubes grow up along the stylar canal (Fig. 3A–B), while simultaneously the cells of the placenta proliferate by anticlinal mitotic divisions (Fig. 3C). Pollen tubes reach the base of the column on the seventh DAP, after which they spread to the placental lobes (Table 1). A single subepidermal somatic cell in the ovary differentiates into a sporogenous cell in the nucellus of each developing ovule (Fig. 3E). This cell directly differentiates into the megasporocyte, which is adjacent to the nucellar epidermis (Fig. 3F, Table 1). The pollen tubes remain near the placenta cells during this phase (Fig. 3D, Table 1).

Next, the inner integument and the outer integument start to differentiate (Fig. 3 E–F). The first phase of the meiotic division of the megasporocyte occurs after 25 DAP, originating a dyad of cells (Fig. 3G, Table 1). Next, the chalazal cell undergoes the second phase of meiosis, but the micropylar cell does not divide, thus forming a triad of megaspores (Fig. 3H). This process doubles the genetic material of the micropylar megaspore; the nuclear volume of the micropylar cell was observed to be larger than that of the degenerated adjacent megaspore

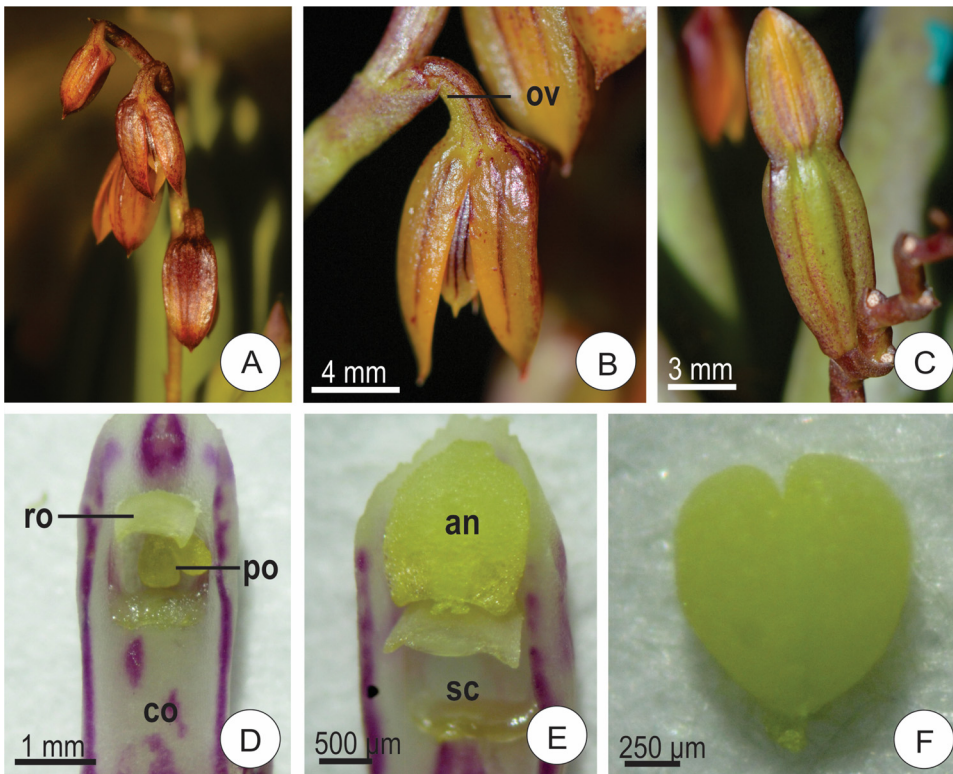


Fig. 1. Morphology of the flower and fruit of *Acianthera johannensis*. A–B. General view of the inflorescence and flower, respectively. C. Ripening fruit. D–F. Respectively, detail of the column, the anther above the stigmatic cavity and the two pollinia. an, anther; co, column; ov, ovary; po, pollinia; ro, rostellum; sc, stigma cavity.

(Fig. 3H–I). Only the chalazal megaspore is functional, thus characterizing ovule development as monosporic. Ovule development is not synchronized within the same fruit (Table 1).

The volume of the functional megaspore increases and the nucleus divides without cytokinesis, thus forming the binucleate megagametophyte (Figs. 3J, 4 A–B, Table 1). The integuments have already differentiated in this phase and are each composed of two cell layers (Fig. 3J). Four nucellar cells are present in the chalazal region until the

occurrence of fertilization (Fig. 4B). The second mitosis occurs in the megagametophyte, but only the micropylar nucleus forms two nuclei, and the chalazal nucleus does not divide. Therefore, a trinucleate megagametophyte is formed (Fig. 4C). The third mitosis also occurs only in the two micropylar nuclei and without cytokinesis, resulting in a five-nucleate megagametophyte (Fig. 4D). One nucleus from each pole then migrates to the center and cellularization occurs to form a mature megagametophyte with four cells: two synergids with the filiform

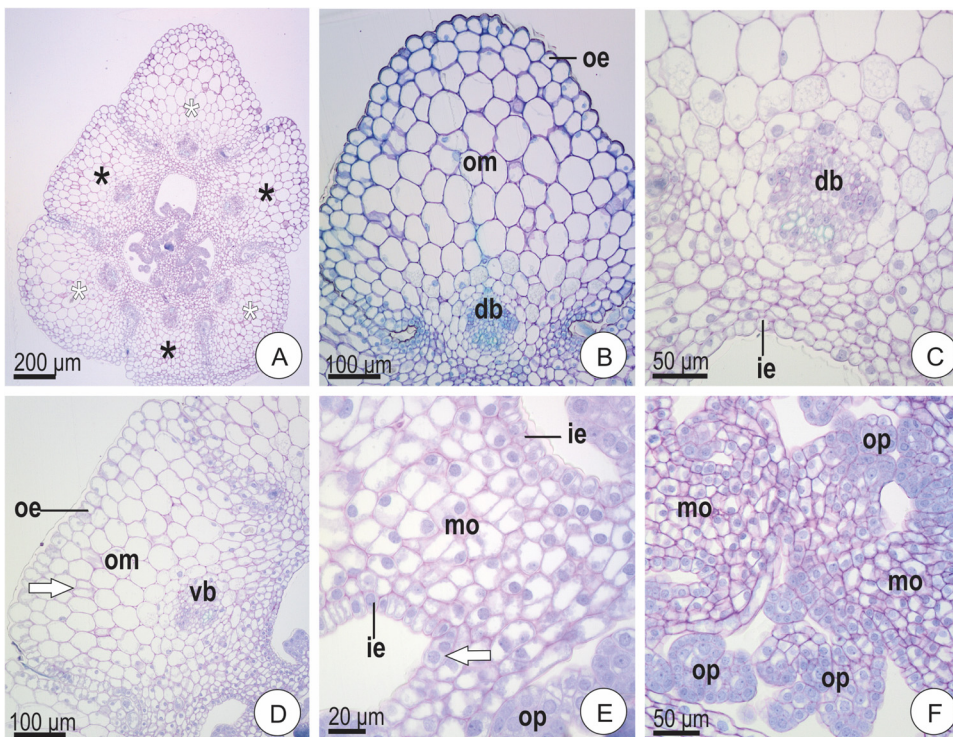


Fig. 2. Ovary of *Acianthera johannensis* prior to pollination (transversal sections). A. General view of the ovary showing sterile (white asterisks) and fertile (black asterisks) valves. B–C. Details of sterile valve; in B, note the variation in cell size among the layers of ovarian mesophyll, and compare them with C, where the dorsal vascular bundle and inner epidermis are also indicated. D–F. Details of the fertile valve in D, the ovarian mesophyll has fewer layers of cells near the ventral vascular bundle than dorsally; in E, detail of the ovarian mesophyll near the placenta and the inner epidermis with anticlinal division (arrow). F. Detail of the ovary with ovule primordia in the placenta. db, dorsal vascular bundle; ie, inner epidermis; oe, outer epidermis; om, ovarian mesophyll; op, ovule primordia; vb, ventral vascular bundle.

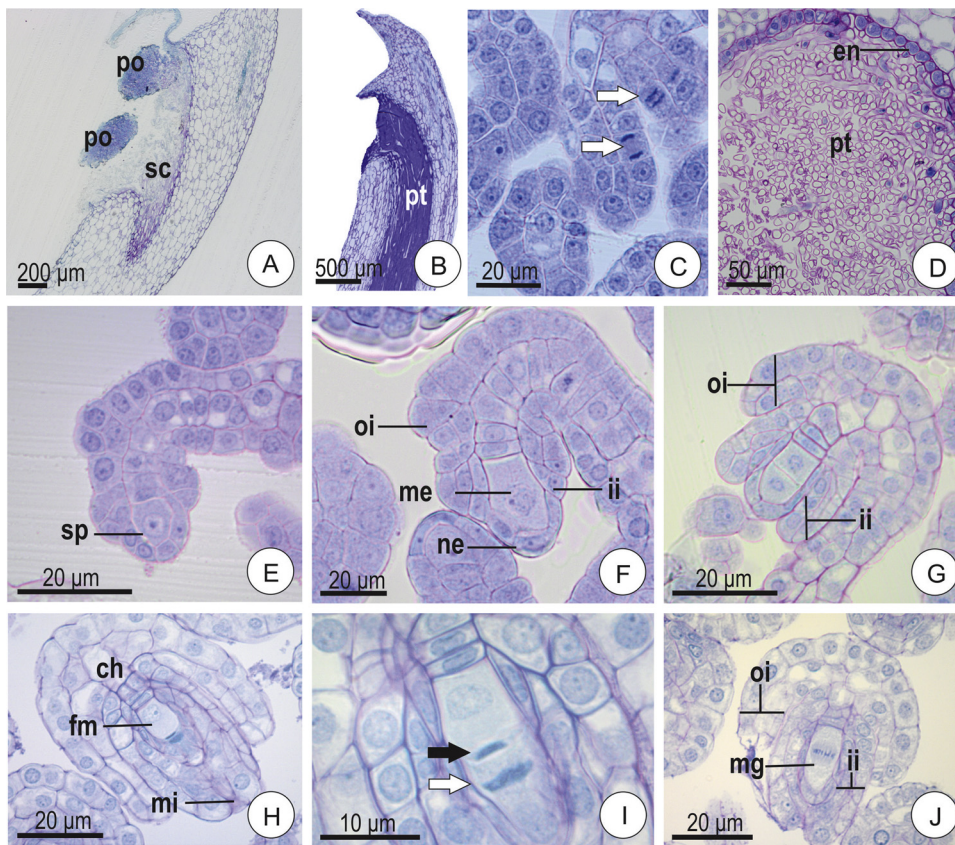


Fig. 3. Gynoecium of *Acianthera johannensis* after manual cross-pollination (A–C, E–J. longitudinal sections; D. transversal sections). A. Detail of the stigmatic cavity showing two pollinia. B. Detail of the column with pollen tubes growing along the stylar channel. C. Detail of ovule primordia showing anticlinal mitotic division (arrows). D. Detail of numerous pollen tubes near the placenta cells. E. Sporogenous cell differentiation in the nucellus of an ovule (17 DAP). F. Megasporocyte differentiation (23 DAP), adjacent to the nucellar epidermis; note the beginning of differentiation of the inner and outer integuments. G. A dyad of cells produced in the first phase of meiosis, and the development of the integuments (25 DAP). H. Functional chalazal megaspore and degenerated megaspores. I. Detail of figure H, highlighting the megaspore that does not undergo the second phase of the meiosis (white arrow) with its voluminous nucleus when compared to the megaspore that underwent meiosis II (black arrow). J. Metaphase plate of megagametophyte during the first mitotic division of megagametogenesis; note that the inner and outer integuments have two layers each. ch, chalaza; en, endocarp; fm, functional megaspore; ii, inner integument; me, megasporocyte; mg, megagametophyte; mi, micropyle; ne, nucellar epidermis; oi, outer integument; po, pollinia; pt, pollen tube; sp, sporogenous cell; sc, stigma cavity.

apparatus and the egg cell in the micropylar pole, and the central cell with a large diploid nucleus (Fig. 4E–F, Table 1). The ovules are anatropous, tenuinucellate and bitegmic. Fertilization occurs at about 40 DAP, after which the penetrated synergid exhibits dense cytoplasm and becomes apoptotic (Fig. 4F, Table 1). Once the zygote is formed the first endosperm nucleus does not divide (Fig. 4G).

Asymmetric zygote division originates two cells, the chalazal cell and the micropylar cell. The chalazal cell undergoes mitosis producing a proembryo of a few cells, while the micropylar cell produces the

suspensor (Fig. 5A–C). The embryo comprises several cells while the suspensor comprises four cells or less (Fig. 5D–E). On the other hand, the outer layer of the testa (exotesta) expands and becomes lignified, but secondary wall deposition is restricted to a strip in the median region of the anticlinal faces of cell walls (Fig. 5F). The embryo possesses undifferentiated cells even in the mature seed (Fig. 5G). The suspensor and inner integument are degenerated and become residual (Fig. 5H). The mature seed possesses only the embryo and the exotesta with the lignified strip in cell walls at this phase (Fig. 5I, Table 1). The time from

Table 1
Time after pollination (in days), developmental phases of the pollen tubes, ovarian wall and pericarp, and ovules and seeds.

Days after pollination	Developmental phases		
	Pollen tubes	Ovarian wall and pericarp	Ovule and seeds
1-7	Pollen grains germinate Pollen tubes grow up along the stylar canal	Ovarian wall with placenta primordium	Ovule primordia
7-20	Pollen tubes reach on base of the column (7th day) Pollen tubes spreading on placental lobes	Elongation of mesocarp cells	Sporogenous cell
20-25		Vascular bundle differentiation in the placenta region	Differentiated megasporocyte Differentiation of the integuments
25-35	Pollen tubes near of the placenta cells	Differentiation of mesocarp and endocarp cells	Meiosis I e II Degeneration of the megaspores Functional megaspore Outer and inner integuments
27-45			Initial development of the megagametophyte First mitotic division of megagametophyte Mature megagametophyte
40-50	Pollen tubes near the micropyle Pollen tubes penetrate the ovule		Fertilization Development of the proembryo and suspensor
50-90	Degeneration of the pollen tubes	Endocarp cells and trichomes with lignified wall thickening Mesocarp with tracheoids Mature pericarp Dehiscence of the fruit (90th day)	Development of the embryo Inner integument and suspensor degenerating Exotesta with lignified cells Mature seeds

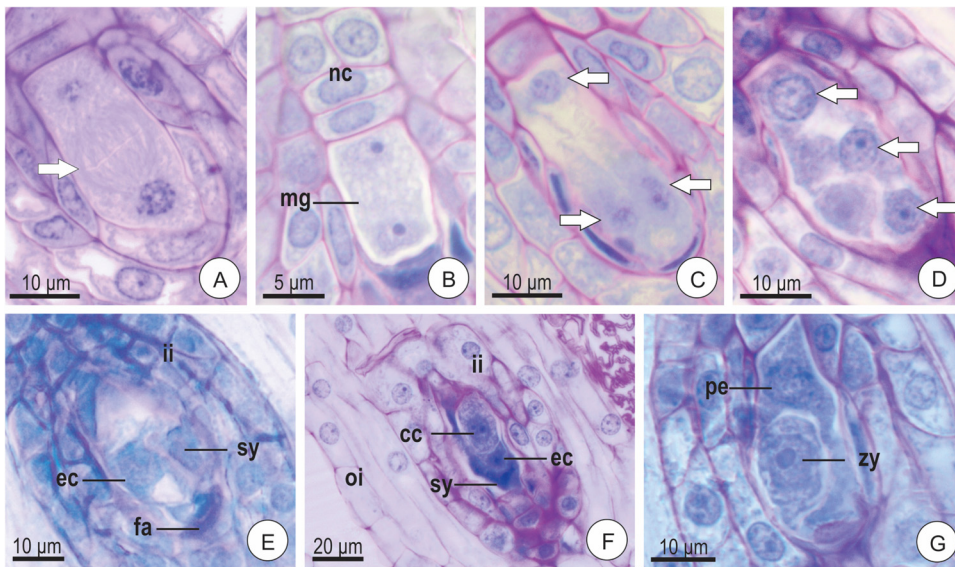


Fig. 4. Ovule of *Acianthera johannensis* after manual cross-pollination (longitudinal sections). A. Metaphase plate of the first mitotic division of the megagametophyte (arrow), with two already distinct nuclei. B. Binucleated megagametophyte (27 DAP); in the chalazal region, notice the four cells of the nucellus. C. Megagametophyte with three nuclei (arrows). D. Detail of megagametophyte with five nuclei, three of them seen in the foreground (arrows). E. Mature megagametophyte (47 DAP) showing one of the synergids with the filiform apparatus and the egg cell, both at the micropylar pole. F. Detail of the megagametophyte showing one degenerated synergid and the central cell. G. Detail of the embryo zygote and the primary endosperm nucleus. cc, central cell; ec, egg cell; pe, primary endosperm nucleus; fa, filiform apparatus; ii, inner integument; mg, megagametophyte; nc, nucellus cells; oi, outer integument; sy, synergid; zy, embryo zygote.

