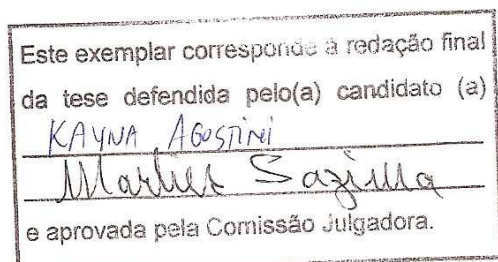


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**Kayna Agostini**

“Ecologia da reprodução de duas espécies de *Mucuna* (Leguminosae, Faboideae, Phaseoleae) – embriologia, citogenética e variabilidade genética – do litoral norte de São Paulo”



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Marlies Sazima

Co-Orientador: Dr. Pedro Luís Rodrigues de Moraes

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Ag75e	<p>Agostini, Kayna Ecologia da reprodução de duas espécies de <i>Mucuna</i> (Leguminosae, Faboideae, Phaseoleae) - embriologia, citogenética e variabilidade genética - do litoral norte de São Paulo / Kayna Agostini. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadores: Marlies Sazima, Pedro Luis Rodrigues de Moraes. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Leguminosae. 2. Polinização. 3. Sementes. 4. Mata Atlântica. 5. Anatomia vegetal. I. Sazima, Marlies. II. Moraes, Pedro Luis Rodrigues de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
--------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Título em inglês: Reproductive ecology of two *Mucuna* species (Leguminosae, Faboideae, Phaseoleae) - embryology, cytogenetic and genetic variability in southeastern Brazil.

Palavras-chave em inglês: Leguminosae; Pollination; Seeds; Mata Atlântica (Brazil); Plant anatomy.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marlies Sazima, Silvana Buzato, Eliana Regina Forni Martins, Samantha Koehler, Ivonne San Martin Gajardo.

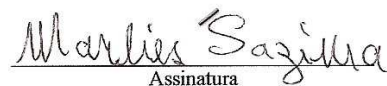
Data da defesa: 30/04/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

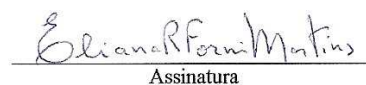
Campinas, 30 de abril de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marlies Sazima


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins


Assinatura

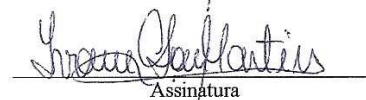
Profa. Dra. Samantha Koehler


Assinatura

Profa. Dra. Silvana Buzato


Assinatura

Profa. Dra. Ivonne San-Martin Gajardo


Assinatura

Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira

Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi

Assinatura

Profa. Dra. Marília de Moraes Castro

Assinatura

Dedico todo o meu trabalho de doutorado

à Pietra, pois ela me ensinou a dar valor para o tempo.....

Agradecimentos

Agradeço

ao Fábio por me incentivar e apostar em mim, ter curiosidade pelo que faço e fazer o carinho necessário nos momentos difíceis e à minha família, meu pai Alberto, minha mãe Maria Helena, ao meu irmão Netto, por sempre me apoiarem e estar ao meu lado nos momentos de decisão e por me darem o que ninguém jamais vai tirar de mim: minha cultura e vontade de aprender.

à Marlies por sua orientação, amizade, compreensão e profissionalismo, uma das pessoas mais serenas que eu já conheci. Foram 10 anos de muita alegria ao seu lado, cada momento vou guardar com muito carinho.

ao Ivan que me ensinou a ter paciência para fazer observações e investir para conseguir o que queremos (quanto tempo demorou, mas ele conseguiu fotografar o guache visitando a *Mucuna japura*).

à Unicamp e ao curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela preocupação em oferecer um ensino de excelente qualidade para seus alunos.

à FAPESP e ao Projeto Biota Gradiente pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste estudo.

à Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins, Dra. Samantha Koehler e Dra. Ivonne San-Martin Gajardo pelas sugestões feitas durante o processo de pré-banca.

à direção do Parque Estadual da Serra do Mar pela autorização; a Fernanda pela sua eficiência; a Laura pelo seu companheirismo e simpatia, aos guardas pelo apoio e transporte durante o trabalho de campo.

ao pessoal da Pousada Betânia por toda a logística que favoreceu horas agradáveis durante o trabalho árduo.

ao Dr. Pedro Luís Rodrigues de Moraes por ter me ensinado as técnicas de eletroforese de isoenzimas para análise da variabilidade genética.

à Profa. Dra. Ana Maria G. A. Tozzi por dar valiosas sugestões para o capítulo sobre microsporogênese desta tese.

à Profa. Dra. Marília Moraes de Castro por me ensinar as técnicas em anatomia vegetal e pelas contribuições valiosas para o capítulo sobre biologia floral desta tese. Sempre ensinando que a organização pode facilitar muito nosso trabalho.

à Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira por me incentivar e sempre valorizar nosso trabalho. Obrigada por sempre reforçar o quanto é gostoso estudar.

ao Prof. Dr. Leonardo Galetto por me ensinar a valorizar os dados que temos, por me ensinar a técnica para análise da composição química de néctar e por me hospedar em sua casa durante minha estadia na Universidade Nacional de Córdoba.

à Iara, Tião e João Carlos por me socorrerem nos laboratórios e a Maria Lúcia por estar sempre à disposição para os serviços burocráticos.

aos alunos do Laboratório de Biossistemática e Anatomia por me auxiliarem durante a parte técnica da tese.

ao pessoal do Ceci (Centro de Convivência Infantil) da Unicamp por acolherem minha filha Pietra durante parte da minha tese.

ao pessoal do Museu pelas conversas descontraídas e pelos cafezinhos.

Enfim, muito obrigada a todos que auxiliaram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

Resumo da Tese.....	1
Abstract.....	3
Introdução Geral.....	4
Capítulo I: Explosive flowers, birds and bats: the secrets of two <i>Mucuna</i> species	
Introduction.....	18
Material and Method	19
Results and Discussion.....	21
Conclusions.....	31
Capítulo II: Nectar features related to pollination in two <i>Mucuna</i> species (Leguminosae, Faboideae)	
Introduction.....	43
Material and Methods.....	45
Results.....	47
Discussion.....	49
Capítulo III: Biologia reprodutiva, efeito dos componentes de fecundidade e da herbivoria no processo reprodutivo de duas espécies de <i>Mucuna</i> (Leguminosae, Faboideae).	
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	69
Resultados e Discussão.....	70
Capítulo IV: Microsporogenesis and pollen cytology in two <i>Mucuna</i> species (Leguminosae: Faboideae).	
Abstract.....	89
Introduction.....	90
Material and Methods.....	91
Results.....	92
Discussion.....	95
Capítulo V: Aspectos da embriologia e suas implicações na limitação de recursos maternos e no aborto de frutos e sementes em duas espécies de <i>Mucuna</i> Adans. (Leguminosae, Faboideae)	
Introdução.....	114
Material e Métodos.....	116
Resultados.....	117
Discussão.....	121
Capítulo VI: Variabilidade genética intrapopulacional em duas espécies de <i>Mucuna</i> (Leguminosae, Faboideae) e sua relação com mecanismos de polinização, sistema reprodutivo e aborto de frutos.	
Introdução.....	140
Material e Métodos.....	143
Resultados e Discussão.....	147
Considerações Finais.....	167

RESUMO DA TESE

Estudos reprodutivos em Leguminosae são escassos e restritos a espécies de importância agrícola e as de regiões temperadas. As informações disponíveis mostram alta incidência de aborto de frutos e sementes na família, mas pouco se conhece sobre as causas dos processos abortivos. No gênero *Mucuna*, cuja ecologia da reprodução é pouco conhecida, ocorre alta produção de frutos e sementes em *M. urens*, enquanto em *M. japira* a produção é muito baixa, devido aos abortos, embora em ambas haja grande número de flores. Os objetivos deste estudo referem-se ao estudo da biologia da reprodução, com ênfase em embriologia, citogenética e variabilidade genética de *Mucuna urens* e *Mucuna japira*, abordando com detalhe os aspectos relacionados nos seguintes itens: 1) descrever detalhadamente a biologia floral e sistemas de polinização de *M. urens* e *M. japira*, 2) estudar detalhadamente a produção e composição do néctar e avaliar a influência deste parâmetro na produção de frutos e sementes, 3) verificar os sistemas reprodutivos e os efeitos dos componentes de fecundidade no processo reprodutivos, 4) desenvolver estudos anatômicos e citogenéticos para verificar o índice meiótico e se existem anormalidades no decorrer da microsporogênese; 5) desenvolver estudos sobre a megasporogênese, megagametogênese e formação do zigoto para analisar processos que possam estar relacionados com o aborto de frutos e sementes, 6) desenvolver análises de sistemas isoenzimáticos para caracterizar a variabilidade genética nas populações naturais das duas espécies de *Mucuna*. A utilização conjunta de dados de biologia reprodutiva com os de embriologia, citogenética, genética populacional e ecologia da polinização trouxeram esclarecimentos sobre as possíveis causas e conseqüências dos abortos de frutos e sementes das duas espécies de *Mucuna*. O estudo de campo foi desenvolvido em Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, SP e as análises de laboratório no Departamento de Botânica da Unicamp e Departamento de Ciências Farmacêuticas da USP-Ribeirão Preto. O aborto de frutos e sementes em *Mucuna japira* parece estar relacionado com: 1) Forrageamento do polinizador, pois todas as flores da inflorescência de *M. japira* abrem ao mesmo tempo, proporcionando que o polinizador, *Cacicus haemorrhous*, visite todas as flores favorecendo a geitonogamia e conseqüentemente o aborto de frutos e sementes; 2) Comportamento de visita do polinizador, pois quando *C. haemorrhous* visita as flores de *M. japira* pólen é

desperdiçado, pois o pássaro apenas ativa o mecanismo explosivo de abertura da flor com o bico e uma quantidade de pólen não é depositada no corpo do polinizador; 3) para *M. urens* que produz mais frutos e sementes do que *M. japira*, reabsorção de néctar é um importante recurso para o desenvolvimento de sementes uma vez que a taxa de reabsorção de néctar por flor para *M. urens* é 3 mg/h e para *M. japira* é 0.25 mg/h; 4) devido a alta taxa de herbivoria pelas larvas de *A. talus*, os recursos das plantas são alocados para reconstituição das partes vegetativas, assim ocorre a diminuição dos recursos disponíveis para o desenvolvimento de frutos e sementes ocasionando o aborto; 5) Recursos maternos não disponíveis para nutrição do embrião, como a indisponibilidade do grão de amido e o isolamento do nucelo pela calose e 6) Ausência da sinérgide haustorial para captura de recursos para o desenvolvimento do embrião.

ABSTRACT

Studies about reproduction in Leguminosae are scanty and generally confined to crop species. Fruit and seed abortion occurs in this family, but there is few information about the causes of abortion process. The knowledgement about reproductive ecology in *Mucuna* is little quantity, but in *Mucuna urens* the production of fruits and seeds is high while in *M. japura* it is low due to abortion. The present work studies the reproductive biology, using some aspects of embryology, cytogenetics and genetic variability of *M. urens* and *M. japura*, and such a study was developed through investigations of: 1) details about floral biology and pollination systems; 2) nectar production and composition related to fruit and seed development; 3) reproductive systems, herbivory and the components of fecundity in reproductive process; 4) cytogenetics and microsporogenesis to verify the occurrence of abnormalities; 5) megasporogenesis, megagametogenesis and zygote formation to verify if these processes are related to fruit and seed abortion and 6) isozymes systems to distinguish the genetic variability in natural populations of both *Mucuna* species. The reproductive biology data together with embryology, cytogenetics, population genetics and pollination ecology elucidated some possible factors and consequences of fruit and seed abortion in these *Mucuna* species. Field work was developed in Atlantic Forest, Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba and the laboratory analyses at Departamento de Botânica, Unicamp and Departamento de Ciências Farmacéuticas, USP-Ribeirão Preto. Fruit and seed abortion in *M. japura* might be related to: 1) pollinator route foraging, due to all flower in a inflorescence of *M. japura* open together, providing the pollinator *C. haemorrhous* visits all flowers, favoring geitonogamy and consequently fruit and seed abortion; 2) pollinator visiting behavior, because when *C. haemorrhous* visits *M. japura* flowers, great amount of pollen is lost, because the bird just triggers the flower explosive opening mechanism with its bill and a amount of pollen is not bonded on its body; 3) for *M. urens* that produces more fruits and seeds than *M. japura*, nectar resorption is an important resource for seed development once nectar resorption rate for *M. urens* is 3 mg/h per flower and for *M. japura* 0.25 mg/h per flower; 4) due to high rate of herbivory by *A. talus* larvae, plant resources are allocated to reconstitution of vegetative parts, then there are less resources for fruit and seed development, causing abortion of these structures; 5) maternal resources are not available for embryo nutrition, as starch grains are not available and nucellus is isolated by callose and 6) haustorial synergids are not present to capture resources for embryo development as in *M. urens*.

INTRODUÇÃO GERAL

Fabaceae compreende 630 gêneros e mais de 18000 espécies distribuídas em três subfamílias, Mimosoideae, Caesalpinoideae e Faboideae (Judd et al. 1999, Lewis & Schrire 2003), representando um dos maiores táxons de Angiospermae, superado em número de espécies apenas pelas famílias Orchidaceae e Asteraceae. Fabaceae possui distribuição cosmopolita, além de ser a segunda família em importância econômica, sendo superada apenas por Poaceae (Judd et al. 1999).

A subfamília Faboideae é constituída por 430 gêneros e cerca de 12600 espécies (Judd et al. 1999) e seus representantes ocorrem em diversas formações vegetais devido à sua grande diversidade e aos vários tipos de reprodução (Polhill et al. 1981). Uma das formações vegetais na qual esta subfamília predomina é a Mata Atlântica brasileira, que devido a sua grande biodiversidade e pelo fato de ser uma das formações vegetais mais ameaçadas é considerada um dos “hot spots” mundiais (Myers et al. 2000).

Diversas características da biologia das Faboideae têm contribuído para seu sucesso ecológico e evolutivo. Dentro destas características podemos destacar a adaptação de suas flores para serem visitadas por abelhas e outros tipos de agentes polinizadores como beija-flores e morcegos, bem como por apresentar vários tipos de sistemas reprodutivos (Arroyo 1981).

O gênero *Mucuna* Adans. (Fabaceae, Faboideae, Phaseoleae), cuja ecologia da reprodução é pouco conhecida, possui cerca de 100 espécies, sendo que apenas 45 são válidas (Bisby et al. 2001). Algumas dessas espécies apresentam valor econômico, sendo importantes para o ciclo do nitrogênio e como adubo orgânico (Oudhia 2001). Na América Central os tricomas dos frutos são misturados ao mel, sendo esta composição muito eficaz na eliminação de parasitas intestinais (Mablerley 1997). Pesquisas recentes com tribos

indígenas do estado de Tocantins revelaram que uma espécie de *Mucuna*, cujo nome indígena é Ahkrô, faz parte das espécies que apresentam importância medicinal, integrando a fitofarmacopéia da tribo Krahô, que está sendo investigada pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (Izique 2002). Este gênero também é importante na medicina popular da Índia e participa da formulação de mais de 200 receitas medicinais indígenas (Agharka 1991, Singh et al. 1996). Tanto as partes vegetativas quanto as reprodutivas possuem propriedades medicinais como: as raízes são usadas como laxantes e aliviam a constipação, nefropatia, elefantíase, neuropatia, úlceras, febre e verminoses (Lindley 1985, Ramnath 1992, Warriar et al. 1995, Shalini 1997, Upadhyay 2000), as folhas são utilizadas para forragem de plantações e também para tratamento de úlceras, inflamações e enxaquecas (Oudhia 2001) e as sementes que podem atuar como adstringentes, laxativos, afrodisíacos e vermífugos (Rastogi & Mehrotra 1991a, 1991b, Singh et al. 1995). Depois da descoberta que as sementes de *Mucuna* contêm L-dopa, uma droga que combate o Mal de Parkinson, a demanda para o mercado internacional aumentou e os fazendeiros indianos iniciaram o cultivo comercial (Farooqi 1999).

