

Sistema reprodutivo do Ipê-Branco – *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae)

Gabriel Gandolphi¹ e Nelson Sabino Bittencourt Jr.^{1,2}

Recebido em 12/02/2010. Aceito em 28/06/2010

RESUMO – (Sistema reprodutivo do Ipê-Branco – *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae)). Estudos sobre sistemas reprodutivos têm indicado o predomínio da autoincompatibilidade de ação tardia (AIT) em Bignoniaceae, embora poucas espécies tenham sido investigadas e ocorram outros tipos de sistemas reprodutivos na família. O presente estudo objetivou determinar o sistema reprodutivo de *T. roseo-alba* através de experimentos de polinizações controladas, análise histológica dos eventos posteriores à polinização, verificação do desenvolvimento *in situ* dos tubos polínicos e testes de germinação de sementes. Apesar de os tubos polínicos penetrarem e fecundarem a maioria dos óvulos em pistilos autopolinizados, o aborto de 100% dos mesmos foi verificado e, embora sua abscisão tenha ocorrido entre o quarto e o sexto dia após o início da antese, observou-se um ligeiro crescimento dos óvulos e do ovário precedendo a abscisão, porém inferior ao crescimento nos pistilos submetidos à polinização cruzada. A endospermogênese inicial e a formação do tubo proembriônico também foram mais lentas nos pistilos autopolinizados. A longevidade dos pistilos autopolinizados foi maior que a de pistilos não polinizados, e a taxa de germinação de sementes foi de 93%, sendo todas as sementes monoembriônicas. Os resultados demonstram que *T. roseo-alba* é espécie auto-estéril, destituída de poliembrionia e que apresenta AIT pós-zigótica.

Palavras-chave: autoesterilidade, autoincompatibilidade de ação tardia, endospermogênese, tubo proembriônico

ABSTRACT – (Breeding system of the White Trumpet Tree – *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae)). Breeding system studies have indicated the predominance of late-acting self-incompatibility (LSI) in Bignoniaceae, despite the relatively few species investigated, and the occurrence of other kinds of breeding systems in this family. This study aimed to determine the breeding system in *T. roseo-alba* by means of controlled experimental pollination, histological analysis of post-pollination events, and studies of pistil longevity, *in situ* pollen tube growth and seed germination. Despite pollen tube penetration and fertilization of most ovules of selfed pistils, 100% of these pistils aborted uniformly between the fourth and sixth day after anthesis onset. Ovary and ovule growth, as well as initial endospermogenesis and proembryonal tube formation were verified in selfed pistils before abscission, but the progress of post-pollination development in these pistils was slower than in crossed pistils. The longevity of self-pollinated pistils was greater than in non-pollinated pistils. Seed germinability was 93%, and all seeds were monoembryonic. These results show that *T. roseo-alba* is a species with post-zygotic LSI, and with no polyembryony.

Key words: endosperm development, late-acting self-incompatibility, proembryonal tube, self-sterility

Introdução

Apesar da diversidade de espécies existente em Bignoniaceae – cerca de 827 espécies (Lohmann 2006) distribuídas em 82 gêneros (Olmstead *et al.* 2009), das quais aproximadamente 620 são espécies neotropicais (Spangler & Olmstead 1999) –, investigações sobre os seus sistemas reprodutivos são relativamente escassas, tendo sido realizadas em pouco mais de 6% (51 espécies) da família (Gibbs & Bianchi 1999; Dutra & Machado 2001; Bittencourt *et al.* 2003; Bittencourt & Semir 2004; 2005; 2006; Correia *et al.* 2005; 2006; Carvalho *et al.* 2007; Yanagizawa & Maiomni-Rodella 2007; Guimarães *et al.* 2008; Maués *et al.* 2008; Srithongchuay *et al.* 2008; Polatto & Alves 2009; Sampaio 2010). Esses estudos indicaram que, com exceção de *Pyrostegia venusta* (Gobatto-Rodrigues & Stort 1992), *Astianthus viminalis* (Bullock 1985), *Tecoma stans* (Singh & Chauhan 1996; Dutra & Machado 2001), *Handroanthus chrysotrichus* (syn. *Tabebuia chrysotricha*), *H. heptaphyllus* (syn. *T. heptaphylla*) (Bittencourt & Semir 2005), *Arrabidaea brachypoda*, *A. samydoidea* e *Jacaranda oxyphylla* (Yanagizawa & Maiomni-Rodella 2007) todas as demais espécies são autoincompatíveis. O predomínio da autoincompatibilidade em Bignoniaceae parece indicar que as barreiras à autofertilidade nesta família são prin-

cipalmente de natureza genética. Por outro lado, estudos realizados em espécies autoférteis de Bignoniaceae indicam que a capacidade de produzir sementes viáveis por autopolinização tanto pode ser decorrente de quebra do sistema de autoincompatibilidade como de uma pseudo-autocompatibilidade decorrente da emergência de apomixia pseudogâmica em espécies poliplóides e poliembriônicas (Bittencourt & Semir 2005; Bittencourt & Moraes 2010).

Embora a autoincompatibilidade seja um evento fisiológico, com base genética, que resulta na incapacidade de plantas férteis formarem sementes quando polinizadas com seu próprio pólen (Brewbaker 1957), certos tipos de depressão endogâmica manifestam-se pela expressão de genes recessivos deletérios, em homozigose, durante o desenvolvimento do embrião e/ou do endosperma, podendo levar ao aborto de até 100% dos frutos resultantes de autopolinização, ainda que os mesmos alcancem diferentes estádios de desenvolvimento (Sage *et al.* 1994). Portanto, a discriminação entre a autoincompatibilidade e a depressão endogâmica de ação precoce como possíveis causas da autoesterilidade frequentemente depende da realização de análises detalhadas da germinação e do desenvolvimento *in situ* dos tubos polínicos, bem como de outros eventos posteriores à polinização no interior dos ovários/frutos e dos óvulos/sementes (Sage *et al.* 1999; Gibbs & Bianchi 1999; Bittencourt *et al.* 2003; Bittencourt & Semir 2005; 2006).

¹ Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Zoologia e Botânica, São José do Rio Preto, SP, Brasil

² Autor para correspondência: nesbitte@ibilce.unesp.br

Nas plantas autoincompatíveis, os tubos polínicos podem ser inibidos no estigma, no estilete, ou a reação da incompatibilidade pode manifestar-se após os tubos polínicos terem alcançado o ovário (Bittencourt 2008). Em todas as 22 espécies autoestéreis de Bignoniaceae investigadas quanto ao local no pistilo onde se manifesta a reação de incompatibilidade foram encontradas evidências da autoincompatibilidade de ação tardia (AIT). A AIT é caracterizada pelo aborto uniforme dos pistilos num curto período após a autopolinização, mesmo tendo os tubos polínicos percorrido o estilete e penetrado a maioria dos óvulos (Seavey & Bawa 1986; Sage *et al.* 1994; Bittencourt 2008). Embora seja um fenômeno amplamente distribuído, ocorrendo de modo agrupado em algumas famílias de angiospermas (Gibbs & Bianchi 1999), os mecanismos fisiológicos e genéticos atuantes na AIT são pouco conhecidos (ver Cope 1962; Jacob 1980; Lipow & Wyatt 2000; LaDoux & Friar 2006).

AAIT pode manifestar-se basicamente de três diferentes modos: (1) com a inibição dos tubos polínicos ocorrendo antes que os óvulos sejam penetrados; (2) com a inibição ocorrendo após a penetração dos óvulos, porém antes de sua fecundação; (3) com a rejeição pós-zigótica dos óvulos (Bittencourt 2008). Estudos em espécies autoincompatíveis de Bignoniaceae, nos quais foram comparados os eventos posteriores à polinização em pistilos autopolinizados *vs.* submetidos à polinização cruzada, indicaram a ocorrência de rejeição pós-zigótica dos pistilos autopolinizados, com o aborto uniforme desses pistilos sendo precedido por um atraso no progresso dos eventos posteriores à polinização, desde a penetração dos óvulos até as fases iniciais da endospermogênese e do desenvolvimento do proembrião (Gibbs & Bianchi 1999; Bittencourt *et al.* 2003; Bittencourt & Semir 2005; 2006).

No Brasil, *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith é uma espécie nativa, muito apreciada como ornamental e de relevante importância econômica, para a qual não há registro de estudos sobre biologia reprodutiva. O objetivo do presente trabalho foi determinar o tipo de sistema reprodutivo ocorrente em *T. roseo-alba* por meio de experimentos de polinizações controladas, análises da longevidade dos pistilos e do desenvolvimento *in situ* dos tubos polínicos por microscopia de fluorescência, análise histológica de eventos posteriores à polinização e testes de germinação de sementes.