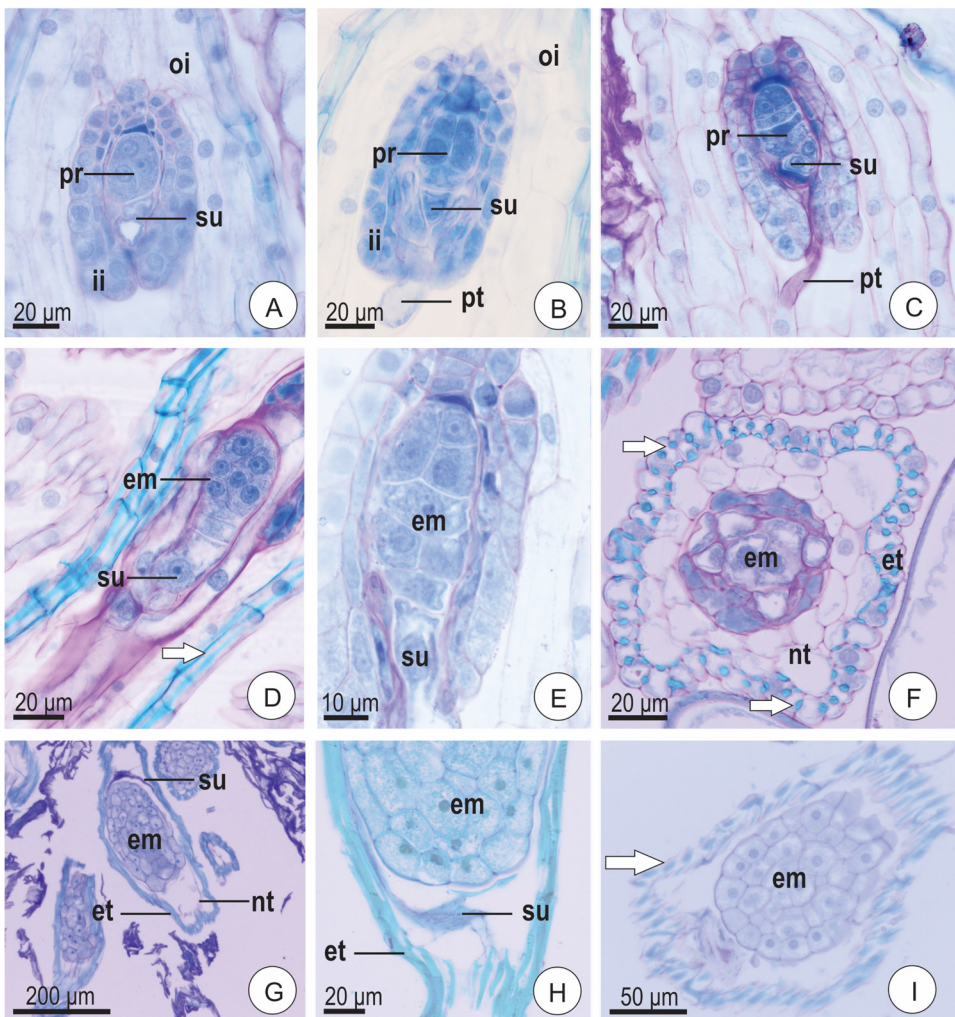


Fig. 5. Young and mature seeds of *Acianthera johannensis* after manual cross-pollination (A–E, G–H. longitudinal sections. F, I. transversal sections). A–F. Seeds about 45 DAP. A. Proembryo at chalazal region; note the suspensor in the micropylar region. B–C. Proembryo and suspensor during development; note residual pollen tube in the micropylar pole. D. Embryo with a dense mass of cells and the suspensor with elongated and more hyaline cells; lignification of strips is beginning in the cell walls of the outer integument (arrow). E. Detail of the embryo and suspensor. F. Seed with embryo, suspensor and multi-layered testa; note the wall with anticlinal lignified thickening in the exotesta (arrows). G–I. Mature seed (50 DAP); in H, detail showing the embryo with undifferentiated cells; suspensor and inner integument in reabsorption. I. Embryo and exotesta with cell walls with lignified anticlinal thickening (arrow). em, embryo; ii, inner integument; et, exotesta; oi, outer integument; nt, endotesta; pr, proembryo; pt, pollen tube; su, suspensor.

pollination to mature seed was 50 days (Table 1), although some ovules were still in the early development at this time.

3.3. Pericarp anatomy

Development of the pericarp occurs after pollination. The young fruit possesses exocarp with one layer of juxtaposed thin-walled cells (Fig. 6A–B). The mesocarp is formed by parenchyma (Fig. 6A–D). As in

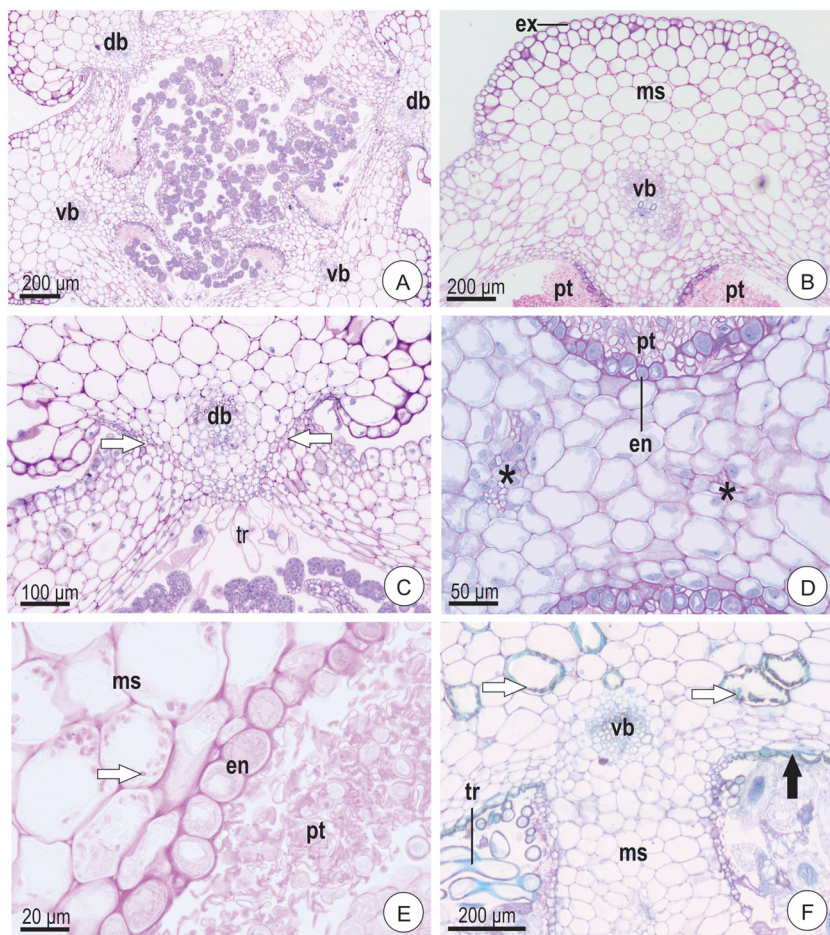


Fig. 6. Young and mature pericarp of *Acianthera johannensis* produced after manual cross-pollination (transversal sections). A–E. Pericarp with 20DAP. A. General view of the pericarp. B. Detail of the fertile valve showing the ventral bundle. C. Detail of the sterile valve; notice the dorsal bundle, two dehiscence lines (arrows) and unicellular tector trichomes in the endocarp. D. Detail of the region near the placenta; notice two vascular bundles (asterisks) in the mesocarp. E. Detail of mesocarp cells with accumulation of polysaccharides highlighted by periodic acid Schiff (PAS) (arrow) and endocarp with dense cells. F. Pericarp with 47 DAP; notice some mesocarp cells with lignified thickening bars on the wall (white arrows) and the complete thickening of the wall of endocarp cells (black arrow), including trichomes. db, dorsal vascular bundle; en, endocarp; ex, exocarp; ms, mesocarp; pt, pollen tube; tr, trichome; vb, ventral vascular bundle.

the ovary, the cells in the median portion and near the exocarp are larger and with intracellular spaces (Fig. 6B–C), while the cells close to the endocarp are small (Fig. 6B–C). Furthermore, there are more cell layers in the fertile valves than in the sterile valves (Fig. 6A). There is no increase in the number of cell layers during the development of the pericarp. However, there was an increase in the volume of parenchyma cells of the mesocarp. Anticlinal divisions occur early in the exocarp and endocarp, thus accommodating mesocarp cell elongation (Table 1). Small and juxtaposed parenchyma cells are present between the valves, which form the dehiscence line in the mature fruit (Fig. 6C). Vascular bundles are immersed in the mesocarp and each fertile valve possesses three vascular bundles: one is ventral (Fig. 6B), and the other two are smaller and located near the placenta (Fig. 6D). On the other hand, the sterile valves possess only a dorsal bundle (Fig. 6C), as described for the ovary.

The endocarp possesses one layer of cells with dense cytoplasm, thin pectic cell walls, and a slightly convex inner periclinal face (Fig. 6D–E). The pollen tubes remain near the placenta endocarp cells until fertilization (Fig. 6B–E). The endocarp cells do not accumulate polysaccharides or proteins, as was observed in the adjacent cell layers of the mesocarp (Fig. 6E). Only sterile valves have unicellular trichomes in the endocarp (Fig. 6C), which become lignified during fruit ripening (Fig. 6F, Table 1). The mesocarp of ripened fruits at 50 DAP possesses some dispersed cells with lignified, irregular and helically-thickened walls (tracheoids), while the cells of the endocarp exhibit lignified walls (Fig. 6F, Table 1).

4. Discussion

Megasporogenesis and megagametogenesis of *A. johannensis* are

characterized by the production of a five-nucleate monosporic megagametophyte. The absence of a second phase of meiosis for the micropylar megaspore, and of mitosis in the chalazal nucleus of the binucleate megagametophyte, are rare characteristics for Orchidaceae. Thus, megagametophyte development of *A. johannensis* is not characterized as the widely-reported *Polygonum* type.

The development of triads of megaspores and of a five-nucleate megagametophyte has been recorded for a few species of the family, such as three species of *Calanthe* (Collabieae, Epidendroideae; Abe, 1972a) and *Gastrodia elata* (Gastrodieae, Epidendroideae; Abe, 1976). These species exhibit monosporic development, and the chalazal nucleus of the binucleate megagametophyte passes through the second mitosis. However, one of these nuclei degenerates, thus producing a megagametophyte with six or five nuclei, which contrasts with the development of the megagametophyte of *A. johannensis*.

Although the number of nuclei of monosporic megagametophytes in Orchidaceae varies widely, various authors classify the megagametophyte as of the *Polygonum* type, even without the typical eight-nucleated pattern (Swamy, 1949a; Maheshwari and Narayanaswamy, 1951; Law and Yeung, 1989; Wang et al., 2016). However, another classification of monosporic megagametophytes of Orchidaceae was proposed by Abe (1972b), who recorded five types of development according to the number of nuclei formed in the megagametophyte. According to this classification, the megagametophyte of *A. johannensis* is of the G4-type. In the G4-type, two consecutive mitoses occur only in the micropylar nucleus of the megagametophyte of the binucleate phase, which explains the absence of antipodal cells at maturity.

Six or eight nuclei have been reported in the megagametophyte of species of Laellinae (sister group of Pleurothallidinae), and of other tribes close to Epidendreae (Calypsoeae, Cymbidieae, Vandae), for

which megagametogenesis has been described (Sharp, 1912; Swamy, 1949a; Cocucci and Jensen, 1969; Abe, 1972a; Law and Yeung, 1989; Mayer et al., 2011). In addition, megasporogenesis in these species can form triads or tetrads of megaspores, with monosporic, bisporic or tetrasporic development (Sharp, 1912; Swamy, 1949a; Cocucci and Jensen, 1969).

This variation in megagametophyte development apparently occurred independently in various lineages of the family. However, most of these studies are strongly biased towards essentially Asian groups and, in general, represent low sampling of species in each group. In addition, Mayer et al. (2011) emphasize that the reduced size of the megagametophyte and the different planes of cuts of nuclei often make their observation difficult, causing misinterpretations related to the number of nuclei of the megagametophyte. Studies of more species with more representation among different lineages are needed to better understand variation in megagametophyte development and its evolution in Orchidaceae.

Although this variation occurs in megasporogenesis and megagametogenesis in orchids, other embryological characteristics of *A. johannensis* are shared with most other species of the family, such as the formation of anatropous, tenuinucellate and bitegmic ovules (Swamy, 1949a, 1949b; Sood, 1985; Fredrikson, 1992; Zhang and O'Neill, 1993; Mayer et al., 2011; Lee and Yeung, 2012). In addition, the absence of the division of the first nucleus of the endosperm and the presence of the suspensor in the immature seed of *A. johannensis* are common among Orchidaceae (Swamy, 1949b; Mayer et al., 2011; Kodahl et al., 2015). The structure of mature seeds of *A. johannensis* and of other orchids is simple and characteristic, with embryos composed of undifferentiated cells until maturity. The inner integument and suspensor are totally degenerated and reabsorbed, leaving the exotesta as the only part persisting as the seed coat (Swamy, 1949b; Fredrikson, 1990; Johri et al., 1992; Mayer et al., 2011). As no meristematic regions were found in ovarian tissues of *A. johannensis*, pericarp growth resulted from vacuolization and stretching of mesocarp cells, as recorded for other species of the family (Sood and Rao, 1986; Mayer et al., 2011). Pericarp dehiscence and seed dispersal in most of the studied orchids are associated with lignification of the walls of the tector trichomes and the common endocarp cells, as well as part of the cell wall of some mesocarp cells (Rasmussen and Johansen, 2006; Mayer et al., 2011; Kodahl et al., 2015), which are characteristics observed in *A. johannensis*.

The asynchrony observed among the developmental phases of ovules, both among fruits with the same developmental time and within the same fruit has been reported for other species of the family (Swamy, 1949a; Mayer et al., 2011). The presence of ovules in the early stages of megasporogenesis and megagametogenesis in fruits of *A. johannensis*, in which most of the ovules had already developed and became fertilized, reinforces the hypothesis that these could be the structures that are often mentioned as “seeds without embryos” in mature fruits (Borba et al., 2001, 2011). These results constitute an important basis for subsequent reproductive studies on the group involving comparative analysis of the development of pollen tubes and seeds from self-pollination and cross-pollination. Such efforts will ultimately help to determine the nature of the complex self-incompatibility mechanism presented by these species.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

Thanks to Clemens Schindwein, Juliana L. S. Mayer, Letícia S. Souto and Rafael F. Almeida for comments and suggestions on the first draft of the manuscript. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES, Finance Code 001) and by the Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; process 430515/2016-2). E.L. Borba (process 311918/2014-0) and D.M.T. Oliveira (process 305686/2018-6) receive fellowship grants from CNPq.

References

- Abe, K., 1972a. Contributions to the embryology of the family Orchidaceae. VI. Development of the embryo sac in 15 species of orchids. Sci. Rep. Tôhoku Univ. Ser. IV, Biol. 36, 135–178.
- Abe, K., 1972b. Contributions to the embryology of the family Orchidaceae. VII. A comparative study of the orchid embryo sac. Sci. Rep. Tôhoku Univ. Ser. IV, Biol. 36, 179–201.
- Abe, K., 1976. A reinvestigation of the development of the embryo sac in *Gastrodia elata* Blume (Orchidaceae). Ann. Bot. 40, 99–102.
- Abe, K., 1977. Development of the embryo sac in *Amitostigma kinoshitae* (Makino) Schltr. (Orchidaceae). Ann. Bot. 41, 897–899.
- Arditti, J., 1979. Aspects of the physiology of orchids. Adv. Bot. Res. 7, 421–655.
- Arekal, G.D., Karanth, A., 1981. The embryology of *Epipogium roseum* (Orchidaceae). Plant Syst. Evol. 138, 1–7.
- Avadhani, P.N., Nair, H., Arditti, J., Hew, C.S., 1994. Physiology of orchid flower. In: Arditti, J. (Ed.), *Orchid Biology: Review and Perspectives VI*. Wiley-Interscience, New York, pp. 189–362.
- Barbosa, A.R., Melo, M.C., Borba, E.L., 2009. Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. Plant Syst. Evol. 283, 1–8.
- Borba, E.L., Semir, J., 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. Ann. Bot. 88, 75–88.
- Borba, E.L., Semir, J., Shepherd, G.J., 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. Ann. Bot. 88, 89–99.
- Borba, E.L., Barbosa, A.R., Melo, M.C., Gontijo, S.L., Oliveira, H.O., 2011. Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): evolutionary and systematic implications. Lankesteriana 11, 207–221.
- Carlson, M.C., 1945. Megasporogenesis and development of the embryo sac of *Cypripedium parviflorum*. Bot. Gaz. 107, 107–114.
- Chen, Y., Zhang, C., Wang, X., Ao, C., 2018. Fertilisation of polar nuclei and formation of early endosperms in *Dendrobium catenatum*: evidence for the second fertilisation in Orchidaceae. Aust. J. Bot. 66, 354–359.
- Christensen, D.E., 1994. Fly pollination in the Orchidaceae. In: Arditti, J. (Ed.), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives VI*. Wiley-Interscience, New York, pp. 415–454.
- Clements, M.A., 1999. Embryology. In: Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W., Rasmussen, F.N. (Eds.), *Genera Orchidacearum - General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae Vol. I*. Oxford University Press, Oxford, pp. 38–58.
- Cocucci, A., Jensen, W., 1969. Orchid embryology: megagametophyte of *Epidendrum scutella* following fertilization. Am. J. Bot. 56, 629–640.
- Dressler, R.L., 1981. *The Orchids: Natural History and Classification*. Harvard University Press, Cambridge.
- Endress, P.K., 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. Ann. Bot. 107, 1465–1489.
- Fredrikson, M., 1990. Embryological study of *Herminium monorchis* (Orchidaceae) using confocal scanning laser microscopy. Am. J. Bot. 77, 123–127.
- Fredrikson, M., 1992. The development of the female gametophyte of *Epipactis* (Orchidaceae) and its inference for reproductive ecology. Am. J. Bot. 79, 63–68.
- Gontijo, S.L., Barbosa, A.R., Melo, M.C., Borba, E.L., 2010. Occurrence of different sites of self-incompatibility reaction in four *Anathallis* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. Plant Spec. Biol. 25, 129–135.
- Gurudeva, M.R., 2011. Development of embryo sac in *Zeuxine gracilis* (Breda) Bl. (Orchidaceae). J. Indian Bot. Soc. 90, 191–194.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant Microtechnique*. Mc Graw Hill, New York.
- Johri, B.M., Ambegaokar, K.B., Srivastava, P.S., 1992. *Comparative Embryology of Angiosperms*, vol. 2. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kodahl, N., Johansen, B.B., Rasmussen, F.N., 2015. The embryo sac of *Vanilla imperialis* (Orchidaceae) is six-nucleate, and double fertilization and formation of endosperm are not observed. Bot. J. Linn. Soc. 177, 202–213.
- Law, S.K., Yeung, E.C., 1989. Embryology of *Calypso bulbosa* I. Ovule development. Am. J. Bot. 76, 1668–1674.
- Lee, Y.I., Yeung, E.C., 2012. Embryology of the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*: ovule development. Bot. Stud. 53, 97–104.
- Lee, Y.I., Yeung, E.C., Lee, N., Chung, M.C., 2008. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: embryo development. Bot. Stud. 49, 139–146.
- Li, Y.Y., Chen, X.M., Guo, S.X., Lee, Y.I., 2016. Embryology of two mycoheterotrophic orchid species, *Gastrodia elata* and *Gastrodia nantoensis*: ovule and embryo development. Bot. Stud. 57, 18. <https://doi.org/10.1186/s40529-016-0137-7>.
- Maheshwari, P., Narayanaswamy, S., 1951. Embryological studies in *Spiranthes australis* Lindl. Proc. Linn. Soc. Bot. 53, 474–486.
- Mayer, J.L.S., Carmello-Guerreiro, S.M., Appezzato-da-Glória, B., 2011. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). Flora 206, 601–609.
- Mazia, D., Brewer, P.A., Alferf, M., 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. Biol. Bull. 104, 57–67.
- Melo, M.C., Taucce, P.P.G., Borba, E.L., 2011. Reproductive biology and isolation mechanisms in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. Plant Syst. Evol. 293, 161–176.
- Novak, S.D., Luna, L.J., Gamage, R.N., 2014. Role of auxin in orchid development. Plant

