

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Museu Nacional

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



**BIOLOGIA REPRODUTIVA E ONTOGENIA DA SEMENTE E DO
FRUTO DE *Myrciaria floribunda* (H. West ex Wild) O. Berg
(MYRTACEAE).**

Diego Pereira Spala

Orientadoras: Dr^a. Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes
Dr^a. Heloisa Alves de Lima Carvalho

Rio de Janeiro
2013

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Museu Nacional

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)

**BIOLOGIA REPRODUTIVA E ONTOGENIA
DA SEMENTE E DO FRUTO
DE
Myrciaria floribunda (H. West ex Wild) O. Berg
(MYRTACEAE).**

Diego Pereira Spala

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

Orientadoras: Dr^a. Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes
Dr^a. Heloisa Alves de Lima Carvalho

Rio de Janeiro

2013

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Museu Nacional
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)

**BIOLOGIA REPRODUTIVA E ONTOGENIA DA SEMENTE E DO
FRUTO DE *Myrciaria floribunda* (H. West ex Wild) O. Berg
(MYRTACEAE).**

Diego Pereira Spala

Aprovada por:

Prof^a. Dr^a. Cláudia Barbieri Mendonça (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Ana Tereza Araújo Rodarte

Prof. Dr. Luiz Antônio de Sousa

Suplentes:

Prof^a. Dr^a. Bárbara de Sá Haiad

Prof^a. Dr^a. Vânia Gonçalves Lourenço Esteves

Ficha catalográfica

S734 Spala, Diego P.

Biologia reprodutiva e ontogenia da semente e do fruto de *Myrciaria floribunda* (H. West ex Wild) O. Berg (MYRTACEAE) / Diego Pereira Spala.
Rio de Janeiro : UFRJ/MN, 2013.
xi,44 f.: il.(algumas color).; 30 cm.

Orientadores: Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes e Heloísa A.de Lima.

Dissertação (Mestrado em Botanica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), 2013.

Bibliografia: f. 36-44

1. Myrtaceae. 2. *Myrciaria floribunda*. 3. Anatomia. 4. Biologia Reprodutiva.
I. Santiago-Fernandes, Lygia Dolores Ribeiro de. II. Lima, Heloísa Alves de
III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. IV. Museu Nacional (Brasil).
Programa de Pós-Graduação em Botânica. V. Título.

CDD583.42

Agradecimentos

A Deus, por guiar a minha vida e permitir que tudo tenha acontecido.

Agradeço ao Museu Nacional, pela oportunidade única.

Agradeço às minhas orientadoras, Prof^a. Dr^a. Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes e Prof^a. Dr^a. Heloísa de Alves Lima, pelas orientações imprescindíveis, além de todo conhecimento compartilhado em longas tardes prazerosas e de suma importância pra minha maturidade profissional e pessoal.

Agradeço à Lygia e Helo por toda paciência, puxões de orelha e dedicação a minha dissertação, mesmo tendo que se dividirem entre as orientações e as eternas tarefas da coordenação da pós.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Bárbara de Sá Haiad, por ter se apresentado sempre bem disposta a discutir conteúdos, trocar informações e pela revisão minuciosa.

Agradeço à Bárbara, por tornar o clima do laboratório sempre agradável.

Agradeço aos amigos de profissão Daniel Leal e Isabela Haddad, por acompanharem toda minha trajetória, pelas trocas de informações sempre prazerosas, por toda ajuda ao longo de todo este trabalho e pelos bons momentos de distração e lazer.

Agradeço ao Daniel, por todo apoio, ajuda, incentivo e força.

Agradeço ao Max Dória e Rafael Pimentel, pelas longas conversas e esclarecimentos sobre técnicas laboratoriais que contribuíram consideravelmente.

Agradeço ao Max, por ceder sua casa para momentos de distração com grandes companhias como Isabella, Daniel e Marina.

Agradeço à Natália Barreira, pelas longas conversas, trocas de informações, auxílio quanto a interpretação de lâminas além de toda amizade.

Agradeço à Marina Moreira e Luciene São Leão, pela amizade, companhia e

incentivo constante no trabalho de campo.

Agradeço à Nathane Berg, pela ajuda fundamental e pelo belo trabalho realizado quanto à confecção de lâminas.

Agradeço ao CNPq, pela Bolsa de Mestrado e pelo auxílio PROAP para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos funcionários do Museu Nacional, por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável tornando tudo mais fácil.

Agradeço infinitamente a meus pais, por serem o que tenho de mais valoroso na vida, pelo apoio constante e incentivo em todos os momentos.

Agradeço à Roberta Spala Neves, pelas eternas conversas e cumplicidade.

Agradeço à Fatima Spala, por toda força e ter me feito acreditar que tudo daria certo.

Agradeço a todos meus familiares, sem exceção, por serem o alicerce fundamental da minha vida.

RESUMO

Myrtaceae pertence à ordem Myrtales e é uma das maiores famílias da flora brasileira; encontra-se entre as mais comuns nas diversas formações vegetais. Estudos relativos à anatomia floral de representantes da tribo Myrteae desenvolvidos no Laboratório de Anatomia Vegetal do Museu Nacional/UFRJ evidenciaram várias alterações no desenvolvimento de óvulos e grãos de pólen de *Eugenia uniflora*, *E. neonitida*, *Myrcia ilheosensis* e *Myrciaria floribunda*, possivelmente relacionadas à baixa relação semente/óvulo, característica da família Myrtaceae. O presente projeto objetivou o estudo da biologia reprodutiva e da ontogênese da semente e do fruto de *M. floribunda*, a fim de fornecer dados para a melhor compreensão da baixa razão semente/óvulo na tribo Myrteae. O objeto de estudo foi uma população de *Myrciaria floribunda* da restinga da APA de Maricá-RJ (Maricá, RJ, Brasil). Para o estudo da biologia reprodutiva foram realizados experimentos de polinização manual. Para estudo anatômico, óvulos entre momentos pós polinização e pré fertilização foram coletados para determinar o número de óvulos por ovário e observação de fatores pré zigóticos como as variações dos padrões de óvulos. Os frutos em diversos estádios de desenvolvimento foram coletados para observação de fatores pós zigóticos como o desenvolvimento do embrião. Os resultados revelaram que em *M. floribunda* há um período de sete meses entre a senescência floral e o início do desenvolvimento dos frutos. Durante esse período, o embrião não ultrapassa a fase globular, baseados nisso, consideramos esse desenvolvimento inicial embrionário retardado como diapausa, levando a discussões para um cenário que inclui plantas e animais. Além disso, os resultados de polinização manual revelaram que: (1) *Myrciaria floribunda* é uma espécie auto-incompatível, (2) a produção de frutos é limitada por meio de polinização, (3), a deposição de grandes quantidades de pólen compatível em estigmas não resultou em frutos com mais sementes, mostrando que não há "limitação de pólen" para a produção de sementes. Concluiu-se que os fatos relacionados com a auto-incompatibilidade, como depressão autogâmica, acrescentados à polinização natural, não são responsáveis pela baixa razão semente/óvulo em *M. floribunda*. As análises anatômicas mostraram óvulos com sacos embrionários extranumerários ou degenerados e ovuloides que explicam a baixa razão semente/óvulo.

ABSTRACT

Myrtaceae belongs to the order Myrtales and is one of the largest families of Brazilian flora; it is among the most common in the various plant formations. Studies on the floral anatomy of representatives of the Myrteae tribe were developed in the Laboratory of Plant Anatomy of National Museum / UFRJ, showing several changes in developing ovules and pollen grains of *Eugenia uniflora*, *E. neonitida*, *Myrcia ilheosensis* and *Myrciaria floribunda*, all these changes may be related to the low ratio seed/ovule, characteristic of the family Myrtaceae. The present study aimed to study the reproductive biology and ontogeny of seed and fruit of *M. floribunda*, to provide data for a better understanding of the low seed / ovule ratio in the tribe Myrteae. The aim of the study was a population of *Myrciaria floribunda* from restinga of the APA-RJ Marica (Marica, RJ, Brazil). To study the reproductive biology, hand pollination experiments were conducted. For anatomical study, ovules between post pollination and pre fertilization were collected to determine the number of ovules per ovary and study pre zygotic factors such as different pattern of ovules. The fruits, in various stages of development, were collected for observation post zygotic factors such as embryo development. The results revealed that in *M. floribunda* there is a gap of seven months between the flower senescence and the beginning of the fruit development. Along this period, the embryo remains in globular phase, and we considered this retarded embryonic development as a diapause, leading the discussion to a broader scenario that includes plants and animals. Moreover, the results of manual pollination revealed that: (1) *Myrciaria floribunda* is a self-incompatible species; (2) the fruit production is limited by pollination; (3) the deposition of large amount of compatible pollen in stigmas did not result in fruits with more seeds showing that there is not "pollen limitation" for seeds production. We concluded that facts related to self-incompatibility, such as inbreeding depression, added to natural pollination, are not responsible for the low seed/ovule ratio in *M. floribunda*. The anatomical analysis showed ovules with extranumerary or degenerated embryo sacs, and ovulodes that can explain the low seed/ovule ratio.

Lista de Figuras

Figura 1: Área de estudo, media histórica pluviométrica e habito.....	17
Figura 2: Inflorescência, botões florais, flor, ovários e frutos.....	18
Figura 3: Germinação do tubo polínico.....	19
Figura 4: Óvulos típicos e atípicos.....	20
Figura 5: Desenvolvimento embrionário.....	21
Figura 6: Desenvolvimento embrionário.....	22
Figura 7: Desenvolvimento embrionário e proliferações nucelares.....	23
Figura 8: Embriões nucelares.....	24
Figura 9: Desenvolvimento do fruto.....	25
Figura 10: Tecidos do fruto e cavidades secretoras	26
Figura 11: Maturação do fruto.....	27
Figura 12: Resumo do desenvolvimento seminal e do fruto.....	28

Lista de Tabelas

Tabela 1: Produção de frutos e sementes em *Myrciaria floribunda* após tratamentos de polinização manual na restinga de Maricá, RJ.....9

Tabela 2: Avaliação do número de óvulos presentes e caracterização dos mesmos a partir da secção transversal de ovários de 15 flores, em seis indivíduos de *Myrciaria floribunda*.....12

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E METODOLOGIA.....	5
2.1 Biologia Reprodutiva.....	5
2.2 Anatomia e testes histoquímicos.....	6
3. RESULTADOS	8
3.1 Aspectos da fenologia e biologia floral.....	8
3.2 Biologia da Reprodução.....	9
3.3 Caracterização anatômica	10
3.3.1 Óvulos.....	10
3.3.2 Semente e fruto.....	12
3.3.3 Desenvolvimento seminal.....	13
3.3.4 Desenvolvimento do fruto.....	15
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. Introdução

Myrtaceae é uma família pertencente à ordem Myrtales *sensu* APG III (2009), com distribuição predominantemente pantropical e segundo Barroso e colaboradores (1984), tem os maiores centros de diversidade na América Tropical e Austrália. A família é bem delimitada, incluindo 132 gêneros e 5671 espécies (Govaerts *et al.*, 2008) e uma das maiores da flora brasileira, encontrando-se entre as mais comuns, nas diversas formações vegetais, com destaque para a Mata Atlântica, especialmente para restinga. Essa é uma das mais complexas famílias, do ponto de vista sistemático, tanto pelo número de espécies e escassez de estudos taxonômicos quanto pela utilização de alguns caracteres crípticos, como tipo de embrião, na delimitação de grandes grupos (Souza & Lorenzi, 2005).

As flores de Myrtaceae são geralmente brancas, bissexuadas, actinomorfas, diclamídeas. Os estames em geral são numerosos e livres, com anteras rimosas. (Souza & Lorenzi, 2005). O gineceu apresenta ovário ínfero ou semi-ínfero e número variável de lóculos e de óvulos (Barroso *et al.*, 1984; Souza & Lorenzi, 2005).

O pólen é o principal recurso oferecido aos polinizadores das flores de Myrtaceae, dentre os quais as abelhas são o grupo mais importante (Lughadha & Proença, 1996). A maioria dos estudos voltados para a polinização de espécies brasileiras enfoca aspectos da biologia floral, em especial a relação de visitantes observados. No entanto, muitos não comprovam se os visitantes são polinizadores realmente efetivos (Gressler *et al.*, 2006).

A abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 teve uma rápida expansão geográfica e caracteriza-se pela capacidade de esgotar os recursos florais e deslocar polinizadores, sendo muitas vezes considerada “pilhadora”, levando ao esgotamento dos recursos florais (Roubik, 1978, 1979, Schaeffer *et al.*, 1983, Roubik *et al.*, 1986, Torezan-Silingardi & Del-Claro, 1998). Nas flores do gênero *Myrciaria* a presença desta abelha também desestimula a atividade de outras espécies de polinizadores (Malerbo-Souza *et al.*, 1991). No entanto, as flores de *E. uniflora*, *E. punctifolia*, *E. rotundifolia* e *E. neomitida* são visitadas por um total de 30 espécies de insetos sendo o polinizador mais frequente as operárias de *A. mellifera*, que muitas vezes promovem inúmeras visitas intraplantas. Em decorrência de sua abundância e

constantes visitas, foram evidenciadas anteras esvaziadas pouco tempo depois da antese (Silva, 2006).

Em Myrtaceae há registro tanto de autocompatibilidade, *Eugenia uniflora* L. e *E. puniceifolia* (Kunth) DC., como de autoincompatibilidade, *E. neonitida* Sobral e *E. roduntifolia* Casar (Silva, 2006). Em *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) O.Berg, a autocompatibilidade foi detectada indiretamente através da análise da variabilidade genética em fragmentos de Mata Atlântica (Franceschinelli *et al.*, 2007).

A delimitação de subfamílias em Myrtaceae primeiramente foi baseada em estudos morfológicos (Johnson & Briggs, 1984). Posteriormente dados anatômicos e moleculares foram combinados à filogenia (Wilson *et al.*, 2001), o que trouxe novas contribuições para a sistemática da família. O fruto carnoso, caráter precioso até então para circunscrição infrafamiliar, surgiu mais de uma vez de modo independente, não sendo, portanto, confiável como caráter taxonômico (Wilson *et al.*, 2001). Em uma nova proposta, Myrtaceae passa a ser dividida, com base em análises moleculares, em duas subfamílias: Myrtoideae com quinze tribos e Psiloxylodeae com duas tribos (Wilson *et al.*, 2005).

A tribo Myrteae foi reconhecida por Candolle (1828) com base nos frutos carnosos. Lucas e colaboradores (2005) apontam a ocorrência da maioria de seus representantes na América do Sul. Nesta tribo os frutos carnosos são de pericarpo amarelo-vitelo, de pouca espessura, com uma única semente globosa. Já a polpa, de origem placentar, é farta e mucilaginosa. (Barroso *et al.*, 1999)

Em Myrteae os caracteres do embrião são variáveis, o que levou Berg (1855-59) a utilizá-los na delimitação de três sub tribos: Myrciinae, que apresenta embrião com cotilédones finos, membranáceos e o eixo do hipocótilo enrolado aos cotilédones; Myrtinae, com embrião longo, fino e em forma de ferradura, onde o hipocótilo se mantém curvado entre dois cotilédones reduzidos; e Eugeniinae, com embrião com cotilédones carnosos e exuberantes, às vezes indivisíveis, e eixo do hipocótilo visível ou não.