Neste trabalho foi proposto estudar a ecologia da reprodução e polinização, bem como a embriologia, citogenética e variabilidade genética de *Mucuna urens* (L.) Medik e *Mucuna japura* A. M. G. Azevedo, Agostini & Sazima, popularmente conhecidas como coronha e bico de pato, respectivamente. Ambas são simpátricas e abundantes no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba, São Paulo, ocorrendo na restinga, mata de encosta e mata de galeria. Não há sobreposição no período principal de floração dessas espécies, pois *M. japura* floresce nos meses de maio e junho (Agostini 2004) e *M. urens* apresenta pico de floração de novembro a dezembro e floração esparsa em vários outros meses.

Essas espécies são lianas, possuem inflorescências pendentes e flores ressupinadas (Arroyo 1981). Ambas apresentam abertura explosiva da flor, como é característico do gênero, que ocorre somente após aplicação de pressão sobre a base da quilha, liberando os elementos reprodutivos e, conseqüentemente, espalhando pólen sobre o polinizador (van Leeuwen 1938, van der Pijl 1941, Baker 1970, Sazima & Sazima 1978, Hopkins & Hopkins 1992, Agostini 2004). Essa forma de exposição dos elementos reprodutivos é a mais derivada em Fabaceae e, geralmente, estas flores com deiscência explosiva apresentam grandes quantidades de néctar (Arroyo 1981).

Ocorre alta produção de frutos e sementes em *M. urens* (K. Agostini, M. Sazima obs. pess.), enquanto em *M. japira* a produção é muito baixa (Agostini 2004), embora em ambas haja grande número de flores por inflorescência. Além disso, em *M. japira*, a formação de frutos nos tratamentos de autopolinização, polinização cruzada e condições naturais é iniciada, mas estes frutos são abortados duas a três semanas após a polinização (Agostini 2004). O processo de aborto de frutos e sementes não é exclusivo de Leguminosae. Em várias famílias de Angiospermae sementes viáveis são formadas de pequena proporção de óvulos; os demais óvulos não se desenvolvem pela ausência de fertilização, ou se fertilizados, os embriões são abortados durante o desenvolvimento (Sedgley 1980, Bawa & Webb 1984, Queller 1985). Pouco se conhece sobre as causas e implicações da mortalidade entre a fertilização e a maturidade da semente (Lloyd 1980, Lloyd et al. 1980, Stephenson 1981, Udovic & Aker 1981). Para explicar a ocorrência de abortos existem várias hipóteses, como a de seleção sexual, atribuindo os abortos à otimização do sucesso reprodutivo masculino e feminino (Lloyd 1980), a que envolve a paternidade do zigoto (Janzen 1977) e a combinação de genes letais (Martin & Lee 1993).

A utilização conjunta de dados de ecologia da polinização e biologia reprodutiva com os de embriologia, citogenética, variabilidade genética podem acrescentar informações ao conhecimento das possíveis causas e conseqüências dos abortos, direcionando pesquisas tanto com relação à produtividade de sementes como a de perspectivas evolutivas (Sedgley 1980, Bawa & Webb 1984, Ebadi et al 1996).

O conhecimento do sistema reprodutivo das espécies é fundamental na investigação das causas de ocorrência de aborto (Bawa 1979). Estudos sobre a biologia reprodutiva de espécies de Faboideae são desenvolvidos em diversas regiões do mundo, sendo mais frequentes nas regiões temperadas ou no Velho Mundo (Doungyotha & Owens 2002, Tandon 2003). Nas regiões tropicais, as informações sobre ecologia reprodutiva de Faboideae estão incluídas em estudos ao nível de comunidades (Bullock 1985, Bawa et al. 1985, Ramirez & Brito 1990, Arroyo & Uslar 1993) sendo poucos os estudos que abordam isoladamente espécies de Faboideae sob estes aspectos (Franco 1995, Gibbs et al. 1999, Gibbs & Sasaki 1998, Teixeira 2001).

Pouco se tem estudado a respeito das modificações histológicas que ocorrem desde o processo de fecundação até a maturação da semente. O estudo da morfologia e do desenvolvimento do óvulo antes, durante e após a fertilização, tem contribuído para o conhecimento da expressão do aborto de frutos e sementes nas Angiospermae. Plantas com altas taxas de aborto apresentam anormalidades no desenvolvimento do saco embrionário, do embrião e do endosperma (Pimienta & Polito 1983, Rim et al. 1990, Palupi & Owen 1997, Arathi et al. 1999, Sage et al. 1999). Esta ausência de fertilização do saco embrionário acarretando o aborto de óvulos também pode estar relacionada à esterilidade do grão de pólen, que ocasiona anormalidades na microsporogênese (Mogensen 1975), a reações de incompatibilidade no estigma ou no estilete da flor (Seavey & Bawa 1986, Sage

et al. 1999) e mesmo, à posição ocupada pelo óvulo dentro do ovário, o que tem sido amplamente estudado em Fabaceae (Hossaert & Valero 1988, Bawa & Buckley 1989, Martin & Lee 1993, Gibbs & Sasaki 1998).

O desenvolvimento anormal do embrião e do endosperma, por sua vez, pode ter origem em restrições de recursos maternos à progênie e em mecanismos pós-zigóticos que atuam como barreiras à autofertilização, conhecidos como auto-incompatibilidade tardia e depressão endogâmica. Tais mecanismos requerem estudos dos eventos que ocorrem durante a fertilização, para que possam ser distinguidos na prática, apesar de serem conceitualmente bem diferenciados (Seavey & Bawa 1986). Há registros de evidências citológicas de aborto de óvulos após a fertilização para *Medicago sativa* e *Pisum sativum* (Brink & Cooper 1947, Linck 1961) e dados anatômicos de flores, frutos e sementes abortados em *Persea americana* (Sedgley 1980) e para o gênero *Dahlstedtia* (Teixeira 2001).

O tipo de polinizador, os padrões de dispersão de pólen e os sistemas reprodutivos são os principais fatores que afetam a variabilidade genética de espécies e populações vegetais (Bawa 1976, Kageyama & Castro 1989, Kageyama 1990, Loveless & Hamrick 1984, Hamrick 1990, Hamrick & Godt 1989, Ohsawa et al. 1993, Borba & Semir 2001, Borba et al. 2001). Polinizadores diferentes apresentam padrões característicos de forrageamento, alguns podem visitar sempre flores próximas enquanto outros realizam vôos de maiores distâncias entre visitas (Levin & Kerster 1968, Feinsinger & Colwell 1978, Schaal 1980, Schmitt 1980, Waser 1982, Ellstrand & Marshal 1985, Fenster 1991, Godt & Hamrick 1993).

Polinizadores que visitam flores próximas favorecem a redução da heterozigosidade na população total e levam à sub-estruturação da população em pequenas manchas

panmíticas, geralmente com elevada homozigosidade na qual a deriva genética pode atuar gerando diferenciação local (Schaal 1980, Schmitt 1980, Crawford 1984, Loveless & Hamrick 1984, Hamrick 1990, Hamrick & Godt 1989, Campbell 1991, Ohsawa et al. 1993). Por outro lado, espécies cujos polinizadores voam longas distâncias entre as visitas, habitualmente apresentam áreas de vizinhança genética maiores, algumas vezes sendo toda a população panmítica devido à rápida migração de genes através da colônia, sendo necessárias pressões seletivas muito fortes para que ocorra a diferenciação local devido à força coesiva do fluxo polínico (Schmitt 1980, Loveless & Hamrick 1984, Ellstrand & Marshall 1985, Hamrick 1990, Hamrick & Godt 1989, Ohsawa et al. 1993, Gandara 1996, Lepsch-Cunha 1996). Essas características conduzem habitualmente à maior diversidade interpopulacional do que intrapopulacional e da espécie como um todo.

A importância do presente trabalho reside em estudar de modo multidisciplinar espécies nativas da Mata Atlântica, ecossistema tropical carente de dados biológicos sobre reprodução e polinização, cujas informações são, em grande parte, preliminares (Brazier et al. 1976, Haekes 1976, Teixeira 2001). Além disso, estes dados fornecerão uma visão mais ampla sobre as interações planta-animal no gênero *Mucuna*, bem como fornecerão bases para entender o processo de aborto de frutos e sementes relacionando vários aspectos da biologia reprodutiva das espécies.

Referências

- Agharka, S. P. 1991.** Medicinal plants of Bombay presidency. *Scientific Publ. Jadhpur* 1: 1 – 2.
- Agostini, K. 2004.** *Ecologia da polinização de Mucuna sp. nov. (Fabaceae) no litoral norte de São Paulo, Brasil.* Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Arathi, H. S.; Ganeshaiyah, K. N.; Uma Shaanker, R. & Hedge, S. G. 1999.** Seed abortion in *Pongamia pinnata* (Fabaceae). *Am. J. Bot.* 86: 659 – 662.
- Arroyo, M. T. K. 1981.** Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill, R. M. & Raven, P. H. (eds.) *Advances in Legume Systematics, Part 2.* Royal Botanic Garden, Kew, 723 – 769.
- Arroyo, M. T. K. & Uslar, P. 1993.** Breeding systems in a temperature mediterranean-type climate montane sclerophyllous forest in Central Chile. *Bot. J. Linn. Soc.* 111: 83 – 102.
- Baker, H. G. 1970.** Bat pollination in Central America. *Rev. Biol. Trop.* 17: 187 – 197.
- Bawa, K. S. 1976.** Breeding of tropical hardwoods: an evaluation of underlying bases, current status and future prospects. In: Burley, J. & Styles, B. T. (eds.). *Tropical trees: variation, breeding and conservation.* Academic Press, London, 43 – 59.
- Bawa, K. S. & Webb, C. J. 1984.** Flower, fruit, and seed abortion in tropical forest trees: implication for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *Am. J. Bot.*: 71: 736 – 751.
- Bawa, K. S. & Buckley, D. P. 1989.** Seed: ovule ratios, selective seed abortion, and mating systems in Leguminosae. *Monog. Syst. Bot.* 29: 243 – 262.

- Bisby, F. A.; Zarrucchi, J. L.; Roskov, Y. R.; Schrire, B. D.; Heald, J. & White, R. J. 2001.** *Legumes of the world*. International Legume Database & Information Service, ILDIS. The University of Reading, Reading. CDROM.
- Borba, E. L. & Semir, J. 2001.** Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Ann. Bot.* 88: 75 – 88.
- Borba, E. L.; Semir, J. & Sheferd, G. J. 2001.** Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Ann. Bot.* 88: 89 – 99.
- Brazier, J. D.; Hughes, J. F. & Tabb, C. B. 1976.** Exploitation of natural tropical resources and the need for genetic and ecological conservation. In: Burley, J. & Styles, B. T. (eds.). *Tropical Trees. Variation, Breeding and Conservation*, Academic Press, London.
- Brink, R. A. & Cooper, C. 1947.** The endosperm in seed development. *Bot. Rev.* 13: 423 – 542.
- Bullock, S. H. 1985.** Breeding system in the flora of a neotropical deciduous forest. *Biotropica* 17: 287 – 301.
- Campbell, D. R. 1991.** Comparing pollen dispersal and gene flow in a natural population. *Evolution* 45: 1965-1968.
- Crawford, T. J. 1984.** What is a population? In: Shorrocks, B. (ed.). *Evolutionary ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 135 – 174.
- Doungyotha, Y. & Owens, J. N. 2002.** The reproductive biology and reproductive success of *Pterocarpus macrocarpus* Kurz. *Biotropica* 34: 58 – 67.

- Ebadi, A.; Sedgley, M.; May, P. & Coombe, B. G. 1996.** Seed development and abortion in *Vitis vinifera* L., cv. Chardonnay. *Int. J. Plant Sci.* 157: 703 – 712.
- Ellstrand, N. C. & Marshall, D. L. 1985.** Interpopulation gene flow by pollen in wild radish, *Raphanus sativus*. *Am. Nat.* 126: 606-616
- Farooqi, A. A.; Khan, M. M. & Asundhara, M. 1999.** Production technology of medicinal and aromatic crops. *Natural Remedies Put.* 26 – 28.
- Feinsinger, P. & Colwell, R. K. 1978.** Community organization among Neotropical nectar-feeding birds. *Am. Zool.* 18: 779-795.
- Fenster, C. B. 1991.** Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae) I. Gene dispersal. *Evolution* 45: 398-409.
- Franco, A. L. M. 1995.** *Ecologia da polinização e biologia reprodutiva de sete espécies de Phaseoleae (Fabaceae)*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Gandara, F. B. 1996.** *Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de Cedrela fissilis Vell. (Meliaceae)*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo.
- Gibbs, P. E.; Lewis, G. P. & Lughadha, E. N. 1999.** Fruit-set induced changes in the sex of flowers in *Caesalpinia calycina* (Leguminosae). *Plant Biol.* 1: 665 – 669.
- Gibbs, P. E. & Sasaki, R. 1998.** Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae – Papilionoideae) in SE Brazil: The effects of pistillate sorting on fruit-set. *Ann. Bot.* 81: 735 – 740.
- Godt, M. J. W. & Hamrick, J. L. 1993.** Patterns and level of pollen gene flow in *Lathyrus latifolius*. *Evolution* 47: 98-110.

- Hamrick, J. L. & Godt, M. J. W. 1989.** Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A. H. D.; Clegg, M. T.; Kahler, A. L. & Weir, B. S. (eds). *Plant population genetics, breeding and germplasm resources*. Sinauer Associates, Sunderland, 43 – 63.
- Hamrick, J. L. 1990.** Isozyme and the analysis of genetic structure in plant populations. In: Soltis, D. E. & Soltis, P. S. (eds.). *Isozymes in plant biology*. Chapman and Hall, London, 87 – 105.
- Hawkes, D. 1976.** Introduction. In: Burley, J. & Styles, B. T. (eds.). *Tropical Trees. Variation, Breeding and Conservation*. Academic Press, London.
- Hopkins, H. C. F. & Hopkins, M. J. G. 1992.** Rediscovery of *Mucuna macropoda* (Leguminosae: Papilionoideae), and its pollination by bats in Papua New Guinea. *Kew Bull.* 48: 297 – 305.
- Hossaert, M. & Valéro, M. 1988.** Effect of ovule position in the pod on patterns of seed formation in two species of *Lathyrus* (Leguminosae, Papilionoideae). *Am. J. Bot.* 75: 1714 – 1731.
- Izique, C. 2002.** O preço da indefinição. *Pesquisa Fapesp* 77: 26 – 28.
- Janzen, D. H. 1977.** A note on optimal mate selection by plants. *Am. Nat.* 11: 365 – 371.
- Judd, W. C.; Campbell, C. S.; Kelloggs, E. A. & Stevens, P. F. 1999.** *Plant systematic – A phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Inc., USA.
- Kageyama, P. Y. 1990.** Genetic structure of tropical tree species of Brazil. In: Bawa, K. S. & Hadley, M. (eds). *Reproductive ecology of tropical forest plants*. UNESCO / The Parthenon Publishing Group, Paris, 375 – 387.
- Kageyama, P. Y. & Castro, C. F. A. 1989.** Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas. *IPEF* 41 – 42: 83 93.

- Lepsch-Cunha, N. 1996.** *Estrutura genética e fenologia de espécies raras de Couratari spp.(Lecythidaceae) na Amazônia Central.* Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo.
- Levin, D. A. & Kester, H. W. 1969.** The dependence of bee-mediated pollen and gene dispersal upon plant density. *Evolution*: 23: 560 – 571.
- Lewis, G. P. & Schrire, B. D. 2003.** Leguminosae or Fabaceae? In: Klitgaard, B. B. & Bruneau, A. (eds.) *Advances in Legume Systematics, Part 10, higher level systematic.* Royal Botanic Garden, Kew, 1-3.
- Linck, A. J. 1961.** The morphological development of the fruit of *Pisum sativum*, var. Alaska. *Phytomorphology* 11: 79 – 84.
- Lindley, J. 1985.** *Flora medica.* Ajay Book Service, New Dehli.
- Lloyd, D. G. 1980.** Sexual strategies in plants. 1. An hypothesis of sexual adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytol.* 86: 69 – 79.
- Lloyd, D. G.; Webb, C. J. & Primack, R. B. 1980.** Sexual strategies in plants. 2. Data on the temporal regulation of maternal investment. *New Phytol.* 86: 81 – 92.
- Loveless, M. D. & Hamrick, J. L. 1984.** Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65 – 95.
- Mablerley, D. J. 1997.** *The plant-book: a portable dictionary of vascular plants utilizing kubitzki's. The families and genera of vascular plants.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Martin, M. E. & Lee, T. D. 1993.** Self pollination and resource availability affect ovule abortion in *Cassia fasciculata* (Caesalpinaceae). *Oecologia* 94: 503 – 509.
- Mogensen, H. L. 1975.** Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 62: 160 – 165.

- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B. & Kent, J. 2000.** Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853 – 858.
- Ohsawa, R.; Furuya, N. & Ukai, Y. 1993.** Effect of spatially restricted pollen flow on spacial genetic structure of an animal-pollinated allogamous plant population. *Heredity* 71:64-73.
- Oudhia, P. 2001.** Kapikachu or Cowhage (*Mucuna pruriens*). www.celestine-india.com/pankajoudhia.
- Palupi, E. R. & Owens, J. N. 1997.** Pollination, fertilization, and embryogenesis of teak (*Tectona grandis* Lf.). *Int.l J. Plant Sci.* 158: 259 – 315.
- Pimienta, E. & Polito, V. S. 1983.** Embryo sac development in almond (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb) as affected by cross, self and non-pollination. *Ann. Bot.* 51: 469 – 479.
- Polhill, R. M.; Raven, P. H. & Stirton, C. H. 1981.** Evolution and systematics of the Leguminosae. In: Polhill, R. M. & Raven, P. H. (eds.) *Advances in Legume Systematics, Part I*. Royal Botanic Garden, Kew, 1 – 26.
- Queller, D. C. 1985.** Proximate and ultimate causes of low fruit productions in *Asclepias exaltatata*. *Oikos*: 44: 373 – 381.
- Ramirez, N. & Brito, Y. 1990.** Reproductive biology of a tropical palm swamp community in the Venezuelan Llanos. *Am. J. Bot.* 77: 1260 – 1271.
- Ramnath, V. 1992.** *Vanosjadhi Shatak*. Serve-Seva-Sangh-Prakashan, Varanasi, India.
- Rastori, R. P. & Mehrotra, B. N. 1991a.** *Compendium of India medicinal plants*. Vol 1 (1960-69), Lucknow and Publications and Information Directorate, New Delhi.
- Rastori, R. P. & Mehrotra, B. N. 1991b.** *Compendium of India medicinal plants*. Vol 2 (1970-79). Lucknow and Publications and Information Directorate, New Delhi.

- Rim, Y. W.; Beusselinck, P. R.; Mcgran, R. L. & Somers, D. A. 1990.** Megagametophyte development in *Lotus corniculatus*. *L. conimbricensis* and their protoplast fusion hybrid. *Am. J. Bot.*: 77: 1084 – 1094.
- Sage, T. L.; Strumas, F.; Cole, W. W. & Barrett, S. C. H. 1999.** Differential ovule development following self and cross pollination the basis of self sterility in *Narcissus triandus* (Amaryllidaceae). *Am. J. Bot.* 86: 855 – 870.
- Sazima, I. & Sazima, M. 1978.** Polinização por morcegos em *Mucuna urens* (Leguminosae). *Livro de resumos do SBPC*: 419.
- Schaal, B. A. 1980.** Measurement of gene flow in *Lupinus texensis*. *Nature* 284: 450-451.
- Schimitt, J. 1980.** Pollination foraging behavior and gene dispersal in *Senecio* (Compositae). *Evolution* 34: 934-943.
- Seavey, S. R. & Bawa, K. S. 1986.** Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. *Bot. Rev.*: 52: 195 – 219.
- Sedgley, M. 1980.** Anatomical investigation of abscised avocado flowers and fruitlets. *Ann. Bot.* 46: 771 – 777.
- Shalini, K. 1997.** *Vedic leguminous plants*. Classical Publ. Co., New Delhi.
- Singh, B. M.; Srivastava, V. K.; Kidwai, M. A.; Gupta, V. & Gupta, R. 1995.** Aloe, psoralea and mucuna. In: Chadha, K. L. & Gupta, R (eds.). *Advances in horticulture*, vol. 11. Medicinal and aromatic plants. Malhotra Publ. House, New Delhi.
- Singh, U.; Wadhvani, A. M. & Johri, B. M. 1996.** Dictionary of economic plants in India. *India Council of Agricultural Research* 45 –146.
- Stephenson, A. G. 1981.** Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annu. Rev.Ecol. Syst.* 12: 253 – 279.

- Tandon R., Shivanna K.R. & Mohan Ram H.Y. 2003.** Reproductive biology of *Butea monosperma* (Fabaceae). *Annals of Botany*. 92: 715-723
- Teixeira, S. P. 2001.** O gênero *Dahlstedtia* Malme: embriologia, sistema reprodutivo e biosistemática. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Udovic, D & Aker, C. L. 1981.** Fruit abortion and the regulation of fruit number in *Yucca whipplei*. *Oecologia* 49: 245 – 248.
- Upadhyay, R. K. 2000.** *Upyogi Jadi – Butiyan*. Randhir Prakashan, Haridwar, India.
- Van der Pijl, L. 1941.** Flagelliflory and cauliflory as adaptations to bats in *Mucuna* and other plants. *Ann. Bot. Gard. Buiten*. 51: 83 – 93.
- Van Leeuwen, W. M. D. 1938.** Observations about the biology of tropical flowers. *Ann. Jard. Bot. Buiten*. 48: 27 – 68.
- Warrier, P. K.; Nambiar, V. P. K. & Ramankutty, C. 1995.** *Indian medicinal plants 4*: 68 – 72.
- Waser, N. M. 1982.** A comparison of distances flown by different visitors to flowers of the same species. *Oecologia* 55: 251-257.

CAPÍTULO I: “Explosive flowers, birds and bats: the secrets of two *Mucuna* species”

Kayna Agostini,

Profa. Dra. Marília de Moraes Castro

Profa. Dra Marlies Sazima

Introduction

Leguminosae is the third largest family of angiosperms and it is distributed worldwide (Lewis et al. 2005). Part of its success is due to its very elaborated floral constructions (Judd et al. 1999, Endress 1994). Floral evolution in Faboideae subfamily is characterized by maximizing pollen and nectar economy, resulting in a gradual selective development of increasingly sophisticated pollinators and the elimination of non-specialized vectors. The highest expression is found among Faboideae flowers with explosive pollen delivery (Arroyo 1981).

Floral biology of Faboideae species is researched in various regions of the world, but most of them in the Old World (Westerkamp 1992, Westerkamp & Paul 1993, Hopkins & Hopkins 1992), however it is still a vast and relatively unstudied group (Stirton 1981). In the Tropical regions most information about Faboideae floral biology is included in community studies (Sobrevila & Arroyo 1982, Bawa et al. 1985, Ramirez & Brito 1990) and few studies with species in particular are relatively scarce (Baker 1970, Morton 1979, Toledo & Hernández 1979, Pereira-Noronha et al. 1982, Bruneau 1997, Cotton 2001).

The genus *Mucuna* Adans. (Leguminosae, Faboideae, Phaseoleae), with about 80 species, shows explosive flower opening (van Leeuwen, 1938, van der Pijl 1941, Baker 1970). This genus is one of the most derived of the Leguminosae family (Bruneau et al.

1994, Lewis et al. 2005), and occurs in the New and Old World tropics (Endress 1994, Lewis et al 2005). In Papuasias, where 20 species are known (Verdcourt 1979), an impressive radiation involving different pollinator groups has taken place. Insects, lorikeets, small bats and nocturnal possums have been recognized as pollinators of different species (Hopkins & Hopkins 1992). In the Neotropics there are few studies about chiropterophilous species (Baker 1970, Sazima & Sazima 1978, von Helversen & von Helversen 1999, 2003) and one with ornithophilous species (Agostini et al. 2006). Information about Neotropical *Mucuna* species, pollinated by birds are restricted to a few records of *Cacicus cela* (Icteridae) visiting *Mucuna rostrata* flowers, but the floral and pollination biology were not studied in detail (Cotton 2001).

The present work describes *Mucuna japira* A. M. G. Azevedo, Agostini & Sazima and *M. urens* (L.) Medikus (Leguminosae, Faboideae, Phaseoleae) structural and temporal details of flowers to understand their functioning and the relationship with pollination biology. This procedure allowed us to address the following specific questions: 1) Might morphological characters and anatomical structures explain the flower explosive opening mechanism? and 2) how do differences in pollinator foraging behavior influence the reproductive success of both *Mucuna* species?.

Materials and Methods

The study site is in the coastal lowlands covered by subhumid evergreen broadleaf forest (Eiten 1970) at Picinguaba (about 23° 20'S, 44° 52'W) in Ubatuba, São Paulo, southeastern Brazil. Average annual rainfall at the study site is 2526ml and average annual temperature is 22,7°C (Sazima et al. 2003). These species occur on rivers ridges in temporarily flooded or very humid areas.

For this study 30 individuals of each species were used and flowers were observed *in situ* to determine phases of anthesis, color (following Kornerup & Wanscher, 1963) and scent intensity (30 flowers of each species). Stigmatic receptivity was tested using the H₂O₂ catalase activity method (Dafni et al. 2005) and aqueous solution of Neutral Red to verify the occurrence of lipids (n=10 flowers for each species), this solution/dye stains lipids red and may indicate the presence and distribution of volatile compounds responsible for the floral odor/scent (Kearns & Inouye 1993).

For general morphological observations, flowers of both species were fixed in FAA (Johansen 1940) for 24h. Keel apices were dehydrated through a tertiary butyl alcohol series, embedded in paraffin and then sectioned (Johansen 1940). Serial transections and longisections were cut at 15µm thickness on a rotary microtome, and stained with Safranin O and Astra blue (Gerlach 1969). Observations were made with Olympus BX51 microscope using polarized light to detect lignin in the cell walls. Keel apices were also dehydrated in a graded acetone series, critical point dried and coated with a thin layer of gold. Scanning electron micrographs were obtained on a JEOL 5800 LV microscope at 10kV.

Nectar production of both species was measured in 10 bagged flowers from different individuals at the pre-anthesis phase. *M. japura* nectar was measured once per day along anthesis, and *M. urens* at each two hours of anthesis. Two variables were measured, volume of nectar using a graduated microlitre syringe (Hamilton, NV, USA), and sugar concentration (percentage sucrose, w/w) with a pocket refractometer (Atago® 0-32%). Total nectar volume and nectar sugar concentration were compared by one-way ANOVA test.

In another group of bagged flowers, all nectar was removed from a flower repeatedly, at 2-h intervals for *M. urens*, starting at 1800h (n=10), and 12-h intervals for *M. japura*, starting at 0600h (n=10) on the first day of anthesis until corolla abscission. Special care was taken to avoid damage to the nectaries and other flower parts.

Direct visual observations of visitors were made and photographs were taken to analyze their visiting behavior. Observations on *M. japura* were made in May and June 2002-2004 and on *M. urens* in November and December 2002-2004. The observations on *M. japura* began at dawn (0500h), ending at late afternoon (1700h) totaling 169 man/hours and on *M. urens* they began at 1800h, ending at 0600h, totaling 64 man/hours.

Results and Discussion

Plant habit and floral features

Mucuna japura (Figure 1a) and *M. urens* (Figure 1b-d) are woody climbers with pseudoracemose inflorescences. The main flowering periods of the studied populations occurred once a year and lasted from May to June in *M. japura* and November to December in *M. urens*, characterizing an annual phenological pattern as defined by Newstrom et al. (1994). Based on Gentry (1974) *M. japura* shows the so-called “cornucopia flowering”, producing a large number of flowers during several weeks and *M. urens* shows “steady-state flowering” whereby the plant produces a few flowers a day over an extended period of time. Especially for *M. urens* this flowering behavior may be an adaptation to favor the spatial memory of the bats (Winter & von Helversen 2001). Spatial memory for food location is likely to be the most important mechanism enabling glossophaginae to relocate flowers and minimize search costs (Winter & von Helversen 2001).

Both species have dangling inflorescences, *M. japira* peduncles are 4,4 - 25,3 cm long (Tozzi et al. 2005) while those of *M. urens* are 60 – 150 cm long. Flagelliflory (flowers placed on the end of long peduncles) is nowhere better developed than in the leguminous vine genus *Mucuna* (Baker 1970). Bird pollinated species within the genus seem to have peduncles shorter than 40 cm, like the bird-pollinated *M. kraetkei* at Papua-New Guinea (van Leeuwen 1938). On the other hand, the peduncles of bat-pollinated *Mucuna* species may reach up to 1000 cm (van der Pijl 1941, Baker 1970, Faegri & van der Pijl 1980, Hopkins & Hopkins 1992). Flagelliflorous inflorescences ensure exposed position of many flowers, and they probably help approaching bats when they fly up from below the horizon and view the flower against the light sky (van der Pijl 1936, Vogel 1968, 1969, Tschapka et al. 1999, Winter & von Helversen 2001).

Each *M. japira* inflorescence bears 12 – 21 showy, yellow, odorless and large flag-flowers (more than 6,5 cm in length) (Figure 1a), which are in anthesis simultaneously and remain fresh and active for seven days (Tozzi et al. 2005, Agostini et al. 2006). Features such as vivid color and lack of odor fit well into the ornithophilous syndrome (Faegri & van der Pijl 1980). Simultaneous anthesis and large number of flowers per inflorescence suit well the needs of perching birds, which thus are able to reach several flowers from a single perch without much movements (Pyke 1981); additionally, flower disposition allows birds to land on the inflorescence (Westerkamp 1990). The longevity of *M. japira* flowers is considered long compared with other Faboideae species, and long anthesis could be important once it increases the possibility of the flowers being visited and pollinated (Primack 1985).

Each *M. urens* inflorescence bears 36-54 greenish, rotten odor and medium size flag-flowers (less than 5 cm length), but only 1-3 flowers are in anthesis simultaneously,

that last one night (Figure 1b – d). Green color probably helps to make the flower inconspicuous for other visually oriented foragers such as sphingid moth and probably also birds (Winter & von Helversen 2001), although features such as opaque color and fetid odor are related to the chiropterophilous syndrome (Faegri & van der Pijl 1980). Few flowers in anthesis simultaneously per inflorescence is related to trapline foraging behavior (von Helversen 1993), increasing the possibility of cross-pollination. Short longevity of *M. urens* flowers seems to be common in *Mucuna* species pollinated by bats, like *M. andreana* and *M. macropoda*, also last only one night (Baker 1970, Hopkins & Hopkins 1992), but this pattern is also found in other Faboideae species (Primack 1985).

Common floral biology features of *M. japira* and *M. urens*

Flowers of both species have typical Faboideae corollas and are individually resupinated due to 180° rotation of the floral pedicel. During anthesis, the standard petal curves backwards and the wing petals expand, as in *Butea monosperma* (Tandon et al 2003). The standard petal of *M. japira* is associated with visual attraction, while in *M. urens* this petal works as an acoustic guide to help in the bat echolocation (von Helversen & von Helversen 1999, 2003). The echoes of such a concave vexillum should be acoustically conspicuous because they persist during a series of calls emitted by a passing bat (Winter & von Helversen 2001). According to these authors the peculiar concave geometry is a feature of some *Mucuna* species that are pollinated by glossophaginae bats, once Palaeotropical bat-pollinated species of *Mucuna*, which are visited by small megachiropterans do not echolocate, nor bird-pollinated species of the genus possess vexilla with the specialized shape and stiffness.

The petals of both species are interconnected, by auricles and indentation, forming one system and allowing a mechanical cooperation among the petals (Stirton 1981). Due to this mechanical cooperation these *Mucuna* species have the explosive tripping mechanism, permitting the explosive pollen delivery (Arroyo 1981, Endress 1994). Flowers with explosive opening mechanism occur in widely different plant families such as Lamiaceae, Urticaceae, Ericaceae, Acanthaceae and Orchidaceae (Suzuki, 2003; Solomon Raju & Purnachandra Rao, 2006). This is a complicated mechanism, which requires tripping by specific biotic vectors (like bees, birds and bats) to cause explosive release of the pollen to result in pollination (Solomon Raju & Purnachandra Rao, 2006). Flower visitors require strength to press the keel petals in order to have access to nectar, only those flower visitors which have the required strength can get access to nectar and in the process, cause keel explosion and pollination (Suzuki, 2003; Solomon Raju & Purnachandra Rao, 2006). In the absence of flower-tripping agents, the flowers remain unpollinated which results in a breakdown of the pollination system (Solomon Raju & Subba Reddi, 1995).