- Signal. Behav. 10 <https://doi.org/10.4161/psb.32169>. e972277.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368–373.
- O'Brien, T.P., McCully, M.E., 1981. *The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods*. Termarcarphi Pty. Ltd., Melbourne.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W., Rasmussen, F.N., 2005. *Genera Orchidacearum. Epidendroideae (Part One)*, vol. 4 Oxford University Press, Oxford.
- Rasmussen, F.N., Johansen, B., 2006. Carpology of orchids. *Selbyana* 27, 44–53.
- Richards, A.J., 1997. *Plant Breeding Systems*, 2nd ed. Chapman & Hall, London.
- Sharp, L.W., 1912. The orchid embryo sac. *Bot. Gaz.* 54, 372–385.
- Sood, S.K., 1985. Gametophytes, integuments initiation and embryogeny in *Microstylis cylindrostachya* (Orchidaceae, Epidendreae). *Proc. Indian Acad. Sci.* 95, 379–387.
- Sood, S.K., 1988. Development of gametophytes, embryogeny and pericarp in *Goodyera repens* (Orchidaceae, Neottieae). *Proc. Indian Acad. Sci.* 98, 149–156.
- Sood, Sk., Rao, P.R.M., 1986. Gametophytes, embryogeny and pericarp of *Microstylis wallichii* Lindl. (Orchidaceae). *Bot. Mat. Tokyo* 99, 351–359.
- Swamy, B.G.L., 1949a. Embryological studies in the Orchidaceae I. Gametophytes. *Am. Midl. Nat.* 41, 184–201.
- Swamy, B.G.L., 1949b. Embryological studies in the Orchidaceae II. Embryogeny. *Am. Midl. Nat.* 41, 202–232.
- van der Pijl, L., Dodson, C.H., 1966. *Orchid Flowers: Their Pollination and Evolution*. University of Miami Press, Miami.
- Wang, L.H., Tsay, J.S., Chi, H.S., 2016. Embryological studies on *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames. *Flora* 224, 191–202.
- Wirth, M., Withner, C.L., 1959. Embryology and development in the Orchidaceae. In: Withner, C.L. (Ed.), *The Orchids, a Scientific Survey*. The Ronald Press Company, New York, pp. 155–188.
- Yang, C.K., Lee, Y.I., 2014. The seed development of a mycoheterotrophic orchid, *Cyrtosia javanica* Blume. *Bot. Stud.* 55, 2–7.
- Zhang, X.S., O'Neill, S.D., 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *Plant Cell* 5, 403–418.

CAPÍTULO II

Ocorrência de dois sítios de autoincompatibilidade em *Acianthera* (Pleurothallidinae, Orchidaceae)

Manuscrito apresentado segundo as normas do periódico
Botanical Journal of the Linnean Society.

**Ocorrência de dois sítios de autoincompatibilidade em *Acianthera*
(Pleurothallidinae, Orchidaceae)**

Mariana Oliveira Duarte, Denise Maria Trombert Oliveira, Eduardo Leite Borba

Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: barreira pré-zigótica – desenvolvimento de tubo polínico – Epidendroideae — morte celular programada – sistema de autoincompatibilidade gametofítico – ultraestrutura celular.

RESUMO

O sítio de reação de autoincompatibilidade em grande parte das espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae) ocorre comumente no canal estilar, onde o crescimento dos tubos polínicos é interrompido. Entretanto, em algumas espécies de *Acianthera* com autoincompatibilidade parcial, tubos polínicos foram observados chegando ao ovário e tornando-se tortuosos e anômalos. Este fenômeno poderia estar relacionado a outro sistema de autoincompatibilidade que opera no ovário após a autopolinização. Com isso, analisamos a morfologia e o desenvolvimento dos tubos polínicos na coluna e no ovário de *Acianthera johannensis*, a fim de avaliar a presença de um segundo sítio de reação de autoincompatibilidade nessa espécie. Para fins de comparação, analisamos também *A. fabriobarrosii*, uma espécie com autoincompatibilidade forte. Análises de microscopia de luz, epifluorescência e eletrônica de transmissão revelaram a presença de dois sítios de autoincompatibilidade atuando em *A. johannensis*. O principal sítio de reação atuou na coluna, como visto em *A. fabriobarrosii*, corroborando outros estudos. Características morfológicas e citológicas dos tubos polínicos obstruídos na coluna indicaram a presença de autoincompatibilidade gametofítica (GSI), sugerindo a presença de morte celular programada nesses tubos. Já o segundo sítio de reação ocorreu no ovário de alguns indivíduos semicompatíveis de *A. johannensis*. De modo geral, há evidências morfológicas de que o sítio de reação de autoincompatibilidade no ovário de *A. johannensis* seja apenas uma reação tardia do GSI, diferentemente do mecanismo de autoincompatibilidade de ação tardia observado em outros grupos de plantas.

INTRODUÇÃO

Os sistemas de autoincompatibilidade homomórficos esporofítico (SSI) e gametofítico (GSI) são mecanismos controlados geneticamente, capazes de evitar a fecundação por gametas provenientes de autopólen, impedindo a germinação dos grãos de pólen ou o crescimento de tubos polínicos incompatíveis, respectivamente (De Nettancourt, 1997; Richards, 1997; Allen & Hiscock, 2008). No microgametófito, a reação do SSI é determinada pelo genoma diploide do esporófito, por meio da deposição de marcadores produzidos pelo tapete diretamente nos grãos de pólen, geralmente impedindo sua germinação no estigma, como registrado em espécies de Brassicaceae (De Nettancourt, 1997; Allen & Hiscock, 2008; Nasrallah, 2019). Em contrapartida, o GSI é o mecanismo mais registrado entre as angiospermas, sendo este determinado pelo genoma haploide do próprio microgametófito, sendo o crescimento dos tubos polínicos interrompido ao longo do estilete (Newbigin *et al.*, 1993; De Nettancourt, 1997; Richards, 1997; Gibbs, 2014).

Outro sistema de autoincompatibilidade (SI) reconhecido em alguns grupos de angiospermas é o sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI), o qual atua somente após os tubos polínicos alcançarem o ovário (Seavey & Bawa, 1986; Gibbs, 2014). Nesse mecanismo, a reação de autoincompatibilidade pode operar anteriormente à penetração dos tubos polínicos nos óvulos ou após a fecundação (Seavey & Bawa, 1986). A ocorrência desses três mecanismos de autoincompatibilidade foi registrada em várias famílias de angiospermas, porém raros estudos investigaram o controle genético associado ao SI na maioria dessas espécies, devido à necessidade de extensos estudos experimentais envolvendo cruzamentos dialélicos entre a prole de famílias autoincompatíveis (Gibbs, 2014).

A presença de SI tem sido pouco registrada em Orchidaceae, uma família tida como predominantemente autocompatível (Dressler, 1981). Porém, em alguns grupos da família, este mecanismo é comumente encontrado, tais como em *Dendrobium* C. Agardh (Johansen, 1990), Oncidiinae (Castro & Singer, 2019) e Pleurothallidinae (Borba *et al.*, 2011). Em Pleurothallidinae, maior subtribo de Orchidaceae (ca. 4.100 espécies), as espécies são predominantemente miiófilas (Luer, 1986; Dressler, 1981, 1993) e autoincompatíveis (Christensen, 1992; Borba *et al.*, 2011; Bogarín *et al.*, 2018). Uma vez que o SI não tenha sido caracterizado geneticamente em nenhuma das espécies desta subtribo (ou mesmo na família), aspectos morfológicos e do desenvolvimento de grãos de pólen e de tubos polínicos foram utilizados para inferir o sistema de autoincompatibilidade no grupo (Borba *et al.*, 2001, 2011; Barbosa *et al.*, 2009; Gontijo *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2011). Diante dos padrões observados, distintos sítios de ocorrência de reações de autoincompatibilidade foram citados em Pleurothallidinae: no estigma, com ausência de germinação dos grãos de pólen (similar ao observado em SSI; Barbosa *et al.*, 2009; Gontijo *et al.*, 2010), no canal estilar, com morte dos tubos polínicos (similar ao GSI; Borba *et al.*, 2011), e obstrução dos tubos polínicos no ovário (Borba *et al.*, 2001; Millner *et al.*, 2015).

Contrastando estes cenários, cinco espécies de *Acianthera* Scheidw. (Pleurothallidinae) com SI apresentaram autoincompatibilidade parcial, em que uma baixa taxa de frutos após autopolinização (10-13%) foi observada (Borba *et al.*, 2011). Nessas espécies, os poucos frutos resultantes de autopolinizações apresentaram alta taxa de sementes inviáveis, ou seja, sementes sem embrião, possuindo apenas o envoltório seminal, ou sementes com resíduos de tecido embrionário morto (Borba *et al.*, 2001, 2011; Melo *et al.*, 2011).

O elevado número de sementes sem embrião em frutos resultantes de autopolinizações tem sido explicado pela ação da depressão endogâmica (Borba *et al.*, 2011), a qual ocasiona a morte precoce de zigotos e embriões (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Hufford & Hamrick, 2003). No entanto, foi visto que, em frutos abortados ou que chegaram à maturidade após autopolinizações em algumas espécies de *Acianthera*, os tubos polínicos se desenvolveram normalmente ao longo da coluna; contudo, ao chegar ao ovário, passavam a apresentar morfologia anômala (Borba *et al.*, 2001, 2011). Com isso, os autores sugeriram que a ocorrência de tubos polínicos irregulares e anômalos nestes frutos poderia ser resultante de um sistema de autoincompatibilidade pré-zigótico tardio atuando no ovário (Borba *et al.*, 2001, 2011). Neste caso, o desenvolvimento do fruto poderia ter continuado, juntamente com a diferenciação dos óvulos, devido à presença de hormônios produzidos durante o crescimento de tubos polínicos até o ovário (Arditti, 1979; Avadhani *et al.*, 1994), levando assim a formação de sementes vazias ou sem embrião.

Diante disso, o objetivo desse estudo foi investigar se algum sistema de autoincompatibilidade estaria agindo no ovário de espécies de *Acianthera* com autoincompatibilidade parcial. Assim, analisamos a morfologia e o desenvolvimento após a germinação dos grãos de pólen e crescimento dos tubos polínicos na coluna e no ovário em *Acianthera johannensis* (Barb.Rodr.) Pridgeon & M.W.Chase, uma espécie com autoincompatibilidade parcial. Para fins de comparação, analisamos também uma espécie com autoincompatibilidade forte, *Acianthera fabribarrosii* (Borba & Semir) F.Barros & F.Pinheiro, com 5% de frutificação em flores autopolinizadas contra 79% em polinizações cruzadas (Borba *et al.*, 2001).

MATERIAL E MÉTODOS

Acianthera johannensis e *A. fabriobarrosii* são espécies rupícolas em áreas de campos rupestres do estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. Ainda que estas espécies apresentem alta similaridade floral e compartilhem os mesmos polinizadores, elas não ocorrem em simpatria (Borba & Semir, 2001). A floração dessas espécies ocorre de novembro a fevereiro e a antese tem duração de 7 a 10 dias (Borba & Semir, 2001). A diferenciação dos óvulos ocorre *ca.* 20 dias após a polinização (DAP) em *A. johannensis* (Duarte *et al.*, 2019) e *A. fabriobarrosii* (Capítulo 3), sendo que os frutos chegam à maturidade com aproximadamente três (*A. johannensis*) e quatro (*A. fabriobarrosii*) meses após a polinização (Borba *et al.*, 2001).

Coletamos os indivíduos de *A. johannensis* nos municípios de Carrancas, Tiradentes e São Tomé das Letras (n=50) e os indivíduos de *A. fabriobarrosii* em Joaquim Felício e Grão Mogol (n=39). Posteriormente, cultivamos os indivíduos em casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Os vouchers estão registrados no herbário BHCB (*A. fabriobarrosii* - Borba *et al.*, 513; *A. johannensis* - Borba *et al.*, 2230). O sistema reprodutivo dessas populações foi previamente avaliado (veja Capítulo 3), confirmando a presença de autoincompatibilidade parcial em *A. johannensis* e de autoincompatibilidade forte em *A. fabriobarrosii*.

Realizamos polinizações cruzadas e autopolinizações experimentais em flores de primeiro dia de antese para análises do desenvolvimento dos tubos polínicos em diferentes intervalos de dias após as polinizações. Flores (1-14 DAP), frutos imaturos (15-60 DAP) e frutos maduros (90-120 DAP) foram coletados e fixados para análises. Os tubos polínicos apresentando desenvolvimento morfológico normal foram considerados compatíveis, sendo principalmente provenientes de polinização cruzada e

levando à formação de frutos com alto conteúdo de sementes viáveis (Borba *et al.*, 2001, 2011). Ao contrário, os tubos polínicos incompatíveis foram aqueles que apresentaram desenvolvimento anômalo e morreram tanto no canal estilar quanto no ovário, sendo provenientes de flores autopolinizadas, levando a formação de frutos com baixo conteúdo de sementes viáveis, como registrado por Borba *et al.* (2001, 2011). O desenvolvimento e a morfologia dos tubos polínicos foram investigados por meio de microscopia de luz, epifluorescência e microscopia eletrônica de transmissão.

Para análise em microscopia de luz flores e frutos foram fixados após os tratamentos de polinizações em ambas as espécies em solução de FAA 50 (formaldeído 37%, ácido acético, álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v; Johansen, 1940). Realizamos secções longitudinais da coluna e secções transversais do ovário e do fruto em micrótomo de rotação Zeiss Hyrax M40 com espessura de 4,5-5 μm . Posteriormente, distendemos as secções em lâminas e coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (modificado de O'Brien *et al.*, 1964). Utilizamos microscópio de luz Olympus Cx41 com câmera acoplada para análises e documentação das amostras.

Para análise morfológica dos tubos polínicos após polinizações cruzadas e autopolinizações em ambas as espécies, fixamos flores (3-17 DAP), frutos imaturos (24-46 DAP) e frutos maduros (80-120 DAP) em FAA 50 por 48 horas e conservados em etanol 50%. Posteriormente, amostras de coluna, ovário e fruto foram tratadas com 10 N NaOH em estufa a 60°C por 45 minutos (peças florais) e 60 minutos (frutos) para dissociação dos tecidos, depois lavadas em água corrente e coradas com solução de azul de anilina 1% (modificado de Martin, 1959) e analisadas em microscópio de epifluorescência.

Para análise da ultraestrutura dos tubos polínicos após polinizações cruzadas e autopolinizações, obtivemos amostras de regiões selecionadas da coluna de flores de 7 a

10 DAP de ambas as espécies e de frutos maduros. As amostras foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 12-24 horas. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas com 1% tetróxido de ósmio em 0,1 M tampão fosfato pH 7,2 e processadas conforme técnicas usuais (Roland, 1978). Contrastamos as secções com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-Spirit (Philips/FEI Co.) a 80 kV.