Material e métodos

Espécie e local de estudo – O trabalho foi realizado durante o período de agosto de 2006 a dezembro de 2009, utilizando-se sete indivíduos localizados no Campus de São José do Rio Preto da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP). *Tabebuia* contém 67 espécies distribuídas nas Antilhas e Américas Central e do Sul (Grose & Olmstead 2007). *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith é uma espécie arbórea de matas semidecíduas, ocorrente nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás (Lorenzi 2002), bem como no Paraguai e na Bolívia, apresentando ainda uma população disjunta no Peru (Gentry 1992). Caracteriza-se por apresentar folhas palmadas com três folíolos, flores brancas ou rosadas com corola tubular-infundibuliforme, estames didínamos com estaminódio reduzido,

gineceu eussincárpico, bicarpelar e multiovulado, frutos do tipo cápsula loculicida e sementes aladas (N. S. Bittencourt Jr, observações pessoais). No Brasil, sua floração é observada nos meses de agosto a outubro (Lorenzi 2002), caracterizando-se pela produção maciça e explosiva de grande número de flores (floração do tipo “big-bang” *sensu* Gentry 1974) após a perda sazonal das folhas. Sua floração é muito rápida, durando não mais que três dias em cada indivíduo e podendo, às vezes, fragmentar-se em dois ou mais pulsos sucessivos e menos intensos de flores em antese, embora florações pontuais e esporádicas de alguns indivíduos tenham sido também observadas em outros períodos do ano, inclusive durante o primeiro semestre (N. S. Bittencourt Jr, observações pessoais). Além do emprego de sua madeira na construção civil, principalmente em acabamentos internos, no Brasil, *T. roseo-alba* é amplamente utilizada na arborização urbana, devido ao seu porte não muito grande e sua floração exuberante (Lorenzi 2002).

Experimentos de polinizações controladas – Inflorescências inteiras foram ensacadas com sacos de papel impermeável de modo a excluir os polinizadores naturais. Subsequentemente, flores em primeiro dia de antese foram submetidas a autopolinizações (com o pólen da mesma flor ou de outra flor do mesmo indivíduo) ou a polinizações cruzadas (pólen de outro indivíduo, localizado a pelo menos 10 m de distância), marcadas com linhas coloridas junto ao pedicelo (cada cor indicando o tratamento e o dia em que o início da antese foi verificado) e reensacadas. Também foram marcadas e ensacadas flores não tratadas, para testar a possibilidade de ocorrer autopolinização espontânea. Flores não ensacadas foram marcadas para verificar-se a taxa de frutificação natural (controle). Pistilos de flores em antese foram fixados em solução de FAA50 (formaldeído 4%:ácido acético glacial:etanol 50%, 5:5:90) e dissecados em estereomicroscópio para contagem do número de óvulos por ovário. Frutos resultantes de polinizações naturais e polinizações cruzadas manuais foram envolvidos em redes de nylon e monitorados até sua deiscência para a contagem, análise morfológica e teste de germinação das sementes. Medidas do comprimento e da largura das sementes, bem como dos embriões (após dissecação de cada semente) foram feitas com paquímetro digital. A eficácia da conversão de óvulos em sementes viáveis foi verificada comparando-se o número médio de óvulos por ovário com o número médio de sementes normais (categoria I; ver Resultados) por fruto.

Análise do desenvolvimento *in situ* dos tubos polínicos – Autopolinizações e polinizações cruzadas adicionais foram feitas para análise dos eventos posteriores à polinização. Quatro a seis pistilos de cada tratamento foram coletados nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a polinização, fixados em FAA50, clarificados em solução de NaOH 9N e corados com azul de anilina, para se verificar a germinação dos grãos de pólen no estigma e o desenvolvimento dos tubos polínicos ao longo do estilete/ovário utilizando-se microscopia de epi-fluorescência (Martin 1959). As lâminas foram analisadas em microscópio Zeiss Axioskop e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX 51, equipado com câmera digital Olympus Q-Color 5.

Análise histológica dos eventos posteriores à polinização – Pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada, bem como pistilos não polinizados, foram coletados diariamente, do primeiro ao quinto dia após o início da antese. Imediatamente após cada coleta, os pistilos tiveram o ovário seccionado transversalmente em fatias de não mais que cinco milímetros de espessura, as quais foram fixadas em solução fixadora contendo paraformaldeído 4%, glutaraldeído 1% e tampão fosfato pH 7,2 0,1M (McDowell & Trump 1976). O material fixado foi desidratado em série etílica e, posteriormente, infiltrado em historesina Leica® para obtenção de secções histológicas seriadas de 4 µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM2255, utilizando-se navalhas de vidro. As secções foram coradas com azul de toluidina O, sendo as lâminas montadas com resina Permount® e analisadas em microscópio óptico Zeiss Axioskop. As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Olympus BX 51, equipado com câmera digital Olympus Q-Color 5. Foram analisados seis pistilos de cada tratamento e intervalo após a polinização. A análise foi feita considerando-se os seguintes eventos posteriores à polinização: penetração dos óvulos pelos tubos polínicos, fecundação (constatada pela presença do tubo polínico junto à micrópila e por uma sinérgide fortemente corada (Bittencourt *et al.* 2003), alterações subsequentes no zigoto e contagem de células como estimativa do progresso do desenvolvimento inicial do endosperma em

pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada. Em óvulos cujo endosperma apresentava mais de 20 células, o número total de células foi determinado com base no montante de núcleos observados nas secções seriadas do endosperma.

Para verificar o crescimento dos óvulos e dos ovários após a polinização, cinco pistilos autopolinizados e cinco pistilos submetidos à polinização cruzada foram coletados em cada um dos intervalos acima citados e fixados em FAA50. O comprimento e largura de cada ovário foram medidos utilizando-se um paquímetro digital. Em seguida, os ovários foram dissecados para a extração dos óvulos e cinco óvulos de cada pistilo foram desenhados em papel sulfite com o auxílio de microscópio de luz com câmara clara Jenamed. Os óvulos foram medidos com base em escala de uma lâmina micrometrada projetada sobre o papel nas mesmas condições ópticas do material examinado.

Longevidade dos pistilos autopolinizados vs. não polinizados – Inflorescências contendo botões florais em pré-antese em dois indivíduos foram ensacadas com redes de nylon. Subsequentemente, 20 flores em primeiro dia de antese foram autopolinizadas, enquanto outras 20 permaneceram não polinizadas. As flores tiveram o seu cálice marcado com colas plásticas coloridas (cada combinação de cores indicando o dia de abertura da flor e o tratamento recebido) e foram re-ensacadas e monitoradas diariamente até a abscisão dos pistilos, os quais foram fixados em FAA50 e, posteriormente, medidos quanto ao comprimento e à largura do ovário utilizando-se um paquímetro digital. A longevidade foi verificada com base nas datas de início da antese e abscisão do pistilo.

Teste de germinação das sementes – Foram utilizadas 100 sementes provenientes de quatro frutos deiscentes, resultantes de polinizações naturais e pertencentes a quatro indivíduos. Testes preliminares mostraram que somente sementes de tamanho normal e portando embrião sadio (categoria I; ver Resultados) germinavam; portanto, sementes com tais características foram selecionadas, esterilizadas com hipoclorito de sódio a 0,5% e semeadas em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido, sendo mantidas nas condições de luz e temperatura ambientes. Os resultados foram registrados após duas semanas, obtendo-se o número de sementes que germinaram e o número de embriões/plântulas por semente. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam comprimento da radícula $\geq 1,0$ cm, bem como crescimento geotrópico negativo do hipocótilo, cotilédones clorofilados e em ângulo reto com o eixo longitudinal do hipocótilo.

Análises estatísticas – O teste do qui-quadrado (Zar 1999) foi utilizado para se comparar o número de sementes em frutos resultantes de polinização natural vs. polinização cruzada manual, bem como o número de óvulos penetrados e de óvulos apresentando os vários estádios dos eventos subsequentes em pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada, nas secções histológicas dos ovários. A homocedasticidade e a normalidade dos dados de dimensões e longevidade dos ovários foram testadas através do teste *F* e do teste Kolmogorov-Smirnov, respectivamente (Ayres *et al.* 2000). As dimensões de ovários em pistilos autopolinizados vs. não polinizados logo após a abscisão foram comparadas pelo teste *t* de Student (bilateral). Os dados de longevidade dos pistilos não polinizados e autopolinizados não apresentaram distribuição normal, sendo comparados por meio do teste Mann-Whitney (Zar 1999). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software BioEstat 2.0 (Ayres *et al.* 2000).