After the first visit when the visitor triggers the explosive opening mechanism in *Mucuna* flowers, the staminal tube moves towards the standard and does not return to the original state. In consecutive visits the visitors do not contact the reproductive organs again, but they still visit the flowers to take the remaining nectar. Thus, *Mucuna* flowers have just one chance to be pollinated. On the other hand, species like *Cytisus scaparius* (pollinated by bees) have explosive opening mechanism but do not secrete nectar, and after the first visit the reproductive organs do not return to the original state (Suzuki 2003). Other species, as *Pongamia pinnata* (pollinated by bees), have explosive opening mechanism, secrete nectar continuously, and after the visits the reproductive organs return to the original state (Solomon Raju & Purnachandra Rao 2006), having more than one chance to

be pollinated. The significance of single flower visits on the reproductive success of plants, in particular in plants that possess a “flower exploding pollination” system, requires further study (Suzuki 2003).

The androecium of these *Mucuna* species consists of two whorls of alternating stamens. Five short stamens with short and hairy anthers and five long stamens with long and glabrous anthers form the staminal tube (for more details see Agostini et al. 2007). The fusion of the stamens in this family confers an important adaptive advantage (Polhill et al 1981) by forming the staminal column and limiting the range of pollinators that can work the flower. Many instances of fusion are specifically associated with pollination mechanisms, probably as the result of coevolution, although it is not known whether they are correlated (Tucker 1987). Another advantage of diadelphly is the prevention of desiccation or dilution of the nectar by wind, rain or solar radiation (Schrire 1989).

Two to three days before flower anthesis the short stamens grow and reach the length of the long stamens, thus all anthers occur at the same level. The long/glabrous anthers release their pollen first and as the short stamens grow, their short/hairy anthers now also open, push all pollen towards the keel apex, where it remain due to the trichomes of the latter anthers. Both anther types release all pollen in the bud phase that characterizes secondary pollen presentation. Probably, the secondary pollen presentation and the explosive mechanism in *Mucuna* is derived from flowers with pump mechanism that is often associated with dimorphic anthers, with the longer anthers dehiscing first, and the shorter acting as pistons moving the pollen out of the keel (Arroyo 1981).

The peltate stigma is covered by a cuticle, and by piercing it, in a receptive stigma, an exudate is released. This exudate is essential for pollen adhesion, hydration and germination on stigmas (Lord & Heslop-Harrison 1984, Shivanna & Owens 1989). Seven

species of Phaseoleae, where the genus *Mucuna* is inserted present the cuticle still intact until flower anthesis and it only ruptures after the pollinator's visit (Shivanna & Owens 1989).

The stigma presents several trichomes at its base and it is situated above the pollen mass and these features prevent contact of the receptive stigmatic surface with self pollen characterizing a herkogamous mechanism, thus reducing self pollination and promoting cross pollination (Holwell et al. 1993). Besides, during a first visit at the moment of flower explosion a pollinator contacts the stigma before receiving pollen.

Morphological aspects of the flower explosive opening mechanism

In the genus *Mucuna* the pistil and stamens are under tension, enclosed in the keel, and release of the reproductive organs occurs through explosive flower opening. At the apex of the keel the petals are stiff and joined to some extent, which probably act as a support to bring about flower explosion after a visit.

In the keel apex of both species, the walls of the mesophyll cells are lignified (Figure 2a-d). Besides, the cells of the inner epidermis have secondary lignified wall thickenings (Figure 2e), except at the keel tip (Figure 2d), only in *M. japura*. These features might explain why *M. japura* flowers are harder to open than those of *M. urens*. The stiffness of the keel could be associated with the presence of lignified tissues.

In non-lignified portion of the keel apex of both species, there are entwined papillae (Figure 2c), which keep the petals firmly united (Figure 2f-g). These papillae are unicellular glandular trichomes, with dense cytoplasm (Figure 2f) and striated cuticle (Figure 2g-h).

For the flower opening and releasing of the reproductive organs, pollinators have to press the keel basis, which results in different strains between the lignified and nonlignified portions of the inner epidermis, as well as of the portion with the entwined papillae.

Morphological features of the flowers of both species are compared in Table 1. These features possibly are related to the pollination biology of the two *Mucuna* species, since *M. japura* is pollinated mostly by the large perching bird, *Cacicus haemorrhous* (Icteridae) (Agostini et al. 2006) and *M. urens* by the small flower bat, *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae) (Sazima & Sazima 1978), which apply different strength (due to their different sizes) to trigger the explosive flower opening.

Nectar Features

The nectaries of both species are lobate, collar/annular form, present a massive secretory tissue and are intrastaminal, i.e. situated between the androecium and the gynoecium. The large amount of nectar is accumulated in the nectar chamber formed by the calyx. Many members of this family offer nectar which is secreted in the innermost parts of the base of the staminal filaments and accumulates in the space created between the stamens and the pistil (Rodríguez-Rianõ et al 1999). Access to nectar is by way of the space created by one of the ten stamens which originates two entrances at its base, so called fenestration (Rodríguez-Rianõ et al. 1999). Species that have androecium with fenestration produce high volume of nectar and allow nectar availability to a narrow range of pollinators, but at the same time provide solid protection to both ovary and nectary (Rodríguez-Rianõ 1999). The trichomes on the ovary and on the style base prevent that the nectar flows toward the staminal tube, instead to the nectar chamber, as van Leeuwen (1938) suggested for *M. kraetkei* which has similar trichomes on these structures.

Nectar secretion in *M. japira* starts at pre-anthesis and stops five days after, while in *M. urens* it starts at pre-anthesis and stops six hours after. For both species if the explosive opening mechanism is triggered, the nectar secretion stops. This may occur due to the unique pollination opportunity, a feature of *Mucuna* species (Baker 1970, Sazima & Sazima 1978, von Helversen & von Helversen 2003).

The nectar volume of *M. japira* and *M. urens* varies with the anthesis period. The highest average nectar volume for *M. japira* is 337,7 μl and occurs at the fifth day of anthesis, and after this period the volume decreases. There is a difference among the average nectar volume during the days of anthesis ($F=6,82$, $p = 0,0001$). The highest average nectar volume for *M. urens* is 310,8 μl and occurs six hours after anthesis. There is also a difference among the average nectar volume during the hours of anthesis ($F=28,9843$, $p = 0,0001$).

The mean nectar concentration in *M. japira* varies from 9,7% to 10,8%, with no differences among the days of anthesis. In *M. urens* the mean nectar concentration varies from 15,0% to 17,0% and no differences among the hours of anthesis occur.

Faboideae flowers with explosive opening mechanism secrete large amounts of nectar, and probably these flowers are derivate from those in which the major source was nectar. The large amount of nectar is a common attribute for passerine bird and bat flowers. *Mucuna japira*, pollinated by *Cacicus haemorrhous* (Agostini et al 2006), presents besides the large quantity of nectar, an adequate concentration that indicates passerine pollination syndrome (Faegri & van der Pijl 1980). On the other hand, the volume and nectar concentration of *M. urens* is similar to several bat flowers as recorded for 33 bat-pollinated flowers of the Neotropics (von Helversen 1993). Bats are expensive pollinators in that they need large amounts of nectar. These requirements should severely restrict the circumstances

under which bats become the preferred pollinator for a plant species. On the other hand, bats can transfer pollen over potentially large distances, which can be important for self-incompatible plants, as in *Mucuna urens* (Chapter 3) (Winter & von Helversen 2001).

Floral Scent

On *M. japira* flowers no smell was perceivable and no osmophores were detected. Flowers without odor is another feature that fits well in passerine pollination syndrome as described by Faegri & van der Pijl (1980).

The flowers of *M. urens* exhale a strong and very unpleasant smell, similar to rotten cauliflower. Scent production starts at sunset (approx. 1800h), decreases progressively during the night, and ceases early in the morning when the flower is senescent. The osmophores in the flowers of this species are concentrated in the inner part of the standard and wing petals. Bats are able to detect and localize food sources guided only by the scent and olfaction is probably the primary sense for the long distance detection of bat flowers (von Helversen et al 2000, Winter & von Helversen 2001) although other senses of the glossophaginae bats, like echolocation, are expected to be used to find flowers.

Floral Visitors

Cacicus haemorrhous, a passerine bird, was the most efficient pollinator of *M. japira*, and its behavior on the flowers and the pollination system were described by Agostini et al. (2006). During the first visit, the bird receives pollen on its head and touches the stigma due to the explosive mechanism of flower opening and pollen delivery (Figure 1a).

Glossophaga soricina was the only bat visitor recorded on *M. urens* flowers, as it was also recorded by Sazima & Sazima (1978). The bats began the visits at 1930h, made intervals around one hour and the visits ceased around 0000h. During the first visit, the bat clings on the flower, grasping the standard with the thumbs and the wings with the feet, where they left visible marks. When the bat tucks its snout into the corolla, it makes a pression at the base of the wing and keel petals triggering the explosive opening mechanism, thus contacting the stigma and receiving most of the pollen on the ventral region (Figure 1b). Subsequent visits to the same flower were made by hovering visits (Figure 1c). Some flowers show 2-3 claw marks on each wing, indicating that the bats tried to open the flowers 2-3 times before having success with the explosive opening mechanism (Figure 1d). These claw marks are useful in assessing the number of visits to a given flower (as the bat does not change position while on the flower) and are still used as indirect evidence of bat visits to a given flower species (Helvesen 1993, Sazima et al. 2003).

The clinging visits to *M. urens* flowers are maybe related to the difficulty of the bat to trigger the explosive opening mechanism - due to morphological features of the keel - during the hovering visits. The bat does not cling on flowers already triggered, because it can achieve the nectar easily during hovering visits. Similar visiting behavior of *Glossophaga soricina* is also known for *Dyssochroma viridiflorum* where the bat clings on the flower during all the visits because the long corolla and its pendulous, vertical position, makes it difficult to take nectar otherwise (Sazima et al. 2003).

Thus, *C. haemorrhous* visits on *M. japura* more pollen is lost than when *G. soricina* visits *M. urens*, because the last pollinator holds the entire flower avoiding that pollen escapes, while the first pollinator just explodes the flower permitting that a amount of pollen does not contact the bird's body. This feature can interfere in the reproductive

process of these *Mucuna* species. It would be expected that such a pollination system (flower exploding pollination) is an adaptation geared toward the efficient removal and deposition of pollen during single flower visits of pollinators because a large amount of pollen is likely to be lost from a flower tripped open by a pollinator (Suzuki 2003). Although flowers of these *Mucuna* species present the same flower opening process, different pollinators suggest that different amounts of pollen are received by each type.

The pollinators of both *Mucuna* species can be compared on their foraging route. All the flowers in an inflorescence of *M. japura* open at the same time. This provides that *C. haemorrhous*, visits all the flowers of the inflorescence, probably promoting geitonogamy and consequently fruit/seed abortion. On the other hand, in *M. urens* just one-three flowers per inflorescence open at the same time, providing that *G. soricina* uses a trap-line foraging route, favoring the cross-pollination and enlarging the genetic variability of the species.

Conclusions

Both pollination systems studied are specialized. In literature, there are studies relating the explosive opening mechanism to bee pollination, but in *Mucuna* it is related to vertebrate pollination, probably because *Mucuna* flowers are large and need more strength to trigger this mechanism. Thus *Mucuna* genus presents the most derived syndromes of pollination: ornithophily and chiropterophily.

Another important aspect of the floral and pollination biology of *Mucuna* is the relation between the explosive opening mechanism and the single flower visits. However, the effect of single flower visits on the reproductive success of plants, in particular in plants that possess a flower exploding pollination system, requires further studies.

Acknowledgements

We thank L. Freitas and M. A. Pizo for reading early versions of the manuscript; I. F. Bressan and S. H. Militão for technical assistance; the Instituto Florestal for the logistical support and the opportunity to work at the Parque Estadual da Serra do Mar, Picinguaba; CNPq, and Fapesp (04/02359-7) for financial support. This research was also supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) as part of the Thematic Project Functional Gradient (Process Number 03/12595-7), within the BIOTA/FAPESP Program – The Biodiversity Virtual Institute (www.biota.org.br), as well as by COTEC/IF 41.065/2005 and IBAMA/CGEN 093/2005.

References

- Agostini K., Sazima M. & Sazima I. 2006.** Bird pollination of explosive flowers while foraging for nectar and caterpillars. *Biotropica* 38: 674-678.
- Agostini K., Forni-Martins E.R., Sazima M. & Tozzi A.M.G.A. 2007.** Microsporogenesis and pollen cytology in two *Mucuna* species (Leguminosae: Faboideae). *Phytomorphology* (submentido).
- Arroyo M.T.K. 1981.** Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill R.M. & Raven P.H, eds. *Advances in Legume Systematics, Part 2*. Kew: Royal Botanic Gardens, 723 - 769.
- Baker H.G. 1970.** Bat pollination in Central America. *Revista de Biología Tropical*. 17: 187 - 197.

- Bawa K.S., Perry D.R., Bullock S.H., Coville R.E. & Grayum M.H. 1985.** Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination mechanisms. *American Journal of Botany* 72: 346 – 356.
- Bruneau A., Doyle J.J. & Doyle J.L. 1994.** Phylogenetic relationships in *Phaseoleae*: evidence from chloroplast DNA restriction site characters. In: Crisp M. & Doyle J.J., eds. *Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny* Kew: Royal Botanic Gardens, 309 – 330.
- Bruneau A. 1997.** Evolution and homology of bird pollination syndromes in *Erythrina* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84: 54 – 71.
- Cotton P.A. 2001.** The behavior and interactions of birds visiting *Erythrina fusca* flowers in the Colombian Amazon. *Biotropica* 33: 662-669.
- Dafni A., Pacini E. & Nepi, M. 2005.** Pollen and stigma biology. In: Dafni A., Kevan P. G. & Husband B. C., eds. *Practical Pollination Biology*. Ontario: Enviroquest, Ltda, 83-146.
- Eiten G. 1970.** A vegetação do Estado de São Paulo. *Boletim do Instituto de Botânica de São Paulo*. 7: 1-147.
- Endress P.K. 1994.** *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Faegri K. & Van der Pijl L. 1980.** *The principle of pollination ecology*. New York: Pergamon Press.
- Gentry A.H. 1974.** Coevolution patterns in Central American Bignoniaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 61: 728 – 759.
- Gerlach D. 1969.** *Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung*. Stuttgart: George Thieme.

- Hopkins H.C.F. & Hopkins M.J.G. 1992.** Rediscovery of *Mucuna macropoda* (Leguminosae: Papilionoideae), and its pollination by bats in Papua New Guinea. *Kew Bulletin* 48: 297 - 305.
- Howell G.J., Slater A.T. & Knox R.B. 1993.** Secondary pollen presentation in angiosperms and its biological significance. *Australian Journal of Botany* 41: 417 - 438.
- Johansen D.A. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: MacGraw-Hill Book Company Inc.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A. & Stevens P.F. 1999.** *Plant systematic – A phylogenetic approach*. USA: Sinauer Associates, Inc.
- Kearns C.A. & Inouye D. W. 1993.** *Techniques for pollination biologist*. Niwot: University Press of Colorado.
- Kornerup A. & Wanscher J.H. 1963.** *Taschelexikon der Farben*. Zürich: Musterschmidt.
- Lord E.M. & Heslop-Harrison Y. 1984.** Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: stigma organization and the breeding system in *Vicia faba* L. *Annals of Botany* 54: 827 - 836.
- Morton E.S. 1979.** Effective pollination of *Erythrina fusca* by the orchard oriole (*Icterus spurius*) – co-evolved behavioral manipulation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 66: 482-489.
- Newstrom L.E., Frankie G.W & Baker H.G. 1994.** A new classification for plant phenology based on flowering patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26: 141 - 159.
- Pereira-Noronha M.R., Silberbauer-Gottsberger I. & Gottsberger G. 1982.** Biologia floral de *Stylosanthes* (Fabaceae) no cerrado de Botucatu, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Biologia*. 42: 595 – 605.