RESULTADOS

DESENVOLVIMENTO DOS TUBOS POLÍNICOS APÓS POLINIZAÇÃO CRUZADA

A germinação dos grãos de pólen e o crescimento dos tubos polínicos após polinizações cruzadas foram similares entre *A. johannensis* e *A. fabriobarrosii*. As duas espécies apresentam flores com duas polínias, as quais são constituídas por tétrades de grãos de pólen (Fig. 1A-B). O microgametófito bicelular, com uma célula vegetativa e outra generativa (Fig. 1C), foi observado ao longo de todo o desenvolvimento do tubo polínico, inclusive no ovário (Fig. 1D). E os gametas foram observados no momento em que os tubos polínicos penetraram os óvulos (Fig. 1E-F).

Em ambas as espécies os grãos de pólen germinaram com cerca de 3 DAP e cresceram aproximadamente sincronizados ao longo do canal estilar (Fig. 2A). Esses tubos polínicos apresentaram diâmetro homogêneo e deposição de tampões de calose regularmente dispostos ao longo da sua extensão (Fig. 2B). Posteriormente, os tubos polínicos alcançaram a base da coluna *ca.* 10 DAP e penetraram o ovário (Fig. 2C), separando-se em três feixes, direcionados a cada uma das três placentas com aproximadamente 12 DAP. Grande quantidade destes tubos polínicos apresentando aspectos morfológicos regulares ainda pode ser observada no canal estilar e na cavidade

seminal de frutos imaturos e maduros de ambas as espécies (Fig. 2D-E), próximo às sementes (Fig. 2F).

DESENVOLVIMENTO DOS TUBOS POLÍNICOS APÓS AUTOPOLINIZAÇÃO

A germinação dos grãos de pólen após autopolinizações em *A. johannensis* e *A. fabiobarrosii* ocorreu a partir de 3 e 5 DAP, respectivamente, período no qual ainda estavam restritos à cavidade estigmática (Fig. 2G). Em flores fenecidas (6-7 DAP), alguns tubos polínicos encontravam-se próximos ao ápice e região mediana da coluna (Fig. 2H) em ambas as espécies. As flores autopolinizadas de *A. fabiobarrosii* e a maior parte das flores autopolinizadas de *A. johannensis* apresentaram tubos polínicos de cessando o crescimento próximos à região mediana ou à base da coluna entre 7 a 14 DAP, não chegando ao ovário. Neste caso, houve pouco sincronismo do crescimento dos tubos polínicos no canal estilar, além de que estes tubos polínicos se tornavam tortuosos (Fig. 2I), com excessiva deposição de calose e dilatação do ápice (Fig. 2J).

Entretanto, em algumas flores fenecidas 10 DAP, os tubos polínicos cresceram regularmente ao longo do canal estilar (Fig. 2K), porém ao alcançarem o ovário, esses apresentavam aspectos irregulares e anômalos. Isso foi observado em quatro indivíduos de *A. johannensis* (de 28 no total) que desenvolveram alguns frutos após as autopolinizações (n=13, em 153 polinizações). Nesses mesmos indivíduos, flores autopolinizadas que seguiram o desenvolvimento, continham tubos polínicos regulares e irregulares no fruto maduro. A maior parte dos tubos polínicos presentes no fruto maduro de *A. johannensis* após a autopolinização apresentou morfologia normal e deposição de tampões de calose regularmente dispostos ao longo da extensão do tubo. Contudo, alguns tubos polínicos apresentaram aspectos semelhantes àqueles interrompidos na coluna (Fig. 2L). Embora não tenha sido quantificado o número de tubos polínicos no canal estilar e no ovário/fruto, observamos maior quantidade de

tubos polínicos percorrendo o canal estilar e chegando ao ovário após as polinizações cruzadas quando comparada às de autopolinizações.

ULTRAESTRUTURA DOS TUBOS POLÍNICOS APÓS POLINIZAÇÕES EXPERIMENTAIS

Não foram observadas diferenças entre as espécies estudadas e os períodos de tempo analisados nos aspectos ultraestruturais dos tubos polínicos após polinizações cruzadas (Fig. 3A-F). De modo geral, os tubos polínicos apresentaram parede celular composta por duas camadas: uma interna, com coloração acinzentada clara e de baixa densidade de elétrons, e outra externa, de coloração escura, apresentando alta densidade de elétrons (Fig. 3B). Na região apical do tubo polínico, o citoplasma continha organelas típicas, entre as quais mitocôndrias com cristas evidentes (Fig. 3B) e dictiossomos e retículo endoplasmático bem desenvolvidos, com membranas típicas (Fig. 3C). O núcleo da célula vegetativa foi observado nas secções analisadas (Fig. 3D), porém não foi possível localizar a célula generativa. A região mais distal do tubo polínico apresentou vacúolos de contorno regular e conteúdo hialino (Fig. 3E). Em frutos maduros, os tubos polínicos não continham citoplasma vivo, e exibiram excessiva deposição de calose em quase toda a sua extensão (Fig. 3F).

Em contraste, flores autopolinizadas de 7 e 9 DAP apresentaram grande parte dos tubos polínicos degenerados no canal estilar (Fig. 4A-B). As primeiras evidências de degeneração no tubo polínico ocorreram nas organelas, tais como retículos endoplasmáticos e dictiossomos, os quais apresentaram membrana dilatada e membranas degeneradas respectivamente (Fig. 4C). Além disso, durante o processo de degeneração, os vacúolos apresentaram contorno irregular e conteúdo floculado, inclusive com fragmentos de membranas internas (Fig. 4D), ao contrário do observado em tubos polínicos compatíveis. A degeneração do citoplasma dos tubos polínicos foi evidenciada pela elevada elétron-densidade do citoplasma, com organelas indistintas e

sem núcleos visíveis (Fig. 4B). Em frutos maduros resultantes de autopolinização, os tubos polínicos continham excessiva deposição de calose e citoplasma degenerado (Fig. 4E-F), como foi observado em frutos maduros resultantes de polinização cruzada.

DISCUSSÃO

As mudanças estruturais observadas, tanto no nível morfológico quanto celular, em tubos polínicos incompatíveis de *Acianthera fabriobarrosii* e *A. johannensis* corroboram a presença de um sistema de autoincompatibilidade agindo na coluna, como sugerido por Borba *et al.* (2001, 2011). Apesar da ocorrência majoritária de reações de autoincompatibilidade na coluna em flores de *A. johannensis*, um segundo sítio de reação foi identificado no ovário nesta espécie, em 22% dos indivíduos estudados.

A presença de tubos polínicos anômalos no ovário e no fruto após autopolinização em alguns indivíduos de *A. johannensis*, similares àqueles obstruídos no canal estilar desta espécie e de *A. fabriobarrosii*, interpretamos como uma reação tardia do sistema de autoincompatibilidade gametofítico (GSI). No entanto, esse mecanismo difere do típico sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI), onde a reação ocorre de forma sincronizada e situando-se somente no ovário (Seavey & Bawa, 1986; Sage *et al.*, 1994; Gibbs, 2014). Sendo assim, os dois sítios de reações de autoincompatibilidade presentes em alguns indivíduos de *A. johannensis* são, provavelmente, governados pelo GSI, o que é sustentado pela uniformidade morfológica observada nos tubos polínicos incompatíveis. A reação do GSI se estendendo até o ovário já foi relatada para espécies de outras famílias (Seavey & Bawa, 1986), sendo que em *Camelia sinensis* L. (Theaceae) a mesma reação ocorreu tanto no estilete quanto no ovário e foi geneticamente comprovada (Zhang *et al.*, 2016). Além disso, o momento da reação do GSI parece está correlacionado com o evento de divisão

mitótica da célula generativa na formação dos núcleos espermáticos (Brewbaker, 1957; Richards, 1997), o que explicaria a amplitude (coluna-ovário) dos locais de reações de autoincompatibilidade observadas em *A. johannensis*. Isto ocorreria devido ao período de divisão mitótica da célula generativa parece não ser sincrônico entre os tubos polínicos ao longo do crescimento nas duas espécies estudadas. Deste modo, podemos sugerir que o mesmo fenômeno deva ocorrer em outras espécies de Pleurothallidinae, as quais apresentam diferentes locais de reações de autoincompatibilidade.

Uma vez que a reação de autoincompatibilidade atua na coluna ou no ovário de flores autopolinizadas de *A. johannensis*, a quantidade de tubos polínicos mortos limitaria o número de óvulos fecundados. Deste modo, a reação do GSI no ovário levaria à alta proporção de óvulos não fecundados após autopolinização, como relatado para uma espécie de Ranunculaceae com LSI pré-zigótico (Hao *et al.* 2012). Entretanto, esse mecanismo não está diretamente relacionado ao baixo número de sementes com embrião em frutos desenvolvidos após autopolinizações em *A. johannensis*, uma vez que a maior parte dos tubos polínicos consegue fecundar os óvulos (Capítulo 3). Sendo assim, a elevada proporção de sementes abortadas em frutos resultantes de autopolinizações em *A. johannensis* é decorrente da depressão endogâmica, como sugerido por Borba *et al.* (2001, 2011) e Capítulo 3.

O crescimento dos tubos polínicos é um processo complexo e envolve interações com o pistilo, por meio de reações químicas e moleculares (Swanson *et al.*, 2004; Chebli & Geitmann, 2007; Dardelle *et al.*, 2010; Hepler *et al.*, 2012). No entanto, quando o crescimento dos tubos polínicos é interrompido no estilete por uma reação de autoincompatibilidade, mudanças ultraestruturais ocorrem nestes tubos incompatíveis (Herrero & Dickinson, 1981; Geitmann *et al.*, 2004; Kovaleva *et al.*, 2020). Tais mudanças ocorrem inicialmente em organelas, como dictiosomos e retículo

endoplasmático, com posterior degeneração do citoplasma (Herrero & Dickinson, 1981; Geitmann *et al.*, 2004), como foi evidenciado em *A. johannensis* e *A. fabiobarrosii*. Essas alterações celulares dos tubos polínicos incompatíveis foram observadas em espécies com GSI geneticamente conhecido, como em *Papaver rhoeas* (Geitmann *et al.*, 2004) e *Petunia hybrida* E. Vilm. (Herrero & Dickinson, 1981; Kovaleva *et al.*, 2020), e foram relacionadas à morte celular programada (PCD). Embora nessas espécies não tenha sido observada a degradação de vacúolos em tubos polínicos incompatíveis, esse processo ocorre em outras células vegetais em que a PCD atua (van Doorn *et al.*, 2011), bem como observados em tubos polínicos incompatíveis de *A. johannensis* e *A. fabiobarrosii*.

As reações típicas do GSI conhecidas, as quais podem resultar em PCD em tubos polínicos incompatíveis, baseiam-se tanto em proteínas S-RNases presentes no pistilo e F-box no microgametófito, sendo esta a mais comum entre as espécies (Frankling-Tong & Frankling, 2003; Sijacic *et al.*, 2004; Gibbs, 2014), quanto em sinalizações de cascatas dependentes de Ca^{2+} , como registrada em *Papaver rhoeas* L. (Bosch & Frankling-Tong, 2008). No caso das espécies autoincompatíveis de Orchidaceae, estudos moleculares não evidenciaram a presença de S-RNases, sugerindo que um distinto controle molecular do GSI pode ocorrer na família (Niu *et al.*, 2017, 2018), além de não haver registro envolvendo sinalizações de cascatas dependentes de Ca^{2+} na morte dos tubos polínicos. Assim, um terceiro mecanismo de reação do GSI pode estar envolvido na morte de tubos polínicos incompatíveis em *A. johannensis* e *A. fabiobarrosii*, bem como outras espécies do grupo. Uma vez que não se conhece o mecanismo molecular envolvido na morte dos tubos polínicos após autopolinização em *Acianthera*, nós sugerimos que esse mecanismo pode envolver a PCD em tubos polínicos incompatíveis nessas espécies. Contudo, estudos moleculares são necessários

para elucidar o tipo de reação do GSI que estaria envolvida na PCD nos tubos polínicos incompatíveis das espécies aqui estudadas, bem como em outras orquídeas autoincompatíveis.

REFERÊNCIAS

- Allen AM, Hiscock SJ. 2008.** Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In: Franklin-Tong VE, ed. *Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms*. Berlin: Springer-Verlag, 73–101.
- Arditti J. 1979.** Aspects of the physiology of orchids. *Advances in Botanical Research* **7**: 421–655.
- Avadhani PN, Nair H, Arditti J, Hew CS. 1994.** Physiology of orchid flower. In: Arditti J, ed. *Orchid biology, review and perspectives VI*. New York: Wiley-Interscience, 189–362.
- Barbosa AR, Melo MC, Borba EL. 2009.** Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Systematics and Evolution* **283**: 1–8.
- Bogarín D, Fernández M, Borkent A, Heemskerk A, Pupulin F, Ramírez S, Smets E, Gravendeel B. 2018.** Pollination of *Trichosalpinx* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **186**: 510–543.
- Borba EL, Semir J. 2001.** Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* **88**: 75–88.
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ. 2001.** Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* **88**: 89–99.
- Borba EL, Barbosa AR, Melo MC, Gontijo SL, Oliveira HO. 2011.** Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): evolutionary and systematic implications. *Lankesteriana* **11**: 207–221.
- Bosch M, Franklin-Tong VE. 2008.** Self-incompatibility in *Papaver*: signaling to trigger PCD in incompatible pollen. *Journal of Experimental Botany* **59**: 481–490.

- Brewbaker JI. 1957.** Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *Journal of Heredity* **48**: 271–277.
- Castro JB, Singer RB. 2019.** A literature review of the pollination strategies and breeding systems in Oncidiinae orchids. *Acta Botanica Brasilica* **33**: 618–643.
- Charlesworth D, Charlesworth B. 1987.** Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual review of ecology and systematics* **18**: 237–268.
- Chebli Y, Geitmann A. 2007.** Mechanical principles governing pollen tube growth. *Functional Plant Science and Biotechnology* **2**: 232–245.
- Christensen DE. 1992.** Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. *Lindleyana* **7**: 28–33.
- Dardelle F, Lehner A, Ramdani Y, Bardor M, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC. 2010.** Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis* pollen tube cell wall. *Plant Physiology* **153**: 1563–1576.
- De Nettancourt D. 1997.** Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction* **10**: 185–199.
- Dressler RL. 1981.** *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler RL. 1993.** *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland: Dioscorides Press.
- Duarte MO, Oliveira DMT, Borba EL. 2019.** Ontogenesis of ovary and fruit of *Acianthera johannensis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae) reveals a particular female embryology. *Flora* **259**: 151462.
- Franklin-Tong V, Franklin FCH. 2003.** The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **358**: 1025–1032.
- Geitmann A, Franklin-Tong VE, Emons AC. 2004.** The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* pollen causes early and striking alterations to organelles. *Cell Death and Differentiation* **11**: 812–822.
- Gibbs PE. 2014.** Late-acting self-incompatibility – the pariah breeding system in flowering plants. *New Phytologist* **203**: 717–734.
- Gontijo SL, Barbosa AR, Melo MC, Borba EL. 2010.** Occurrence of different sites of self-incompatibility reaction in four *Anathallis* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Species Biology* **25**: 129–135.

- Hao YQ, Zhao XF, She DY, Xu B, Zhang DY, Liao WJ. 2012.** The role of late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in governing female fertility in monkshood, *Aconitum kusnezoffii*. *PLoS ONE* **7**: e4703.
- Hepler PK, Kunkel JG, Rounds CM, Winship LJ. 2012.** Calcium entry into pollen tubes. *Trends in Plant Science* **17**: 32–38.
- Herrero M, Dickinson HG. 1981.** Pollen tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraspecific matings. *Journal of Cell Science* **47**: 365–383.
- Hufford KM, Hamrick LL. 2003.** Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). *Evolution* **57**: 518–526.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: Mc Graw Hill.
- Johansen B. 1990.** Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **103**: 165–196.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A–138A.
- Kovaleva LV, Zakharova EV, Timofeeva GV, Andreev IM, Golivanov YY, Bogoutdinova LR, Baranova EN, Khaliluev MR. 2020.** Aminooxyacetic acid (AOA), inhibitor of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthesis, suppresses self-incompatibility-induced programmed cell death in self-incompatible *Petunia hybrida* L. pollen tubes. *Protoplasma* **257**: 213–227.
- Luer CA. 1986.** Icones Pleurothallidarum I. Systematics of Pleurothallidinae. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* **15**: 1–81.
- Martin FW. 1959.** Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* **34**: 125–128.
- Melo MC, Taucce PPG, Borba EL. 2011.** Reproductive biology and isolation mechanisms in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **293**: 161–176.
- Millner HJ, McCrea AR, Baldwin TC. 2015.** An investigation of self-incompatibility within the genus *Restrepia*. *American Journal of Botany* **102**: 487–494.
- Nasrallah JB. 2019.** Self-incompatibility in the Brassicaceae: regulation and mechanism of self-recognition. *Current Topics in Developmental Biology* **131**: 435–452.