Espécies da tribo Myrteae têm sido estudadas no Museu Nacional/UFRJ, quanto à anatomia floral e à biologia reprodutiva. A baixa razão semente/óvulo, registrada por Silva (2006), em espécies de *Eugenia*, é característica marcante também em muitas espécies de Myrtaceae (Schmid, 1972). Raramente todos os óvulos de uma flor resultam em sementes (Stephenson, 1981). Limitação polínica em

virtude da atividade do polinizador tem sido frequentemente estudada (Larson & Barret, 2000).

Lopes (2008) e Spala (2010) descrevem variações no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos de *E. uniflora* e *Myrcia ilheosensis* Kiaersk. como anteras com grãos de pólen colapsados e, apenas em *E. uniflora*, grãos com proliferações celulares. Em ambos os casos, parte ou a totalidade do pólen era atingida, seja em algumas ou em todas as lojas de uma mesma antera. Foram encontradas também anomalias no gineceu, mais especificamente nos óvulos tais como sacos embrionários extranumerários, óvulos sem quaisquer indícios de saco embrionário, sacos embrionários degenerados e proliferação nas sinérgides. Óvulos com ausência de saco embrionário já foram relatados para a família e são denominados ovuloides (Prakash, 1969; Bohte & Drinam, 2005). Lopes (dados não publicados) afirma também que essas variações ocorrem em *M. floribunda* em intensidade e frequência ainda maiores, levando à perda de funcionalidade dos óvulos. Tais características fazem de *M. floribunda* um bom modelo para análises dos eventos relacionados à esterilidade.

Dentre os estudos realizados sobre Myrtaceae, e mais especificamente sobre a tribo Myrteae, poucos são os que incluem o gênero *Myrciaria*, membro do grupo Plinia e da subtribo Eugeniinae Berg. (Lucas, 2007). Dados anatômicos, tanto do eixo floral quanto do fruto são inexistentes na literatura. No gênero *Myrciaria* o fruto é do tipo bacídeo, com pericarpo de pouca a muita espessura, espaço central dividido em septos e geralmente com poucas sementes envolvidas por uma polpa (Barroso *et al.*, 1999). Apresenta embriões com cotilédones grandes e indivisíveis com difícil delimitação do hipocótilo. A germinação é hipógea (Kausel 1956, 1966).

Myrciaria floribunda é uma espécie de hábito arbustivo a arbóreo, com crescimento lento, podendo atingir até 20 metros de altura. A espécie é de fácil identificação por apresentar uma casca esbranquiçada (Franceschinelli *et al.*, 2007).

A espécie apresenta floração nos meses de dezembro e janeiro enquanto os frutos aparecem nos meses de julho a outubro (Souza, 2005). Outros autores, ao estudarem *M. floribunda* na APA de Maricá, destacam o mesmo espaço de tempo entre a floração e o aparecimento dos frutos (Rodarte, 2008 e Greco, 2012, dados não publicados). Os pesquisadores verificaram que a floração ocorre nos meses de janeiro a março e posteriormente a esse evento, curiosamente, não foi registrada a

presença de frutos em desenvolvimento.

O presente trabalho tem como objetivo o estudo da biologia reprodutiva e ontogenia da semente e fruto de *Myrciaria floribunda*, espécie que exhibe grande variação no desenvolvimento dos óvulos, visando fornecer subsídios para a compreensão da baixa relação semente/óvulos na tribo Myrteae. São propostas hipóteses para explicar a reduzida produção de sementes em *M. floribunda*: (1) fatores relacionados à autocompatibilidade ou pós-zigóticos podem estar relacionados ao aborto dos embriões por depressão autogâmica; (2) a polinização natural é ineficiente e (3) fatores pré-zigóticos reduzem o número de óvulos férteis.

O estudo justifica-se pela possibilidade de investigar o desenvolvimento das sementes em uma espécie com ampla variedade de alterações nos óvulos, em menor grau, também registradas em outros gêneros de Myrtaceae.

2. Material e Metodologia

O objeto de estudo foi uma população de *Myrciaria floribunda* localizada sobre o cordão interno da restinga da APA (Área de Proteção Ambiental) de Maricá - RJ, situada no litoral fluminense, município de Maricá, entre os distritos de Barra de Maricá e Itaipuaçu, entre as coordenadas 22°55' a 22°54'S e 42°48' a 42°54' W (Fig. 1A). Na área de estudo, a população distribuiu-se sobre solo arenoso, em moitas intercaladas por espaços praticamente desnudos (Fig. 1A).

O clima da região é do tipo AW tropical chuvoso (Koeppen, 1948), com chuvas concentradas no verão e reduzidas no inverno (Fig. 1B). Os dados de precipitação e temperatura foram tomados para a estação climatológica auxiliar de Maricá e cedidos pelo INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). No período de estudo a estação não coletou dados para setembro/2011 e de março de 2012 a janeiro de 2013, motivo pelo qual apenas sugestões acerca da influência das chuvas na indução da floração e do desenvolvimento dos frutos foram possíveis.

2.1 Biologia Reprodutiva

Para o estudo da biologia reprodutiva, limitação polínica e fatores relacionados à autocompatibilidade foram aplicadas técnicas de polinização manual com diferentes tratamentos, utilizando-se sacos de organza para isolar as flores em fase de pré-antese e de pós-polinização manual. Foram realizados os seguintes experimentos:

- ✓ Autopolinização espontânea (autogamia), onde botões em pré-antese foram apenas ensacados e acompanhados;
- ✓ Autopolinização manual (autofertilidade), onde botões em pré-antese foram ensacados e, após a abertura, as flores foram autopolinizadas com seu próprio pólen;
- ✓ Polinização cruzada (xenogamia), onde botões em pré-antese foram ensacados e, após a abertura, foi promovida a polinização cruzada, suplementando-se o estigma com pólen de outro indivíduo;
- ✓ Polinização natural (controle), onde não houve ensacamento e as flores foram apenas marcadas e acompanhadas.

Todos os experimentos foram acompanhados até a maturidade do fruto ou

senescência da flor. Para verificar a ocorrência de limitação polínica, decorrente de falhas na atuação dos polinizadores, foram utilizados dois parâmetros: I. diferença significativa entre as porcentagens de frutificação obtidas a partir de polinização cruzada manual e polinização natural (controle), verificada através do teste do Qui-quadrado (χ^2); II. índice de limitação polínica [ILP= 1- (Fc/Fpc)], onde Fc é a porcentagem de frutificação em condições naturais (controle) e Fpc é a porcentagem de frutificação da polinização cruzada manual (xenogamia) (Larson & Barret, 2000). Para excluir a hipótese de que a atuação dos polinizadores pudesse estar envolvida na redução do número de sementes por fruto, a limitação polínica também foi avaliada em nível de sementes produzidas nos dois tratamentos. De acordo com Freitas e colaboradores (2010), valores negativos ou próximos a zero (< 0,2) indicam ausência de limitação e valores acima de 0,8 indicam limitação severa.

Para a análise do crescimento *in situ* do tubo polínico, flores com estigmas manualmente polinizados (autopolinização e polinização cruzada), em dois indivíduos, foram coletados 24 horas (auto - n=10, cruzada - n=10), 48 horas (auto - n=10, cruzada - n=10) e 72 horas (auto - n=10, cruzada - n=10) após a polinização e fixadas em álcool 70%. Pistilos foram amaciados em solução 9 M NaOH por 60 minutos, lavados em água corrente e corados com azul de anilina (Martin, 1959). Os pistilos foram analisados, sob luz UV, em microscópio de epifluorescência Olympus BX-51.

2.2 Anatomia e testes histoquímicos

Para o estudo de anatomia, os frutos foram coletados ao longo de todo o desenvolvimento, desde 24 horas após a polinização até a maturidade do fruto (cerca de sete meses).

As coletas nas primeiras 72 horas foram realizadas em paralelo à análise do crescimento *in situ* do tubo polínico e objetivaram estimar o número de óvulos/ovário assim como detectar variações nos óvulos relacionadas a fatores pré-zigóticos. As coletas aos vinte dias, 3 meses e 7 meses em diante foram realizadas para monitorar o desenvolvimento do fruto e embrião e possíveis fatores pós-zigóticos relacionados à autocompatibilidade ou ao aborto dos embriões. Os frutos foram fixados em solução de formaldeído 4% + glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,2 (Gahan, 1984), submetidos à baixa pressão, mensurados

(comprimento), desidratados em série etílica e emblocados em Histoiresin[®]. Secções seriadas de 1-3 μ m de espessura, obtidas com navalha de vidro em micrótomo rotativo Spencer modelos Spencer 820 (American Optical Co) e RM2255 (Leica), foram coradas com Azul de Toluidina (Feder & O'Brien, 1968).

As observações, mensurações e documentações fotográficas foram realizadas em microscópio Olympus BX-51 com câmara Q color 5 e software Image-Pro Express. As imagens foram trabalhadas no software Photoshop[®] 6.0 e as pranchas montadas utilizando o CorelDRAW[®] 12.

Para avaliar e quantificar o número de sementes por frutos maduros originados de polinização natural os mesmos foram seccionados e observados com auxílio do microscópio estereoscópico Leica EZ4.

Para testar a presença das principais classes de metabólitos secundários secções de material emblocado e fresco, obtidas em micrótomo rotativo e de Ranvier respectivamente, foram posteriormente tratadas com: (a) Sudan Black e IV, para compostos de natureza lipofílica (Jensen, 1962), (b) Lugol, para amido (Langeron, 1949), (c) solução de dicromato de potássio, para compostos fenólicos (Johansen, 1940), (d) Vermelho de Rutênio, para substâncias pécticas (Langeron, 1949), (e) ácido acético e ácido clorídrico para a determinação da natureza química dos cristais através de testes de solubilidade diferencial (MacLean & Ivemey-Cook, 1952).

3. Resultados

3.1. Aspectos da fenologia e biologia floral

Myrciaria floribunda, na área de estudo, tem hábito subarbustivo a arbustivo e altura de um a três metros (Figs. 1C e D). Após intensa emissão foliar no início de janeiro, surgiram botões florais que mantiveram-se com pouco ou nenhum desenvolvimento por um período de aproximadamente de 70 dias (Fig. 2A) quando houve a retomada do desenvolvimento floral. Durante o período de estudo (2011 a 2013) a floração ocorreu a partir de meados de março, após um período de baixa pluviosidade no mês de fevereiro (2011=1,4mm; 2012=5,6mm e 2013=33,8mm), seguido por um aumento considerável dos índices pluviométricos em março (2011=150,9; sem dados para 2012 e 2013=205,7mm). Observou-se que grupos de indivíduos apresentaram floração massiva, de forma sincrônica intraplanta, após alguns dias de chuva. A assincronia interplantas teve como consequência a extensão do período de floração, ao longo do mês de abril e início de maio, com florescimento sucessivo de grupos de indivíduos.

As flores apresentam 0,8 cm, são inodoras, tetrâmeras, com sépalas verdes e pétalas alvas. Os estames são numerosos, constituindo o principal elemento atrativo sendo o pólen único recurso floral disponível (Fig. 2B). O estigma localiza-se acima dos estames, caracterizando hercogamia. São visitadas intensamente no início da manhã por diversos insetos, dos quais se destacam, pela frequência de visitas, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e *Trigona spinipes* Fabricius, 1793. Estas abelhas esgotam rapidamente os grãos de pólen. Flores visitadas contrastam com as ensacadas pela abundância deste recurso nestas últimas.

As flores são efêmeras, com antese durando algumas horas da manhã, já estando senescentes no período da tarde quando se observa perda do perianto, dos estames e manutenção do estilete por mais uma semana. Os ovários medem nesta fase 0,1 cm (Fig. 2C e detalhe) mantendo-se verdes, sem qualquer evidência de desenvolvimento por um período de cerca de sete meses.

Em meados de outubro, quando houve um incremento no volume de chuvas (setembro de 2011=67,1mm; outubro de 2011=133,8mm), os frutos cresceram e amadureceram rapidamente até o final de dezembro. Nesta fase os frutos apresentam cor laranja e emanam forte odor da superfície glabra (Fig. 2D). No ápice

dos frutos há duas regiões cicatriciais circulares, uma correspondente ao local de inserção do cálice, corola e estames e outra ao local do estilete (Fig. 2E). O pericarpo é espesso, macio e de sabor levemente azedo. Os frutos na maturidade não apresentam lóculos discerníveis e contêm em geral uma semente (86,7%; N= 30 frutos) que ocupa quase que a totalidade do fruto, pressionando o pericarpo (Fig. 2F). Alguns frutos (13,3%) apresentam duas sementes de tamanhos diferentes.

3.2. Biologia Reprodutiva

Os testes de polinização manual mostraram que a espécie apenas produz frutos a partir de polinizações manuais cruzadas (xenogamia), ainda que com um baixo sucesso (16,5%), sendo portanto autoestéril (Tab. 1). A produção de frutos por xenogamia foi significativamente maior do que a produção natural de frutos ($\chi^2 = 7,81$ para $p < 0,01$). O índice de limitação polínica (ILP), em nível de produção de frutos, foi de 0,62 ($>0,2$), atestando limitação polínica, ainda que pouco severa ($<0,8$), e, portanto, apontando falhas no processo de polinização das flores na população estudada. No entanto, o ILP em nível de semente foi 0 (zero), uma vez que não houve diferença no número de sementes por fruto nos tratamentos de polinização cruzada manual (xenogamia) e polinização natural (controle). Considerando-se que a média de sementes por fruto é 1,13 (de 30 frutos maduros obteve-se 34 sementes) e a média de óvulos por flor é 5,4 (Tab. 2), a razão semente /óvulo obtida para *M. floribunda* é 0,21, o que significa que apenas 21% dos óvulos resultam em sementes.

Tabela 1: Produção de frutos e sementes em *Myrciaria floribunda* após tratamentos de polinização manual na restinga de Maricá, RJ.

Tratamentos	Flores (N)	Frutos (N)	Sementes(N)	Sucesso(%)
Polinização Cruzada (xenogamia)	127	21	21	16,5
Autopolinização espontânea	114	0	0	0
Autopolinização Manual	94	0	0	0
Polinização Natural	176	11	11	6

Os estigmas nos quais a polinização cruzada (xenogamia) foi realizada exibiram grãos de pólen emitindo tubo polínico 24 horas após a polinização. Também foi observada a penetração do tubo por entre as células do estigma (Fig. 3A e detalhe). Em estigmas coletados 48 horas após a polinização, os tubos atingiram o tecido transmissor e apresentaram intensa fluorescência evidenciando os *plugs* de calose (Fig. 3B). Após 72 horas, os tubos atingiram a base do estilete, não tendo sido registrada a penetração do tubo na micrópila (Fig. 3C). Nas flores autopolinizadas não foi observada a emissão de tubos polínicos até 72 horas após a polinização (Figs. 3D, E, F).