- Polhill R.M., Raven P.H. & Stirton C.H. 1981.** Evolution and systematics of the Leguminosae. In: Polhill R.M. & Raven P.H., eds. *Advances in legume systematics*. Kew: Royal Botanical Garden 1: 1-26.
- Primack R.B. 1985.** Longevity of individual flowers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 15 – 37.
- Pyke G.H. 1981.** Why hummingbirds hover and honeyeaters perch. *Animal Behavior*. 29: 861-867.
- Ramirez N. & Brito Y. 1990.** Reproductive biology of a tropical palm swamp community in the Venezuela Llanos. *American Journal of Botany* 77: 1260 – 1271.
- Rodríguez-Riaño T., Ortega-Olivencia A. & Devesa J.A. 1999.** Types of Androecium in the Fabaceae of SW Europe. *Annals of Botany* 83: 109-116.
- Sazima I. & Sazima M. 1978.** Polinização por morcegos em *Mucuna urens* (Leguminosae). In: *Livro de resumos do SBPC*: 419.
- Sazima M., Buzato S. & Sazima I. 2003.** *Dyssochroma viridiflorum* (Solanaceae): a Reproductive Bat-dependent Epiphyte from the Atlantic Rainforest in Brazil. *Annals of Botany* 92: 725-730.
- Schrire B.D. 1989.** A multidisciplinary approach to pollination biology in Leguminosae. In: Stirton C.H. & Zarucchi J.L., eds. *Advances in Legume Biology*. St Louis: Missouri Botanical Garden, 183–242
- Shivanna K.R. & Owens S.J. 1989.** Pollen-pistil interactions (Papilionoideae). In: Stirton C.H. & Zarucchi J.L., eds. *Advances in Legume Biology*. St Louis: Missouri Botanical Garden, 157-182

- Sobrevila C. & Arroyo M.T.K. 1992.** Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. *Plant Systematics and Evolution*. 140: 19 – 37.
- Solomon Raju A.J. & Purnachandra Rao S. 2006.** Explosive pollen release and pollination as a function of nectar feeding activity of certain bees in the biodiesel plant, *Pongamia pinnata* (L.) Pierre (Fabaceae). *Current Science*. 90: 960-967.
- Solomon Raju A.J. & Subba Reddi C. 1995.** Explosive pollen release and pollination in flowering plants. *Proceedings of the Indian National Science Academy. (Part B)*. 61: 323-332.
- Stirton C.H. 1981.** Petal sculpturing in Papilionoid legumes. In: Polhill R.M. & Raven P.H., eds. *Advances in legume systematics*. Kew: Royal Botanical Garden 2, 781-788.
- Suzuki N. 2003.** Significance of flower exploding pollination on reproduction of the Scotch broom, *Cytisus scoparius* (Leguminosae). *Ecological Research*. 18: 523-532.
- Tandon R., Shivanna K.R. & Mohan Ram H.Y. 2003.** Reproductive biology of *Butea monosperma* (Fabaceae). *Annals of Botany*. 92: 715-723
- Tschapka M., von Helversen O. & Barthlott W. 1999.** Bat pollination of *Weberocereus tunilla*, an epiphytic rain forest cactus with functional flagelliflory. *Plant Biology* 1: 554-559.
- Toledo V.M. & Hernández, H.M. 1979.** *Erythrina oliviae*: a new case of oriole pollination in Mexico. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 66: 503 – 511.
- Tozzi A.M.G.A, Agostini K. & Sazima M. 2005.** A new species of *Mucuna* Adans.(Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) from southeastern Brazil, with a key to Brazilian species. *Taxon* 54: 451-455.
- Tucker S.C. 1987.** Floral initiation and development in legumes. In: Stirton C.H., ed. *Advances in legume systematics*. Kew: Royal Botanic Gardens 3: 183-239.

- Van der Pijl L. 1936.** Fledermäuse und Blumen. *Flora*. 31: 1–40.
- Van der Pijl L. 1941.** Flagelliflory and cauliflory as adaptations to bats in *Mucuna* and other plants. *Ann. Bot. Gard. Buiten*. **51**: 83 - 93.
- Van Leeuwen W.M.D. 1938.** Observations about the biology of tropical flowers. *Ann. Bot. Gard. Buiten*. 48: 27 - 68.
- Verdcourt B. 1979.** *A Manual of New Guinea Legumes*. Kristen Press, PNG.
- Von Helversen D. & Von Helversen O. 1999.** Acoustic guide in bat-pollinated flower. *Nature* 398: 759 - 760.
- Von Helversen D. & Von Helversen O. 2003.** Object recognition by echolocation: nectar-feeding bat exploiting the flowers of a rain forest vine. *Journal of Comparative Physiology A* 189: 327-336.
- Von Helversen O. 1993.** Adaptations of flowers to the pollination by Glossophagine bats. In: *Plant-Animal Interactions in Tropical Environments*. Barthlott W., ed. Bonn: Museum Alexander Koenig, 41 – 59.
- Von Helversen O., Winkler L. & Bestmann H.J. 2000.** Sulphur-containing `perfumes` attract flower-visiting bat. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural and Behavioral Physiology* 186: 143-153.
- Vogel S. 1968.** Chiropterophilie in der Neotropischen Flora. Neue Mitteilungen I. *Flora*. 157: 562-602.
- Vogel S. 1969.** Chiropterophilie in der neotropischen Flora. Neue Mitteilungen II. *Flora*. 158: 185 -222
- Westerkamp C. 1990.** Bird-flowers, hovering versus perching exploitation. *Botanica Acta* 103: 366-371.

- Westerkamp C. 1992.** The co-operation between the asymmetric flower of *Lathyrus latifolius* (Fabaceae – Viciae) and its visitors. *Phyton* 33: 121 – 137.
- Westerkamp C. & Paul H. 1993.** *Apios americana* a fly-pollinated papilionaceous flower? *Plant Systematics and Evolution* 187: 135 – 144.
- Winter Y. & von Helversen O. 2001.** Bats as pollinators: foraging energetics and floral adaptations. In *Cognitive Ecology of Pollination*. Chittka L. & Thomson J. D., eds. Cambridge: Cambridge University Press, 148-170.

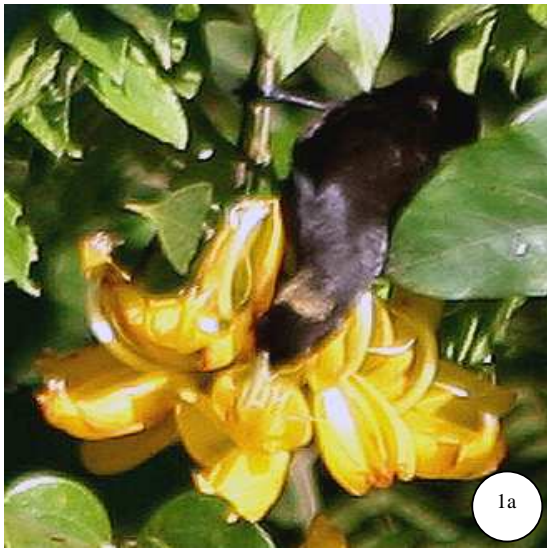
Legends

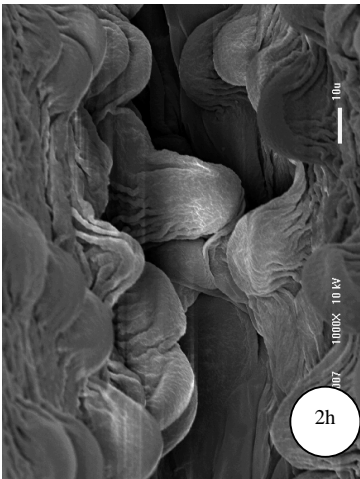
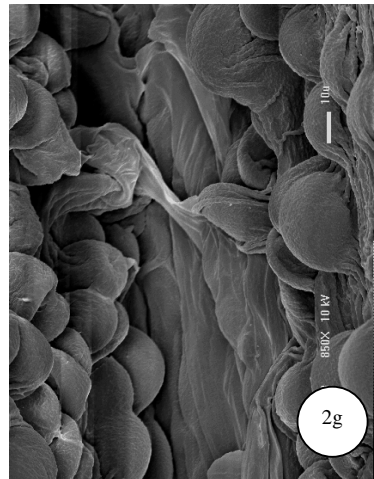
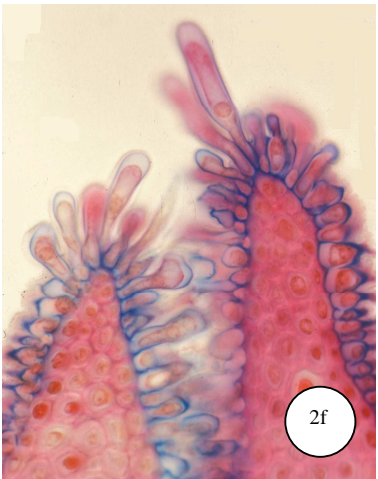
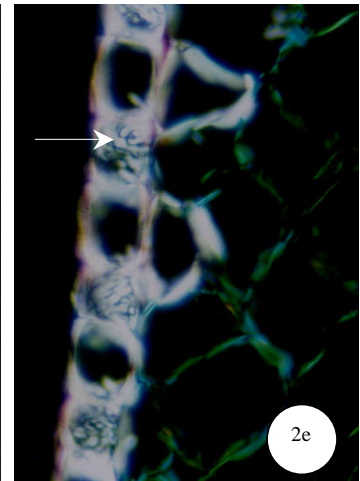
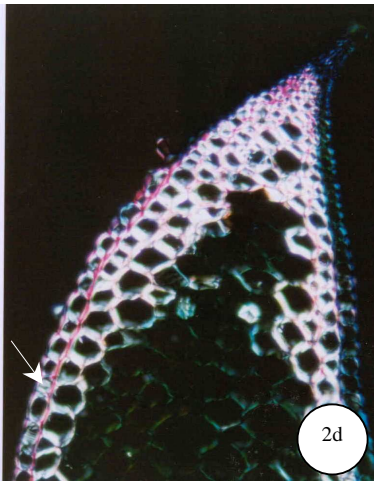
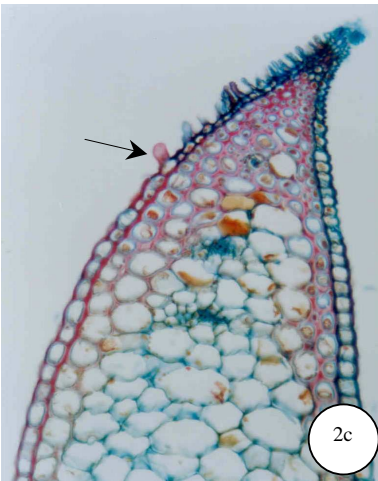
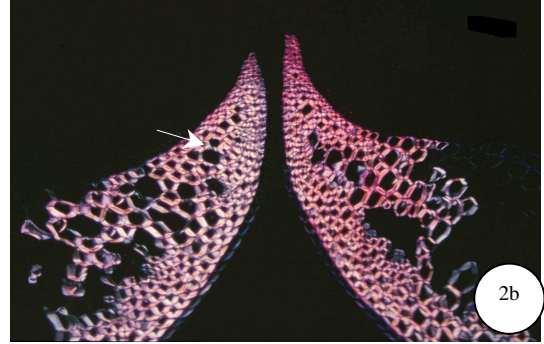
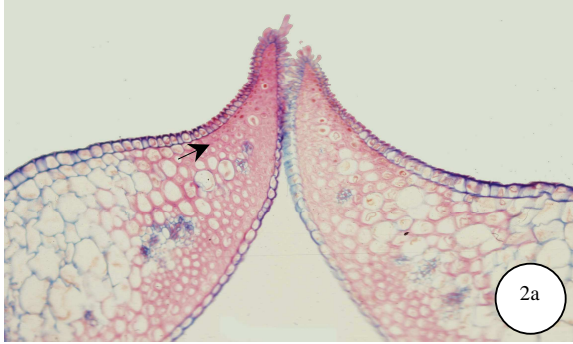
Figure 1 – **a)** *M. japira* inflorescence with 12 – 21 showy, yellow, odorless and large flag-flowers (more than 6,5 cm long), which are in anthesis simultaneously and remain fresh and active for seven days. The passerine bird *C. haemorrhous* is the pollinator and receives pollen on its head during the first flower visit. **b)** *M. urens* inflorescence with 36-54 greenish, rotten odor and medium size flag-flowers (less than 5 cm long), but only 1-3 flowers are in anthesis simultaneously, that last one night. The nectarivorous bat *G. soricina* is the pollinator and receives pollen on its ventral region during the first flower visit. **c)** Subsequent visits to the same flower were made by hovering visits by the bat. **d)** Some flowers of *M. urens* show 2-3 claw marks on each wing, indicating that the bats tried to open flowers 2-3 times before having success with the explosive opening mechanism.

Figure 2 – Anatomical studies of the explosive flower opening mechanism of *M. japira* and *M. urens*. **A – E.** Lignification in the cell walls of the keel tip of *Mucuna* species. **A – B.** *M. urens*. **C – E.** *M. japira*. **A, C.** general view. **B, D – E.** Sections observed in polarized light. (A – D. 16x; E. 40x). **F – H.** Glandular papillae in the keel apex of *Mucuna* species. **F.** *M. urens*. **G – H.** *M. japira*. **F.** sample analyzed on light microscope. **G – H.** Micrographs observed with SEM. (F. 60x; G. 1000x; H. 850x).

Table 1 – Major morphological features are compared between *M. urens* and *M. japira* inflorescences and flowers.

	<i>Mucuna japira</i>	<i>Mucuna urens</i>
peduncle size	4.4 – 25.3 cm	60.0 – 150.0 cm
flowers/inflorescence	12 – 21	36 – 54
flower color	yellow	greenish
flower odor	odorless	rotten cauliflower
flower size	more than 6.5 cm	less than 5 cm
flower anthesis	diurnal	nocturnal
anthesis period	seven days	one night
Flower in anthesis/inflorescence	12 – 21	1 – 3
Keel mesophyll lignification	present	present
inner epidermis lignification	present	absent
secondary thickenings in the inner epidermis	present	absent
entwined glandular papillae	present	present
papillae with striated cuticle	present	absent
nectar volume	337.7 ul	310.8 ul
nectar concentration	9.7 – 10.8 %	15.0 – 17.0 %
pollinator	<i>C. haemorrhous</i> (passerine bird)	<i>G. soricina</i> (nectarivorous bat)
local of pollen deposition	pollinator's head	pollinator's ventral region
foraging route of pollination	visits all flower in the inflorescence at the same time	trap line route





CAPÍTULO II: “Nectar features related to pollination in two *Mucuna* species (Leguminosae, Faboideae)”

Kayna Agostini

Profa Dra. Marlies Sazima

Prof. Dr. Leonardo Galetto

Introduction

The diversity of floral structures, colours and rewards is related to pollination biology (Baker & Baker 1983, Vogel 1991). Plants with biotic pollination attract their pollen vectors generally offering rewards (Willson 1983). Of the diverse floral rewards offered by plants, nectar is the most important. It is composed of sugars which constitute the major energy source for pollinators and may contain a variety of other solutes compounds, e. g. phenols, amino acids, reducing acids, lipids, proteins, alkaloids (Percival 1961, Baker & Baker 1983, Simpson & Neff 1983, Gottsberger et al. 1984, Bernardello 1991, Stiles & Freeman 1993). Sugars dominate the total solute in floral nectar: these are mainly sucrose, fructose and glucose in varying proportions according to the species (Baker & Baker 1983, Freeman et al. 1991; Stiles & Freeman 1993).

Nectar variability is determined by many traits related to each plant species. These include nectar volume, concentration, production rate, composition, removal effects, active resorption, flower age, as well as other extrinsic traits such as pollinator behavior, air temperature and humidity, and the presence of nectar robbers (e.g. Corbet 1978, Baker & Baker 1983, Zimmerman & Pyke 1986, Feinsinger 1978, Murawski 1987, Waser & Mitchell 1990, Búrquez & Corbet 1991, Mitchell & Waser 1992, Rathcke 1992,

Bernardello et al 1994, Galetto et al 1994, Rivera et al 1996, Torres & Galetto 1998, Galetto & Bernardello 2004).