- Newbigin E, Anderson MA, Clarke AE. 1993.** Gametophytic self-incompatibility Systems. *The Plant Cell* **5**: 1315–1324.
- Niu SC, Huang J, Zhang YQ, Li PX, Zhang GQ, Xu Q, Chen LJ, Wang JY, Luo YB, Liu ZJ. 2017.** Lack of S-RNase-based gametophytic self-incompatibility in orchids suggests that this system evolved after the monocot-eudicot split. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1106.
- Niu SC, Huang J, Xu Q, Li PX, Yang HJ, Zhang YQ, Zhang GQ, Chen LJ, Niu YX, Luo YB. 2018.** Morphological type identification of self-incompatibility in *Dendrobium* and its phylogenetic evolution pattern. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 2595.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.
- Richards AJ. 1997.** *Plant breeding systems*. London: Chapman & Hall.
- Roland JC. 1978.** General preparations and staining of thin sections. In: Hall JL, ed. *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. New York: Elsevier, 1–62.
- Sage TL, Bertin R, Williams EG. 1994.** Ovarian and other late-acting self-incompatibility. In: Williams EG, Clark AE, Knox RB, eds. *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants, vol. 2*. Dordrecht: Kluwer, 116–140.
- Seavey SF, Bawa KS. 1986.** Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *The Botanical Review* **52**: 195–218.
- Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao TH. 2004.** Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* **429**: 302–305
- Swanson R, Edlund AF, Preuss D. 2004.** Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annual Review of Genetics* **38**: 793–818.
- van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur LAJ, Petersen M, Smertenko A, Taliansky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV. 2011.** Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1241–1246.

Zhang CC, Wang LY, Wei K, Wu LY, Li HL; Zhang F, Cheng H, Ni DJ. 2016.
Transcriptome analysis reveals self-incompatibility in the tea plant (*Camellia sinensis*) might be under gametophytic control. *BMC Genomics* **17**: 359.

FIGURAS

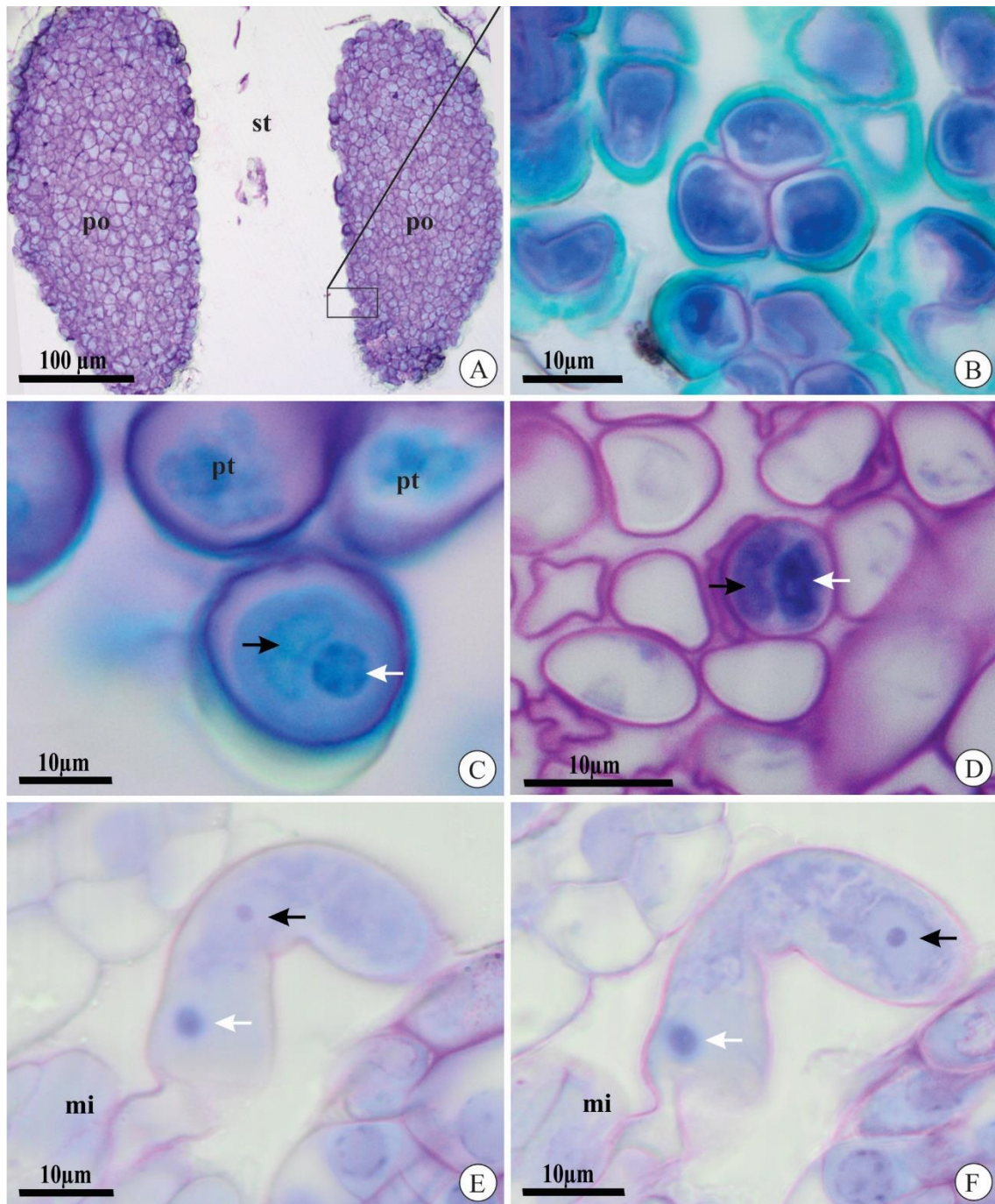


Fig. 1. Polínias e tubos polínicos de *Acianthera johannesensis* (A-B, E-F) e *A. fabiobarrosii* (C-D) em microscopia de luz. Secções transversais (A-D) e longitudinais (E-F). **A.** Duas polínias no interior da cavidade estigmática. **B.** Tétrades de grãos de pólen. **C.** Grão de pólen após polinização cruzada; note a célula generativa (seta preta) e o núcleo da célula vegetativa (seta branca). **D.** Tubos polínicos observados no ovário 27 DAP; note as duas células no microgametófito, a célula generativa (seta preta) e o

núcleo da célula vegetativa (seta branca). **E-F.** Tubo polínico na micrópila 40 DAP em dois planos de foco sequenciais; observe a célula vegetativa em ambas as figuras (seta branca) e os dois gametas (setas pretas), um visível em cada figura. mi, micrópila; po, polínia; pt, tubo polínico; st, cavidade estigmática.

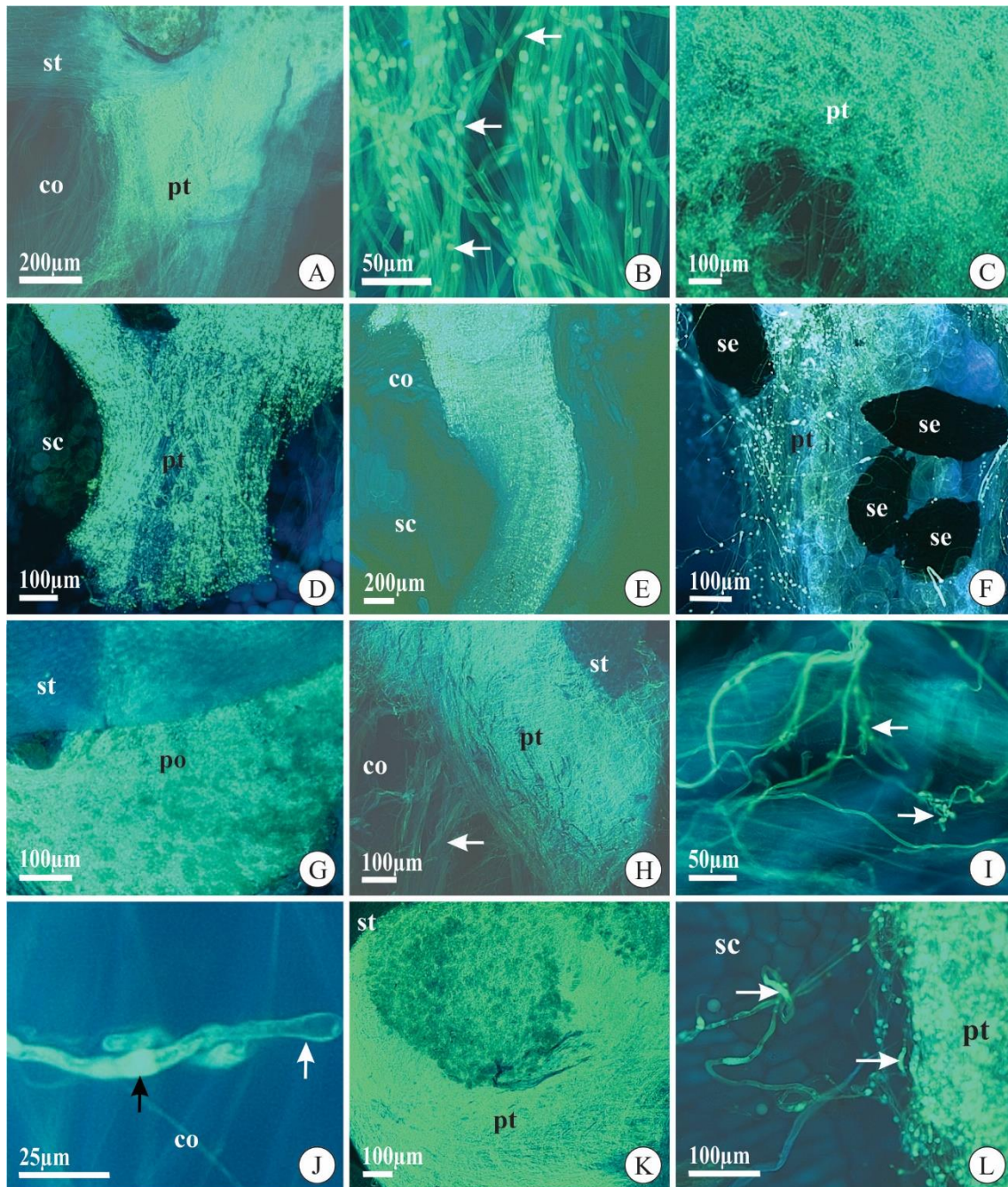


Fig. 2. Germinação dos grãos de pólen e crescimento dos tubos polínicos em flores e frutos de *Acianthera fabiobarrosii* (A, C, E, G, I) e *A. johannensis* (B, D, F, H, J-L) observados em microscópio de epifluorescência. A-F. Resultados de polinizações cruzadas. A-B. Tubos polínicos crescendo na coluna 7 DAP; em B, note o padrão de tampões de calose regularmente dispostos em toda a extensão do tubo (setas). C. Tubos polínicos chegando ao ovário 10 DAP. D. Tubos polínicos na cavidade seminal 38 DAP. E. Vista geral de tubos polínicos presentes na coluna e na cavidade seminal do

fruto 120 DAP. **F.** Tubos polínicos próximos às sementes com embrião no fruto maduro (90 DAP). **G-L.** Resultados de autopolinizações. **G.** Polínia na cavidade estigmática 5 DAP. **H.** Tubos polínicos interrompidos próximos ao ápice da coluna 7 DAP (seta). **I.** Tubos polínicos com aparência tortuosa (setas) 7 DAP, com crescimento interrompido na coluna. **J.** Detalhe do tubo polínico anômalo na coluna; observe o tampão com excessiva deposição de calose (seta preta) e o ápice dilatado (seta branca). **K.** Tubos polínicos de flor autopolinizada fenecida de um indivíduo semicompatível 7 DAP; note o crescimento sincrônico dos tubos polínicos no canal estilar. **L.** Tubos polínicos com morfologia regular em fruto maduro 90 DAP; observe alguns tubos polínicos com padrões irregulares (setas). co, coluna; po, polínica; pt, tubo polínico; sc, cavidade seminal; se, semente; st, cavidade estigmática.

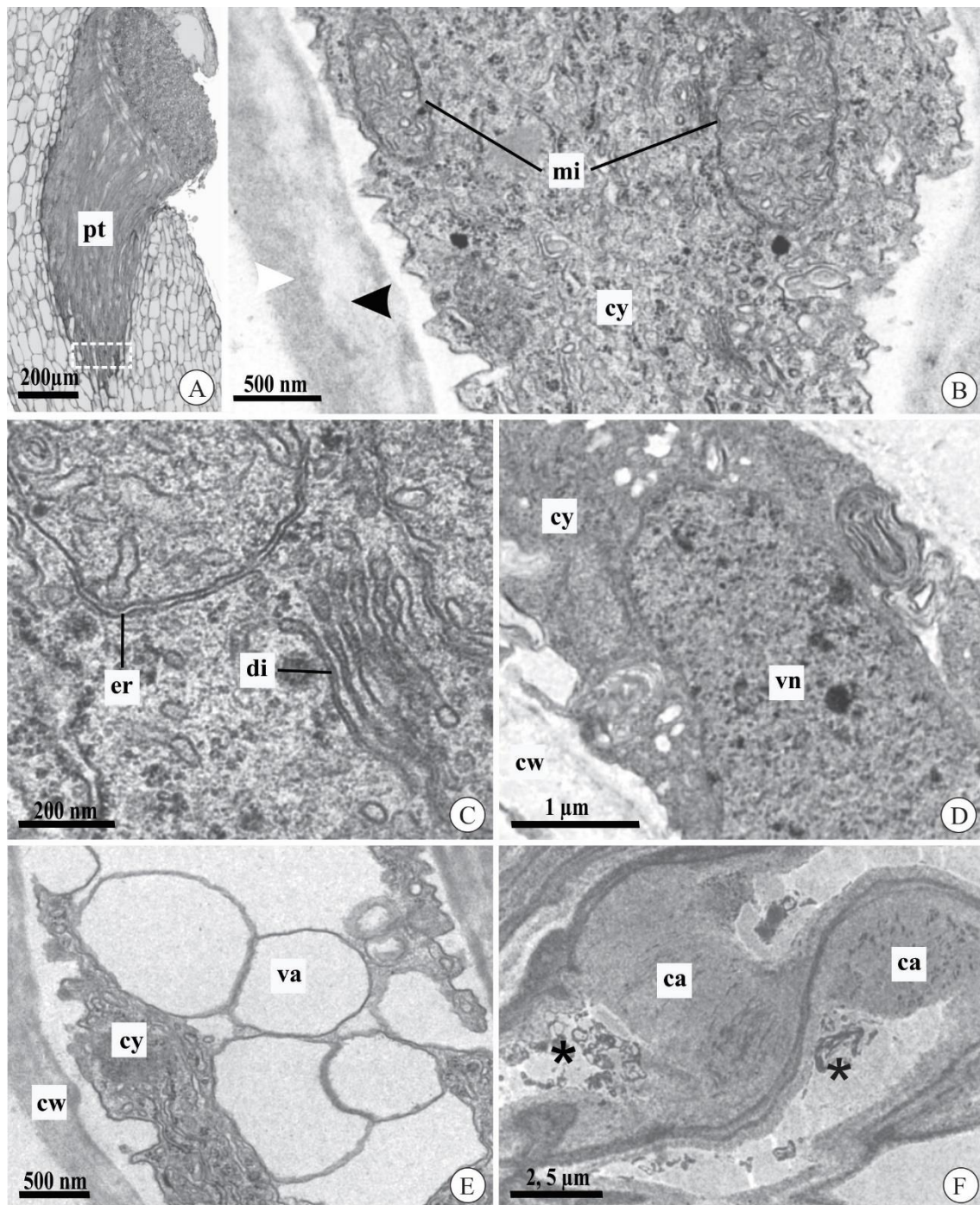


Fig. 3. Tubos polínicos no canal estilar e na cavidade seminal do fruto de *Acianthera johannensis* (A, D, F) e *A. fabiobarrosii* (B-C, E) após polinizações cruzadas, vistos utilizando microscopia de luz (A) e eletrônica de transmissão (B-F). **A.** Vista geral dos tubos polínicos no canal estilar; o retângulo tracejado destaca a região analisada nas demais figuras, exceto F. **B.** Região apical do tubo polínico com citoplasma típico e parede celular com duas camadas de diferente elétron-densidade, uma interna (ponta de

seta preta) e outra externa (ponta de seta branca). **C.** Detalhe do tubo polínico com retículo endoplasmático e dictiossomas bem desenvolvidos. **D.** Tubo polínico evidenciando o núcleo da célula vegetativa. **E.** Região distal do tubo polínico, evidenciando os vacúolos com contorno regular e conteúdo hialino. **F.** Tubos polínicos na cavidade seminal do fruto maduro de 90 DAP; note o citoplasma degenerado (asteriscos) e a presença de calose. ca, calose; cy, citoplasma; cw, parede celular; di, dictiossomo; er, retículo endoplasmático; mi, mitocôndria; pt, tubo polínico; va, vacúolo; vn, núcleo da célula vegetativa.