3.3. Caracterização anatômica

3.3.1. Óvulos

Os ovários de *Myrciaria floribunda* apresentam média de 5,4 óvulos (4 a 8; n= 15). Entre a pós-polinização e a pré-fertilização foram observados três padrões anatomicamente distintos dos óvulos (Tab. 2), ainda que, em relação ao tegumento, não tenham sido detectadas diferenças entre eles. Esses padrões podem ocorrer todos em óvulos de um mesmo ovário:

- **Típico**

Apenas 26% dos óvulos são típicos, caracterizados por: nucelo composto de células com citoplasma denso e vacuoma desenvolvido; saco embrionário com duas sinérgides, oosfera e célula média (Fig. 4A).

As sinérgides são volumosas, com citoplasma denso e polarizado, posicionado junto ao polo micropilar, enquanto o vacúolo está voltado para o polo calazal. O aparato fibrilar cora-se com tonalidade lilás, ficando bastante evidente essa região. A oosfera apresenta núcleo e citoplasma voltados para o polo calazal (Fig. 4A) e a célula média possui núcleos polares situados próximo à oosfera e vacúolo grande que ocupa a maior porção do saco embrionário (Fig. 4B).

- **Atípico**

Os óvulos atípicos correspondem à maioria (75%) e podem exibir alterações no saco embrionário (60%) ou no nucelo (15%). No primeiro caso os óvulos podem conter:

- 1) Saco embrionário aparentemente degenerado: preenchido por material amorfo, possivelmente restos celulares (Fig. 4C).
- 2) Sacos embrionários extranumerários: um situado no centro do nucelo e outro próximo ao tegumento e ambos apresentam-se diminutos, tamanhos inferiores a sacos típicos (Fig. 4D).
- 3) Ovuloides: apenas células nucleares com vacúolo grande e núcleo bastante evidente, sem qualquer indício de formação de saco embrionário (Fig. 4E).

No segundo caso, óvulos com saco embrionário sem alterações apresentam proliferações nucleares que comprimem inicialmente o saco embrionário de forma massiva e posteriormente vão se tornando localizadas e eventualmente algumas originam embriões nucleares, que serão descritos mais adiante (Fig. 4F).

Tabela 2: Avaliação do número de óvulos presentes e caracterização dos mesmos a partir da secção transversal de ovários de 15 flores, em seis indivíduos de *Myrciaria floribunda*.

Flores/Ovários	Nº óvulos	Padrão Típico	Padrão Atípico	
			Alterações do saco embrionário	Proliferação do nucelo
1	4	0	3	1
2	4	1	3	0
3	6	3	2	1
4	6	1	4	1
5	6	2	3	1
6	4	1	3	0
7	6	1	5	0
8	7	2	4	1
9	5	2	3	0
10	5	2	3	0
11	6	1	4	1
12	8	2	3	3
13	4	1	2	1
14	4	1	2	1
15	6	1	4	1
Total: 15	81	21 (25,93%)	48 (59,25%)	12 (14,81%)
Média: 5,4				

3.3.2. Semente e fruto

A semente e o fruto tiveram desenvolvimento desacoplado. A semente - tegumentos e embrião - desenvolveu-se ao longo de nove meses, lentamente nos primeiros sete e de forma acelerada nos dois últimos. Por outro lado, a diferenciação dos tecidos do fruto, seu crescimento subsequente e a maturação restringiram-se ao oitavo e nono meses pós-polinização (novembro e dezembro). Como consequência, mesmo com desenvolvimento desacoplado, fruto e semente alcançaram a maturidade concomitantemente.

3.3.3. Desenvolvimento seminal

Com 20 dias após a polinização, o proembrião tem poucas células com citoplasma denso e núcleo evidente. O suspensor é diminuto e posicionado voltado para região micropilar. O endosperma tem núcleos livres (Fig. 5A).

Três meses após a polinização, o embrião encontra-se no início da fase globular; tem poucas células, com núcleo evidente e citoplasma denso. O suspensor é tricelular, formado por uma célula grande, ancorada à micrópila, de contorno quadrangular, citoplasma menos denso que o do embrião propriamente dito e vacúolo central. As demais são menores e de contorno retangular. O endosperma encontra-se celularizado; as células têm parede delgada, vacúolo conspícuo ocupando quase todo o volume do lume e apresentam contornos variados, sem padrão definido. O nucelo é constituído por aproximadamente três camadas de células de contorno retangular, núcleo evidente e citoplasma com baixa densidade (Fig. 5B).

O tegumento da semente apresenta epiderme delgada, com células achatadas de contorno retangular enquanto as do parênquima subepidérmico tem contorno semelhante aos das epidérmicas e grande concentração de fenóis. As células das demais camadas têm contorno circular, núcleo evidente e menor tamanho (Fig. 5C).

Sete meses após a polinização, início do oitavo mês, pode-se observar uma aceleração no desenvolvimento do embrião que passa apresentar expressivo aumento do número de células atingindo assim o estágio globular. Nessa fase, a protoderme já está estabelecida e o suspensor alongado pelo crescimento celular (Fig. 5D). Essa aceleração é acompanhada pelo início do crescimento do fruto que apresenta entre 0,1 e 0,2 cm.

Frutos com 0,2cm apresentam embrião em estágio globular tardio, sendo possível observar no ápice do mesmo, divisões em série, relacionadas ao início da formação de um dos cotilédones (Fig. 5E).

Na transição de 0,2 cm para 0,3 cm, os cotilédones já diferenciados encontram-se em fase de crescimento. No suspensor é possível identificar duas fileiras de células (Fig. 5F). Com 0,3 cm, os cotilédones alongam-se e o embrião cordiforme passa a torpedo. O suspensor se mostra ainda presente (Fig. 6A).

Os cotilédones encontram-se com epiderme e parênquima em diferenciação nos frutos com 0,4 cm e seus ápices, em processo de alongamento, terminam por se tocarem (Fig. 6B). Posteriormente, na transição de 0,4 para 0,5 cm os cotilédones se fundem apenas na região apical, sendo possível discernir a protoderme da face interna nas regiões mediana e basal do cotilédone. Nesse estágio os dois meristemas apicais - caulinar e radicular já estão delimitados (Fig. 6C e detalhe).

Em frutos com 0,5 cm os cotilédones de ápices fusionados alongam-se aumentando o comprimento do embrião e surgem cavidades secretoras próximas à epiderme interna dos cotilédones (Fig. 6D). Alguns frutos foram predados por insetos que ao atravessarem o pericarpo, formaram túneis até atingir as sementes, cujos embriões são parcial ou completamente consumido (Fig. 6E).

Frutos de tamanho entre 0,6 e 0,7 cm têm o embrião na fase final de seu desenvolvimento. Algumas de suas cavidades já se encontram em fase secretora (Fig. 6F). Na posição da nervura central dos cotilédones, há presença de pró-câmbio (Fig. 6F) e o meristema caulinar não apresenta primórdios (Fig. 7A).

O fruto apresenta-se maduro com aproximadamente 0,8 a 0,9 cm, quando o embrião está volumoso, com grande reserva de amido nas células parenquimáticas e todas suas cavidades secretoras em fase pós-secretora. O suspensor não é mais observado e o eixo hipocótilo-radícula é quase imperceptível (Fig. 7B).

Desenvolvimento de embriões nucelares.

Em frutos nos quais há duas sementes, estas tem tamanhos diferentes: a maior corresponde à semente única da maioria dos frutos; a menor está sempre associado à presença de proliferação do nucelo que comprime o saco embrionário e ocasionalmente é observada desde as primeiras 24 horas pós-polinização. Tais células apresentam contorno irregular e citologicamente são muito similares às células do nucelo (Fig. 4F).

Passados 20 dias pós-polinização, essas proliferações concentram-se junto a uma determinada região do nucelo, aleatoriamente, caracterizando-se inicialmente por células globosas que se destacam pelo tamanho e espessura da parede celular (Fig. 7C) além da disposição em pares (Fig. 7C detalhe). Progressivamente, esses pares, sofrem divisões que levam à formação de massas que invadem o endosperma (Fig. 7D e detalhe, Fig. E).

Com três meses, as massas ocupam grande parte da área inicialmente ocupada por endosperma (Fig. 7F) e determinadas células dispostas também em pares diferenciam-se das demais pelo tamanho maior, citoplasma mais denso e núcleo celular mais evidente (Fig. 8A).

Com sete meses após a polinização (frutos entre 0,1 e 0,2 cm) um embrião se diferenciou na massa proliferativa de origem nucelar. O suspensor tricelular deste ancora-se às células proliferativas e caracteriza-se por células retangulares vacuoladas enquanto o proembrião apomítico apresenta uma única célula globosa no ápice do suspensor (Fig. 8B).

No fruto maduro (0,9 cm), o ritmo de desenvolvimento dos embriões nucleares é mais lento que o dos zigóticos, os primeiros encontrando-se em fase globular, sem protoderme e com suspensor pouco diferenciado (Fig. 8C e D).

3.3.4. Desenvolvimento do fruto

Até o final do sétimo mês pós-polinização os ovários, ainda com 0,1 cm, apresentam epiderme uniestratificada, parênquima com células globosas, cavidades secretoras, feixes vasculares e idioblastos drusíferos. Estes últimos são mais concentrados no entorno dos lóculos ovarianos (Fig. 9A e B). Todas as células, em maior ou menor grau, contêm fenóis, especialmente nos quatro estratos subepidérmicos que circundam os lóculos (Fig. 9C).

No oitavo mês, inicia-se o desenvolvimento do pericarpo, levando ao estabelecimento de duas regiões anatômicas distintas. A região que compreende as camadas celulares situadas adjacentes à epiderme externa até a região vascularizada é denominada aqui mesocarpo externo (ME), caracterizado por células vacuoladas e abundância de cavidades secretoras que sofrem grande aumento de volume, acompanhando o crescimento em diâmetro do fruto. A região situada abaixo da região vascularizada estendendo-se até as camadas celulares adjacentes à epiderme da face interna é denominada de mesocarpo interno (MI) e caracterizada pela abundância de mucilagem nos espaços intercelulares, idioblastos drusíferos e fenólicos (Fig. 9D).

O crescimento dos frutos é marcado por numerosas mitoses no MI (Fig.10A), enquanto que no ME ocorre início da formação de um grande número de novas cavidades secretoras que se somam àquelas originadas no ovário (Fig. 10B). Essas

estruturas têm origem nas células da epiderme externa e se diferenciam das demais por apresentar maior tamanho. Posteriormente, as cavidades são deslocadas para a região mais interna do parênquima por divisões das células subepidérmicas (Fig. 10C). Em frutos com 0,2 cm as células, formadoras da cavidade, sofrem sucessivas divisões e diferenciam-se do parênquima adjacente por apresentarem citoplasma denso e o vacuoma pouco desenvolvido (Fig. 10D). O aumento do volume é concomitante ao início da secreção e levam ao afastamento dessas células, delimitando um espaço interno, o lume. Além disso, este aumento leva à compressão das células parenquimáticas adjacentes e à formação de uma bainha que reveste a cavidade nos frutos com 0,3 cm (Fig.10E). Na fase secretora, os frutos já se encontram com 0,4 cm e há formação de vacúolos, nas células do epitélio secretor, junto à bainha e reposicionamento do epitélio com a formação da cavidade secretora de maneira esquizógena (Fig.10F). No ME, a diferenciação se encerra em frutos com 0,4 cm onde o progressivo aumento do pericarpo leva à internalização das cavidades (Fig. 11A e B).

Em frutos com 0,5 cm, no MI, o ritmo das divisões celulares diminui progressivamente e ocorre acúmulo de matriz extracelular mucilaginosa nos espaços intercelulares que leva à perda de contato entre as células (Fig. 11A e C). Paralelamente enquanto há diminuição progressiva das concentrações de fenóis no mesocarpo, principalmente nas camadas de parênquima subepidérmico do MI, que circundam a semente, há aumento destes nas células do tegumento (Fig. 11D). A partir desta fase, ocorre predação de frutos por larvas de insetos, o que leva ao espessamento progressivo das paredes celulares das camadas mais internas do MI no sentido centrífugo (Fig. 6E).

Em frutos não predados, todo o MI inicia no sentido centrífugo um processo de morte celular programada marcado pela retração do citoplasma e gradual redução de sua densidade. Em frutos com 0,6 e 0,7 cm este processo atinge quase todo o MI (Fig. 11E). Os frutos atingem a maturidade com aproximadamente 0,8 e 0,9 cm, quando o MI encontra-se totalmente colapsado, substituído por matriz mucilaginosa (Fig. 11F).

A figura 12 resume todo o desenvolvimento seminal e do fruto descrito neste trabalho.

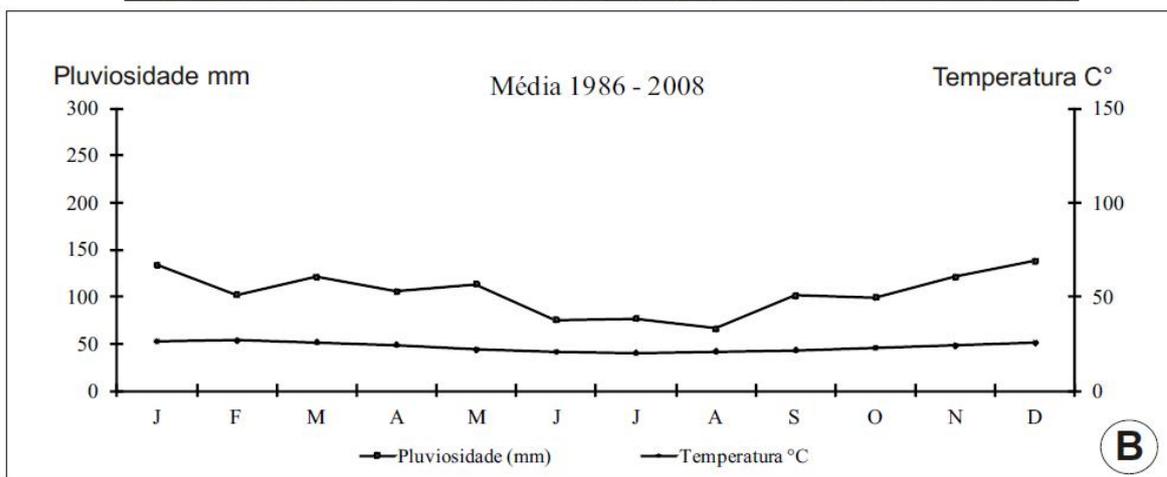


Figura 1: Área de estudo, média histórica pluviométrica e hábito de *Myrciaria floribunda*. **A** - Detalhe da área de estudo (fonte: <http://maps.google.com>); **B** - Média histórica de pluviosidade (INMET - Instituto Nacional de Meteorologia); **C** - Indivíduos com hábito arbustivo com cerca de 1 metro; **D** - Indivíduos com hábito arbóreo de aproximadamente três metros.