Nectar is secreted with particular rhythms, throughout the lifespan of a flower, which allow the nectar production dynamics of a species to be determined. Knowledge of nectar production dynamics is fundamental to the understanding of the plant-animal relationship, aspects such as the plant's strategy of offering nectar, the activity patterns, frequency and diversity of pollinators of a plant species, the rate of nectar consumption by animals, among others, could not be understood without it (Galetto & Bernardello 2004).

The effect of nectar removal by floral visitors may have a pronounced effect on the total amount secreted by a flower. Although in some species removal does not modify nectar production (e.g. Galetto & Bernardello 1993, 1995, Galetto et al 2000) in others the total amount of sugar in the nectar may be increased (e.g. Pyke 1991, Galetto & Bernardello 1995, Castellanos et al 2002) or decreased (e.g. Galetto & Bernardello 1992, Bernardello et al. 1994, Galetto et al. 1997). Predictions for these patterns are not straightforward because they may be related to pollinators, environmental factors, plant resource allocation, or other factors.

Although there are many papers relating nectar composition with flower biotypes, main pollinator guilds, pollinator preferences, there are less research done on the nectar secretion pattern and the relationship with pollinators or seed production. Two species of *Mucuna* (Leguminosae, Faboideae) that have different pollination syndromes were chosen to examine their nectar production dynamics and nectar sugar components to evaluate if there are correlations among these features and to consider the results in the context of plant-pollinator interactions and plant reproduction.

Both species of *Mucuna* presents explosive flower opening (Agostini & Sazima 2008) which is a feature of most *Mucuna* species. *Mucuna japira* displays ca. 15 flowers per inflorescence that open simultaneously, are yellow, remain open for seven days, and are pollinated by the insectivorous passerine bird *Cacicus haemorrhous* which has a large corporal mass (Agostini et al 2006). The abortion of fruits and seeds in different stages of development is common for this species. *Mucuna urens* opens 1-3 greenish flowers per inflorescence that last only one night, and are pollinated by the nectarivorous bat *Glossophaga soricina* which has a small corporal mass (Sazima & Sazima 1978, Agostini et al 2008) and the abortion of fruits and seeds is not common.

The knowledge of the floral biology of this genus is scanty especially concerning floral nectar features. The present work was undertaken to study and compare nectar features in *M. japira* and *M. urens* addressing the following questions: (1) What is the dynamics of nectar production throughout the lifetime of the flower and the inflorescence? (2) What is the chemical composition of the nectar? (3) What is the floral response to nectar removal considering the explosive flower opening? (4) Are there differences in nectar sugar composition and production dynamics between the species as they are visited by different types of pollinators? (5) How does the resorption of the nectar influence species reproduction?

Material and Methods

The study site is in the coastal lowlands covered by subhumid evergreen broadleaf forest (Eiten 1970) at Picinguaba (about 23°20'S, 44°52'W) in Ubatuba, São Paulo, southeastern Brazil. Average annual rainfall at the study site is 2500 ml and average annual temperature is 22 °C (Sazima et al. 2003). These species occur on river ridges or in

temporarily flooded or very humid areas. This study was conducted in May, 2002-2004 for *M. japura* and in December, 2004-2006 for *M. urens*.

Nectar production was measured in seven different individuals and 78 flowers of *M. japura*, varying from 10 to 13 flowers per day of anthesis and in seven different individuals and 69 flowers of *M. urens*, varying from nine to 12 flowers per two hours of anthesis. Two variables were measured, volume of nectar using a graduated microlitre syringe (Hamilton, NV, USA), and sugar concentration (percentage sucrose, w/w) with a pocket refractometer (Atago®, Tokyo, Japan 0-32%). The amount of sugar produced was expressed in milligrams and was calculated after (Galletto & Bernardello 2005). It was not necessary to bag the flowers of these species of *Mucuna* because the keel of the flower is closed and to reach the nectar the pollinator must trigger the explosive opening flower mechanism.

Total nectar volume, concentration and rate of sugar were compared by one-way analysis of variance ANOVA test and with the Bonferroni's *post hoc* test for multiple comparisons among pairs of means. For statistical tests the SPSS statistical program package (SPSS release 10.0, 1999) was used.

In another group of flowers, all nectar was removed from a flower repeatedly, 12-h intervals for *M. japura*, starting at 0600h (n=10) on the first day of anthesis and 2-h intervals for *M. urens*, starting at 1800h (n=10) until corolla abscission.

Nectar sugar composition was compared in nectar samples taken from unvisited flowers in different periods of anthesis. Nectar drops were placed on Whatman (Maidstone, England) #1 chromatography paper and quickly dried; in the laboratory, nectar was re-dissolved and sugar separation was accomplished by gas chromatography. Nectar was lyophilized and silylated according to Sweeley et al. (1963). The derivatives were then injected into a Konik KNK 3000-HRGS gas chromatograph equipped with a Spectra-

Physics SP 4290 data integrator, a flame ionization detector, and a SE 30 capillary column (30 m long, 0.25 mm diameter and 0.25 μm thickness of the inner pellicle). Nitrogen was the carrier gas (2 ml/min) and the following temperature program: 200°C/1 min, 1°C/min until 208°C, 10°C/min until 280°C for 2 min. Carbohydrate standards (Sigma Chem.) were prepared using the same method.

To analyse how nectar resorption is affecting reproduction, two groups of flowers of both species were followed until fruit development: hand cross pollinated flowers from which nectar was not removed (55 for *M. japira* and 34 for *M. urens*), and natural cross pollinated flowers from which nectar was removed (997 for *M. japira* and 536 for *M. urens*).

Results

Nectar traits varied among the two species examined, but were constant for each one. Both species had a constant mean nectar sugar concentration throughout the flower lifetime ranging ca. 10% (F [4,50]=0,709 $p<0,590$) for *M. japira* and ca. 16% (F[3,36]=1,654 $p<0,194$) for *M. urens* (Figure 1a-b and Table 1).

Both species secreted high volume of nectar. Their secretion began at the bud stage, for *M. japira* nectar amount at the bud stage was ca. 55% and for *M. urens* was ca 22% of the maximum volume of nectar secreted by a flower (Figure 1c-d and Table 1). Nectar secretion lasted five days for *M. japira* and eight hours for *M. urens*. The first species reached the maximum nectar accumulation (volume) on the fifth day of anthesis (ca 340 μl per flower, 5100 μl per inflorescence) while *M. urens* reached it eight hours after anthesis (ca 310 μl per flower, 310-930 μl per inflorescence) (Figure 1c-d). For both species nectar secretion varied throughout the period of anthesis. For *M. japira* the amount of nectar

secreted in first and the second day of anthesis were the same, ca 196 ul, and differ from the third, fourth and fifth days of anthesis, ca 311ul, (F[4,50]=9,18 $p < 0,0001$) (Figure 1c-d). For *M. urens* there were three different stages of nectar secretion: the first two hours of anthesis, ca. 68 ul, four to six hours of anthesis, ca. 200 ul, and eight hours of anthesis, ca.310 ul, (F[3,36]=108,686 $p < 0,0001$) (Figure 1c-d).

Mean sugar secretion rate during the entire nectar secretion period for *M. japura* was 0,13 mg/hour per flower and ca. 2 mg/hour per inflorescence (Table 1), but it varied during the anthesis period (F[4,50]=7,388 $p < 0,0001$) and for *M. urens* was 5,07 mg/hour per flower and ca. 5-15 mg/hour, and it also varied during the anthesis period (F[3,36]=91,017 $p < 0,0001$) (Figure 1e-f).

Nectar resorption occurred in both species: in *M. japura* the resorption period lasted ca. two days while in *M. urens* it lasted ca. six hours (Figure 1c-f). Nectar resorption rate in *M. japura* was ca. 0,25 mg/hour per flower and ca. 4mg/h per inflorescence, while in *M. urens* was ca. 3 mg/h per flower and 3-9 mg/hour per inflorescence (Table 1).

Nectar sugars were glucose, fructose and sucrose for both *Mucuna* species (Table 2). Percentage of sucrose for *M. urens* and for *M. japura* was variable among flowers of the same individual and among individuals (Table 2). Percentage of sucrose was higher in *M. urens* flowers than in those of *M. japura* (Table 1 and 2) and the percentage of hexose sugar was higher in *M. japura* flowers than in *M. urens* flowers, and for *M. japura* hexose ratios indicated that the individuals had more fructose than glucose (Table 2). For *M. urens* nectar varies from hexose-rich (68.75% of flowers) to sucrose-rich (31.25% of flowers) and for *M. japura* nectar varies from hexose-dominant (20% of flowers), hexose-rich (70% of flowers) to sucrose-rich (10% of flowers) (Table 2).

Independently of the period of anthesis, both species interrupt nectar secretion after the first removal. Although the flowers were checked throughout their lifetime no nectar was secreted afterwards.

Once the explosive flower opening mechanism is triggered by a pollinator to reach the nectar and remove it nectar secretion is interrupted. *Mucuna* flowers just have one opportunity to be pollinated, as on a second visit the pollinator does not contact the reproductive organs (Agostini et al. 2006, Agostini et al. 2008).

For both species of *Mucuna* in manual cross pollinated flowers, without nectar removal, the seed production was higher than in natural cross pollinated flowers, with nectar removal. Thus, in flowers without nectar removal the amount of resorpted nectar could be larger than in flowers with nectar removal, indicating that resorption may influence plant reproduction.

Discussion

Many Faboideae species offer nectar which is secreted in the innermost parts of the base of the staminal filaments and accumulates in the space between the stamens and the pistil (Rodríguez-Riaño et al. 1999). Nectar flows through two furrows (so called *fenestra*) and accumulates in the calyx besides the staminal tube. The two furrows are created by one of the stamens that is not connected to the staminal tube.

The ovary of these *Mucuna* species is densely covered by trichomes, which probably prevent nectar to flow towards the staminal tube, a feature mentioned for *M. kraetkei* by van Leeuwen (1938).

The large amount of nectar secretion (ca 340 ul) and the very low sugar concentration (ca 10%) of *Mucuna japura* are well suited features for its passerine pollinator *Cacicus haemorrhous* (Agostini et al. 2006), since such attributes are known for several plant species pollinated by passerine birds (Faegri & van der Pijl 1980, Baker & Baker 1983, Nicolson 2002, Nicolson & Fleming 2003). Passerine birds need large amount of nectar which is an expensive investment for the plant that also need to produce floral structures and storage nectar (Stiles 1978). There are some hypotheses to explain the low nectar concentration in the flowers pollinated by passerine birds: 1) nectar extraction by birds is more efficient (Baker 1975); 2) do not encourage bees (Bolten & Feinsinger 1978); 3) offer the sufficient amount of water to the birds (Baker 1975, Calder 1979), 4) can encourage birds' visits, once the amount of sugar is low and the energy is not sufficient (Collins & Clow 1978, Martínez del Rio et al 2001).

Large amounts of nectar (ca 310 ul) and low sugar concentration (ca 17%) were recorded for *Mucuna urens*, besides other features may be related to chiropterophily (Faegri & van der Pijl 1980, von Helversen 2003). The volume and the nectar concentration of *M. urens* are similar to several bat flowers as recorded for 33 bat-pollinated species of the Neotropics (von Helversen 1993). Bats are expensive pollinators in that they need large amounts of nectar. These requirements should severely restrict the circumstance under which bats become, the preferred pollinator for a plant species (Winter & von Helversen 2001). On the other hand, bats offer pollen transfer over potentially large distances, which is important for self-incompatible species, like *Mucuna urens*.

Large amounts of nectar seem to be a feature of several? *Mucuna* species, mainly in those in which pollination by vertebrate occurs, once these pollinators have a higher body

mass than other pollinators and they are endotherms (Stiles 1978, Faegri & van der Pijl 1980, Cruden et al. 1983, Ladley et al. 1997).

Sugar production rate is higher in *M. urens* than in *M. japira*. This attribute fits to the pollinator types of both species, as the pollinator of the former species, *Glossophaga soricina* is a nectarivorous bat and its diet is mostly based on nectar (Winter & von Helversen 2001), whereas *Cacicus haemorrhous* is an insectivorous/frugivorous bird, which includes a high proportion of insects and fruits in its diet (Pyke 1980, Stile 1981).

In terms of patterns of nectar sugar production *M. japira* is characterized as slow-producer (secretes 5 to 10 percent of their maximum per hour) and *M. urens* as fast-producer (secretes 20 to 70 percent of their maximum per hour) following the definition of Cruden et al. (1983).

Faboideae flowers with explosive opening mechanism secrete large amounts of nectar and probably these flowers are derived from those in which the major source was nectar (Arroyo 1981). Nectar production stops when the explosive flower opening mechanism is triggered and this can be related to the opportunity of just one pollination, since after the explosive opening the staminal column moves towards the standard petal and in other visits the pollinator does not contact the reproductive organs (Baker 1970, Sazima & Sazima 1978, von Helversen & von Helversen 2003). Some species of Loranthaceae with explosive flower opening do not stop to produce nectar after the explosive mechanism is triggered, but they produce negligible nectar amounts, a feature not related by Ladley et al. (1997) to pollination possibilities.

In Faboideae subfamily, in general, sucrose, glucose and fructose are the sugars in the nectar and no other type was detected, but most species have high proportion of sucrose and relative low proportions of fructose and glucose (van Wyk 1993). Generally in this

subfamily the two hexoses occur in more or less equal proportions, but often with slightly more fructose than glucose (van Wyk 1993), like it happens in *M. japura*, but in *M. urens* the proportion of glucose is higher than fructose.

The much higher proportion of fructose in the nectar of *M. japura* is probably related to the diet of *Cacicus haemorrhous*, a frugivorous/insectivorous bird, and the proportion of fructose in the nectar may simulate the proportions of fructose that occur in fruit pulps.

The majority of the sampling of *M. urens* flowers show hexose-rich nectar and this species is pollinated by the bat *Glossophaga soricina* (Sazima & Sazima 1978) strengthening the suggestion of Baker & Baker (1983) and Baker et al. (1998) that chiropterophilous flowers have hexose-rich nectar. Baker & Baker (1983) and Baker et al. (1998) also suggested that flowers pollinated by passerine birds have hexose-dominant nectar, which fits not very well since most of the samplings of *M. japura* flowers have hexose-rich nectar.

Interplant and intraplant nectar sugar composition must be discussed in this study, because nectar variability occurs in both species of *Mucuna*. With very few exceptions, investigation on nectar sugar composition has focused on comparisons at species level or above (Herrera et al. 2006). These studies however, have revealed that nectar chemistry, including sugar proportion, may differ among individuals, populations, cultivars or subspecies of the same species (Biernaskie & Cartar 2004, Herrera et al. 2006, Canto et al. 2007). The idea that nectar sugars are relatively constant within species has been challenged by Herrera et al. (2006), who measured nectar sugar of *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae) in southern Spain, comparing variation on different levels, including variation between the five separate nectaries within flowers.

The magnitude of intra-plant variation in nectar sugar composition reported in this study is similar or even greater than that ordinarily found in interspecific comparisons (Baker & Baker 1983). This findings contrasts with the notion of intra-specific constancy prevailing in most recent literature on nectar sugar composition, and corroborates the results of Herrera et al. (2006) and Canto et al. (2007).

Additionally, the broad intra-plant variation in nectar sugar composition exhibited by the two *Mucuna* species could have important effects on the foraging patterns of pollinators and thus, presumably, on the selective pressures exerted by them on that floral trait (Herrera et al. 2006, Canto et al. 2007).

One hypothesis suggested by Biernaskie & Cartar (2004) and Herrera et al. (2006) is that within-plant variation in nectar sugar composition, acting alone or in concert with variation in nectar volume, may likewise be advantageous to plants by decreasing the number of flowers visited per plant by variance-sensitive, risk-averse pollinator foragers, thus representing one further adaptive mechanism reducing geitonogamy.