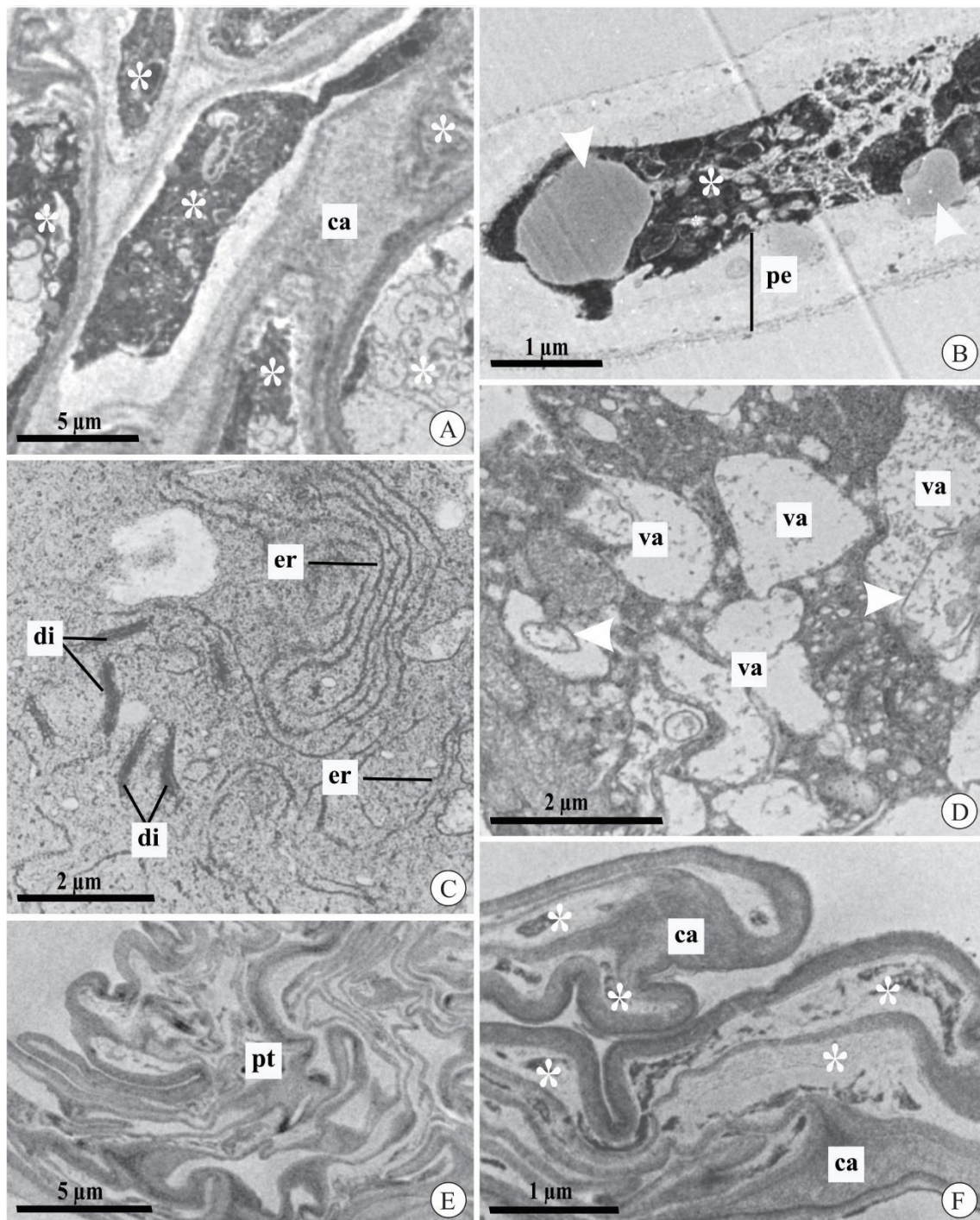


Fig. 4. Tubos polínicos crescendo no canal estilar e na cavidade seminal do fruto de *Acianthera johannensis* (A, C-F) e *A. fabiobarrosii* (B) após autopolinizações experimentais, vistos utilizando microscopia eletrônica de transmissão. **A.** Tubos polínicos com citoplasma em processo de degeneração (asteriscos) 7 DAP, evidenciado pela elevada elétron-densidade. **B.** Tubo polínico com grande espaço periplasmático, presença de gotículas lipídicas (pontas de seta) e citoplasma degenerado (asterisco) aos

9 DAP. **C.** Detalhe do tubo polínico com retículos endoplasmáticos com membranas dilatadas e dictiossomos em processo de degeneração aos 7 DAP. **D.** Tubo polínico com citoplasma em processo de degeneração; note a presença de vacúolos com contorno irregular e conteúdo floculado, e membranas internas nos vacúolos (pontas de seta). **E-F.** Tubos polínicos na cavidade seminal do fruto maduro (90 DAP); em F, note o citoplasma totalmente degenerado (asteriscos) e deposição de calose. ca, calose; di, dictiossomo; er, retículo endoplasmático; pe, espaço periplasmático; pt, tubo polínico; va, vacúolo.

CAPÍTULO III

Evidências de óvulos abortados após a reação de autoincompatibilidade no ovário em *Acianthera* (Pleurothallidinae, Orchidaceae)

Manuscrito apresentado segundo as normas do periódico *Plant Biology*.

Evidências de óvulos abortados após a reação de autoincompatibilidade no ovário em *Acianthera* (Pleurothallidinae, Orchidaceae)

Mariana Oliveira Duarte, Denise Maria Trombert Oliveira, Eduardo Leite Borba

Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Palavras-chave: degeneração de óvulo, depressão endogâmica, semente abortada, sinalização pólen-óvulo, sistema de autoincompatibilidade gametofítico.

RESUMO

(1) O sistema de autoincompatibilidade gametofítico (GSI) que atua no ovário em algumas espécies de *Acianthera* pode agir na morte parcial dos tubos polínicos. Com isso, investigamos se esse mecanismo estaria relacionado à alta taxa de sementes sem embrião em frutos resultantes de autopolinização nessas espécies.

(2) Conduzimos polinizações experimentais em *A. johannensis*, o qual o GSI atua parcialmente no ovário e, para se ter um referencial de uma espécie com GSI típico, também analisamos *A. fabriobarrosii*. Avaliamos a taxa de frutificação, a frequência de óvulos fecundados e analisamos o desenvolvimento de óvulos e sementes após as polinizações experimentais.

(3) Não houve diferenciação de células da placenta em flores autopolinizadas de *A. fabriobarrosii*, ao contrário de *A. johannensis*, a qual apresentou algumas flores com diferenciação do ovário após autopolinizações. Ovários de *Acianthera johannensis* apresentaram menor proporção de óvulos fecundados após autopolinização quando comparados aos de polinização cruzada. Além disso, mais de 60% dos óvulos não fecundados estavam em processo de degeneração em ovário/fruto após autopolinizações em *A. johannensis*.

(4) Esses resultados demonstraram que o GSI no ovário está associado ao menor número de óvulos fecundados e à maior proporção de óvulos degenerados, devido à morte dos microgametófitos. Portanto, a elevada taxa de sementes sem embrião encontrada em frutos resultantes de autopolinizações em *A. johannensis* está relacionada à depressão endogâmica e não ao GSI que ocorre no ovário.

INTRODUÇÃO

Os sistemas de autoincompatibilidade e a depressão endogâmica são mecanismos importantes na manutenção da elevada variabilidade genética encontrada em espécies de Orchidaceae (Sharma *et al.* 2000; Borba *et al.* 2001a, 2007; Cruz *et al.* 2011), sendo considerados fundamentais na diversificação das angiospermas (Husband & Schemske 1996; De Nettancourt 1997; Allen & Hiscock 2008; Ferrer & Good 2012). Uma vez que a maioria das espécies de Orchidaceae é autocompatível, (Dressler 1981), em casos onde a endogamia ocorre, a depressão endogâmica é frequentemente registrada (Stort & Martins 1979; Borba & Braga 2003; Silva-Pereira *et al.* 2007; São Leão *et al.* 2019). A ação da depressão endogâmica nessas espécies age precocemente, levando ao aborto de zigotos e embriões, devido à expressão de alelos recessivos deletérios em homozigose (Charlesworth & Charlesworth 1987; Husband & Schemske 1996; Hufford & Hamrick 2003).

Embora a autogamia possa ocorrer na maioria das espécies de Orchidaceae, a autopolinização autônoma é comumente evitada devido à presença de barreiras pré-polinização, sendo estas espaciais, morfológicas ou etológicas, favorecendo assim a alogamia (Dressler 1981, 1993; Borba & Semir 1999; Borba & Braga 2003; Pansarin & Amaral 2008; São Leão *et al.* 2019). No entanto, a presença dessas barreiras não impede a autofecundação, sendo esta evitada apenas por sistemas de autoincompatibilidade pré-zigóticos (SI) capazes de inibirem a germinação dos grãos de pólen ou o crescimento de tubos polínicos (De Nettancourt 1997; Richards 1997). Ainda que a presença do SI em orquídeas tenha sido pouco registrada (Dressler 1981), este mecanismo é comumente encontrado nas espécies da subtribo Pleurothallidinae (Barbosa *et al.* 2009; Borba *et al.* 2011; Bogarín *et al.* 2018).

Nesta subtribo, o gênero *Acianthera*, o qual compreende cerca de 200 espécies distribuídas por toda América do Sul (Pridgeon *et al.* 2005), tem sido um dos mais estudados quanto ao sistema reprodutivo, sendo as espécies predominantemente autoincompatíveis (Borba *et al.* 2001b, 2011; Melo *et al.* 2011). Aparentemente, a reação do sistema de autoincompatibilidade gametofítico (GSI) é a mais frequente nas espécies de *Acianthera*, cessando o crescimento de tubos polínicos incompatíveis ainda na coluna (Borba *et al.* 2001b, 2011; Capítulo 2).

Neste gênero, as espécies podem apresentar diferentes graus de autoincompatibilidade, desde parcial a completa (Borba *et al.* 2001b, 2011; Melo *et al.* 2011). As espécies com autoincompatibilidade parcial formam alguns frutos após a autopolinização, eventualmente podendo chegar a 1/3 do observado em polinizações cruzadas, porém esses frutos apresentam menos de 20% das sementes com embrião (Borba *et al.* 2001b, 2011; Melo *et al.* 2011). Embora a alta taxa de sementes sem embrião em frutos provenientes de autopolinização possa estar relacionada à depressão endogâmica, a presença de tubos polínicos irregulares e anômalos nesses frutos revelou um segundo sítio de reação de autoincompatibilidade agindo no ovário de *Acianthera johannensis* (Barb.Rodr.) Pridgeon & M.W.Chase (Borba *et al.* 2001b, 2011; Capítulo 2). Essa reação de autoincompatibilidade no ovário é governada pelo mesmo mecanismo que age na coluna, o GSI (Capítulo 2), diferindo do típico sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI) encontrado em outras famílias (Seavey & Bawa 1986; Gibbs 2014).

A reação do GSI no ovário pode operar na maior parte dos tubos polínicos incompatíveis, ocasionando o aborto da flor ou do fruto imaturo, além disso pode agir na morte parcial dos tubos, em que o desenvolvimento desse fruto é continuado (Borba *et al.* 2001b; Capítulo 2). Neste último caso, o desenvolvimento do fruto ocorre devido

a presença de tubos polínicos percorrendo o canal estilar que levam à produção de auxinas, as quais estão diretamente relacionadas a diferenciação do ovário (Arditti 1979; Avadhani *et al.* 1994, Novak *et al.* 2014). Deste modo, também poderia ocorrer o crescimento de óvulos não fecundados, formando assim as estruturas consideradas vazias ou sementes sem embrião em frutos resultantes de autopolinização, como sugerido para algumas espécies de *Acianthera* (Borba *et al.* 2001b; Capítulo 2) e de *Restrepia* (Millner *et al.* 2015).

Para inferir a ação da depressão endogâmica, a maioria dos estudos baseia-se apenas na análise de sementes (contagem e presença do embrião) em frutos após experimentos de polinização (Harder *et al.* 2012). Contudo, a distinção entre óvulos não fecundados e sementes abortadas pode ser de difícil detecção, uma vez que o crescimento dos tegumentos dos óvulos pode ser induzido pela ação de hormônios durante o desenvolvimento do fruto (Van Overbeek *et al.* 1941; Seavey *et al.* 2000; Harder *et al.* 2012).

Diante deste cenário, testamos se a ocorrência do sistema de autoincompatibilidade que opera no ovário de flores de *A. johannensis* está diretamente relacionada à elevada taxa de estruturas descritas como sementes sem embrião ou vazias em frutos resultantes de autopolinizações. Com isso, abordamos as seguintes questões: (1) O desenvolvimento dos óvulos provenientes de autopolinização difere daqueles seguidos de polinização cruzada? (2) Ovário/fruto desenvolvido após autopolinização tem a maioria dos óvulos não fecundados? (3) Os óvulos não fecundados são capazes de continuar o crescimento até a maturação do fruto? (4) As estruturas descritas como sementes sem embrião ou vazias em frutos desenvolvidos após autopolinizações são óvulos não fecundados e não sementes abortadas?

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies e área de estudo

Analisamos o desenvolvimento de óvulos e sementes em *A. johannensis*, e a título de comparação, analisamos também *Acianthera fabriobarrosii* (Borba & Semir) F.Barros & F.Pinheiro, uma espécie com autoincompatibilidade forte (Borba *et al.* 2001b). *Acianthera johannensis* e *A. fabriobarrosii* apresentam biologia e morfologia floral muito similares, inclusive sendo polinizadas pelas mesmas espécies de Diptera (Borba & Semir 2001; Borba *et al.* 2001b). Os indivíduos de *A. johannensis* foram coletados em campos rupestres situados no estado de Minas Gerais, Brasil, nos municípios de Carrancas, Tiradentes e São Tomé das Letras (n=50), enquanto que os indivíduos de *A. fabriobarrosii* foram coletados nos municípios de Joaquim Felício e Grão Mogol (n=39). Os indivíduos foram cultivados em casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais, e os vouchers estão depositados no herbário BHCB (Borba *et al.* 513 - *A. fabriobarrosii*; Borba *et al.* 2230 - *A. johannensis*).

Polinizações experimentais

Polinizações cruzadas intraespecíficas (intra e interpopulacionais) e autopolinizações experimentais foram realizadas em flores no primeiro dia de antese, a fim de confirmar a presença do mecanismo de autoincompatibilidade nas populações coletadas. Posteriormente, as flores polinizadas foram acompanhadas até o seu fenecimento ou desenvolvimento do fruto. Os frutos que chegaram à maturidade foram coletados e fixados em solução de FAA 50 (formaldeído 37%, ácido acético glacial e etanol 50 %, 1:1:18 v/v; Johansen 1940) por 48 horas e armazenados em etanol 50%. Usando paquímetro digital, foram mensuradas as medidas de comprimento e largura dos

frutos maduros resultantes dos tratamentos de polinização. A normalidade dos dados obtidos para estes parâmetros foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk e os valores foram comparados pelo teste *t* de Student utilizando o software R (R Development Core Team 2019). Adicionalmente, cerca de 500 sementes por fruto de ambos os tratamentos para cada uma das espécies foram avaliadas e classificadas como sementes viáveis (sementes com embrião bem desenvolvido) ou inviáveis (sementes sem embrião ou com embrião reduzido), segundo Borba *et al.* (2001b). Óvulos e sementes de frutos jovens e maduros foram reagidos com floroglucinol acrescido de HCl para avaliação da presença de lignina (O'Brien & McCully 1981) nas células do envoltório seminal.

Desenvolvimento de óvulos e sementes após polinizações experimentais

Uma vez que a megasporogênese, megagametogênese e o desenvolvimento de sementes após polinizações cruzadas já foram descritas e detalhadas para *A. johannensis* (Duarte *et al.* 2019), nós analisamos somente o desenvolvimento de ovários e frutos após autopolinizações para essa espécie. Além disso, para termos o referencial de ontogênese feminina em uma espécie com GSI típico, foi analisado o desenvolvimento de óvulos e sementes de *A. fabiobarrosii* após polinizações experimentais. De modo geral, comparamos os principais eventos da ontogênese feminina entre as espécies e os tratamentos de polinizações.

O tempo de coleta de ovários e frutos após polinizações experimentais adicionais foi aplicado de acordo com Duarte *et al.* (2019). Os intervalos de coleta de 7, 12, 20, 38-44, 46, 90 e 120 dias após as polinizações (DAP) foram avaliados para as duas espécies. Para cada intervalo, ovários e frutos foram coletados e fixados em FAA 50 por 48 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica (50-95%) e incluídas em (2-hidroxietil)-metacrilato Leica®. Foram feitas secções seriadas

longitudinalmente e transversalmente, com espessura entre 4,5-5 μm , usando micrótomo de rotação Zeiss Hyrax M40. As secções foram coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (modificado de O'Brien *et al.* 1964), analisadas e documentadas em microscópio Olympus CX41 com câmera acoplada. Algumas amostras de frutos maduros foram coradas com vermelho de rutênio para avaliação da presença de pectina (O'Brien & McCully 1981).

Para avaliar o sucesso de fecundação dos óvulos após experimentos de polinizações controladas em *A. johannensis*, analisamos a ocorrência de óvulos fecundados e não fecundados em secções de ovários/frutos 38-46 DAP em ambos os tratamentos. Para isso, avaliamos dez secções (mínimo de 50 μm de distância entre cada secção) de cada ovário/fruto desenvolvido a partir de autopolinização (n= 3; 39, 44, 46 DAP) e de polinizações cruzadas (n = 6; 38, 40, 42, 44 DAP). Para cada secção, analisamos apenas os óvulos com megagametófito visível, sendo contabilizado um total de 661 óvulos e sementes. Os óvulos fecundados foram caracterizados pela penetração do tubo polínico, pelo conteúdo citoplasmático denso da sinérgide ou pela presença do zigoto, e sementes pela presença de embrião. Os valores obtidos em proporção foram transformados em arco seno e comparados pelo teste *t* de Student utilizando o software R (R Development Core Team 2019).