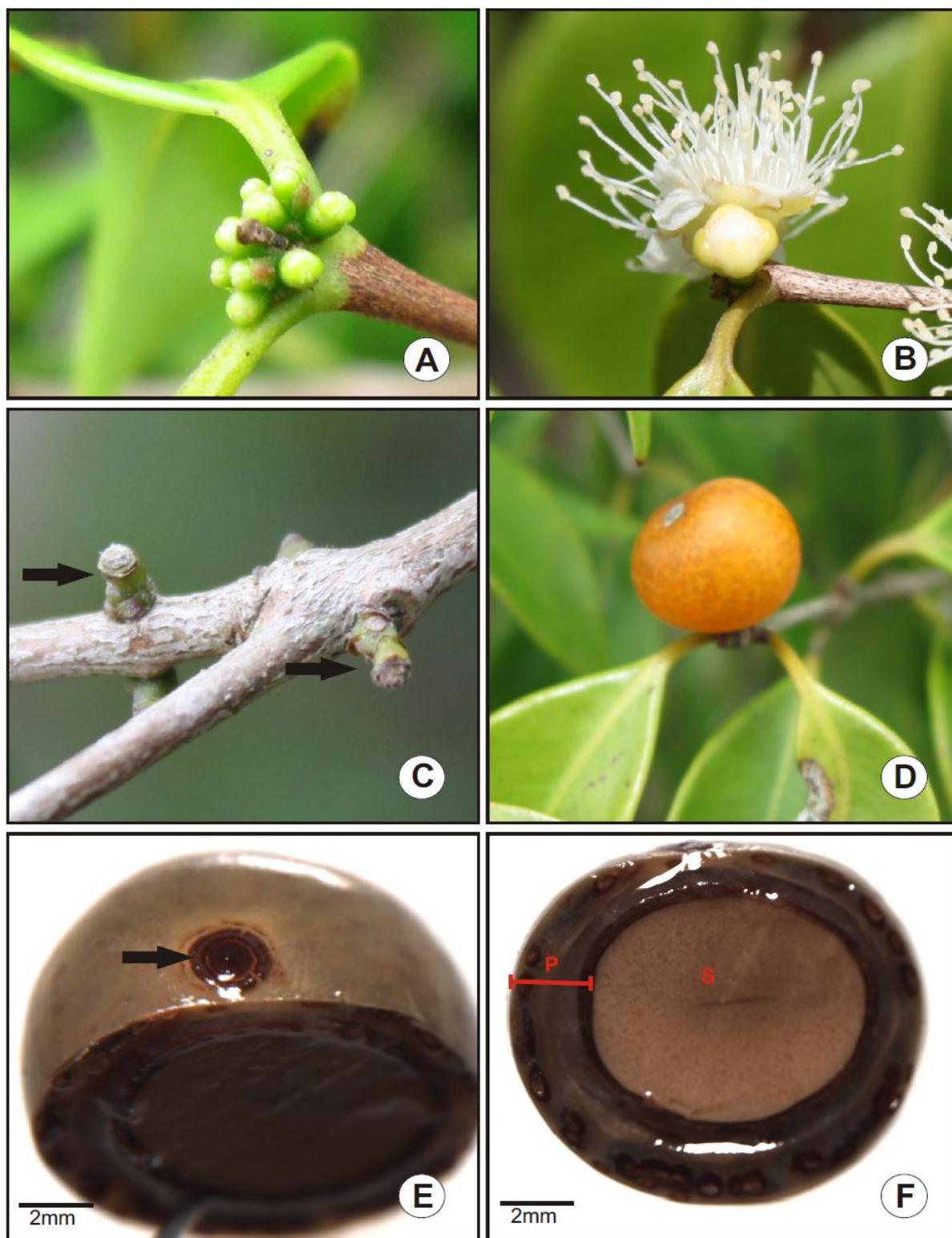


Figura 2: Botões florais, inflorescência, ovários e frutos de *Myrciaria floribunda*. **A** - Inflorescência com botões florais sem desenvolvimento; **B** - Flor em antese; **C** - Ovários inconspícuos mantidos na planta após senescência floral (setas); **D** - Fruto maduro; **E** - Região de cicatriz do fruto onde se inseriam os verticilos florais (seta); **F** - Pericarpo (P) e semente (S).

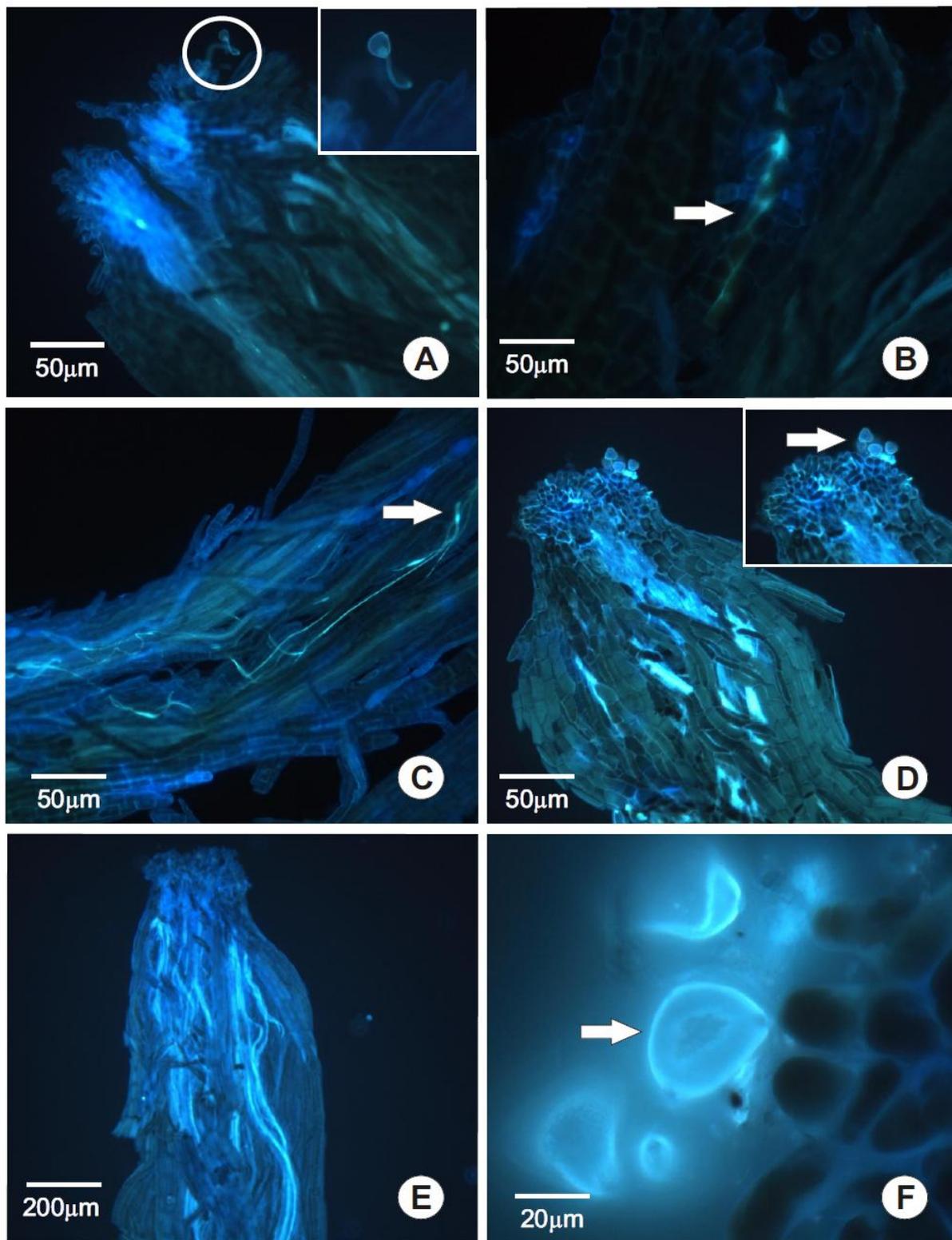


Figura 3: Germinação do tubo polínico. **A,B e C:** Polinização cruzada. **A** - Grão de pólen germinando e tubo polínico penetrando por entre as células do estigma, 24 horas após a polinização (destaques); **B** - 48 horas pós polinização, tubo polínico no tecido transmissor (seta); **C** - 72 horas pós polinização, quando os tubos atingem a base do estilete (seta); **D** - 24 horas pós polinização, com grãos de pólen depositados no estigma sem que haja germinação (destaque); **E** - Estigma e estilete, 72 horas pós polinização, sem evidência de germinação polínica; **F** - Pólen com citoplasma centralizado 72 horas após a polinização (seta).

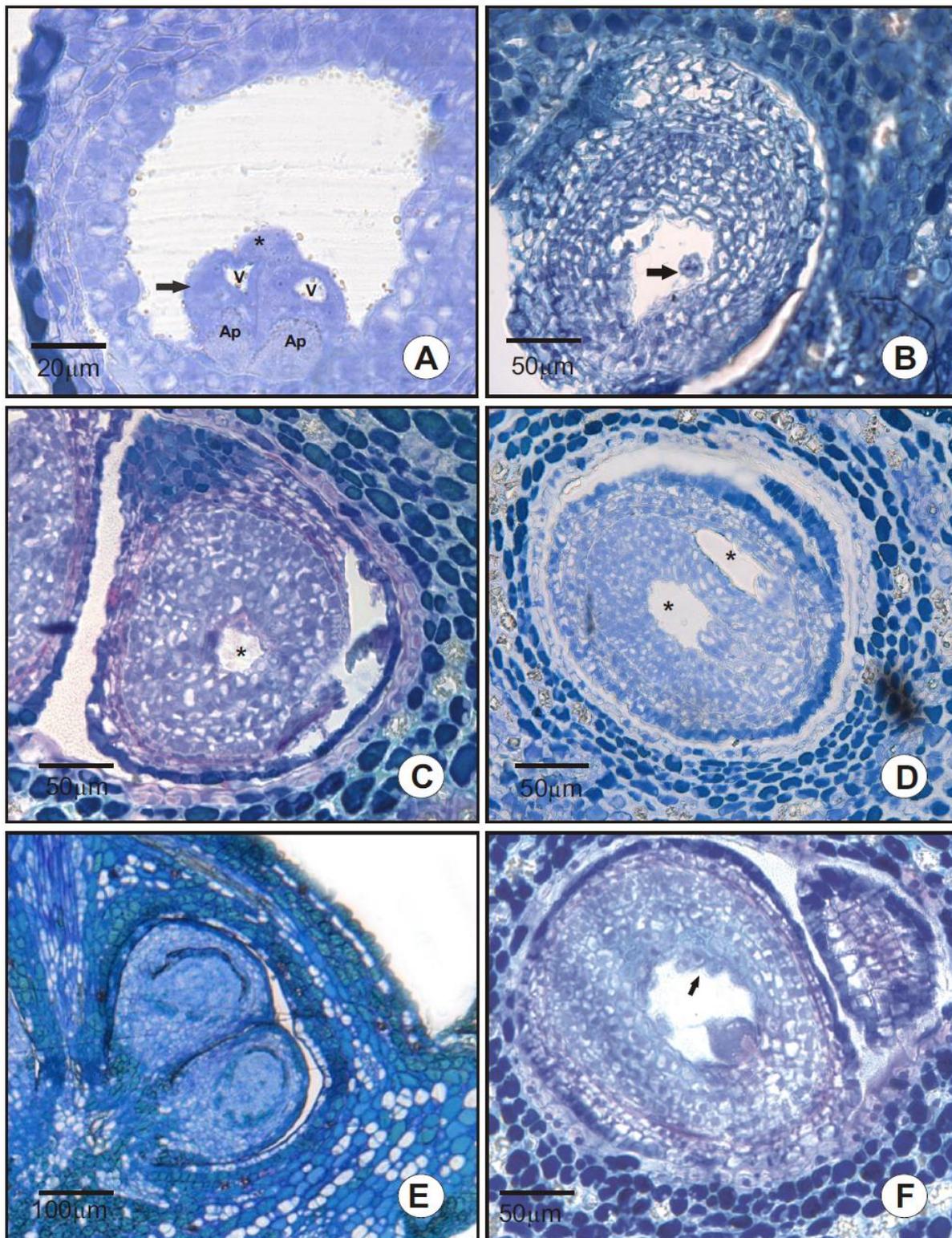


Figura 4: Óvulos típicos e atípicos. **A** - Óvulo com desenvolvimento típico contendo duas sinérgides (seta) evidenciando aparato fibrilar (Ap) e vacúolo (V) próximo à oosfera (*); **B** - Núcleos da célula média (seta); **C** - Óvulo com saco embrionário degenerado, contendo restos celulares (*); **D** - Sacos embrionários extranumerários (*); **E** - Ovuloides; **F** - Óvulo com proliferação nucelar (seta).

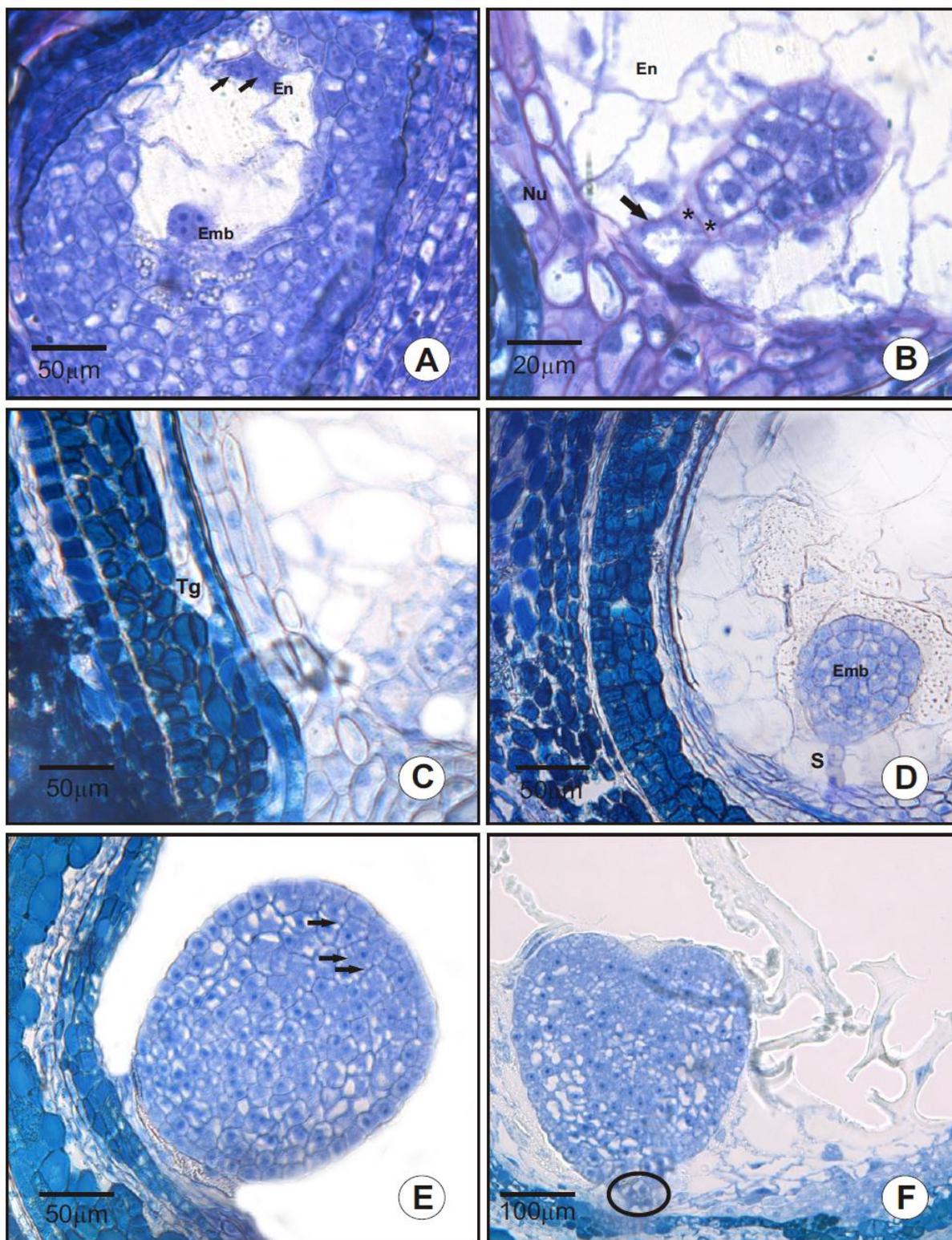


Figura 5: Desenvolvimento embrionário. **A** - Pró embrião com 20 dias pós polinização e endosperma com núcleos livres (setas). Emb= embrião, En= endosperma; **B** - Embrião globular com 3 meses pós polinização e suspensor tricelular com célula basal (seta) e outras duas retangulares (*). En= endosperma, Nu= nucelo; **C** - secção de óvulo, evidenciando tegumento (Tg); **D** - Embrião globular (Emb) com protoderme diferenciada, 7 meses pós polinização. S= suspensor; **E** - Início da diferenciação dos cotilédones (setas); **F** - Embrião em estágio cordiforme e suspensor (destaque).