The decrease in nectar production in both species of *Mucuna* can be related to nectar resorption. Evaporation does not happen because the nectar of these species is enclosed in a nectar chamber without contact to the environment. Furthermore, the nectar volume would decrease and nectar concentration would increase if evaporation would be occurring. Nectar resorption has been reported more frequently in the recent literature, which suggests that nectar resorption is not a usual floral feature (Nepi & Stpiczyńska 2007a). Cruden et al. (1983) pointed out that resorption occurs when a maximum nectar production is reached and pollinators are inactive. Even though resorption may be energetically an expensive alternative, a flower that reabsorbs nectar not removed by visiting nectarivores can reclaim at least a part of the energy allocated for nectar production (Búrquez & Corbet 1991). This

strategy of resource recovery has recently been demonstrated or hypothesized by Búrquez & Corbet (1991), Koopowitz & Marchant (1998), Luyt & Johnson (2002), Stpiczyńska (2003a, b) and Nepi & Stpiczyńska (2007b).

For *M. urens* that produces more fruits and seeds than *M. japira*, nectar resorption may be an important resource for the development of the seeds once nectar resorption rate per flower for *M. urens* is 3 mg/h and for *M. japira* is 0.25 mg/h. Ecological consequences of nectar resorption have rarely been considered (Búrquez & Corbet 1991, Luyt & Johnson 2002). Removal of nectar from flowers no longer available for pollination may have evident advantages (Búrques & Corbet 1991). Resorption can increase the resources available to developing seeds in this and other flowers on the same plant (Búrquez & Corbet 1991). Luyt & Johnson (2002) showed that *Mystacidium venosum* (Orchidaceae) reabsorbs unused nectar following pollination, and that fruit quality may be enhanced as a consequence.

References

- Agostini K., Sazima M. & Sazima I. 2006.** Bird pollination of explosive flowers while foraging for nectar and caterpillars. *Biotropica* 38: 674-678.
- Agostini K., Castro M.d.M. & Sazima M. 2008.** Explosive flowers, birds and bats: the secrets of two *Mucuna* species. *Annals of Botany*. In preparation
- Arroyo M.T.K. 1981.** Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill R.M. & Raven P.H. (eds.) *Advances in Legume Systematics, Part 2*. Kew, Royal Botanic Garden, 723 – 769.
- Baker H.G. 1970.** Bat pollination in Central America. *Revista de Biología Tropical*. 17: 187–197.

- Baker H.G. 1975.** Sugar concentration in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica* 7: 37–41.
- Baker H.G. & Baker I. 1983.** Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones C.E. & Little R.J. (eds): *Handbook of experimental pollination biology*. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 117 – 141
- Baker H.G., Baker I. & Hodges S.A. 1998.** Sugar composition of nectars and fruits consumed by birds and bats in the tropics and subtropics. *Biotropica* 30: 559-586
- Bernadello L.M., Galetto L. & Juliani H.R. 1991.** Floral nectar, nectary structure and pollinators in some Argentinean Bromeliaceae. *Annals of Botany* 67: 401-411.
- Bernadello L.M., Galetto L., Jaramillo J. & Grijalba E. 1994.** Floral nectar and chemical composition of some species from Reserva Río Guajalito, Ecuador. *Biotropica* 26: 113 – 116.
- Biernaskie J.M. & Cartar R.V. 2004.** Variation in rate of nectar production depends on floral display size: a pollinator manipulation hypothesis. *Functional Ecology* 18: 125-129.
- Bolten A.B. & Feinsinger P. 1978.** Why do hummingbird flowers secrete dilute nectar? *Biotropica* 10: 307 – 309.
- Búrquez A. & Corbet S.A. 1991.** Do flowers reabsorb nectar? *Functional Ecology* 5: 369 – 379.
- Calder W.A. 1979.** On the temperature-dependency of optimal nectar concentrations for birds. *Journal of Theoretical Biology* 78: 185 – 196.
- Canto A., Pérez R., Medrano M., Castellanos M.C. & Herrera C.M. 2007.** Intra-plant variation in nectar sugar composition in two *Aguilegia* species (Ranunculaceae):

Contrasting patterns under field and glasshouse conditions. *Annals of Botany* 99: 653-660.

Castellanos M.C., Wilson P. & Thomson J.D. 2002. Dynamic nectar replenishment in flowers of *Penstemon* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 89:111-118.

Collins B.G. & Clow H. 1978. Feeding behavior and energetics of the Western spinebill (*Acanthorhynchus superciliosus*). *Australian Journal of Zoology* 26: 269 – 277.

Corbet S.A. 1978. Bee visits and the nectar of *Echium vulgare*. In: Richards A.J. (ed.): *The pollination of flowers by insects*. London Academic Press, London, 21-30.

Cruden R.W., Hermann S.M. & Peterson S. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. In Bentley B. & Elias T.S. (eds.): *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, 80-125.

Eiten G. 1970. A vegetação do Estado de São Paulo. *Boletim do Instituto de Botânica de São Paulo*. 7: 1-147.

Faegri K. & van der Pijl L. 1980. *The principle of pollination ecology*. Pergamon Press, New York.

Feinsinger P. 1978. Ecological interactions between plants and hummingbirds in a successional tropical community. *Ecological Monographs* 6: 105-128.

Freeman C.E., Worthington R.D. & Jackson M.S. 1991. Floral nectar sugar compositions of some South and Southeast Asian species. *Biotropica* 23: 568-574.

Galetto L., Bernardello G. & Juliani H.R. 1994. Nectar secretion pattern and removal and concentration-volume variations effects in *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae). *New Phytologist* 127: 465-471

- Galetto L., Bernardello G. & Rivera G. 1997.** Nectar, nectaries, flower visitors, and breeding system in some Argentinean Orchidaceae. *Journal of Plant Research* 110: 393-403.
- Galetto L., Bernardello G., Isele I.C., Vesprini J., Speroni G. & Berdue A. 2000.** Reproductive biology of *Erythrina crista-galli* (Fabaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87: 127-145
- Galetto L. & Bernardello G. 1993.** Nectar secretion pattern and removal effects in three species of Solanaceae. *Canadian Journal of Botany* 71: 1394–1398.
- Galetto L. & Bernardello G. 1995.** Characteristics of nectar secretion by *Lycium cestroides*, *L. Ciliatum* (Solanaceae) and their hybrid. *Plant Species Biology* 11: 157-163.
- Galetto L. & Bernardello G. 2004.** Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six Ipomoea species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany* 94: 269-280.
- Galetto L. & Bernardello L. 1992.** Nectar secretion pattern and removal effects in six Argentinean Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Botanica Acta* 105: 292–299.
- Galetto L. & Bernardello G. 2005.** Nectar. In:.. Dafni A., Kevan P. & Husband B.C. (eds.): *Practical Pollination Biology*. Enviroquest, Cambridge, Ontario, Canada, 261-313
- Gottsberger G., Schrawen J. & Linskens H.F. 1984.** Amino acids and sugars in nectar and their puntative evolutionary significance. *Plant Systematics and Evolution* 145: 55 – 77.

- Herrera C.M., Pérez R. & Alonso C. 2006.** Extreme intraplant variation in nectar sugar composition in an insect-pollinated perennial herb. *American Journal of Botany* 93: 575–581.
- Koopowitz H. & Marchant T.A. 1998.** Postpollination nectar resorption in the African epiphyte *Aerangis verdickii* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85:508–512
- Ladley J.J., Kelly D. & Robertson A.W. 1997.** Explosive flowering, nectar production, breeding systems, and pollinators of New Zealand mistletoes (Loranthaceae). *New Zealand Journal of Botany* 35: 345-360.
- Luyt R. & Johnson S.D. 2002.** Postpollination nectar reabsorption and its implications for fruit quality in an epiphytic orchid. *Biotropica* 34:442-446.
- Martínez del Rio C., Schondube J.E., McWhorter T.J. & Herrera L.G. 2001.** Intake responses in nectar feeding birds: digestive and metabolic causes, osmoregulatory consequences, and coevolutionary effects. *American Zoologist* 41: 902 – 915.
- Mitchell R.J & Waser N.M. 1992.** Adaptive significance of *Ipomopsis aggregata* nectar production: pollination success of single flowers. *Ecology* 73: 633-638.
- Murawski D.A. 1987.** Floral resource variation, pollinator response, and potential pollen flow in *Psiguria warscewiczii*. *Ecology* 68: 1273-1282.
- Nepi M. & Stpicyńska M. 2007a.** The complexity of nectar: secretion and resorption dynamically regulate features. *Naturwissenschaften* 10: on line
- Nepi M. & Stpicyńska M. 2007.** Nectar resorption and translocation in *Cucurbita pepo* L. and *Platanthera chlorantha* Custer (Rchb.). *Plant Biology* 9:93–100
- Nicolson S.W. 2002.** Pollination by passerine birds: why are the nectars so dilute? *Comparative Biochemical Physiology B*: 131: 645 – 652.

- Nicolson S.W. & Fleming P.A. 2003.** Nectar as food for birds: the physiological consequences of drinking dilute sugar solutions. *Plant Systematic and Evolution* 238: 139 – 153.
- Percival M.S. 1961.** Types of nectar in Angiosperms. *New Phytologist*. 60: 235 – 281.
- Pyke G.H. 1980.** The foraging behavior of honeyeaters: a review and some comparisons with hummingbirds. *Australian Journal of Ecology* 5: 343-369.
- Pyke G.H. 1991.** What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature* 350: 58-59.
- Rathcke B.J. 1992.** Nectar distributions, pollinator behavior, and plant reproductive success. In Hunter M.D., Ohgushi T. & Price P.W. (eds.): *Effects of resource distribution on animal-plant interactions*. Academic Press, New York, 113-138.
- Rivera G.L., Galetto L. & Bernardello G. 1996.** Nectar secretion pattern, removal effects, and breeding system of *Ligaria cuneifolia* (Loranthaceae). *Canadian Journal of Botany* 74: 1996-2001.
- Rodríguez-Riaño T., Ortega-Olivencia A. & Devesa J.A. 1999.** Types of Androecium in the Fabaceae of SW Europe. *Annals of Botany* 83: 109-116.
- Sazima I. & Sazima M. 1978.** Polinização por morcegos em *Mucuna urens* (Leguminosae). In: *Resumos da XXX Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*: p. 419.
- Sazima M., Buzato S. & Sazima I. 2003.** *Dyssochroma viridiflorum* (Solanaceae): a reproductively bat – dependent epiphyte from the Atlantic rainforest in Brazil. *Annals of Botany* 92: 725 – 730.
- Simpson B.B. & Neff J.L. 1983.** Evolution and diversity of floral rewards. In: Jones C.E. & Little R.J. (eds): *Handbook of experimental pollination biology*. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 142-159.

- Stiles F.G. 1978.** Ecological and evolutionary implications of bird pollination. *American Zoologist* 18: 715 – 727.
- Stiles F.G. 1981.** Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Annals of Missouri Botanical Garden* 68: 323-351.
- Stiles F.G. & Freeman C.E. 1993.** Patterns in floral nectar characteristics in some bird-plant species from Costa Rica. *Biotropica* 25: 191 – 205.
- Stpiczyńska M. 2003a** Nectar resorption in the spur of *Platanthera chlorantha* Custer (Rchb.) Orchidaceae—structural and microautoradiographic study. *Plant Systematic and Evolution* 238:119–126
- Stpiczyńska M. 2003b** Incorporation of [3H]sucrose after the resorption of nectar from the spur of *Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb. *Canadian Journal of Botany* 81:927–932.
- Sweeley E.C, Bentley R., Makita M. & Wells W.W. 1963.** Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of the American Chemical Society* 85: 2497-2507.
- Torres C. & Galetto L. 1998.** Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). *Botanical Journal of Linnean Society*
- Van Leeuwen W.M.D. 1938.** Observations about the biology of tropical flowers. *Ann. Jard. Bot. Buiten.* 48: 27 – 68.
- Van Wyk B.E. 1993.** Nectar sugar composition in southern African Papilionoideae (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 21: 271-277.
- Vogel S. 1991.** Radiación adaptativa del síndrome floral en las familias neotropicales. *Bol. Acad. Nac. Ci.* 59: 5 – 30.

- Von Helversen O. 1993.** Adaptations of flowers to the pollination by Glossophagine bats. In: Barthlott, W. (ed.): *Plant-Animal Interactions in Tropical Environments*. Museum Alexander Koenig, Bonn. 41 – 59.
- Von Helversen D. & von Helversen O. 2003.** Object recognition by echolocation: a nectar-feeding bat exploiting the flowers of a rain forest vine. *Journal of Comparative Physiology A* 189: 327 – 336.
- Winter Y. & von Helversen O. 2001.** Bats as pollinators: foraging energetics and floral adaptations. In Chittka L. & Thomson J.D. (eds.): *Cognitive Ecology of Pollination..* Cambridge: Cambridge University Press, 148-170.
- Waser N.M. & Mitchell R.J. 1990.** Nectar standing crops in *Delphinium nelsonii* flowers: spatial autocorrelation among plants? *Ecology* 71: 116-123.
- Willson M.F. 1983.** *Plant reproductive ecology*. John Wiley & Sons, New York.
- Zimmerman M. & Pyke G.H. 1986.** Reproduction in *Polemonium*: patterns and implications of floral nectar production and standing crops. *American Journal of Botany* 73: 1405-1415.

Legend

Figure 1 – A-F: features of nectar production in two species of *Mucuna*. A-B. Nectar sugar concentration. A=*M. japura*, B=*M. urens*. C-D. Nectar volume. C=*M. japura*, D=*M. urens*. E-F. Sugar secretion rate. E=*M. japura*, F=*M. urens*.

Table 1: Differences and similarities in flower and nectar traits between two species of *Mucuna*

	<i>M. japura</i>	<i>M. urens</i>
Flower lifetime	Seven days	One night
N° of open flowers per inflorescence	Ca. 15 (all flowers simultaneously)	1-3
Nectar amount at the bud stage	> 55 % of the maximum nectar secreted by a flower	< 22 % of the maximum nectar secreted by a flower
Nectar secretion period	> five days	Ca. 8 hours
Nectar secretion rate during the entire nectar secretion period	0.13 mg / hour	5.07 mg / hour
Nectar secretion rate per inflorescence during the initial stages of anthesis	Ca. 2 mg / hour	Ca. 5-15 mg / hour
Time of maximum nectar accumulation (volume) per flower	During the fifth day (ca. 340 ul)	At midnight (ca. 310 ul)
Nectar concentration throughout the flower lifetime	Constant (ca. 10 %)	Constant (ca. 16 %)
Nectar interruption after nectar removal	yes	yes
Nectar reabsorption period	Ca. two days	Ca. 6 hours
Nectar reabsorption rate per flower	Ca. 0.25 mg / hour	Ca. 3 mg / hour
Nectar reabsorption rate per inflorescence	Ca. 4 mg / hour	Ca. 3-9 mg / hour
Nectar sugar composition	Variable, hexose-rich to sucrose-rich	Variable, hexose-dominant to sucrose-rich
Hexose dominant	fructose	Glucose