Resultados

Experimentos de polinizações controladas – Nenhuma das flores utilizadas nos testes de autopolinização induzida e autopolinização espontânea formou fruto, e a taxa de frutificação por polinização cruzada induzida foi quase cinco vezes maior que por polinização natural (Tab. 1). Os frutos alcançaram a maturidade sofrendo deiscência em média 29,8 dias após a realização das polinizações manuais ($n = 26$). As sementes obtidas foram classificadas em seis categorias, quanto à forma e tamanho, e também quanto à presença,

forma e tamanho do embrião (Fig. 1): (1) sementes normais, i.e., sementes com $8,62 \pm 1,08$ mm (média \pm desvio padrão) de comprimento e $27,70 \pm 4,86$ mm de largura, portando um embrião de formato simétrico, sem mal-formações, com $6,12 \pm 0,59$ mm de comprimento e $8,26 \pm 0,84$ mm de largura; (2) sementes de tamanho normal com embrião atrofiado (i.e., embrião $\leq 5,5$ mm de comprimento por $7,0$ mm de largura), ou apresentando deformidades e/ou manchas de necrose; (3) sementes de tamanho normal sem embrião; (4) sementes atrofiadas (≤ 6 mm de comprimento por 14 mm de largura) contendo embrião atrofiado; (5) sementes atrofiadas sem embrião. O teste do qui-quadrado, realizado para o número de sementes normais vs. sementes anormais (i.e., dados agregados das categorias 2-5) em frutos resultante de polinização natural vs. polinização cruzada manual, indicou diferença não significativa ($\chi^2 = 3,64$, $df = 1$, $p = 0,063$). O número de óvulos por ovário foi de $110,2 \pm 6,96$ (média \pm desvio padrão) e as taxas de conversão de óvulos por ovário em sementes viáveis (categoria I) por fruto em polinizações naturais e polinizações cruzadas foram de 27,9% e 37,7%, respectivamente.

Análise do desenvolvimento *in situ* dos tubos polínicos – Embora tenha ocorrido a abscisão de 100% dos pistilos autopolinizados entre o quarto e o sexto dia após o início da antese, verificou-se nos mesmos o desenvolvimento de grande número de tubos polínicos ao longo do estilete (Fig. 2a) e a penetração de muitos óvulos. Ao final do primeiro dia após a autopolinização, os tubos polínicos já haviam alcançado o ovário e penetrado grande parte dos óvulos (Fig. 2b).

Análise histológica dos eventos posteriores à polinização – Tanto nos pistilos autopolinizados quanto nos submetidos à polinização cruzada, os tubos polínicos desenvolveram-se nos espaços intercelulares do tecido transmissor até alcançarem o ovário, dentro do qual cresceram sobre a epiderme das placentas penetrando os óvulos através da micrópila.

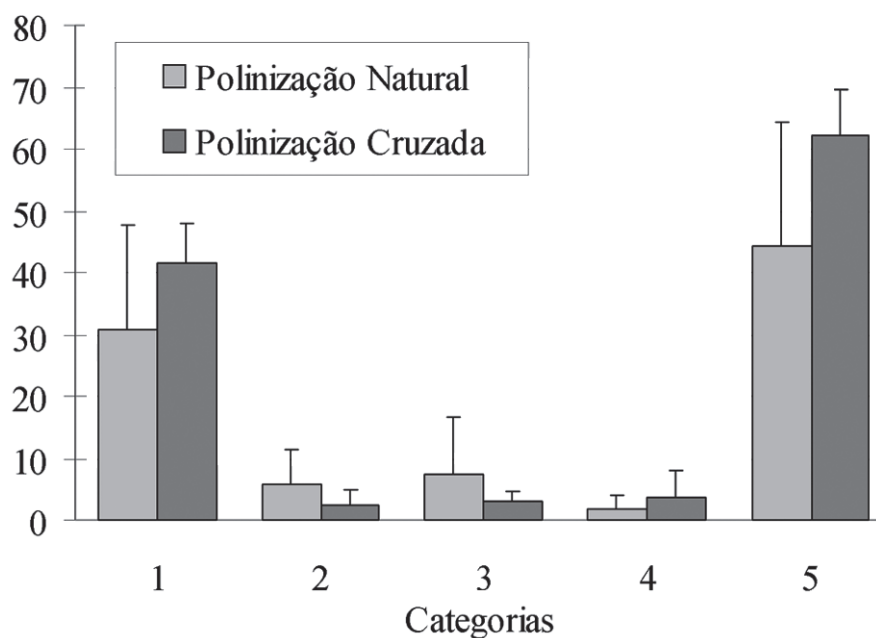
O saco embrionário de *T. roseo-alba* é do tipo *Polygomonum*, contendo célula central com dois núcleos polares, três antípodas localizadas no pólo calazal e aparelho oosférico (uma oosfera e duas sinérgides) no pólo micropilar (Fig. 3a). Após a penetração do óvulo, o tubo polínico descarrega parte do seu protoplasma em uma das sinérgides, que adquire uma forte coloração pelo azul-de-toluidina (Fig. 3b-c). Em seguida, uma alça citoplasmática se forma no pólo calazal da sinérgide penetrada, entre a oosfera e a célula central (Fig. 3b).

Constatou-se, pela análise dos óvulos em pistilos não polinizadas, que as antípodas começam a se degenerar após o segundo dia de antese, sendo que, no terceiro dia, a maioria dos óvulos apresentou antípodas degeneradas.

A formação do endosperma ocorre por divisões mitóticas da célula endospermica primária (célula central fecundada), cada divisão sendo seguida de citocinese (endospermogênese celular). A primeira divisão é sempre transversal, originando uma câmara micropilar e uma câ-

Tabela 1. Experimentos de polinizações controladas e frutificação em *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith.

Árvore	Autopolinização				Polinização Cruzada			
	Induzida		Espontânea		Induzida		Polinização Natural	
	Nº flores	Nº frutos	Nº flores	Nº frutos	Nº flores	Nº frutos	Nº flores	Nº frutos
1	75	0	65	0	33	23	100	26
2	80	0	51	0	43	10	100	0
3	63	0	43	0	16	9	100	9
4	52	0	50	0	20	14	100	6
Total	300	0	290	0	112	56 (50,0)	400	41 (10,6)

Figura 1. *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith. Número de sementes de diferentes categorias (ver texto) em frutos resultantes de polinização natural e polinização cruzada induzida.

mara calazal (estádio de endosperma bicelular, Fig. 3c). O segundo ciclo de mitoses, usualmente longitudinal, ocorre quase sempre simultaneamente nas células calazal e micropilar, originando o endosperma com quatro células. O terceiro ciclo mitótico corresponde à divisão transversal das células micropilares do endosperma 4-celular, originando o estágio 6-celular (Fig 3d). Os demais ciclos mitóticos da endospermogênese inicial são usualmente transversais e ocorrem a partir do par intermediário de células do endosperma 6-celular, conferindo às células resultantes uma disposição em estratos transversais, com cada estrato composto por duas células, sendo as células dos pólos micropilar e calazal, geralmente, de tamanho maior (Figs 3e e 4a-b). As duas células resultantes da divisão vertical da célula calazal do endosperma bicelular geralmente não sofrem divisões subsequentes, diferenciando-se num conspícuo haustório calazal, o qual induz alterações estruturais na hipóstase (Figs 3d-e e 4b-c).

Após a fecundação, o zigoto se expande adquirindo um formato tubular, dando início à formação do tubo proembriônico (Figs. 3d e 4b-e). A presença de um zigoto tubular/tubo proembriônico foi verificada tanto em óvulos de pistilos autopolinizados quanto nos submetidos à polinização cruzada, alongando-se intrusivamente em direção ao pólo calazal do endosperma. Embora não tenha sido feita nenhuma observação direta da cariocinese no núcleo do zigoto, um tubo proembriônico binucleado foi claramente verificado em diversos óvulos. Um dos núcleos migra para o pólo micropilar e gradualmente se degenera (Fig. 4a), enquanto o outro migra para a extremidade calazal do tubo proembriônico (Fig. 4b). O núcleo calazal sofre cariocinese seguida de citocinese transversal, dando origem às células apical e basal do proembrião bicelular (Fig. 4c-e).