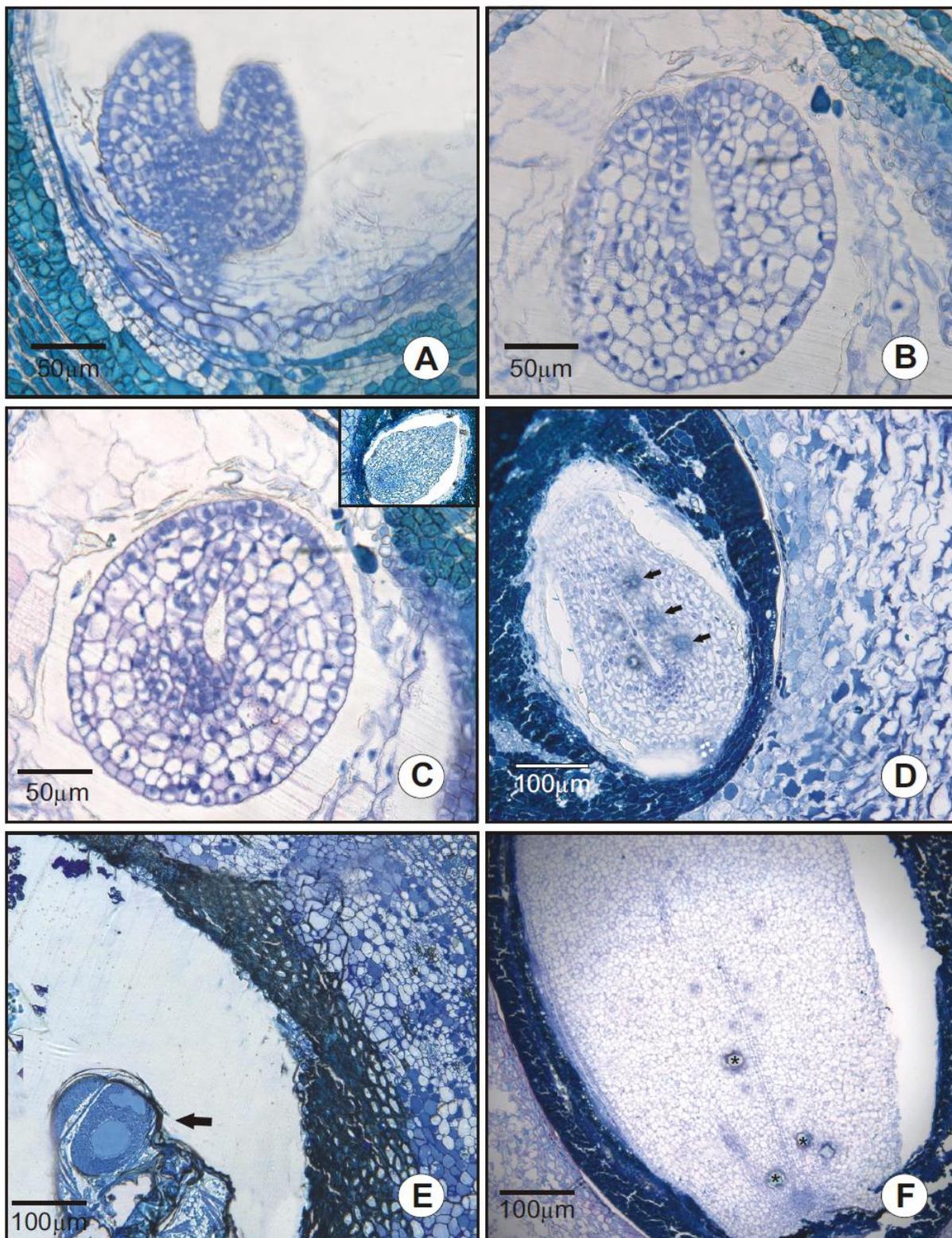


Figura 6: Desenvolvimento embrionário. **A** - Início do estágio de torpedo; **B** - cotilédones se alongam e se tocam; **C** - Fusão do ápice dos cotilédones e radícula diferenciada (destaque); **D** - Início do desenvolvimento de cavidades secretoras no embrião (setas); **E** - Inseto invasor do fruto, ocupando a região correspondente a semente (seta); **F** - Fase final do desenvolvimento embrionário com cavidades em fase pós secretora (*).

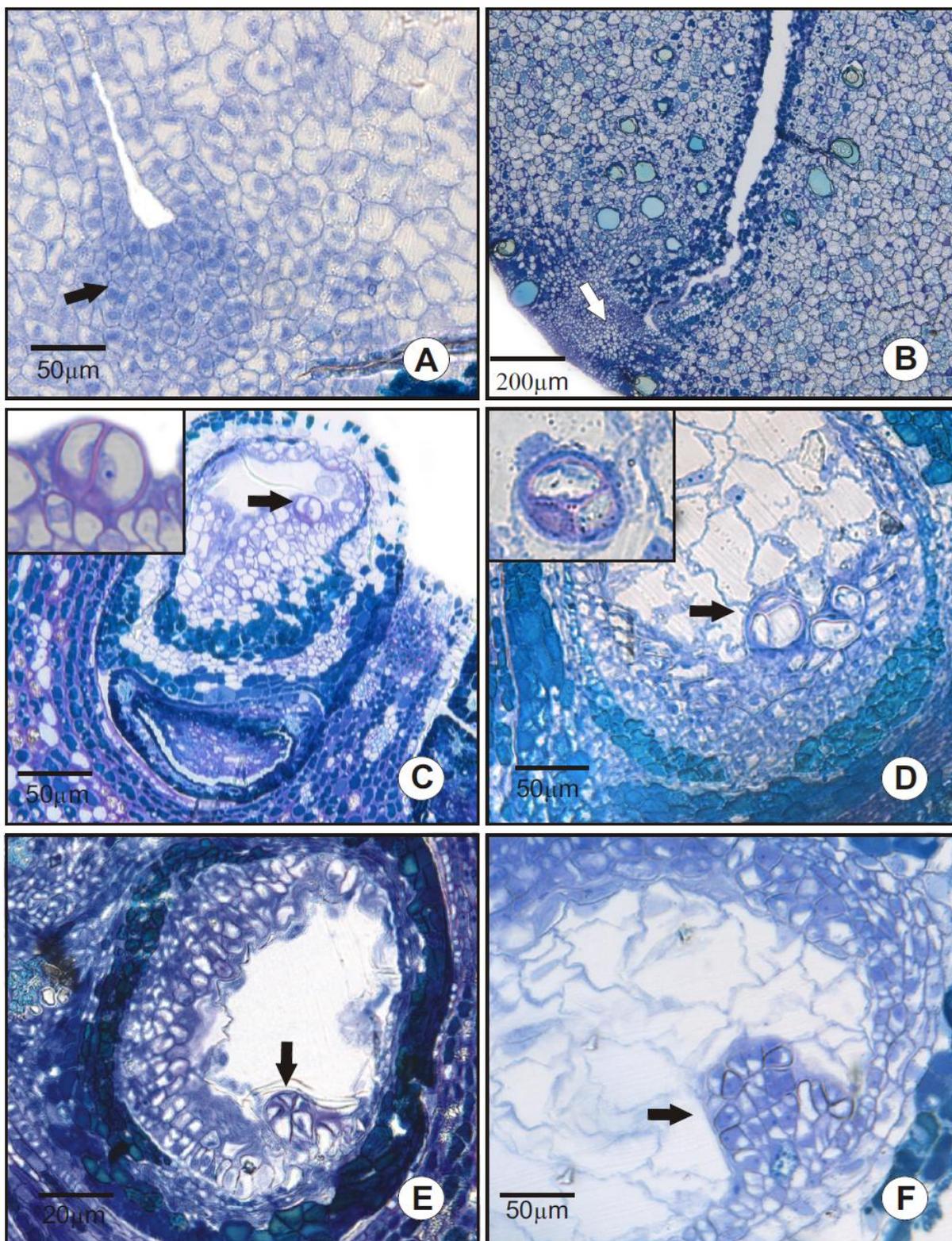


Figura 7: Desenvolvimento embrionário e embriões nucelares. **A** - Meristema caulinar (seta); **B** - Embrião maduro com reserva de amido e eixo hipocótilo-radícula (seta) pouco perceptível; **C** - Disposição em par de células de proliferação nucelar (seta e destaque); **D-F** - Proliferações nucelares invadindo progressivamente o endosperma (setas).

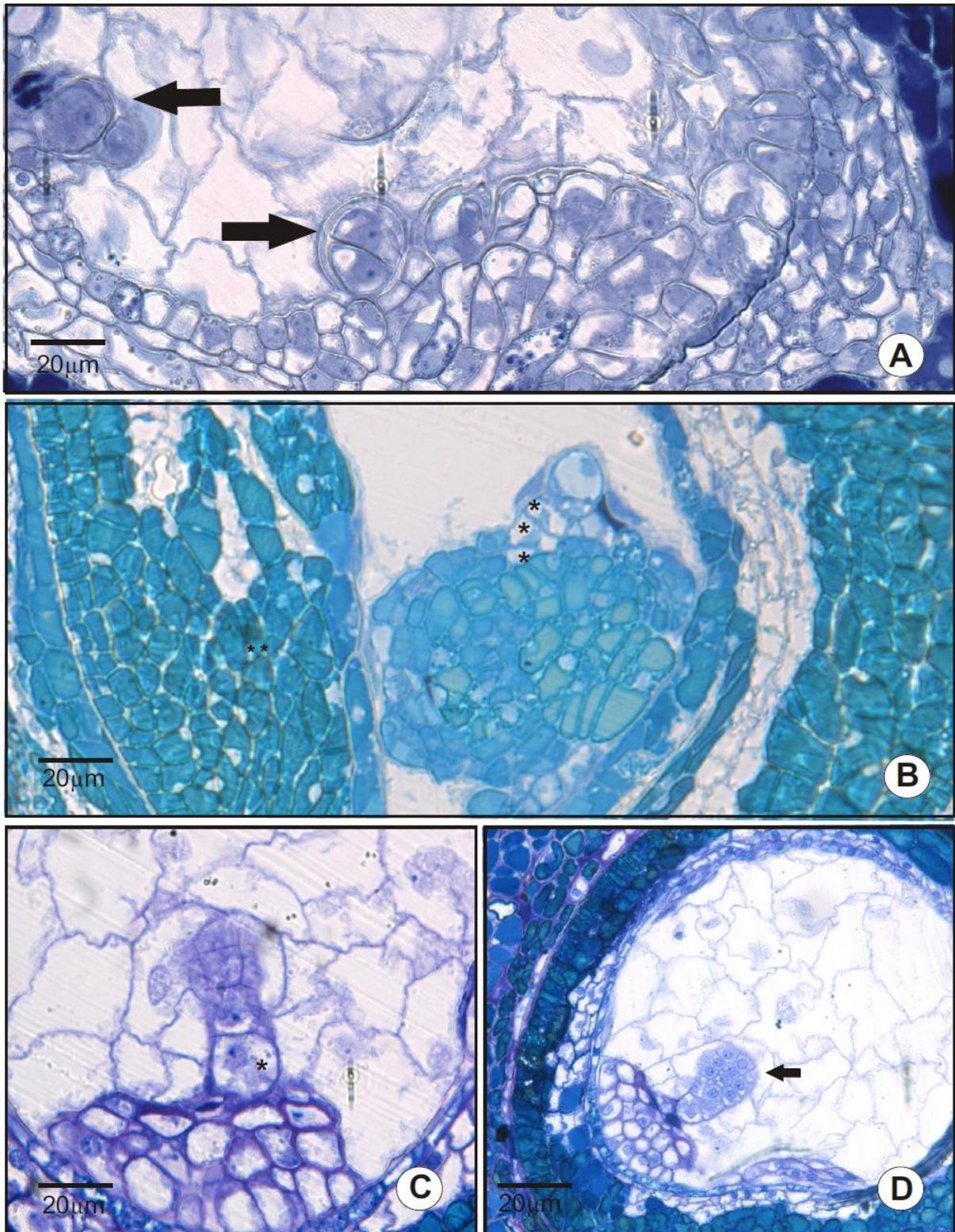


Figura 8: Embriões nucleares. **A** - Massa proliferativa diferenciando-se (setas); **B** - Embrião nuclear com suspensor tricelular (*); **C, D** - Embrião nuclear multicelular sem diferenciação de tecidos (seta) e com suspensor composto por célula basal conspícua(*).