RESULTADOS

Frutificação após polinizações experimentais

Flores de *Acianthera fabriobarrosii* desenvolveram frutos somente após polinizações cruzadas (Tab. 1). Estes chegaram à maturidade em, aproximadamente, 120 DAP, com média de 15,5 mm de comprimento e 5,4 mm de largura, apresentando mais de 90% das sementes com embrião (Tab. 1). Por outro lado, *A. johannensis*

formou 13 frutos desenvolvidos após autopolinizações (n=153, Tab. 1), provenientes apenas de quatro indivíduos oriundos de três populações. A frutificação por polinização cruzada nesta espécie foi maior do que por autopolinização (Tab. 1), com exceção de um indivíduo que obteve 32% de frutos formados em autopolinizações (n=25 flores) contra 16% em polinizações cruzadas (n=18 flores). Os frutos alcançaram a maturidade entre 90-110 DAP em ambos os tratamentos de polinizações. Entretanto, os frutos resultantes de polinização cruzada apresentaram largura ($t = 2,685$, $p \leq 0,05$) e comprimento ($t = 3,752$, $p \leq 0,5$) maiores em relação aos frutos resultantes de autopolinização, bem como maior proporção de sementes viáveis (Tab. 1) em *A. johannensis*.

Desenvolvimento de óvulos e sementes após polinizações experimentais

Flores após polinizações cruzadas em *A. fabiobarrosii* apresentaram tubos polínicos próximos à placenta com ca. 10 DAP (Fig. 1A). Em contraste, em flores autopolinizadas de *A. fabiobarrosii* e grande parte das flores de *A. johannensis*, as quais feneceram entre 7-14 DAP, os tubos polínicos não alcançaram o ovário e a placenta estava degenerada (Fig. 1B). No entanto, algumas exceções ocorreram em flores autopolinizadas de quatro indivíduos de *A. johannensis*, em que os tubos polínicos cresceram até o ovário e, concomitantemente, iniciou-se o processo de diferenciação da célula arquesporrial 10 DAP, como foi observado em flores de *A. fabiobarrosii* após polinizações cruzadas (Fig. 1C).

A megasporogênese em *A. fabiobarrosii* envolveu a formação de díade após a meiose I do megasporócito (Fig. 1D) a partir de 25 DAP. Logo após, a célula calazal desta díade passou pela segunda fase da meiose. Desta forma, ao final foram formados três megásporos (Fig. 1E), em que apenas o mais próximo à calaza foi funcional, sendo

os outros dois degenerados (Fig. 1F). Paralelamente a esse processo, os tegumentos interno e externo diferenciaram-se, sendo formados por duas camadas de células cada (Fig. 1D). Devido ao baixo número de frutos desenvolvidos após autopolinizações em *A. johannensis*, não foi possível analisar o processo da megasporogênese após autopolinizações nessa espécie.

A megagametogênese iniciou-se a partir de 25-35 DAP para ambas as espécies, havendo diferença no número de núcleos do megagametófito entre as espécies. O megagametófito de *A. johannensis* comumente apresentou cinco núcleos, os quais formaram duas sinérgides, a oosfera e a célula central (dois núcleos polares) na maturidade (Fig. 1G). Já o megagametófito maduro de *A. fabiobarrosii* continha seis núcleos, formando duas sinérgides, a oosfera, a célula central com um núcleo polar e duas antípodas (Fig. 1H), sendo as antípodas degeneradas após a fecundação. De modo geral, ambas as espécies apresentaram óvulos anátropos, tenuinucelados e bitegmentados.

A fecundação dos óvulos ocorreu aproximadamente 40 DAP em ambos os tratamentos e espécies (Fig. 2A-B). Logo após a fecundação, o zigoto embrionário e o núcleo primário do endosperma foram formados em ambas as espécies. Contudo, somente o zigoto passou por divisão transversal (Fig. 2C), originando uma célula calazal e outra micropilar. A célula calazal após divisões mitóticas originou o proembrião, enquanto a célula micropilar deu origem ao suspensor (Fig. 2D). Somente após a formação do zigoto, as células do tegumento externo iniciaram o processo de alongamento e diferenciação (Fig. 2E). Frutos resultantes de autopolinização em *A. johannensis* e polinização cruzada em *A. fabiobarrosii* apresentaram sementes com embrião desenvolvido com aproximadamente 50 e 60 DAP, respectivamente. As sementes de ambas as espécies continham embrião com células indiferenciadas e

envoltório composto por uma camada de células da testa com espessamento lignificado na parede (Fig. 2F-G). Óvulos não fecundados foram observados em frutos maduros de *A. johannensis* após a autopolinização, em que a parede das células do tegumento continha apenas pectina (Fig. 2H), sendo estes óvulos ainda ligados na placenta.

Ovários e frutos jovens de *A. johannensis* mostraram maior proporção de óvulos fecundados após polinizações cruzadas ($t = 10,059$; $df = 75,77$; $p < 000,1$; Fig. 3) quando comparados aos de autopolinizações, os quais continham *ca.* 40% dos óvulos não fecundados (Fig. 3). Além disso, a maior parte dos óvulos não fecundados (60%) iniciou o processo de degeneração das células do tegumento externo (Fig. 2I) e, posteriormente, ocorreu à morte do megagametófito.

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que a elevada taxa de sementes sem embrião, em frutos resultantes de autopolinização em *A. johannensis*, está diretamente relacionada à ação precoce da depressão endogâmica e não à reação de autoincompatibilidade tardia. Foi demonstrado que as estruturas previamente observadas de fato são sementes abortadas e não óvulos não fecundados em frutos após autopolinização, evidenciado pela: fecundação na maioria dos óvulos; degeneração da maior parte dos óvulos não fecundados; e alongamento e diferenciação das células do tegumento apenas em óvulos fecundados. Estes eventos indicam que há formação de sementes após a autopolinização, e que a depressão endogâmica é a causa dos abortos em zigotos e embriões nesses frutos em *A. johannensis*, como foi sugerido para essa e outras espécies de Pleurothallidinae com autoincompatibilidade parcial.

Como esperado e indicado por Borba *et al.* (2001, 2011), foram constatadas a autoincompatibilidade forte para *A. fabriobarrosii* e parcial em *A. johannensis*, em que

quatro indivíduos semicompatíveis foram encontrados nesta última espécie. Em tese, a ocorrência eventual de autocompatibilidade em espécies de orquídeas autoincompatíveis estaria restrita a um ou poucos indivíduos dentro das populações (Johansen 1990; Gontijo *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2011; Millner *et al.*, 2015), observado apenas em um indivíduo de *A. johannensis* neste estudo. Contudo, a verdadeira autocompatibilidade ocorre quando os grãos de pólen provenientes de polinização cruzada e autopolinização, apresentam a mesma competitividade, sendo capazes de produzir conjuntos semelhantes de sementes viáveis (Levin 1996; Harder *et al.* 2012). Em indivíduos semicompatíveis, a falha do sistema de autoincompatibilidade pode ter ocorrido por meio de mutações no gene ligado a autoincompatibilidade, por poliploidização e até mesmo pela idade da flor, levando a uma flexibilidade deste sistema (Richards, 1997; Travers *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2017). Deste modo, essa flexibilidade do SI pode ser reconhecida em *A. johannensis*, dado o fato de que uma reação de autoincompatibilidade parcial opera no ovário após autopolinizações em indivíduos semicompatíveis dessa espécie (Capítulo 2).

Embora a principal causa da abscisão de flores autopolinizadas nestas duas espécies seja a reação de GSI operando na coluna (Borba *et al.* 2001b; Capítulo 2), a presença do GSI no ovário de alguns indivíduos de *A. johannensis*, como registrado no Capítulo 2, estaria relacionada ao baixo número de óvulos fecundados resultantes de autopolinizações quando comparado ao de polinização cruzada. Isto ocorre devido à morte parcial dos tubos polínicos no ovário, que limita a quantidade de tubos viáveis para fecundar os óvulos, como relatado para *A. johannensis*, e também para outras espécies com LSI pré-zigótico (Sage *et al.* 1994, 1999; Sage & Sampson 2003; Hao *et al.* 2012). Adicionalmente, a reação de autoincompatibilidade também pode levar ao colapso do tegumento do óvulo e posterior degeneração do megagametófito (Sage *et al.*

1999; Sage *et al.* 2006; Xiong *et al.* 2019), uma vez que a reação do GSI no ovário atua na morte dos microgametófitos, como observado em *A. johannensis*.

O típico desenvolvimento de óvulos e sementes em *A. johannensis* observados após polinizações cruzadas, destacando a redução no número de megásporos e de núcleos formados no megagametófito (Duarte *et al.* 2019), também foi encontrado em após autopolinizações nessa espécie, bem como em *A. fabriobarrosii* (polinizações cruzadas). Embora o número de núcleos no megagametófito maduro tenha diferido entre as duas espécies, outras características, tais como formação de tríades de megásporos, megagametófito monospórico, óvulo anátropo, tenuinucelado e bitegmentado, e semente composta por embrião indiferenciado e exotesta, foram idênticas entre essas espécies, bem como observado em outras espécies de Orchidaceae (Swamy 1949; Johri *et al.* 1992; Mayer *et al.* 2011).

As principais diferenças entre os tratamentos de polinizações ocorreram anteriormente ao desenvolvimento dos óvulos, uma vez que a maior parte das flores autopolinizadas de *A. johannensis* e todas de *A. fabriobarrosii* não apresentaram diferenciação das células da placenta. Aparentemente não há indução de hormônios durante o crescimento de tubos polínicos incompatíveis anteriormente à abscisão das flores em espécies autoincompatíveis, ao contrário de espécies com autocompatibilidade, em que os tubos polínicos próprios são capazes de induzir a diferenciação dos óvulos (Johansen 1990; Zhang & O'Neill 1993), como observado em alguns indivíduos de *A. johannensis*. A indução de auxina em flores não polinizadas, registradas em algumas espécies de Orchidaceae (Arditti 1979; Johansen 1990; Zhang & O'Neill 1993) e também em outras famílias (e.g., Van Overbeek *et al.* 1941), leva ao desenvolvimento de frutos partenocárpicos, sendo que em alguns casos foi observado o crescimento tegumentar em óvulos. Entretanto, a aplicação de NAA (ácido naftaleno-

acético) em flores não polinizadas de *Acianthera* não induziu o desenvolvimento de frutos e diferenciação da placenta, aumentando, no entanto, a longevidade em algumas flores destas espécies (dados não publicados).

De modo geral, este estudo demonstrou que (1) em frutos resultantes de autopolinizações em *A. johannensis*, o desenvolvimento de óvulos e sementes não diferiu daqueles oriundos de polinização cruzada; (2) ovários/frutos desenvolvidos após autopolinizações tiveram a maior parte dos óvulos fecundados; (3) a maioria dos óvulos não fecundados estava degenerada nesses ovários/frutos; (4) os frutos desenvolvidos após autopolinizações tiveram grande parte das sementes abortadas, não possuindo embrião. Assim, tanto a depressão endogâmica quanto o GSI no ovário são mecanismos relacionados à baixa quantidade de sementes viáveis por autofecundação em indivíduos semicompatíveis de *A. johannensis*.

Diante deste cenário, corroboramos que a ação do GSI e a depressão endogâmica estão relacionadas a elevada variabilidade genética e a baixa endogamia encontrada em populações em que há indivíduos semicompatíveis (Borba *et al.* 2001a). Por fim, sugerimos que devido à magnitude de reações de autoincompatibilidade encontrada nas espécies de Pleurothallidinae, principalmente em *Acianthera*, estudos genéticos e dialélicos são necessários para elucidar a base molecular e os mecanismos envolvidos nestes processos.

REFERÊNCIAS

- Allen A.M., Hiscock S.J. (2008) Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In: Franklin-Tong V.E., (Ed), *Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 73–101.
- Arditti J. (1979) Aspects of the physiology of orchids. *Advances in Botanical Research*, 7, 421–655.

- Avadhani P.N., Nair H., Arditti J., Hew C.S. (1994) Physiology of orchid flower. In: Arditti J. (Ed), *Orchid biology, review and perspectives VI*. Wiley-Interscience, New York, USA, pp 189–362.
- Barbosa A.R., Melo M.C., Borba E.L. (2009) Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Systematics and Evolution*, **283**, 1–8.
- Bogarín D., Fernández M., Borkent A., Heemskerk A., Pupulin F., Ramírez S., Smets E., Gravendeel B. (2018) Pollination of *Trichosalpinx* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **186**, 510–543.
- Borba E.L., Semir J. (1999) Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution*, **217**, 197–204.
- Borba E.L., Semir J. (2001) Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany*, **88**, 75–88.
- Borba E.L., Felix J.M., Solferini V.N., Semir J. (2001a) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: Evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany*, **88**, 419–428.
- Borba E.L., Semir J., Shepherd G.J. (2001b) Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany*, **88**, 89–99.
- Borba E.L., Braga P.I.S. (2003) Reproductive biology of *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melittophily and self-compatibility in a basal Laeliinae. *Revista Brasileira de Botânica*, **26**, 541–549.
- Borba E.L., Funch R.R., Ribeiro P.L., Smidt E.C., Silva-Pereira V. (2007) Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Plant Systematic and Evolution*, **267**, 129–146.
- Borba E.L., Barbosa A.R., Melo M.C., Gontijo S.L., Oliveira H.O. (2011) Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): evolutionary and systematic implications. *Lankesteriana*, **11**, 207–221.
- Charlesworth D., Charlesworth B. (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 237–268.

- Cruz D.T., Selbach-Schadelbach A., Lambert S.M., Riberio P.L., Borba E.L. (2011) Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, **295**, 87–98.
- De Nettancourt D. (1997) Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction*, **10**, 185–199.
- Dressler R.L. (1981) *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge, USA.
- Dressler R.L. (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, USA.
- Duarte M.O., Oliveira D.M.T., Borba E.L. (2019) Ontogenesis of ovary and fruit of *Acianthera johannensis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae) reveals a particular female embryology. *Flora*, **259**, 151462.
- Ferrer M.M., Good S.V. (2012) Self-sterility in flowering plants: preventing self-fertilization increases family diversification rates. *Annals of Botany*, **110**, 535–553.
- Gibbs P.E. (2014) Late-acting self-incompatibility – the pariah breeding system in flowering plants. *New Phytologist*, **203**, 717–734.
- Gontijo S.L., Barbosa A.R., Melo M.C., Borba E.L. (2010) Occurrence of different sites of self-incompatibility reaction in four *Anathallis* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Species Biology*, **25**, 129–135.
- Hao Y.Q., Zhao X.F., She D.Y., Xu B., Zhang D.Y., Liao W.J. (2012) The role of late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in governing female fertility in monkshood, *Aconitum kusnezoffii*. *PLoS ONE*, **7**, e4703.
- Harder L.D., Hobbhahn N., Richards S.A. (2012) How depressed? Estimates of inbreeding effects during seed development depend on reproductive conditions. *Evolution*, **66**, 1375–1386.
- Hufford K.M., Hamrick L.L. (2003) Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). *Evolution*, **57**, 518–526.
- Husband B.C., Schemske D.W. (1996) Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, **50**, 54–70.
- Jiang J., Guan Y., McCormick S., Juvik J., Lubberstedt T., Fei S.Z. (2017) Gametophytic self-incompatibility is operative in *Miscanthus sinensis* (Poaceae) and is affected by pistil age. *Crop Science*, **57**, 1948–1956.

- Johansen D.A. (1940) *Plant microtechnique*. Mc Graw Hill, New York, USA.
- Johansen B. (1990) Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **103**, 165–196.
- Johri B.M., Ambegaokar K.B., Srivastava P.S. (1992) *Comparative embryology of Angiosperms*. Springer, Berlin, Germany.
- Levin D.A. (1996) The evolutionary significance of pseudo-self-fertility. *American Naturalist*, **148**, 321–332.
- Mayer J.L.S., Carmello-Guerreiro S.M., Appezzato-da-Glória B. (2011) Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Flora*, **206**, 601–609.
- Melo M.C., Taucce P.P.G., Borba E.L. (2011). Reproductive biology and isolation mechanisms in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, **293**, 161–176.
- Millner H.J., McCrea A.R., Baldwin T.C. (2015). An investigation of self-incompatibility within the genus *Restrepia*. *American Journal of Botany*, **102**, 487–494.
- Novak S.D., Luna L.J., Gamage R.N. (2014) Role of auxin in orchid development. *Plant Signaling and Behavior*, **10**, e972277.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, **59**, 368–373.
- O'Brien T.P., McCully M.E. (1981) *The study of plant structure: principles and selected methods*. Termarcaphi Pty. Ltd, Melbourne, Australia.
- Pansarin E.R., Amaral M.C.E. (2008) Pollen and nectar as a reward in the basal epidendroid *Psilochilus modestus* (Orchidaceae: Triphoreae): a study of floral morphology, reproductive biology and pollination strategy. *Flora*, **203**, 474–483.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W., Rasmussen F.N. (2005) *Genera Orchidacearum*, vol 4, Epidendroideae (part one). Oxford University Press, Oxford, UK.
- R Development Core Team. (2019) R: *A language and environment for statistical computing [Software]*. Vienna, AT, R Foundation for Statistical Computing.
- Richards A.J. (1997) *Plant breeding systems*. Chapman & Hall, London, UK.