A fecundação e a endospermogênese inicial foram verificadas na maioria (88%) dos óvulos de pistilos au-

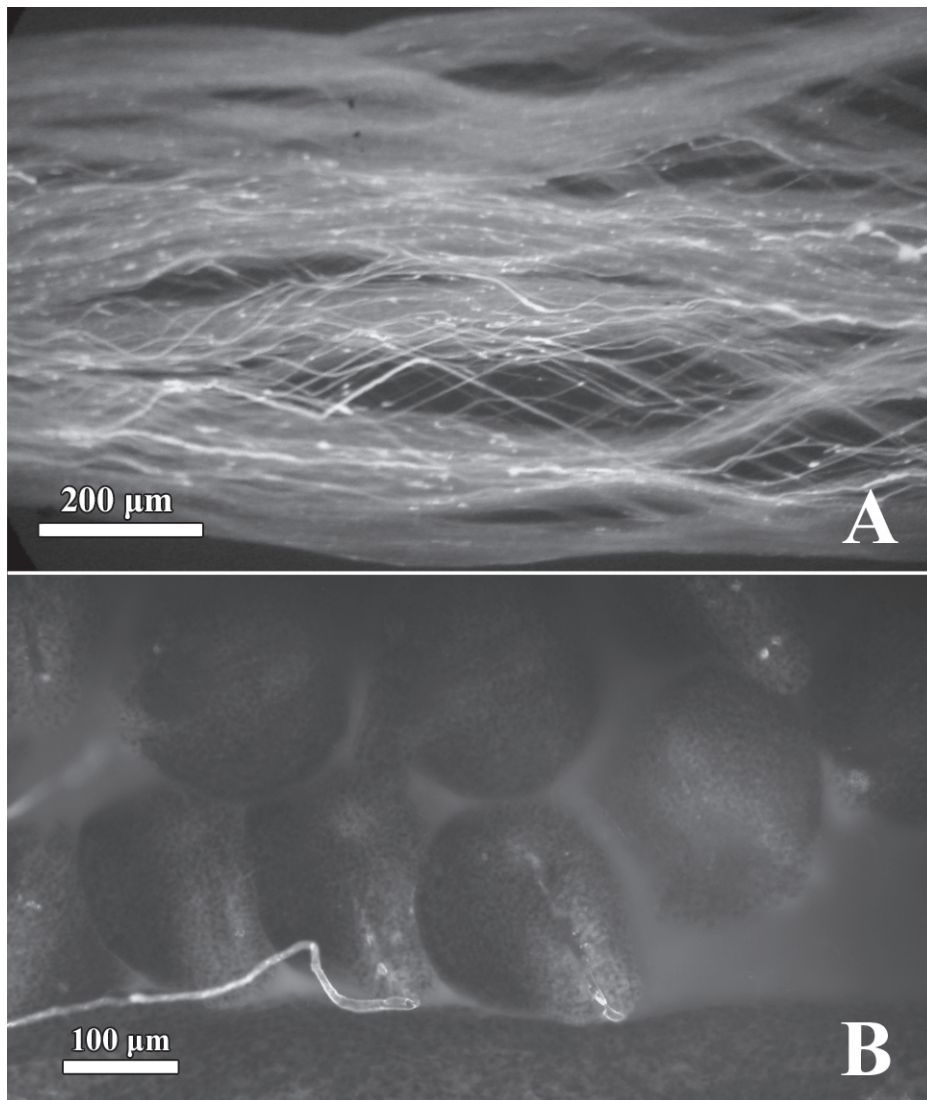


Figura 2. Fotomicrografias em microscópio de epifluorescência de pistilos autopolinizados de *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith. Tubos polínicos (A) ao longo do estilete, 72 horas após a polinização e (B) penetrando os óvulos, 24 horas após a autopolinização.

topolinizados. Embora o número de óvulos fecundados tenha sido maior em pistilos autopolinizados no primeiro dia após a polinização, situação inversa foi verificada nos demais intervalos analisados, com os pistilos submetidos a polinização cruzada sempre apresentando maior número de óvulos fecundados (Tab. 2). O número de óvulos contendo endosperma em desenvolvimento, ou apresentando endosperma com maior número de células, foi também sempre inferior nos pistilos autopolinizados, relativamente aos submetidos à polinização cruzada, a partir do segundo dia. A discrepância entre autopolinização e polinização cruzada quanto à taxa de desenvolvimento dos endospermas tendeu a se intensificar proporcionalmente ao aumento do intervalo entre os dias de polinização e coleta dos pistilos (Tab. 2). No quinto dia após a polinização, mais de 70% dos óvulos em pistilos autopolinizados apresentavam endosperma com 12 ou menos células, ao passo que 68% dos óvulos apresentavam endosperma com 21 ou mais células nos pistilos

submetidos à polinização cruzada. Os testes estatísticos χ^2 indicaram que as diferenças encontradas ao se comparar pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada são significativas em todos os intervalos após a polinização (Tab. 3). A presença do tubo proembriônico binucleado foi constatada a partir do segundo e do quarto dias após a polinização em pistilos submetidos à polinização cruzada e autopolinizados, respectivamente. Porém, a primeira divisão mitótica com citocinese foi verificada apenas em proembriões resultantes de polinizações cruzadas, no quinto dia após a polinização.

Embora tenha ocorrido o aborto de todos os pistilos autopolinizados, estes sofreram um ligeiro crescimento antes da abscisão, tanto com relação ao ovário quanto aos óvulos (Fig. 5). A queda na tendência de crescimento dos óvulos no último intervalo após a polinização, provavelmente, se deveu à inevitável murcha dos pistilos durante o período compreendido entre a abscisão e a coleta para fixação.

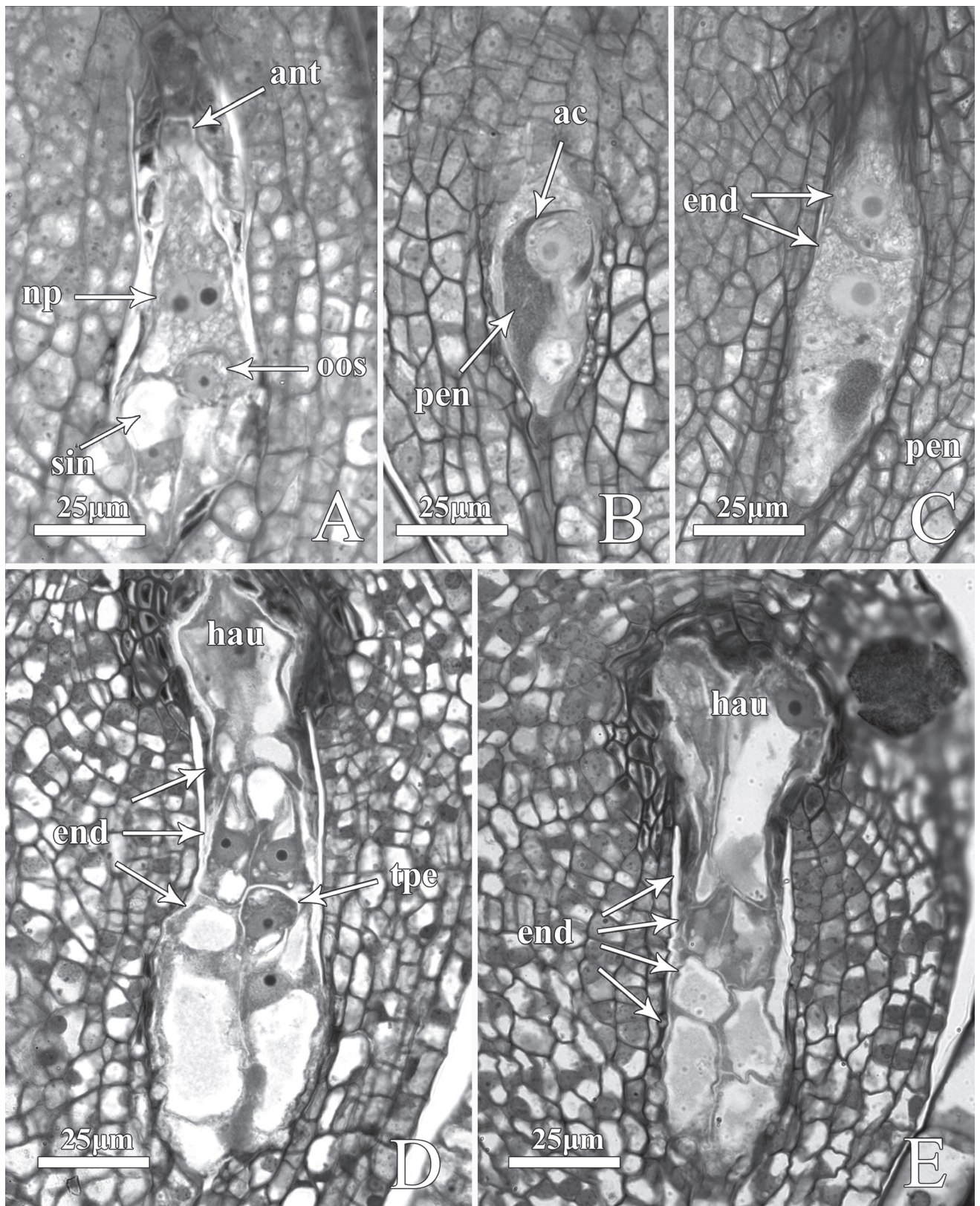


Figura 3. Secções longitudinais de óvulos/sementes de *T. roseo-alba* (Ridley) Sandwith. A. saco embrionário maduro de óvulo não fecundado; B. óvulo fecundado (secção longitudinal tangencial), evidenciando a presença da sinérgide penetrada (pen) pelo tubo polínico; C. endosperma bicelular; D. endosperma 6-celular; E. endosperma 8-celular. ac: alça citoplasmática da sinérgide penetrada, entre a oosfera e a célula central; np: núcleos polares; oos: oosfera; sin: sinérgide; end: células do endosperma; tpe: tubo proembriônico; hau: haustório calazal.