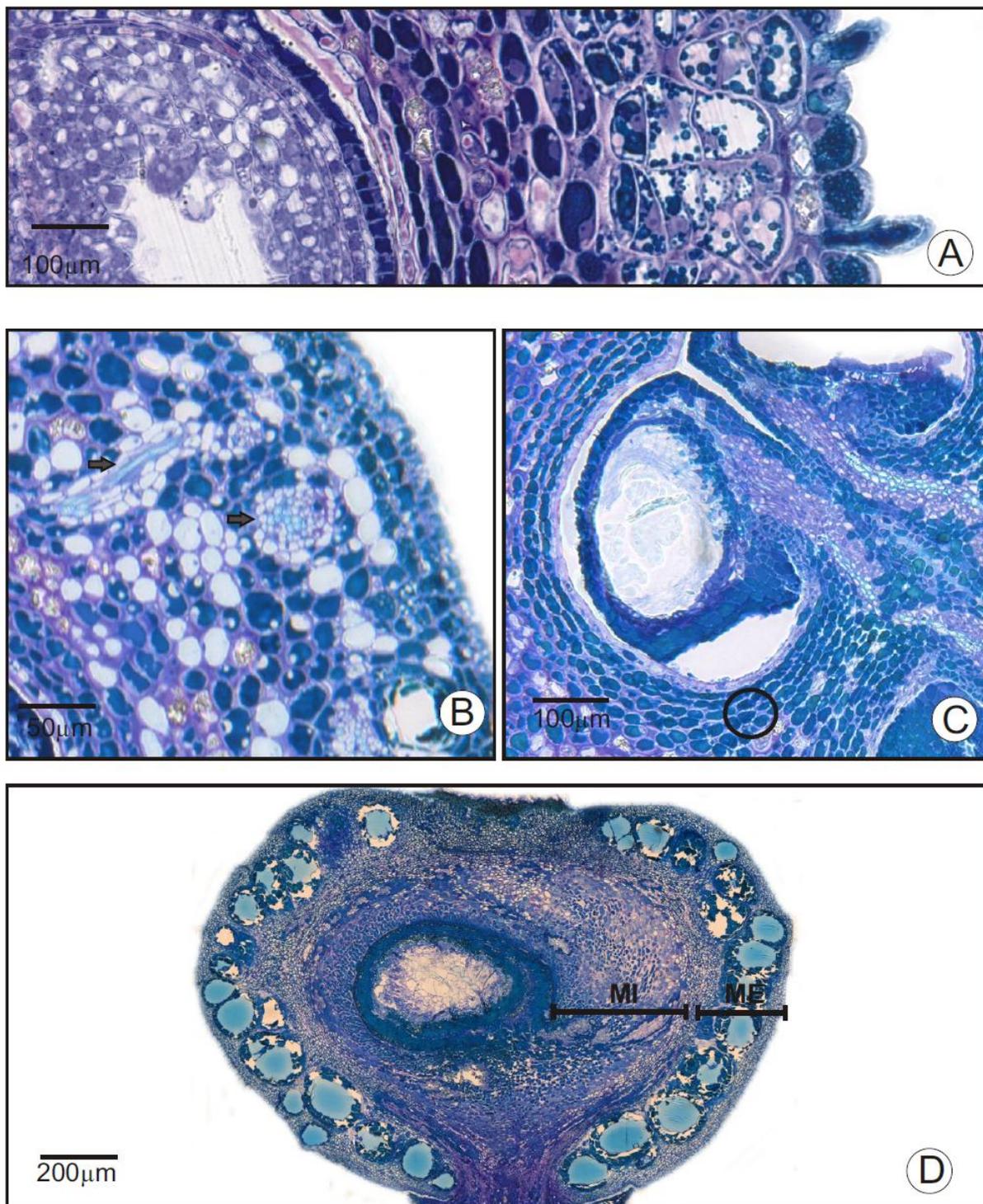


Figura 9: Desenvolvimento do fruto. **A** - Secção de óvário, evidenciando os tecidos; **B** - Feixes vasculares (setas); **C** - Estratos subepidérmicos ricos em fenóis (destaque); **D** - Fruto em desenvolvimento. Estabelecimento de duas regiões, o mesocarpo externo (ME) rico em cavidades secretoras e o mesocarpo interno (MI) rico em substância mucilaginosa nos espaços intercelulares, idioblastos drusíferos e fenólicos.

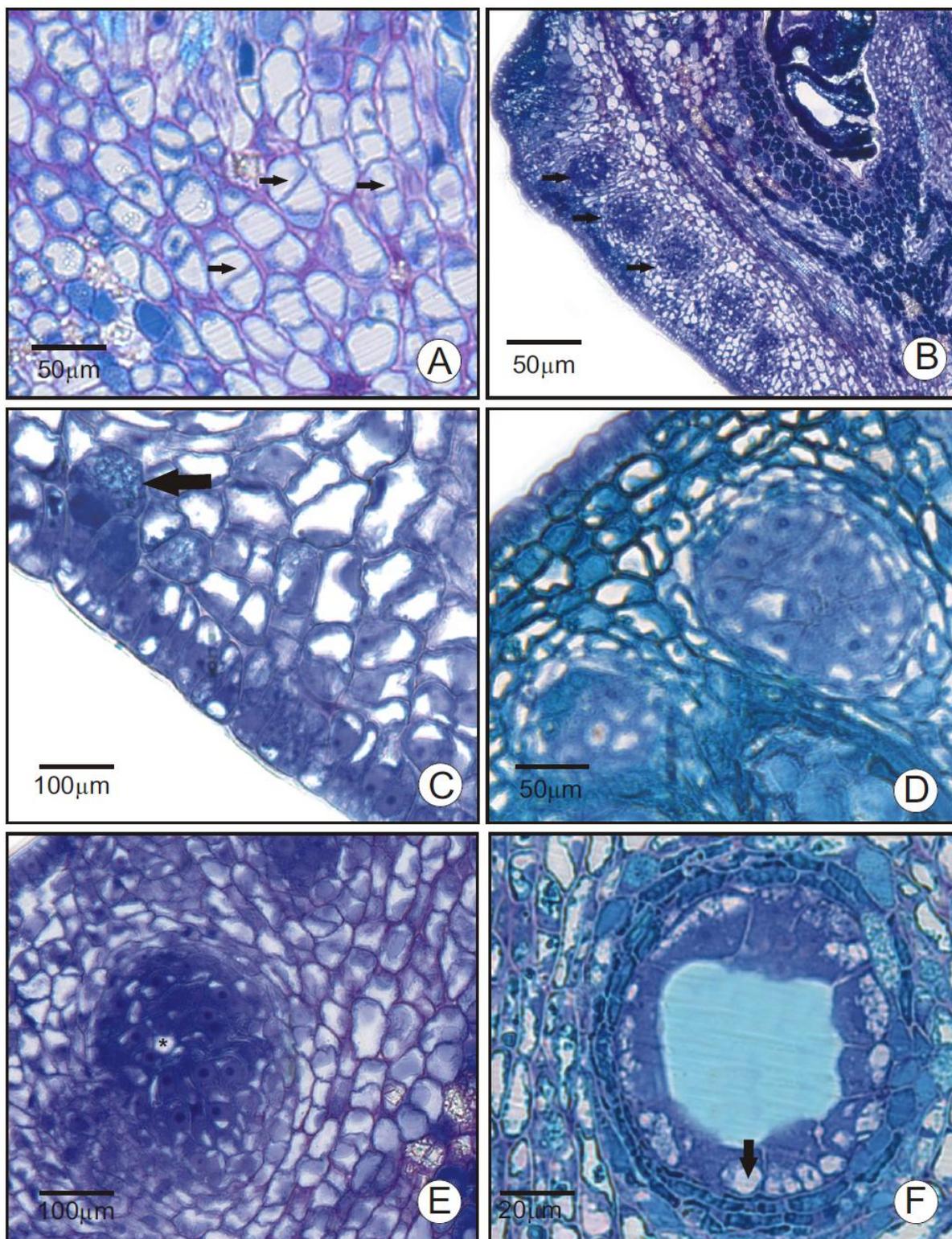


Figura 10: Tecidos do fruto e desenvolvimento de cavidades secretoras. **A** - Divisões mitóticas no MI (setas); **B** - Início da formação de grande quantidade de cavidades (setas); **C** - Origem epidérmica das cavidades (seta); **D** - Internalização das cavidades no ME; **E** - Início da secreção e afastamento celular determinando o lume da cavidade (*); **F** - Maturação da estrutura, epitélio secretor com citoplasma voltado para o lume da cavidade e vacúolo (seta) para bainha parenquimática.

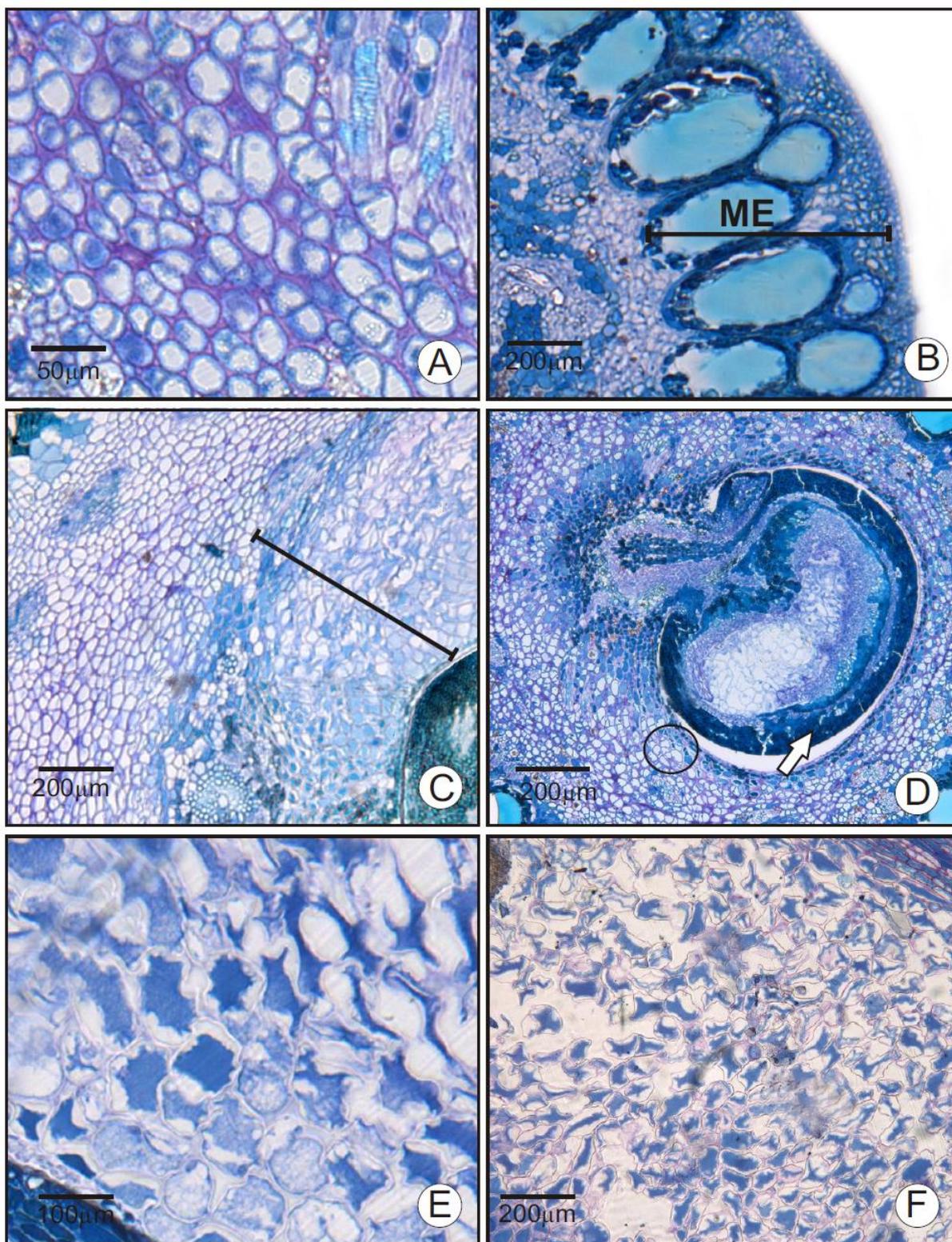
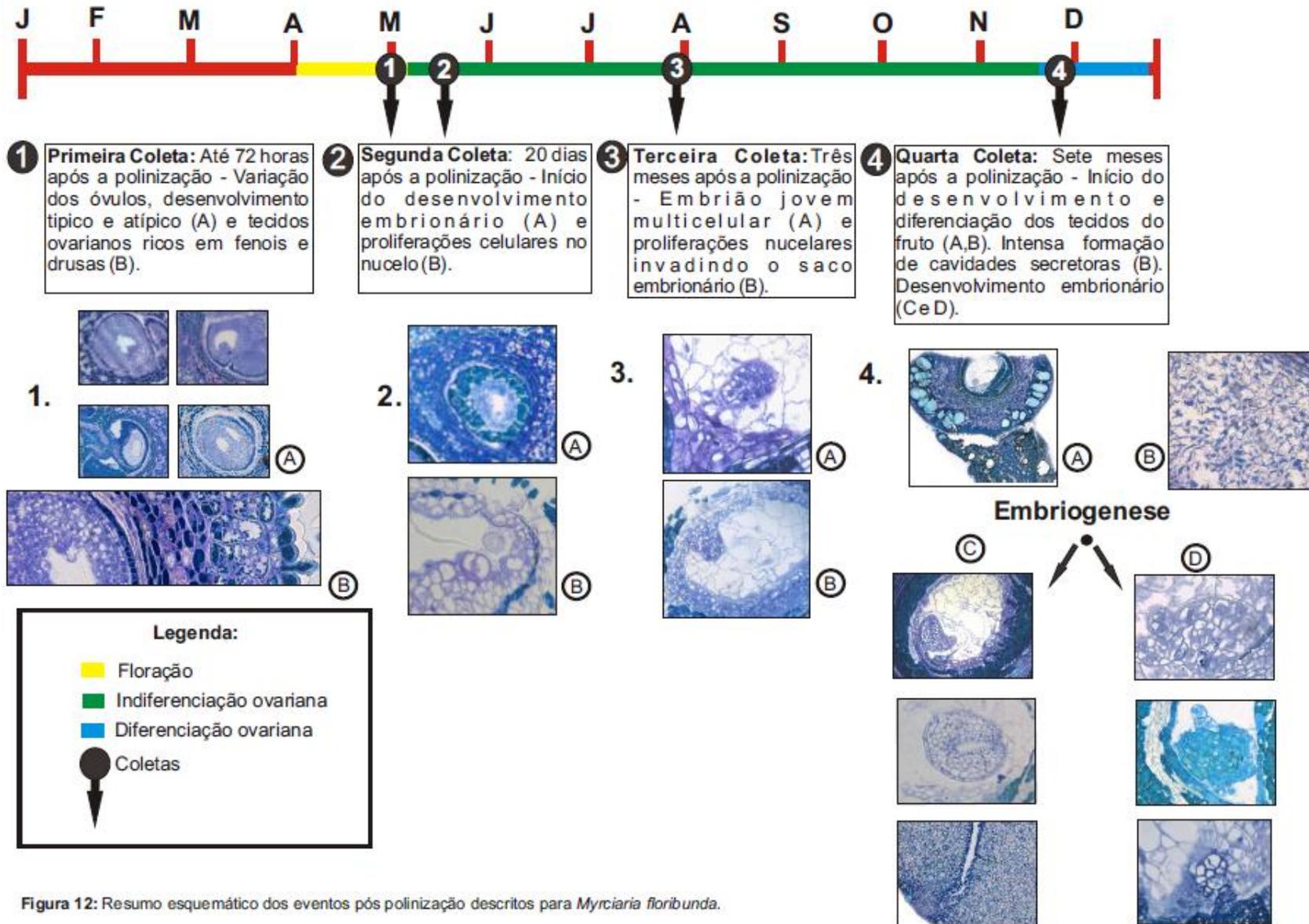


Figura 11 : Maturação do fruto. **A** - Aumento da concentração de mucilagem intercelular no mesocarpo interno (MI); **B** - Internalização das cavidades secretoras no mesocarpo externo (ME); **C** - Início da morte celular do MI no sentido centrífugo (destaque); **D** - Diminuição da concentração de fenóis subepidêmico (destaque) e aumento do mesmo nos tegumentos da semente (seta); **E,F** - Morte celular programada do MI, caracterizada pela retração do citoplasma e perda de sua densidade.