- Sage T.L., Bertin R., Williams E.G. (1994) Ovarian and other late-acting self-incompatibility. In: Williams E.G., Clark A.E., Knox R.B. (Eds.), *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants*, vol. 2. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp 116–140.
- Sage T.L., Strumas F., Cole W.W., Barrett S.C.H. (1999) Differential ovule development following self- and cross-pollination: the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 855–870.
- Sage T.L., Sampson F.B. (2003) Evidence for ovarian self-incompatibility as a cause of self-sterility in the relictual woody angiosperm, *Pseudowintera axillaris* (Winteraceae). *Annals of Botany*, **91**, 807–816.
- Sage T.L., Price M.V., Waser N.M. (2006) Self-sterility in *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae) is due to prezygotic ovule degeneration. *American Journal of Botany*, **93**, 254–262.
- São Leão L.C., Sá-Haiad B., Rodarte A.T.A., de Araujo Pimentel R.R., Benevides C.R., Santiago-Fernandes L.D.R., Lima H.A. (2019) Reproductive biology of two synchronopatric neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). *Flora*, **251**, 95–104.
- Seavey S.F., Bawa K.S. (1986) Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *The Botanical Review*, **52**, 195–218.
- Seavey S.R., Mangels S.K., Chappel N.J. (2000) Unfertilized ovules of *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) continue to grow in developing fruits. *American Journal of Botany*, **87**, 1765–1768.
- Sharma I.K., Clements M.A., Jones D.L. (2000) Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbossa* R.Br. (Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **28**, 651–663.
- Silva-Pereira V., Camargo E., Smidt E., Borba E.L. (2007) Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Systematic and Evolution*, **269**, 171–182.
- Stort M.N.S., Martins P.S. (1979) Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). *Ciência & Cultura*, **38**, 1080–1083.
- Swamy B.G.L. (1949) Embryological studies in the Orchidaceae. I. Gametophytes. *The American Middle Naturalist*, **41**, 184–201.
- Travers S.E., Mena-Alí J.I., Stephenson A.G. (2004) Plasticity in the self-incompatibility of *Solanum carolinense*. *Plant Species Biology*, **19**, 127–135.

- Van Overbeek J., Concklin M.E., Blakelee A.F. (1941) Chemical stimulation of ovule development and its possible relation to parthenogenesis. *American Journal of Botany*, **28**, 647–656.
- Xiong H., Zou F., Yuan D., Tan X., Yuan J., Liao T., Niu G. (2019) Comparison of self- and cross-pollination in pollen tube growth, early ovule development and fruit set of *Camellia grijsii*. *International Journal of Agricultural Biology*, **18**, 1478/201x/00–0–000–000
- Zhang X.S., O'Neill S.D. (1993) Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *The Plant Cell*, **5**, 403–418.

Tab. 1. Porcentagem de frutos maduros, sementes viáveis e medidas de comprimento e largura dos frutos após polinizações experimentais em duas espécies de *Acianthera*.

Espécie	Frutificação (<i>N</i> flores/ <i>N</i> indivíduos)		Sementes viáveis (mín.-máx.)		Comprimento/largura dos frutos, em mm média±desvio padrão (<i>N</i>)	
	Autopolinização	Polin. cruzada	Autopolinização	Polin. cruzada	Autopolinização	Polin. cruzada
<i>A. fabriobarrosii</i>	0% (64/12)	59% (91/18)	-	91% (83-99%)	-	15,5±2,2/5,4±0,8 (21)
<i>A. johannensis</i>	8,5% (153/28)	46% (166/28)	27% (21-32%)	90% (65-99%)	8±2,2/3,4±0,8 (4)	12,5±1,5/4,6±0,8 (14)

N, número amostral; Polin., polinização; mín.-máx., mínimo-máximo.

Figuras

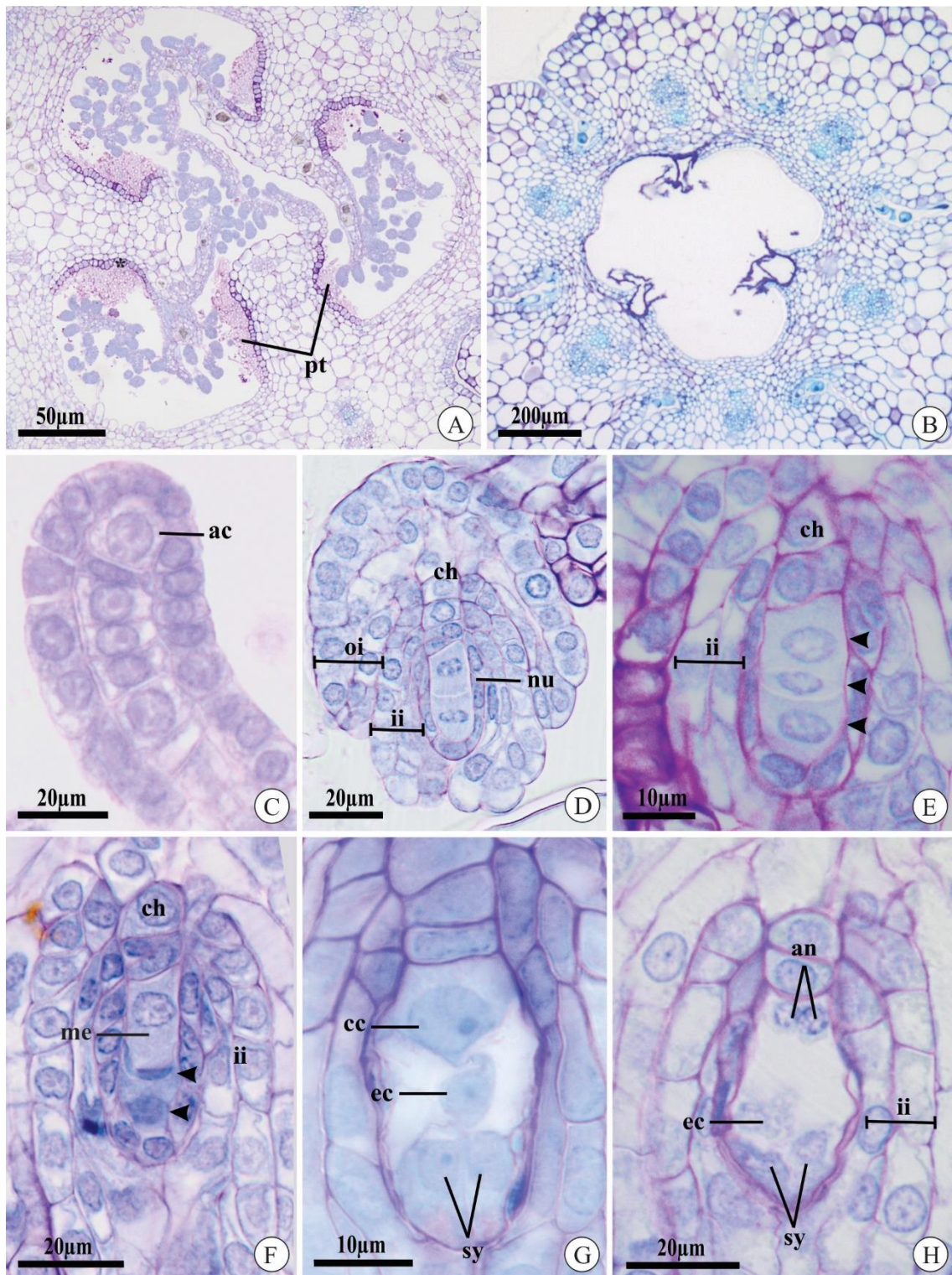


Fig. 1. Desenvolvimento de óvulos após polinizações cruzadas em *Acianthera fabiobarrosii* (A,C-F, H) e autopolinizações em *A. johannensis* (B, G). Secções transversais (A-B) e longitudinais (C-H). A. Visão geral do ovário com primórdios de

óvulos e tubos polínicos 21 DAP. **B.** Placentas degeneradas 7 DAP. **C.** Diferenciação da célula arquesporial no nucelo 18 DAP. **D.** Díade de megásporos; note a epiderme nucelar subjacente à díade e o desenvolvimento do tegumento interno e externo. **E.** Tríade de megásporos (pontas de seta) após a meiose II. **F.** Megagametófito jovem próximo à região calazal; note os dois megásporos não funcionais em processo de degeneração (pontas de seta). **G.** Megagametófito maduro de *A. johannensis* com duas sinérgides, a oosfera e a célula central. **H.** Megagametófito maduro de *A. fabriobarrosii* com duas sinérgides, a oosfera e as duas antípodas. ac, célula arquesporial; an, antípodas; cc, célula central; ch, calaza; ec, oosfera; ii, tegumento interno; me, megagametófito jovem; nu, nucelo; oi, tegumento externo; pt, tubos polínicos; sy, sinérgide.

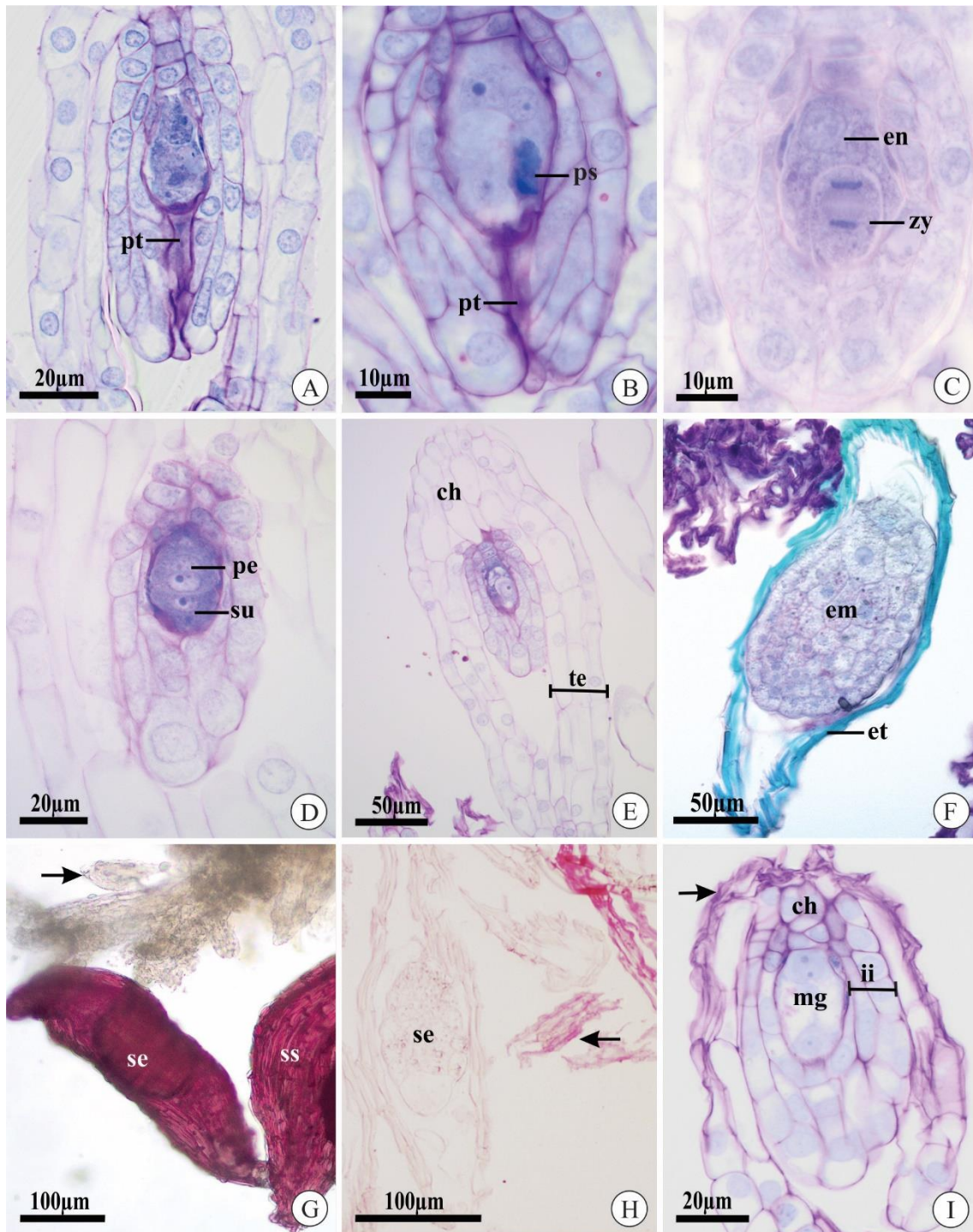


Fig. 2. Desenvolvimento de sementes após polinizações cruzadas em *Acianthera fabiobarrosii* (A, D-F) e autopolinizações em *A. johannensis* (B-C, G-I). Secções longitudinais. **A.** Óvulo fecundado 40 DAP. **B.** Óvulo fecundado 39 DAP; note uma das sinérgides apoptótica. **C.** Placa metafásica da primeira divisão do zigoto 42 DAP; observe a presença do núcleo primário do endosperma. **D-E.** Semente imatura; em D,

note o proembrião e suspensor; em E, observe as células da testa alongadas. **F.** Semente madura de fruto 100 DAP; note o embrião e o envoltório da semente; observe a exotesta com coloração esverdeada evidenciando o espessamento lignificado da parede. **G.** Presença de lignina na parede de células da exotesta em sementes com embrião e sem embrião de frutos maduros 100 DAP, evidenciada pelo teste com floroglucinol; note a presença de óvulos não fecundados (seta) sem coloração. **H.** Semente madura e óvulo não fecundado degenerado; observe a parede péctica das células tegumentares do óvulo degenerado corado com vermelho de rutênio (seta). **I.** Óvulo não fecundado (39 DAP) com tegumento externo degenerado (seta). ch, calaza; em, embrião; en, endosperma; et, exotesta; ii, tegumento interno; mg, megagametófito maduro; pe, proembrião; ps, sinérgide penetrada; pt, tubo polínico; se, semente com embrião; ss, semente sem embrião; su, suspensor; te, testa; zy, zigoto.

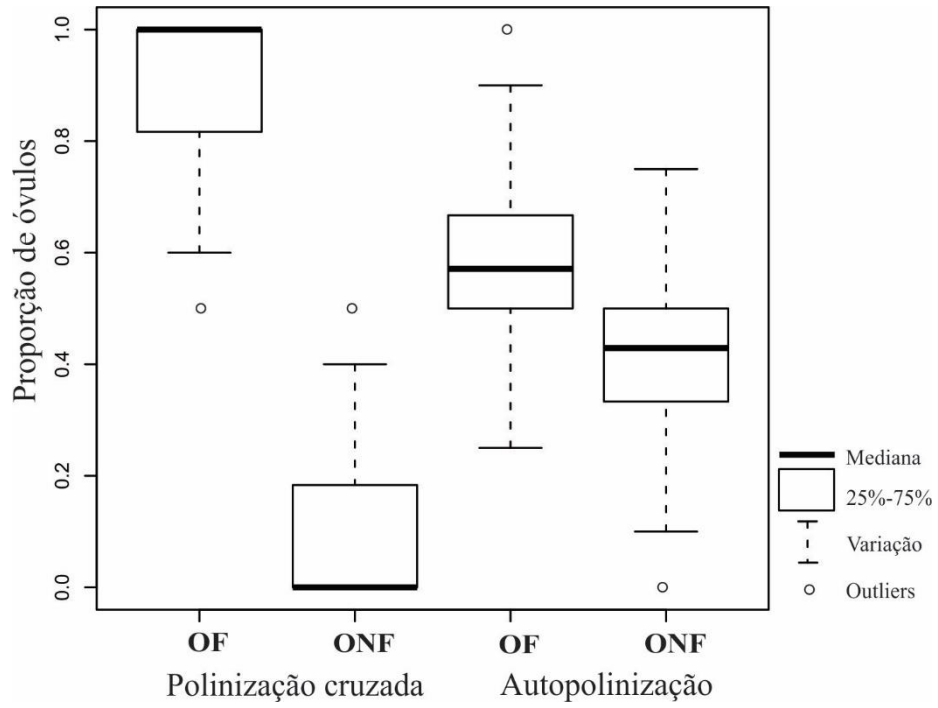


Fig. 3. Proporção de óvulos fecundados (OF) e óvulos não fecundados (ONF) em ovários/frutos 38 a 46 dias após polinizações experimentais em *Acianthera johannensis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora um sistema de autoincompatibilidade possa atuar tardiamente no ovário de *Acianthera johannensis*, esse mecanismo não está relacionado ao elevado número de estruturas consideradas sem embrião em frutos resultantes de autopolinização, como foi sugerido neste estudo. De acordo com as predições concluímos que:

(1) a presença de tubos polínicos irregulares e anômalos encontrados nos ovários/frutos de *A. johannensis* após autopolinizações é devida ao sistema de autoincompatibilidade que atua tardiamente no ovário;

(2) os sítios de reações de autoincompatibilidade na coluna e no ovário são governados pelo sistema de autoincompatibilidade gametofítico (GSI);

(3) a morfologia dos tubos polínicos obstruídos no ovário é homóloga aos tubos polínicos que cessam o crescimento na coluna após autopolinização;

(4) as estruturas vazias em frutos desenvolvidos após autopolinização são sementes abortadas e não óvulos não fecundados, dada à ocorrência de fecundação em grande parte dos óvulos;

(5) o desenvolvimento dos óvulos em ovários após autopolinização é similar aos de polinização cruzada.

O registro de morte celular programada em tubos polínicos incompatíveis na coluna contribui para o entendimento da autoincompatibilidade em *Acianthera*. Além disso, acreditamos que a ocorrência do GSI no ovário também atua em outras espécies de Pleurothallidinae com autoincompatibilidade parcial.

Sugerimos que futuras investigações abordem tanto estudos morfológicos do tubo polínico quanto moleculares da reação de autoincompatibilidade em Pleurothallidinae, a fim de esclarecer se o mecanismo de reação do GSI nessas espécies é diferente do registrado em outras famílias.