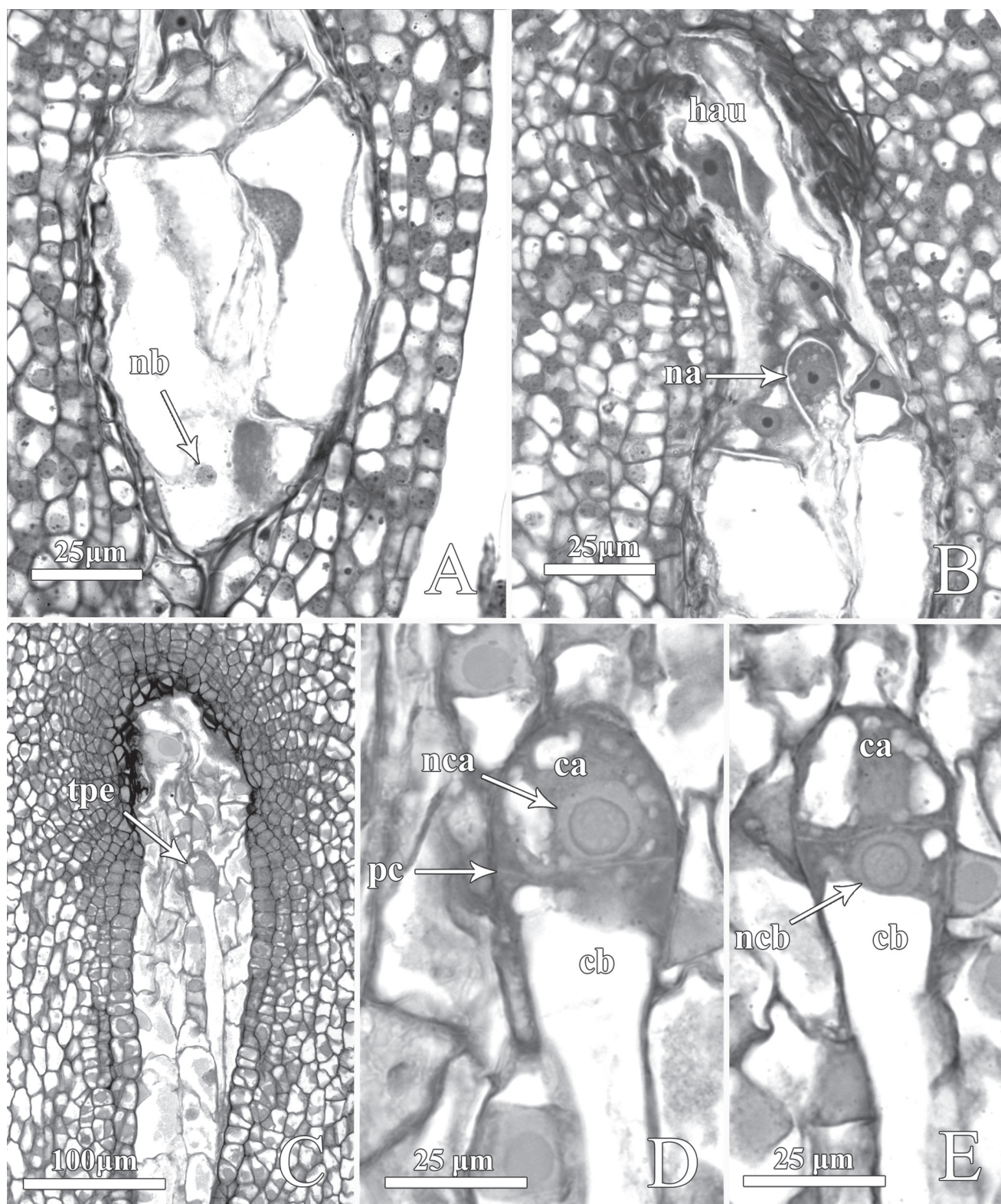


Figura 4. Secções longitudinais de óvulos/sementes de *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith. A-B. Secções seriadas de um mesmo óvulo de pistilo autopolinizado, no quinto dia, evidenciando os núcleos basal (nb) e apical (na) do tubo proembriônico binucleado; C-E. óvulo de pistilo submetido à polinização cruzada, no quinto dia, mostrando o tubo proembriônico (tpe) em estágio bem mais avançado que nas fotos anteriores (proembrião bicelular); D-E. secções seriadas do mesmo óvulo da figura anterior, mostrando em maior aumento as células apical (ca) e basal (cb), com seus respectivos núcleos e a parede celular transversal (pc). hau: haustório calazal; nca: núcleo da célula apical; ncb: núcleo da célula basal.

Tabela 2. Óvulos de *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith: eventos posteriores à polinização 1-5 dias após a autopolinização vs. após a polinização cruzada.

Estádio do óvulo	1 dia (%)		2 dias (%)		3 dias (%)		4 dias (%)		5 dias (%)	
	Auto.	Cruz.	Auto.	Cruz.	Auto.	Cruz.	Auto.	Cruz.	Auto.	Cruz.
Nf	87 (44,4)	102 (77,9)	69 (50,0)	22 (16,7)	67 (45,9)	18 (35,4)	38 (26,4)	14 (16,5)	13 (12,0)	1 (1,3)
Fecund.	39 (19,9)	26 (19,9)	4 (2,9)	2 (1,5)	2 (1,4)	0	0	0	0	0
End 2c	70 (35,7)	3 (2,2)	16 (11,6)	4 (3,0)	3 (2,1)	0	1 (0,7)	0	0	0
End 4c			17 (12,3)	15 (11,4)	6 (4,1)	1 (1,9)	6 (4,2)	0	0	0
End 6c			32 (23,2)	48 (36,4)	42 (28,8)	8 (15,7)	24 (16,6)	2 (2,4)	1 (0,9)	0
End 8c				40 (30,3)	23 (15,6)	15 (29,4)	52 (36,1)	5 (5,9)	35 (32,4)	4 (5,1)
End 10c				1 (0,7)	2 (1,4)	8 (15,7)	21 (14,6)	3 (3,5)	23 (21,3)	6 (7,7)
End 12c					1 (0,7)	1 (1,9)	2 (1,4)	3 (3,5)	18 (16,7)	1 (1,3)
End 14c								3 (3,5)	8 (7,4)	5 (6,4)
End 16c								3 (3,5)	6 (5,6)	4 (5,1)
End 18c								5 (5,9)	2 (1,9)	3 (3,9)
End 20c								4 (4,7)	1 (0,9)	1 (1,3)
End 21-30								19 (22,4)	0	15 (19,2)
End 31-40								17 (20,0)	1 (0,9)	9 (11,5)
End 41-50								7 (8,2)		5 (6,4)
End 51-60										6 (7,7)
End 61-70										6 (7,7)
End 71-80										3 (3,9)
End 81-90										5 (6,4)
End +90c										4 (5,1)
Total	196 (100)	131 (100)	138 (100)	132 (100)	146 (100)	51 (100)	144 (100)	85 (100)	108 (100)	78 (100)

Nf: número de óvulos não fecundados; Fecund.: número de óvulos fecundados, porém ainda sem endosperma; End 2c: óvulos fecundados contendo endosperma com duas células; End 4c: óvulos fecundados contendo endosperma com 4 células; etc.; End +90c: óvulos fecundados contendo mais que 90 células.

Longevidade dos pistilos autopolinizados vs. não polinizados – A longevidade dos pistilos autopolinizados foi significativamente superior à longevidade dos pistilos não polinizados, sendo seis dias a longevidade máxima alcançada pelos primeiros (Fig. 6a). Ao abortarem, tanto o comprimento como a largura dos ovários foram significativamente maiores nos pistilos autopolinizados, indicando ocorrer um ligeiro crescimento dos mesmos antes de sua abscisão (Fig. 6b).