4. Discussão e conclusões

O presente estudo, ao investigar a baixa razão semente/óvulo, característica de Myrtaceae, revelou um desenvolvimento reprodutivo único na população de *Myrciaria floribunda* na restinga de Maricá. A singularidade na fenologia, expressa pela ausência de desenvolvimento do fruto por sete meses, e no desenvolvimento embrionário retardado levaram a interpretação das estratégias reprodutivas da espécie para um cenário que inclui além das plantas, também os animais.

Tanto a floração quanto o desenvolvimento dos frutos ocorreram em períodos nos quais as chuvas são frequentes. Os dados de pluviosidade disponíveis para a área de estudo são mensais e incompletos nos anos de estudo, o que dificultou verificar a existência de correlação entre floração e pluviosidade, já registrada anteriormente para outras espécies da família (Proença & Gibbs, 1994; Kawasaki, 1989). Fidalgo & Kleinert (2009) constataram que a floração de seis espécies pertencentes a quatro gêneros de Myrtaceae coincidiu com o período de maior índice pluviométrico em área de restinga em Ubatuba-SP. A floração de *M. floribunda* se enquadra na estratégia “big-bang” - grande fração de flores em antese de maneira sincronizada - estabelecida por Proença & Gibbs (1994) para espécies de Myrtaceae, com base no trabalho de Gentry (1974) em Bignoniaceae.

Os experimentos de polinização manual revelaram que a espécie é autoincompatível, já que nos cruzamentos de autopolinização manual nenhum fruto foi obtido. Os testes para observar crescimento de tubo polínico corroboraram este resultado, uma vez que as flores que receberam grãos de pólen cruzados apresentaram tubos polínicos nas primeiras 24 horas, ao passo que nas autopolinizadas não houve a germinação, mesmo após 72 horas. Em *M. floribunda* há um reconhecimento da origem dos grãos de pólen no nível do estigma. Por outro lado, Franceschinelli e colaboradores (2007) registraram para a espécie, em área de floresta úmida (Serra da Mantiqueira), uma alta taxa de endocruzamentos e uma baixa taxa de heterozigose, até mesmo em regiões com grande número de indivíduos, o que é compatível com autocompatibilidade. Desta forma, sendo os indivíduos da população de *M. floribunda* estudados autoincompatíveis, fatores relacionados à autocompatibilidade, como depressão autogâmica, não são responsáveis pela baixa razão semente/óvulo observada.

A antese estende-se por apenas algumas horas da manhã e, pouco tempo após, as anteras encontram-se totalmente vazias de pólen, fato também observado para espécies de *Eugenia* na restinga de Grumari (Silva, 2006). Embora o estudo dos visitantes florais não tenha sido nosso objetivo, a abelha *Apis mellifera*, considerada “pilhadora” e capaz de esgotar recursos florais pouco tempo após a antese das flores (Gressler *et al.*, 2006), pode estar envolvida uma vez que visitas por esta abelha foram registradas nas duas localidades de estudo (Grumari e Maricá).

A ocorrência de limitação polínica para a espécie, em nível de produção de frutos, pode estar relacionada à ação pilhadora de *A. mellifera*, mas, também, à transferência intraplanta de pólen pelos visitantes florais. Neste último caso, a transferência não resulta na produção de frutos uma vez que a espécie é autoincompatível. Por outro lado, a falta de limitação polínica, em nível de sementes (pelo fato de que a deposição de grande quantidade de pólen compatível sobre estigmas receptivos não resultou em frutos com maior número de sementes em relação à polinização natural) atesta que a baixa produção de sementes por fruto não está relacionada a falhas na polinização. Conclui-se assim que embora a polinização natural seja ineficiente em nível de produção de frutos, não está relacionada à baixa razão semente/óvulo na espécie.

A presença de diferentes padrões nos óvulos pode explicar a baixa razão semente/óvulo. Os óvulos típicos provavelmente darão origem a sementes pela presença de saco embrionário desenvolvido. Dentre os óvulos atípicos, aqueles com sacos embrionários extranumerários podem estar relacionados à baixa razão semente/óvulo uma vez que, por apresentarem-se diminutos, podem ter vigor reduzido. Por outro lado, não se pode excluir a possibilidade da formação de sementes poliembriônicas, que contribuiriam para a elevação da produção de sementes as quais, no entanto, não foram observadas. Óvulos com sacos embrionários aparentemente degenerados, juntamente com os ovuloides também contribuem para a baixa produção de sementes. Esses dois últimos padrões atípicos já foram anatomicamente estudados em espécies de *Quercus* (Fagaceae) classificados como óvulos que não resultam em sementes (Mogensen, 1975). Embora o autor não utilize o termo ovuloide e descreva estes como óvulos com nucelo sólido, atribui a esses óvulos, somados aos com sacos embrionários

aparentemente degenerados, a baixa produção de sementes por fruto no gênero. A presença de ovuloides é característica marcante do gênero *Eucalyptus* (Bohte & Drinnan, 2005) embora também documentado em outros gêneros australianos da família Myrtaceae (Prakash, 1969).

A presença de óvulos com proliferações nucelares, denominadas células precursoras de embriões adventícios ou *adventitious embryos precursor cells* (AEPs) (Bittencourt *et al.*, 2010, Sampaio *et al.*, 2013), é um fenômeno bastante estudado na literatura e conhecido como embriogênese adventícia (Koltunow, 1993) ou apomixia esporofítica (Sampaio *et al.*, 2013), termo adotado neste trabalho. Trata-se da proliferação de células do nucelo e/ou dos tegumentos dos óvulos que leva à formação de embriões diretamente dos tecidos maternos, sem que haja fertilização (Koltunow, 1993 e Sampaio *et al.*, 2013). O modelo utilizado para estudos de embriogênese adventícia é *Citrus* (Rutaceae), onde tanto embriões nucelares quanto zigóticos desenvolvem-se em um mesmo óvulo (Savidan, 2000; Santos-Filho *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2007 e Kishore *et al.*, 2012). Embriogênese adventícia é o caso mais comum de apomixia (Carman, 1997) e é frequentemente relatada em muitas famílias de angiospermas, dentre elas, Myrtaceae (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2005). Bittencourt e colaboradores (2010) relacionam apomixia à poliploidia. Na família Myrtaceae há registro de poliploides, mas não para as espécies do gênero *Myrciaria* (Costa & Forni-Martins, 2006).

Em *M. floribunda* 15% de óvulos têm AEPs, ou seja, potencial para desenvolvimento de apomixia esporofítica, no entanto, não ocorre poliembrião, ao contrário do registrado para os casos de *Citrus* (Savidan, 2000; Filho *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2007 e Kishore *et al.*, 2012) e em *Anemopaegma* (Bignoniaceae) (Sampaio *et al.*, 2013). Em sementes de *Citrus*, onde há reduzido grau de poliembrião, o embrião zigótico é maior e mais vigoroso, sugerindo que há uma competição por nutrientes do endosperma entre embriões nucelares e zigóticos (Filho *et al.*, 2000). Os resultados da autopolinização permitem inferir que a apomixia esporofítica na espécie estudada é dependente da produção de endosperma sexual, uma vez que flores não polinizadas não resultam em frutos assim como fora verificado também para as espécies de *Handroanthus* (Bignoniaceae) (Bittencourt *et al.*, 2010).

Em *M. floribunda*, o único embrião da semente é o produto final de uma competição diferente da comumente observada em *Citrus*, *Anemopaegma* e *Handroanthus* (Savidan, 2000; Filho *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2007; Bittencourt *et al.*, 2010; Kishore *et al.*, 2012; Sampaio *et al.*, 2013). Nestes, a disputa é por nutrientes do endosperma entre indivíduos diplóides com genótipos diferentes - o embrião zigótico e o embrião adventício. Na população estudada, a competição ocorre precocemente, em fases que precedem a fertilização, e envolve um indivíduo haploide - o saco embrionário - e um tecido do esporófito diplóide (planta mãe) - o nucelo. Em alguns óvulos atípicos, os tecidos maternos parecem levar vantagem por proliferarem invadindo o espaço ocupado pelo saco embrionário e geram embriões adventícios. Já nos óvulos com desenvolvimento típico, o saco embrionário apresenta-se vigoroso e sem AEPs. Portanto, os fatores pré-zigóticos, relacionados a óvulos atípicos - particularmente àqueles com sacos embrionários extranumerários, aparentemente degenerados e ovuloides - são os responsáveis pela baixa razão semente/óvulo. Os óvulos com nucelo proliferativo - também enquadrados no padrão atípico - podem ou não estar relacionados à baixa razão semente/óvulo, uma vez que eventualmente desenvolvem-se em sementes.

O fato de que embriões nucelares na maturidade do fruto atingem apenas estágio globular pode ser interpretado no contexto das estratégias de defesa do embrião contra a herbivoria. Sementes com embriões nucelares já foram registradas anteriormente na família Myrtaceae (Silva, 2006; Coneglian, 2007). Sua presença aumentaria a probabilidade das sementes com embriões zigóticos prosperarem, uma vez que aquelas com embriões nucelares também estariam disponíveis para a predação. Curiosamente, como se vê mais adiante, esses embriões, diferentemente dos embriões zigóticos, não apresentam cavidades secretoras, sendo mais propensos à predação, uma vez que essas estruturas desempenham proteção contra herbivoria (Rasolli, 2003; Ogunwande *et al.*, 2005; Stefanello *et al.*, 2008). Perea e colaboradores (2013) sugerem estratégia equivalente para *Ulmus lavis* (Ulmaceae) relacionada à produção de sementes vazias. O gasto energético para produção dessas sementes é baixo e essas ao serem predadas contribuiriam consideravelmente para o sucesso das sementes com embriões. Sementes estéreis de *Magnolia grandiflora* (Magnoliaceae) e *Paeonia mlokosewitchii* (Paeoniaceae) apresentam o tegumento externo carnoso e avermelhado cuja função seria a de

atrair predadores, enquanto que as sementes férteis apresentam coloração escura e são menos conspícuas (Leins & Erbar, 2010). As sementes de *M. floribunda* estão em lento desenvolvimento e protegidas pelos tecidos ovarianos. Os ovários inconspícuos, com embriões em início de desenvolvimento, podem contribuir para a proteção dos mesmos contra a herbivoria, ao passarem despercebidos, já que, no período de maturação dos frutos, frequentemente há a presença de larvas e insetos no interior das sementes.

Outros possíveis mecanismos de proteção contra a herbivoria estão presentes no pericarpo de *M. floribunda*. A elevada concentração de compostos fenólicos próximos à epiderme interna pode estar associada à proteção do embrião, por serem grupos de metabólitos secundários que apresentam sabor adstringente, (Ray, 2006) que causa na língua uma sensação de aperto. Da mesma forma, Coneglian (2007) descreve nos frutos de três espécies de Myrtaceae elevadas concentrações de fenóis nos estratos celulares do pericarpo próximos a semente, sugerindo o mesmo mecanismo de defesa.

Ainda como mecanismos relacionados a defesa, cristais de oxalato de cálcio (drusas) em *M. floribunda* parecem oferecer importante proteção do embrião, ao causar irritações e sensação de queimaduras em organismos invasores (Franceschi & Horner, 1980). As drusas, que também desempenham auxílio no mecanismo de osmorregulação (Raven & Smith, 1976), são numerosas no ovário durante os sete meses pós-polinização e na fase inicial do desenvolvimento do fruto. À medida que o fruto cresce não se observa mais essas estruturas, porém inicia-se o desenvolvimento de grande quantidade de cavidades secretoras.

Os componentes majoritários dos óleos essenciais que preenchem as cavidades secretoras de Myrtaceae são os terpenoides (Arruda & Victório, 2011; Stevens, 2001). Os óleos mostraram-se eficientes no combate a microorganismos como bactérias e fungos (Rasolli, 2003; Stefanello *et al.*, 2008). Ogunwande e colaboradores (2005) ao estudarem os óleos essenciais retirados do fruto de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) afirmam que esses apresentaram propriedades bactericidas.

O progressivo surgimento de muitas cavidades secretoras e o aumento de tamanho dos frutos somados à gradual diminuição dos fenóis e cristais de oxalato de cálcio sugerem uma substituição gradual e contínua das estratégias de defesa

durante o desenvolvimento do fruto. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de mudança de função: de proteção, quando em desenvolvimento, e de dispersão, quando maduros.

O intervalo de sete meses entre a floração e o aparecimento dos frutos embora registrado na população de *M. floribunda* da restinga de Maricá (Rodarte, 2008 e Greco, 2012) e da restinga da Marambaia (Souza, 2005) nunca foi relatado, até onde se sabe, na literatura botânica, exceto por Ram & Rao (1976, 1981) para *Emblica officinalis* (Euphorbiaceae). Os autores, buscando compreender melhor o fato do crescimento dos frutos terem início apenas quatro meses após a polinização, procederam a análises somente do ponto de vista hormonal, sem qualquer estudo anatômico ou ontogenético.

Ram & Rao (1976, 1981) classificaram o fenômeno acima como dormência dos frutos. No entanto, o termo pode ter diferentes significados. Dormência está relacionada à suspensão temporária de crescimento de qualquer estrutura que contenha um meristema (Lang, 1987), tornando a utilização do termo inapropriada pela ausência de meristema nos ovários de *M. floribunda*. Por outro lado, outros autores caracterizaram dormência como a ausência de desenvolvimento de tecidos (Vriezen *et al.*, 2007; Shukla, 2011). Neste contexto, a permanência do ovário, sem que haja desenvolvimento do fruto por sete meses após a polinização, pode ser caracterizado como dormência. O termo dormência utilizado na literatura botânica está especialmente relacionado a casos de inibição da germinação de sementes. Para sementes, Baskin & Baskin (2004) definem dormência “como incapacidade do embrião de germinar por um período de tempo específico, sob condições ambientais normais e favoráveis à germinação, isto é, após a quebra da dormência”. Os autores descrevem cinco classes de dormência: morfológica, fisiológica, morfofisiológica, física e combinada, todas ocorrendo no período pré-germinativo. Outros ainda utilizam-se do termo “animação suspensa” (Gupta *et al.*, 2012) para se referir ao mesmo fenômeno. Portanto, a utilização do termo dormência de uma maneira geral para estruturas vegetais que contenham um meristema, mas que não estejam em desenvolvimento, aliada à utilização restrita a mecanismos pré germinativos de sementes, nos leva a concluir que dormência não reflete o fenômeno ocorrente nos ovários de *M. floribunda*.