Teste de germinação das sementes – Revelou uma taxa de germinação de 93%. Todas as sementes apresentaram apenas um embrião, o qual produziu uma única plântula por semente germinada.

Discussão

Os presentes resultados indicam que *Tabebuia roseo-alba* é uma espécie autoincompatível e dependente de agentes polinizadores para que ocorra a produção de sementes. No entanto, a análise de microscopia de fluorescência mostrou que, aparentemente, não há diferença entre a velocidade do desenvolvimento dos tubos polínicos ao longo do estilete em pistilos autopolinizados e submetidos à polinização cruzada (análises mais detalhadas, com a coleta dos pistilos sendo realizada em intervalos menores entre o momento da polinização e o intervalo de 24 horas, seriam necessários para se confirmar esta hipótese), e que os tubos polínicos não são impedidos de penetrar os óvulos em pistilos autopolinizados. A análise histológica, por sua vez, revelou que cerca de metade dos óvulos em pistilos autopolinizados já se encontra

fecundada e apresenta endosperma em desenvolvimento no segundo dia após a polinização, e que o aborto desses pistilos ocorre somente quando a maior parte dos seus óvulos está fecundada. Tais resultados, combinados à longevidade estendida dos pistilos autopolinizados e à constatação de que esses pistilos abortam uniformemente em um curto período após a polinização, claramente indicam a ocorrência de AIT em *T. roseo-alba*, com rejeição pós-zigótica dos pistilos.

Estudos realizados em *Ceiba chordatii* e *C. speciosa* (Bombacaceae), ambas com AIT (Gibbs & Bianchi 1993), revelaram um aumento da longevidade dos pistilos autopolinizados, em comparação com pistilos não polinizados (Gibbs *et al.* 2004), semelhante ao verificado em *T. roseo-alba* no presente estudo. Este fenômeno parece ser um efeito secundário da AIT, decorrente de interações entre os tubos polínicos e o gineceu que acabam postergando a abscisão dos pistilos (Gibbs *et al.* 2004). Não se sabe se tal longevidade estendida em pistilos autopolinizados poderia ser generalizada para taxons que apresentam AIT. Não obstante, é importante salientar que a ocorrência de tal fenômeno em espécies autoincompatíveis de famílias filogeneticamente não relacionadas, tais como Bignoniaceae e Bombacaceae, é uma indicação de que o aumento da longevidade de pistilos autopolinizados, relativamente a pistilos não polinizados, pode ser um caráter comum aos taxons que apresentam AIT.

Evidências da AIT do tipo pós-zigótica têm sido encontradas em todas as espécies autoestéreis de Bignoniaceae investigadas quanto aos eventos posteriores à polinização, tais como *Dolichandra cynanchoides* (Gibbs & Bianchi

Tabela 3. χ^2 das diferenças quantitativas verificadas na análise histológica de pistilos de *Tabebuia roseo-alba* autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada*.

Intervalo de fixação	Estádios de desenvolvimento comparados	χ^2
1 dia	Óvulos fecundados e sem endosperma ou em estágio anterior vs. óvulos com endosperma bicelular ou em estágio subsequente.	50,59
2 dias	Óvulos com endosperma 4-celular ou em estágio anterior vs. óvulos com endosperma 6-celular ou em estágio subsequente.	53,38
3 dias	Óvulos com endosperma 6-celular ou em estágio anterior vs. óvulos com endosperma 8-celular ou em estágio subsequente.	42,11
4 dias	Óvulos com endosperma 10-celular ou em estágio anterior vs. óvulos com endosperma 12-celular ou em estágio subsequente.	132,74
5 dias	Óvulos com endosperma 12-celular ou em estágio anterior vs. óvulos com endosperma 14-celular ou em estágio subsequente.	84,43

*Os dados referem-se à incidência de óvulos apresentando endospermas com duas a até mais de 90 células do 1º ao 5º dia após a polinização. As diferenças foram sempre significativas (df = 1; P < 0,001).

1999), *Tabebuia nodosa* (Gibbs & Bianchi 1999), *Spathodea campanulata* (Bittencourt *et al.* 2003), *Zeyheria montana* (Bittencourt & Semir 2004), *Handroanthus umbellatus*, *H. impetiginosus*, *H. vellosi* (Bittencourt & Semir 2005) e *Jacaranda racemosa* (Bittencourt & Semir 2006), confirmando a hipótese de que a autoesterilidade em espécies de diferentes gêneros de Bignoniaceae apresenta uma série de características em comum e representa um caráter basal do grupo. Por sua vez, a autofertilidade em Bignoniaceae (Bittencourt & Moraes 2010) parece ser um caráter derivado que pode ter emergido diversas vezes na família a partir de ancestrais autoincompatíveis.

Nas espécies autoincompatíveis de Bignoniaceae acima citadas, uma menor eficácia de penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados ocorreu desde os primeiros intervalos verificados após a polinização, indicando a atuação de um mecanismo de reconhecimento e inibição dos tubos polínicos incompatíveis tão logo estes começavam a alcançar o ovário, ou talvez mesmo antes (nessas espécies, análises detalhadas sobre a velocidade do crescimento dos tubos polínicos ao longo do estilete/ovário em pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada nunca foram realizadas). Sage *et al.* (1994) admitem que, em angiospermas autoincompatíveis que apresentam rejeição pós-zigótica dos pistilos autopolinizados, as reações de reconhecimento do sistema reprodutivo podem ocorrer no tecido transmissor, sobre a epiderme da placenta, sobre o obturador (quando presente), em contato com os tegumentos, ou mesmo no nucelo (quando presente), mas as consequências dessas reações não se expressam até que os tubos polínicos incompatíveis penetrem o saco embrionário e realizem a dupla fecundação. Neste contexto, a menor taxa de penetração dos óvulos tão logo os tubos polínicos incompatíveis começam a alcançar o ovário, tal como usualmente verificado em Bignoniaceae, é congruente com a hipótese de que a rejeição pós-zigótica desses pistilos seja acompanhada de alguma forma de inibição pré-zigótica dos tubos polínicos. Entretanto, nos pistilos autopolinizados de *T. roseo-alba*, a despeito das eficácias de penetração e fecundação dos óvulos terem também sido menores a partir do segundo dia após a polinização, no primeiro dia, o número de óvulos penetrados e fecundados em

pistilos autopolinizados foi maior que nos pistilos cruzados. Tal resultado é uma indicação de que a AIT com rejeição pós-zigótica dos pistilos pode ocorrer mesmo quando não acompanhada por qualquer mecanismo de inibição pré-zigótica dos tubos polínicos incompatíveis.

Em *Tabebuia roseo-alba*, o desenvolvimento inicial do endosperma em óvulos de pistilos autopolinizados seguiu o mesmo padrão de divisões celulares observado em pistilos submetidos à polinização cruzada. Da mesma forma, nenhuma diferença foi verificada entre os dois tratamentos quanto ao desenvolvimento inicial do tubo proembriônico. Portanto, não foram encontrados sinais de malformações no endosperma ou no tubo proembriônico em óvulos de pistilos autopolinizados, os quais seriam esperados caso o aborto desses pistilos fosse decorrente dos efeitos de genes recessivos deletérios associados a uma depressão endogâmica de ação precoce (Sage *et al.* 1994; Bittencourt 2008).

Entretanto, verificou-se um atraso no desenvolvimento do endosperma e do tubo proembriônico em óvulos de pistilos autopolinizados, quando comparados aos óvulos de pistilos submetidos à polinização cruzada. Esse atraso foi verificado logo no segundo dia, quando os pistilos submetidos à polinização cruzada começam a apresentar endospermas com maior número de células que nos pistilos autopolinizados. Embora essa diferença inicialmente tenha sido pouco expressiva, intensificou-se progressivamente nos dias subsequentes alcançando sua expressão máxima no último intervalo analisado. De acordo com Gibbs & Bianchi (1993), a manutenção do desenvolvimento de um fruto jovem, decorrente de polinização compatível, poderia ocorrer devido ao desenvolvimento inicial de suas sementes, as quais emitiriam um tipo de sinal hormonal à planta mãe capaz de evitar a abscisão do fruto. No caso de flores autopolinizadas, os óvulos/sementes enviariam um tipo de sinal diferente daquele enviado quando a flor é polinizada com o pólen de outro indivíduo da mesma espécie. Em *Tabebuia roseo-alba*, assim como em outras espécies que apresentam AIT pós-zigótica, esse sinal hormonal diferente seria o fator causal associado ao atraso no desenvolvimento inicial do endosperma e do proembrião, bem como ao crescimento incipiente e subsequente abscisão dos frutos iniciados a partir

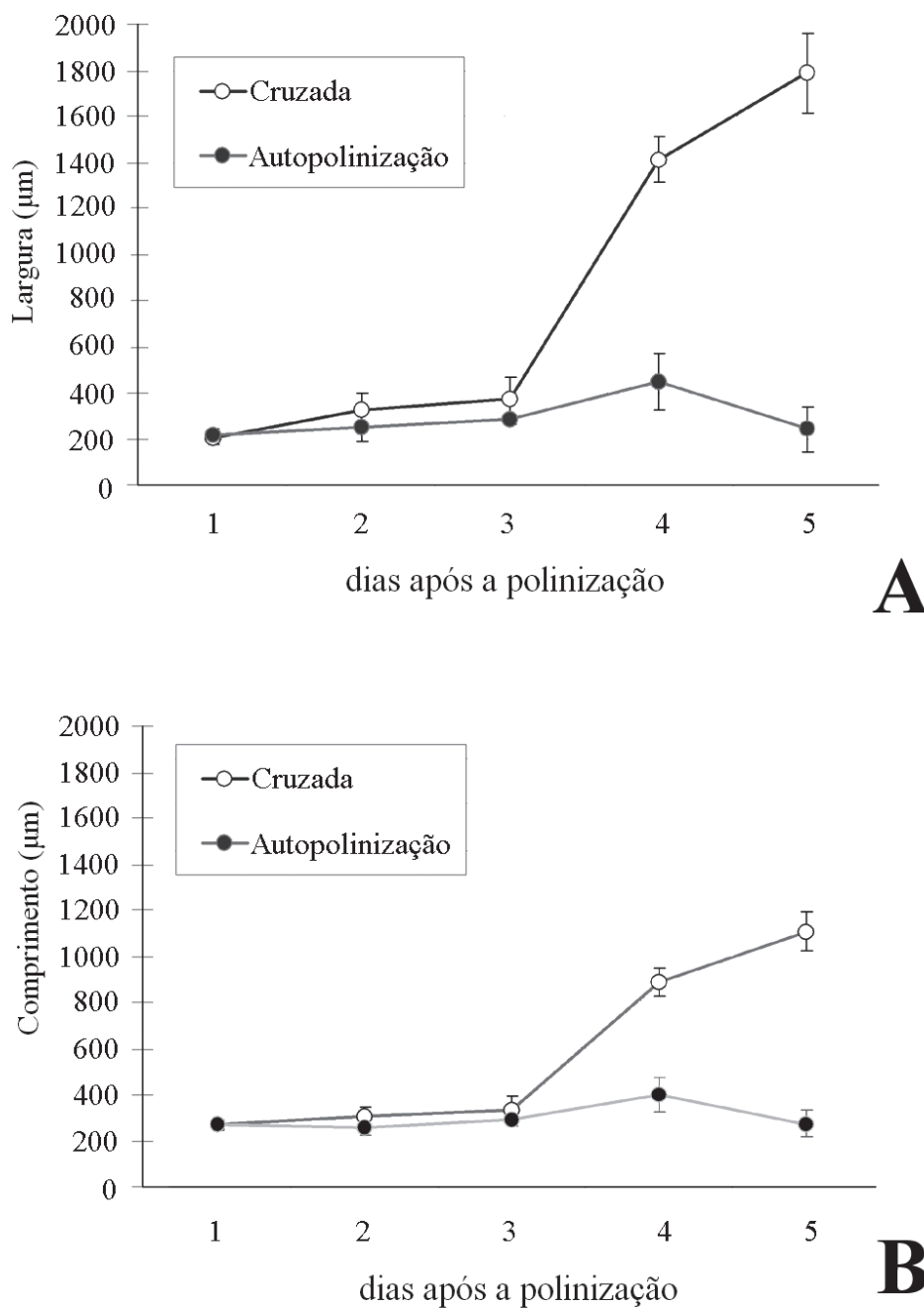


Figura 5. Médias da largura (A) e do comprimento (B), em μm , dos óvulos/sementes em pistilos autopolinizados vs. submetidos à polinização cruzada de *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith, 1-5 dias após a polinização. As barras verticais indicam os desvios padrão.

de pistilos autopolinizados (Gibbs *et al.* 2004; Bittencourt & Semir 2005).

Embora no presente estudo não tenha sido feita a análise do desenvolvimento embrionário, o embrião de *Tabebuia roseo-alba* provavelmente é do tipo Onagráceo (*sensu* Johansen 1950), pois esse tipo de embriogenia – verificada em *T. rosea*, *Millingtonia hortensis*, *Dolichandrone falcata*, *Heterophragma adenophyllum*, *Stereospermum chelonoides* (Johri *et al.* 1992), *Handroanthus ochraceus* (Costa *et al.*

2004) e *H. chrysotrichus* (Bittencourt & Moraes 2010) – é considerada característica de Bignoniaceae (Davis 1966; Johri *et al.* 1992). No presente trabalho, verificamos ainda que a primeira divisão celular da formação do proembrião foi transversal, resultando em uma célula apical e uma célula basal. Portanto, o núcleo calazal do tubo proembriônico binucleado é responsável pela formação de todo o corpo do embrião propriamente dito, bem como do suspensor, tal como verificado em *H. chrysotrichus* (Bittencourt & Moraes 2010).

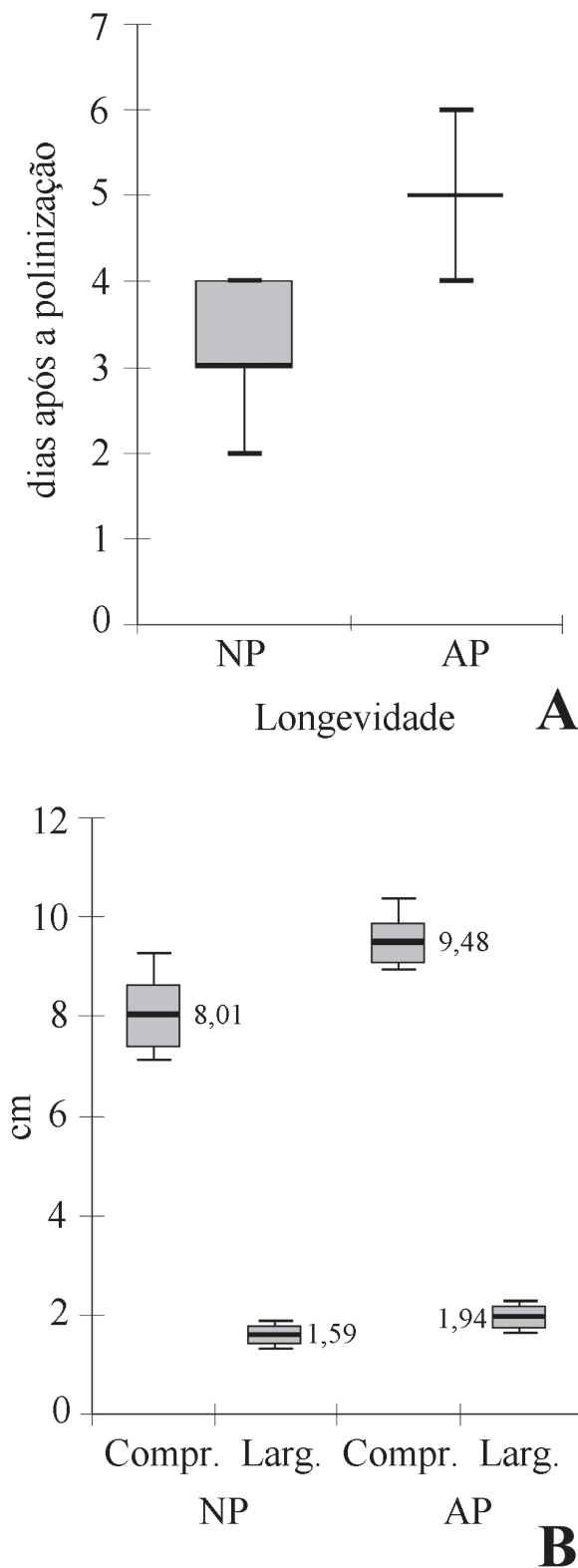


Figura 6. *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith. Longevidade (A) e dimensões (B) dos ovários em pistilos autopolinizados e não polinizados ao abortarem. As diferenças tanto no comprimento como na largura dos ovários são significativas ($t = 8,82$ e $5,18$, respectivamente; $P < 0,001$). As caixas indicam medianas e quartis (A), ou médias e desvios padrão (B); as barras verticais indicam a variação entre valores mínimo e máximo de cada medida. NP = não polinizados; AP = autopolinizados.