O fato dos tecidos ovarianos levarem sete meses para iniciarem a diferenciação em fruto contrasta com o desenvolvimento contínuo e lento do embrião que não ultrapassa o estágio globular durante todo esse período, evidenciando um desacoplamento entre o desenvolvimento do fruto e do embrião. Neste contexto, o lento desenvolvimento inicial embrionário de *M. floribunda* difere da dormência pré-germinativa e configura uma dormência precoce. Até onde sabemos, esse registro é inédito para plantas, mas é um fenômeno amplamente estudado na literatura zoológica, denominado diapausa e definido como um tipo de dormência exclusiva do início do desenvolvimento embrionário (Mead, 1993; Renfree & Shaw, 2000).

Esse fenômeno é de ampla distribuição, em insetos e vertebrados - peixes, répteis, aves e mamíferos (Renfree & Shaw, 2000). A diapausa caracteriza-se pela drástica redução ou cessação de mitoses durante o desenvolvimento embrionário (Lopes *et al.*, 2004) sendo influenciada tanto por variações nas taxas hormonais da mãe quanto por fatores ambientais como fotoperiodismo e disponibilidade de nutrientes. O fenômeno estaria associado a maior chance de a prole prosperar, já que adia o nascimento para um período favorável (Renfree & Shaw, 2000).

Apesar de não empregado na literatura botânica, o termo diapausa cabe para caracterizar o desenvolvimento embrionário em *M. floribunda*, uma vez que este se mostrou vagaroso nos sete primeiros meses e, após esse período, rápido até alcançar a maturidade, coincidindo com épocas mais favoráveis, com o dobro do volume de chuva em relação aos meses anteriores. A dormência embrionária precoce é identificada em diversos grupos animais que curiosamente não são relacionados filogeneticamente (Lopes *et al.*, 2004).

Na restinga de Maricá, exceto por *M. floribunda*, o crescimento dos frutos é contínuo desde o fim da floração até a dispersão das sementes (H. A. Lima, comunicação pessoal). Assim, o atraso no início do crescimento dos frutos é um indicio da diapausa. No entanto, essa informação é rara, uma vez que estudos fenológicos, que em geral contêm esse dado, podem não expressar com clareza o atraso, tornando especialmente difícil novos registros.

Conclui-se que tanto fatores relacionados à autocompatibilidade e pós zigóticos quanto a polinização natural não são os responsáveis pela baixa razão semente/óvulo em *M. floribunda*, uma vez que a espécie é autoincompatível em nível de estigma e os experimentos de polinização manual não resultaram em frutos com

maior número de sementes do que a polinização natural (apesar desta se ineficiente em nível de produção de frutos). Portanto, atribui-se a fatores pré zigóticos a baixa produção de sementes na espécie, já que estes reduzem o número de óvulos férteis.

5. Referências Bibliográficas

- Andrade, R. A.; Martins, A. B. G.; Lemos, E. G. M.; Luz, F. J. F.; Silva, M. T. H. 2007. Detecção de polimorfismo em porta-enxertos para citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal 29: 345-349.
- Angiosperm Phylogeny Group. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*: 1-17.
- Arruda, R. D. C. O., Victório, C. P. 2011. Leaf secretory structure and volatile compounds of *Eugenia copacabanensis* Kiaersk. (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research* 23: 1-6.
- Barroso, G. M.; Morim, M. P.; Peixoto, A. L.; Ichaso, C. L. F. 1999. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. UFV, Viçosa, Brasil. 443p.
- Barroso G. M.; Peixoto, A. L.; Ichaso C. L. F.; Guimarães E. F.; Costa C. G.; Lima H. C. 1984. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Vol.2. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. Imprensa Universitária.
- Baskin, J. M.; Baskin, C. C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.
- Bittencourt, N. S.; Moraes, G.; Ismael, C. 2010. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *Hochraceus*, *Bignoniaceae*): a histological study of post pollination events. *Plant Systematics and Evolution* 288: 59-76.
- Bohte, A.; Drinnam, A. 2005. Ontogeny, anatomy and systematic significance of ovular structures in the 'eucalypt group' (Eucalypteae, Myrtaceae). *Plant Systematics and Evolution* 255: 17-39.

- Candolle, A. P. 1828. Myrtaceae. *In: Prodrromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* 3: 207-296.
- Carman, J. G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 51-94.
- Coneglian, I. R. N. 2007. Morfologia e ontogênese do pericarpo e semente de *Eugenia puniceifolia* (H. B. & K.) DC., *Myrcia bella* Camb. e *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg (MYRTACEAE). Dissertação de Mestrado. Universidade estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- Costa, I. R. D., Forni-Martins, E. R. 2006. Chromosome studies in species of *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from south-eastern Brazil. *Australian Journal of Botany* 54: 409-415.
- Feder, N.; O' Brien, T. P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55: 123-142.
- Fidalgo, A. D. O.; Kleinert, A. D. M. P. 2009. Reproductive biology of six Brazilian Myrtaceae: is there a syndrome associated with buzz-pollination? *New Zealand Journal of Botany* 47: 355-365.
- Filho, W. S. S.; Moreira, C. S.; Cunha, M. A. P.; Sobrinho, A. P. C.; Passos, O. S. 2000. Poliembriõnia e frequênça de híbridos em *Citrus* spp. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 857-864.
- Franceschi, V. R.; Horner, H. T. J. R. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review* 46: 361-427.
- Franceschinelli, E. V.; Vasconcelos, G. M. P.; Landau, E. M.; Ono, K.Y.; Santo, F. A. M. 2007. The genetic diversity of *Myrciaria floribunda* (Myrtaceae) in Atlantic Forest fragments of different sizes. *Journal of Tropical Ecology* 23: 361-367.

- Freitas, L., Wolowski, M., Sigliano M. I. 2010. Ocorrência de limitação polínica em plantas de Mata Atlântica. *Oecologia Australis* 14: 251-265.
- Gahan, P. B. 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry - an introduction*. London: Academic Press Inc., xi + 301 p., il.
- Gentry, A. H. 1974. Coevolutionary patterns in central american bignoniaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 728-759.
- Govaerts, R.; Sobral, M.; Ashton, P.; Barrie, F.; Holst, B. K.; Landrum, L.; Matsumoto, K.; Mazine, F. F.; Lughadha, E. N.; Proença, C.; Silva, L. H. S.; Wilson, P.; Lucas, E. 2008. *World Checklist of Myrtaceae*. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Greco, A.V. 2012. Fenologia de Myrtaceae: Uma nova abordagem em educação ambiental na restinga de Maricá ,RJ, Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual do Rio de Janeiro.
- Gressler, E.; Pizo, M. A.; Morellato, P. C. 2006. Polinização de dispersão de sementes de Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 509-530.
- Gupta,V.; Shrivastava, V.; Shrivastava, G.; Anand, N.; Mathur, A. 2012. Study of the relationship between Salt Concentration, ABA Production and Mangroves Species: A Review. *Current Research in Pharmaceutical Sciences* 01: 05-10.
- Jensen, W. A. 1962. *Botanical Histochemistry: principles and practice*. San Francisco: W. H. Freeman & Co., 408 p.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. London: Mac. Graw-Hill Comp. Book Inc. 593p. il.
- Johnson, L. A. S.; Briggs, B. G. 1984. *Myrtales and Myrtaceae - a phylogenetic*

- analysis. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: 700-756.
- Kausel, E. 1956. Beitrag zur Systematik der Myrtaceen. *Arkiv för Botanik* 3: 491-516.
- Kausel, E. 1966. Lista de las Mirtáceas y Leptospermáceas Argentinas. *Lilloa* 32: 323-368.
- Kawasaki, M. L. 1989. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Myrtaceae. *Boletim Botânica* 11: 121-170.
- Kishore, K.; Mônica, N.; Rinchen, D.; Lepcha, B.; Pandey, B. 2012. Polyembryony and seedling emergence traits in apomitic citrus. *Scientia Horticulturae* 138: 101-107.
- Koeppen, W. 1948. *Climatologia: com um estudo de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Económica. México. 479p.
- Koltunov, A. M. 1993. Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* 5: 1425-1437.
- Lang, G. A. 1987. Dormancy: a new universal terminology. *Hort Science* 22: 817-820.
- Langeron, M. 1949. *Précis de microscopie*. Paris, Masson et Cie. Ed., 1430 p. il.
- Larson, B. M. H.; Barret, S. C. H. 2000. A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 69: 503-520.
- Leins, P.; Erbar, C. 2010. *Flower and Fruit - Morphology, Ontogeny, Phylogeny, Function and Ecology*. Schweizerbat Science Publishers Edit. 439 p. il.
- Lopes, F. L.; Desmarais, J. A.; Murphy, B. D. 2004. Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction* 128: 669-678.

- Lopes, B. C. 2008. Desenvolvimento floral e estudo palinológico de *Eugenia uniflora* L. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Lucas, E. J.; Belshan, S. R.; Nic Lughadha, E.M., Orloyich, D. A.; Sakuragui, C. M.; Chase, M. W.; Wilson, P. G. 2005. Phylogenetic patterns in the frash-fruited Myrtaceae - preliminary molecular evidence. *Plant Systemetics and Evolution* 251: 35-51.
- Lucas, E. J.; Harris, S. A.; Mazine, F. F.; Belsham, S. R.; Nic Lughadha, E. M.; Telford, A.; Gasson, P. E.; Chase, M. W. 2007. Suprageneric phylogenetics of *Myrteae*, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: 1105-1128.
- Lughadha, E. N.; Proença, A. C. 1996. A survey of the reproductive biology of the *Myrtoideae* (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 480-503.
- MacLean, R. C.; Iveney-Cook, W. R. 1952. Textbook of praticial botany. 5^a ed., London: Longmans Greenands Co., 476 p. il.
- Malerbo-Souza, D. T.; Nogueira-Couto, R. H.; Toledo, V. A. A. 1991. Abelhas visitantes nas flores de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.) e produção de frutos. *Acta Scientiarum* 26: 1-4.
- Martin, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125-128.
- Mead, R. A. 1993. Embryonic diapause in vertebrates. *Journal of Experimental Zoology* 266: 629-41.
- Mendes-Rodrigues, C.; Carmo-Oliveira, R.; Talavera, S.; Arista, M.; Ortiz, P. L.; Oliveira, P. E. 2005. Polyembryony and apomixes in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae - Bombacoideae). *Plant Biology* 7: 533-540.
- Mogensen, H. L. 1975. Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae). *American Journal of*

Botany 62 (2): 160-165.

- Ogunwandle, I. A.; Olawore, N. O.; Ekundayo, O.; Walker, T. M. 2005. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. The International Journal of Aromatherapy 15: 147-152.
- Perea, R.; Venturas, M.; Gil, L. 2013. Empty seeds are not always bad: simultaneous effect of seed emptiness and masting on animal seed predation. PLoS ONE 8(6): e65573. doi: 10.1371/journal.pone.0065573.
- Prakach N. 1969. The embryology of *Kunzea capitata* Reichb N Prakash Australian Journal of Botany 17: 97-106.
- Proença, C. E. B.; Gibbs, P. E. 1994. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. New Phytologist 126: 343-354.
- Ram, S., Rao, T. R. 1976. Naturally occurring cytokinins in Aonla (*Emblica officinalis* Gaertn.) fruit. New Phytologist 76: 441-448.
- Ram, S.; Rao, T. R. 1981. Naturally occurring auxins and inhibitors and their role in fruit growth of Aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). New Phytologist 88: 53-66.
- Rasooli, I. 2003. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 2200-2205.
- Raven, J. A.; Smith F. A. 1976. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. New phytologist 76: 415-431.
- Ray, F. E. 2006. Esau's Plant Anatomy. Wiley & Sons, New Jersey.
- Renfree, M. B.; Shaw, G. 2000. Diapause. Annual Review of Physiology 62: 353-75.
- Rodarte, A. T. A. 2008. Caracterização especial, temporal e biologia floral das espécies de restinga, com ênfase nos recursos florais. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Roubik, D. W. 1978. Competitive interactions between neotropical pollinators and africanized honeybees. *Science* 201: 1030-1032.
- Roubik, D. W. 1979. Africanized honeybees, stingless bees and the structure of tropical plant pollinator communities. In *Proceedings of the IV International Symposium on Pollination* (D. Caron, ed.). Maryland Agricultural Experimental Station, Maryland: 403-417.
- Roubik, D. W.; Moreno, J. E.; Vergara, C.; Wittmann, D. 1986. Sporadic food competition with the African honeybee: projected impact on neotropical social bees. *Journal of Tropical Ecology* 2: 97-111.
- Sampaio, D. S.; Junior, N. S. B.; Oliveira, P. G. 2013. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from central Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 173: 77-91.
- Santos-Filho, W. D. S.; Moreira, C. D. S.; Cunha, M. A. P. D.; Sobrinho, A. P. D. C.; Passos, O. S. 2000. Poliembrião e sequência de híbridos em *Citrus* spp. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 35: 857-864.
- Savidan, Y. 2000. Apomixis genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 18: 13-85.
- Schaffer, W. M.; Zeh, D. W.; Buchmann, S. L.; Kleinhaus, I.; Schaffer, M. V.; Antrin, J. 1983. Competition for nectar between introduced honeybees and native North American bees and ants. *Ecology* 64: 564-577.
- Schmid, R. 1972. A resolution of the *Eugenia* - *Syzygium* controversy (Myrtaceae). *American Journal of Botany* 59: 423-436.
- Shulka, A. K. 2011. Effect of foliar application of calcium and boron on growth, productivity and quality of Indian gooseberry (*Emblica officinalis*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* 81: 628-32.

- Silva, A. L. G. 2006. Biologia Reprodutiva de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Souza, M. C. 2005. Myrtaceae Juss. da Restinga da Marambaia, RJ - Brasil. Dissertação de Mestrado. Escola Nacional de Botânica Tropical, do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Souza, V. C; Lorenzi, H. 2005. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum: 260-266.
- Spala, D. P. 2010. Anatomia floral de *Myrcia ilheosensis* Kiaersk (MYRTACEAE). Monografia de conclusão de curso. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Stefanello, M. É. A.; Cervi, A. C.; Ito, I. Y.; Salvador, M. J.; Wisniewski, A.; Simionatto, E. L. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). Journal of Essential Oil Research 20 (1): 75-78.
- Stephenson, A. G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic 12: 253-79.
- Stevens, P. F. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. Versão 12, Julho 2012. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Torezan-Silingardi, H. M.; Del-Claro, K. 1998. Behavior of visitors and reproductive biology of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) in cerrado vegetation. Ciência e Cultura 50: 281-284.
- Vriese, W. H.; Feron, R.; Maretto, F.; Keijman, J.; Mariani, C. 2007. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. New Phytologist 177: 60-76.

Wilson, P. G.; O' Brien, M. M.; Gadek, P. A.; Quinn, C. J. 2001. Myrtaceae revisited: A reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany* 88: 2013-2025.

Wilson, P.G.; O' Brien, M. M.; Heslewood, M. M.; Quinn, C. J.; 2005. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 251: 3-19.