O crescimento do tubo proembriônico em direção ao pólo calazal do endosperma garante que o embrião se desenvolva em um local nutricionalmente mais favorecido (Bittencourt 2003). A formação de um tubo proembriônico binucleado precedendo o desenvolvimento do embrião propriamente dito em Bignoniaceae é uma descoberta recente, tendo sido verificada pela primeira vez em *Spathodea campanulata* (Bittencourt *et al.* 2003) e confirmada em *H. impetiginosus* (Bittencourt & Semir 2005) e *H. chrysotrichus* (Bittencourt & Moraes 2010).

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio concedido ao segundo autor para o financiamento do projeto (Processo nº 05/59234-4) e pela bolsa de Iniciação Científica concedida ao primeiro autor (Processo nº 07/58510-3). Ao IBILCE/UNESP por disponibilizar a infraestrutura necessária, bem como pela oportunidade de realização deste trabalho.

Referências bibliográficas

- Ayres, M.; Ayres, M.J.; Ayres, D.L. & Santos, A.S. 2000. **BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas biológicas e médicas**. Belém, Sociedade Civil Mamirauá/CNPq.
- Bittencourt Jr, N.S. 2003. **Auto-incompatibilidade de ação tardia e outros sistemas reprodutivos em Bignoniaceae**. 275p. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Bittencourt Jr, N.S. 2008. Autoincompatibilidade em angiospermas com ênfase nos sistemas de ação tardia. Pp. 213-215. In: Loliola, M.I.B.; Baseia, I.G. & Lichston, J.E. (Org.). **Atualidades, Desafios e Perspectivas da Botânica no Brasil**. Natal, Sociedade Botânica do Brasil.
- Bittencourt Jr, N.S.; Gibbs, P.E. & Semir, J. 2003. Histological study of post-pollination events in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), a species with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany** **91**(7): 827-834.
- Bittencourt Jr, N.S. & Semir J. 2004. Pollination biology and breeding system of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae). **Plant Systematics and Evolution** **247**(3-4): 241-254.
- Bittencourt Jr, N.S. & Semir, J. 2005. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Sciences** **166**(3): 493-506.
- Bittencourt Jr, N.S. & Semir J. 2006. Floral biology and late-acting self-incompatibility in *Jacaranda racemosa* (Bignoniaceae). **Australian Journal of Botany** **54**(3): 315-324.
- Bittencourt Jr, N.S. & Moraes, I.G. 2010. Self-fertility and polyembryony in South American Yellow Trumpet Trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae), a histological study of post-pollination events. **Plant Systematics and Evolution** **288**(1-2): 59-76.
- Brewbaker, J.L. 1957. Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. **The Journal of Heredity** **48**(6): 271-277.
- Bullock, S.H. 1985. Breeding systems in flora of tropical deciduous forest in Mexico. **Biotropica** **17**(3): 287-301.
- Cope, F.W. 1962. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. **Heredity** **17**(2): 157-182.
- Carvalho, A.T.; Santos-Andrade, F.G. & Schindwein, C. 2007. Baixo sucesso reprodutivo em *Anemopaegma laeve* (Bignoniaceae) no Parque Nacional do Catimbu, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biociências** **5**(1): 102-104.
- Correia, M.C.R.; Pinheiro, M.C.B. & Lima, H. A. 2005. Biologia floral e polinização de *Arrabidaea conjugata*. **Acta Botanica Brasilica** **19**(3): 501-510.
- Correia, M.C.R.; Pinheiro, M.C.B. & Lima, H. A. 2006. Biologia floral e polinização de *Anemopaegma chamberlaynii* Bur. & K. Schum. (Bignoniaceae). **Lundiana** **7**(1): 39-46.

- Costa, M.E.; Sampaio, D.S.; Paoli, A.A.S. & Leite, S.C.A.L. 2004. Poliembrião e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 27(2): 395-406.
- Davis, G.L. 1966. **Systematic embryology of the angiosperms**. New York. John Wiley & Sons.
- Dutra, J.C.S. & Machado, V.L.L. 2001. Entomofauna visitante de *Stenobium stans* (Juss.) Seem (Bignoniaceae), durante seu período de floração. **Neotropical Entomology** 30(1): 43-53.
- Gentry, A.H. 1974. Coevolutionary Patterns in central american Bignoniaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 61(2): 728-759.
- Gentry, A.H. 1992. Bignoniaceae - Part II (Tribe Tecomeae). **Flora Neotropica** 25 (2): 1-370.
- Gibbs, P.E. & Bianchi, M. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with Late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta** 106: 64-71.
- Gibbs, P.E. & Bianchi, M. 1999. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany** 84(4): 449-457.
- Gibbs, P.E. & Bianchi, M.B.; Taroda Ranga, N. 2004. Effects of self-, chase and mixed self/cross-pollinations on pistil longevity and fruit set in *Ceiba* species (Bombacaceae) with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany** 94(2): 305-310.
- Gobatto-Rodrigues, A.A. & Stort, M.N. 1992. Biologia floral e reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 15(1): 37-41.
- Grose, S.O. & Olmstead, R.G. 2007. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). **Systematic Botany** 32(3): 660-670.
- Guimarães, E.; Stasi, S.C. & Maimoni-Rodella, R.C.S. 2008. Pollination Biology of *Jacaranda oxyphylla* with an Emphasis on Staminode Function. **Annals of Botany** 102(5): 699-711.
- Jacob, V.J. 1980. Pollination, fruit-setting and incompatibility in *Cola nitida*. **Incompatibility Newsletter** 12: 50-56.
- Johansen, D. A. 1950 **Plant Embryology: embryogeny of the Spermatophyta**. Massachusetts, Waltham.
- Johri, B.M.; Ambegaokar, K.B. & Srivastava, P.S. 1992. **Comparative Embryology of Angiosperms** v. 2. Berlin, Springer-Verlag.
- LaDoux T. & Friar E.A. 2006. Late-acting self-incompatibility in *Ipomopsis tenuifolia* (Gray) V. Grant (Polemoniaceae). **International Journal of Plant Sciences** 167(3): 463-471.
- Lipow, S.R. & Wyatt, R. 2000. Single gene control of postzygotic self-incompatibility in poke milkweed, *Asclepias exaltata* L. **Genetics** 154(2): 893-907.
- Lohmann, L.G. 2006. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **American Journal of Botany** 93(2): 304-318.
- Lorenzi, H. 2002. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, vol. 1**. Nova Odessa. Plantarum.
- Martin, 1959. F.W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology** 34: 125-128.
- Maués, M.M.; Oliveira, P.E.A.M. & Kanashiro, M. 2008. Pollination biology in *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don. (Bignoniaceae) at the “Floresta Nacional do Tapajós”, Central Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 31(3): 517-527.
- Mcdowell, E.M. & Trump, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 100: 405-414.
- Olmstead, R.G.; Zjhra, M.L.; Lohmann, L.G.; Grose, S.O. & Eckert, A. J. 2009 A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany** 96(9): 1731-1743.
- Polatto, L.P. & Alves Jr, V.V. 2009. Sistema reprodutivo de *Sparattosperma leucanthum* (Vell.) K. Schum (Bignoniaceae). **Árvore** 33(2): 289-296.
- Sage, T.L.; Bertin, R.J. & Williams, E.G. 1994. Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. Pp. 116-140. In: Williams, E.G.; Clarke, A.E.R. & Knox B. (eds.) **Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants**. Kluwer Academic.
- Sage, T.L.; Strumas, F.; Cole, W.W. & Barrett, S.C. 1999. Differential ovule development following self- and cross-pollination: the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). **American Journal of Botany** 86(6): 855-870.
- Sampaio, D.S. 2010. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade**. (Doutorado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais) – Universidade Federal de Uberlândia, MG.
- Seavey, S.R. & Bawa, K.S. 1986. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. **Botanical Review** 52(2): 195-219.
- Singh, J. & Chauhan, S.V.S. 1996. Morphological changes in the stigma of seasonally transient sterile *Tecoma stans*. L. **Phytomorphology** 46: 1-7.
- Spangler, R.E. & Olmstead, R.G. 1999. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences *rbcL* and *ndhF*. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 86(1): 33-46.
- Srithongchuay, T.; Bumrungsri, S. & Sripao-Raya, E. 2008. The pollination ecology of the late-successional tree, *Oroxylum indicum* (Bignoniaceae) in Thailand. **Journal of Tropical Ecology** 24(5): 477-484.
- Yanagizawa, Y.A.N.P. & Maimoni-Rodella, R.C.S. 2007. Floral visitors and reproductive strategies in five melittophilous species of Bignoniaceae in southeastern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 50(6): 1043-1050.
- Zar, J.H. 1999. **Biostatistical analysis**. New Jersey, Prentice-Hall.