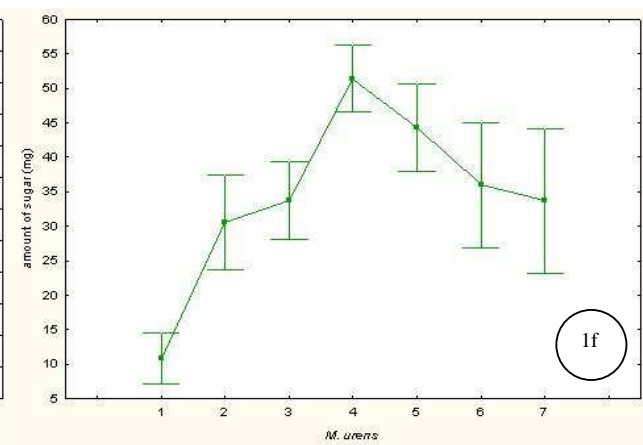
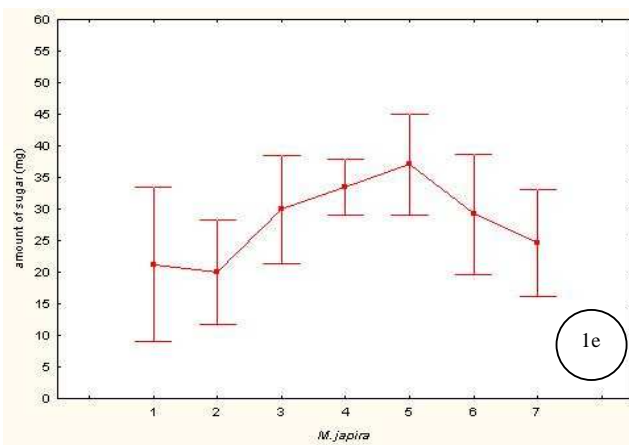
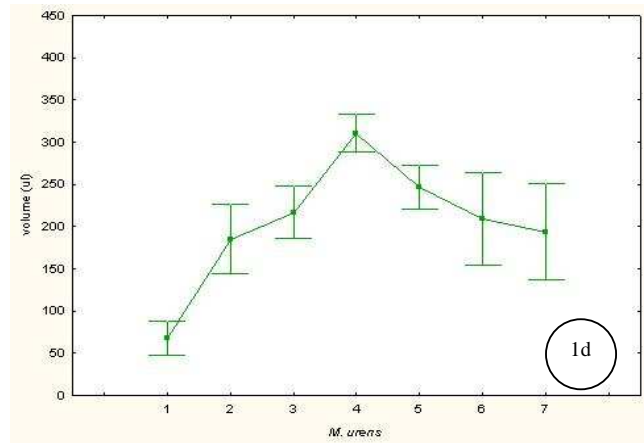
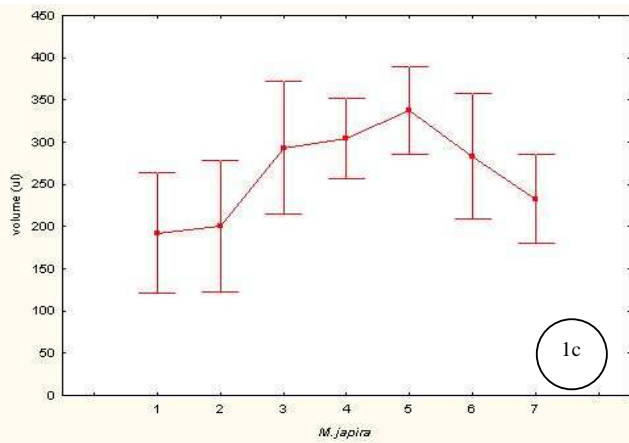
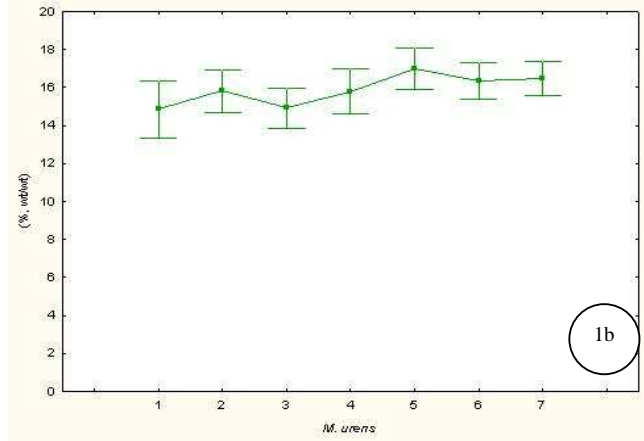
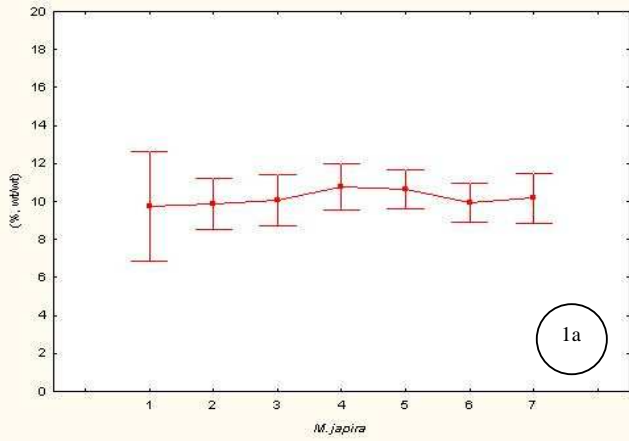
Table 2 – Nectar sugar composition of two *Mucuna* species

M. urens	Fructose	Glucose	Sucrose	S/(F+G)	G/F
<u>Plant 1</u>					
Flower 1	29.75	33.76	36.49	0.58	1.13
Flower 2	55.57	33.48	10.95	0.12	0.60
Flower 3	34.72	45.20	20.08	0.25	1.30
Flower 4	29.67	34.79	35.54	0.55	1.17
<u>Plant 2</u>					
Flower 1	39.42	34.31	26.27	0.36	0.87
Flower 2	42.36	42.74	14.89	0.17	1.00
Flower 3	29.56	34.03	36.41	0.57	1.15
Flower 4	37.04	45.51	17.45	0.21	1.23
<u>Plant 3</u>					
Flower 1	47.15	40.12	12.73	0.15	0.85
Flower 2	37.94	34.39	27.67	0.38	0.91
Flower 3	37.20	44.46	18.34	0.22	1.19
<u>Plant 4</u>					
Flower 1	30.36	25.77	43.86	0.78	0.85
Flower 2	30.39	31.97	37.64	0.60	1.05
Flower 3	29.74	38.49	31.77	0.47	1.29
<u>Plant 5</u>					
Flower 1	37.74	37.19	25.08	0.33	0.99
Flower 2	43.30	45.25	11.45	0.13	1.04
M. japura					
<u>Plant 1</u>					
Flower 1	95.62	3.05	1.33	0.01	0.03
Flower 2	46.42	11.56	43.03	0.74	0.25
<u>Plant 2</u>					
Flower 1	74.25	6.86	18.89	0.23	0.09
Flower 2	61.36	18.05	20.59	0.26	0.29
<u>Plant 3</u>					
Flower 1	64.80	12.85	22.35	0.29	0.20
Flower 2	62.49	21.26	16.25	0.19	0.34
<u>Plant 4</u>					
Flower 1	78.32	4.86	16.82	0.20	0.06
Flower 2	65.07	17.55	17.37	0.21	0.27
<u>Plant 5</u>					
Flower 1	72.58	4.43	22.98	0.30	0.06
Flower 2	74.12	18.08	7.79	0.08	0.24

hexose-dominant nectar

hexose-rich nectar

sucrose-rich nectar



Capítulo III: “Biologia reprodutiva, efeito dos componentes de fecundidade e da herbivoria no processo reprodutivo de duas espécies de *Mucuna* (Leguminosae, Faboideae)”

Kayna Agostini

Profa. Dra. Marlies Sazima

Introdução

O conhecimento do sistema reprodutivo das espécies é fundamental na investigação das causas de ocorrência de aborto (Bawa 1979). Estudos sobre a biologia reprodutiva de espécies de Faboideae são desenvolvidos em diversas regiões do mundo, sendo mais freqüentes nas regiões temperadas ou no Velho Mundo (Doungyotha & Owens 2002, Tandon 2003). Nas regiões tropicais, as informações sobre ecologia reprodutiva de Faboideae estão incluídas em estudos ao nível de comunidades (Bullock 1985, Bawa et al. 1985, Ramirez & Brito 1990, Arroyo & Uslar 1993) sendo poucos os estudos que abordam isoladamente espécies desta subfamília sob estes aspectos (Franco 1995, Gibbs & Sasaki 1998, Teixeira 2001).

Segundo Arroyo (1981) a auto-incompatibilidade é um fenômeno pouco freqüente em Leguminosae. Entretanto, segundo Gibbs & Sasaki (1998) espécies auto-incompatíveis são muito freqüentes em Faboideae. Nesta sub-família, cerca de 60% das espécies de Erythrinae são auto-incompatíveis, subtribo na qual se situa o gênero *Mucuna*.

A incidência de aborto de flores e frutos em Faboideae é alta, como em *Pisum sativum* L. (Briggs et al., 1987), em *Lotus corniculatus* (O'Donoghue & Grant 1988; Rim et al. 1990) e em *Dahlstedtia* (Teixeira et al. 2006). Considerável aborto de frutos

também ocorre em *Dioclea rufescens*, gênero filogeneticamente próximo de *Mucuna* (Bruneau et al. 1994), e segundo Franco (1995) os tubos polínicos desta espécie penetram na micrópila de óvulos após autopolinização e polinização cruzada, mas em ambos os casos não há formação de frutos maduros. Por outro lado, em *Dioclea violacea* ocorre formação de frutos maduros, mas geralmente são resultantes de autopolinizações (Franco 1995).

Em várias famílias de Angiospermae sementes viáveis são formadas a partir de pequena proporção de óvulos, dos quais alguns não se desenvolvem devido à ausência de fertilização e em outros, que são fertilizados, os embriões são abortados durante o desenvolvimento (Sedgley 1980, Bawa & Webb 1984). Vários fatores, sem causa genética conhecida, podem acarretar o aborto de flores e frutos (Lloyd 1980, Stephenson 1981, Bawa & Webb 1984). Entre eles estão a quantidade de grãos de pólen depositados no estigma (Morgensen, 1975) e a competição de óvulos por recursos para o desenvolvimento da semente (Lloyd, 1980). A competição dos tubos polínicos combinada com a limitação de recursos pode resultar em aborto seletivo de óvulos e sementes (Hossaert and Valéro 1988).

É interessante notar que estudos envolvendo estes aspectos em Leguminosae apresentam certas vantagens devido à disposição linear dos óvulos no ovário e, conseqüentemente, das sementes (Hossaert & Valéro 1988). A situação mais freqüente em Leguminosae é o aumento das taxas de aborto do embrião ocorrendo em direção às posições mais distantes do estilete (Bawa & Buckley 1989). Neste caso, óvulos basais seriam fertilizados pelos tubos polínicos com crescimento mais lento ou com menor capacidade competitiva, resultando numa progênie menos vigorosa e, portanto mais propensa a ser abortada (Bawa & Buckley 1989, Martin & Lee 1993, Gibbs & Sasaki 1998). Mesmo que as características genéticas e a qualidade dos grãos de pólen permaneçam constantes entre todos os grãos de pólen que fertilizam uma flor, o primeiro

óvulo fertilizado iniciará a captação de recursos antes dos óvulos fertilizados posteriormente (Teixeira et al. 2006). Portanto, este óvulo se tornará o embrião dominante e os demais óvulos não terão recursos suficientes para se desenvolverem em sementes grandes (Teixeira et al. 2006). Por outro lado, a limitação dos recursos maternos pode ocasionar o aborto dos óvulos fertilizados nas regiões próximas ao estilete, o que conferiria vantagem espacial para os óvulos basais (Susko 2006). Este padrão também foi encontrado em espécies de Leguminosae (Horovitz et al. 1976, Heering, 1994).

Outro fator que pode influenciar no aborto de frutos e sementes é o processo de herbivoria. Segundo Niesenbaun (1993, 1996), a herbivoria pode afetar significativamente o aborto seletivo através da redução da disponibilidade de recursos devido à remoção de folhas, mas estudos que apóiam esta hipótese ainda são raros na literatura. Herbivoria geralmente reduz o valor adaptativo da planta devido à perda da capacidade fotossintética, à exaustão dos nutrientes estocados e ao gasto energético para elaboração de defesas físicas e químicas após o processo de herbivoria (Hersch 2006).

Mucuna japura ocorre em áreas restritas da Mata Atlântica do Estado de São Paulo, mais especificamente, no município de Ubatuba, enquanto *M. urens* possui distribuição mais ampla, ocorrendo inclusive em outros ecossistemas como a Amazônia (Ribeiro et al. 1999). Ambas as espécies são lianas, com flores papilionáceas dispostas em inflorescências pseudo-racemosas, contendo 12 – 15 e 36 – 54 flores, respectivamente em *M. japura* e *M. urens* (Tozzi et al. 2005, Agostini et al. 2007). As flores possuem cinco óvulos por ovário, dispostos linearmente ao longo da placenta. Os frutos são secos e deiscentes, sendo que em *M. japura* podem se desenvolver de 1–2 sementes e em *M. urens* de 1–5 sementes.

Os objetivos deste trabalho são: 1) determinar o sistema reprodutivo de *M. japura* e *M. urens*, para detectar as causas das diferentes taxas de produção e aborto de frutos, 2)

investigar os efeitos dos componentes de fecundidade (padrões de produção de frutos e sementes), ou seja, verificar a quantidade de óvulos por ovário e de sementes por fruto no processo reprodutivo de *M. japura* e *M. urens* e 3) discutir se a herbivoria pode influenciar no processo reprodutivo de *M. japura*.

Material e métodos

Os sistemas reprodutivos de *Mucuna japura* e *M. urens* foram estudados a partir de testes de polinização manual em indivíduos de ambas as espécies, seguindo os métodos de Radford et al. (1974). Para os experimentos de polinizações manuais foram ensacados botões em pré-antese, cuja quantidade por tratamento para cada espécie consta da Tabela 1 e os seguintes tratamentos foram realizados:

a-autopolinização espontânea (flores ensacadas e sem tratamento posterior);

b-autopolinização manual (grãos de pólen foram depositados no estigma da própria flor);

c-polinização cruzada manual (grãos de pólen provenientes de várias flores de indivíduos diferentes foram transferidos para estigmas de flores emasculadas);

d-polinização em condições naturais (flores após serem visitadas foram ensacadas para verificar a formação de frutos)

Foram realizadas quantidades limitadas de tratamentos de polinizações por inflorescência, para não sobrecarregar a planta com frutos em desenvolvimento (Franco 1995). Para comparação da formação de frutos entre as espécies e entre os tratamentos foi utilizado o teste estatístico χ^2 e entre todos os tratamentos foi utilizado o teste G (Zar 1999).

Para avaliar a taxa de formação de frutos (polinização em condições naturais), foi estimado o número de flores em 10 indivíduos de cada espécie, e após dois meses, foi contado o número de frutos em formação. A contagem do número de óvulos/ovário foi

realizada em 10 flores de cada espécie e as diferenças na formação de frutos em relação à posição na inflorescência (posição apical, mediana ou basal) em 51 inflorescências de *M. japira* e em 79 de *M. urens*. O número de sementes/frutos e a posição de maior número de aborto de sementes foram registrados em 67 frutos de *M. japira*, de seis indivíduos e em 100 frutos de *M. urens*, de 10 indivíduos. Em *M. japira* foi possível analisar frutos apenas no início do desenvolvimento, pois esta espécie raramente completa o desenvolvimento dos seus frutos.

Para analisar a influência da herbivoria, observações foram realizadas na parte vegetativa e reprodutiva dos indivíduos de *M. japira* e *M. urens*.

Resultados e Discussão

Biologia Reprodutiva

Ocorre diferença significativa na formação de frutos quando comparamos entre os tratamentos de *M. japira* ($G = 247,6872$, $p < 0,05$) (Tab. 1). Nesta espécie não ocorre autopolinização espontânea, sugerindo que mecanismos de hercogamia possam estar atuando. Além disso, há baixa formação de frutos de autopolinização manual, sendo um indício de auto-incompatibilidade.

A produção de frutos maduros de *M. japira* (Fig. 1) em polinizações em condições naturais é baixa quando comparada com a produção oriunda de polinização cruzada manual ($\chi^2=69,5942$, $p<0,05$) (Tab. 1). Além disso, embora nos tratamentos de autopolinização, polinização cruzada e polinização em condições naturais o desenvolvimento de frutos é iniciado, estes frutos são abortados duas a três semanas após a polinização (Fig. 1B-1D).

A baixa produção de frutos em condições naturais leva a questionar a eficiência de polinização, principalmente, em relação à baixa frequência do polinizador que segundo

Bawa & Webb (1984) pode ser um dos fatores da baixa produção de frutos em relação ao número elevado de flores, situação mencionada para *Mucuna kraetkei* que, aparentemente, é polinizada por aves de grande porte (van Leeuwen 1938). Outro fator, pode ser o tipo de forrageamento alimentar do pássaro polinizador que, geralmente, visita várias flores da mesma inflorescência, efetuando polinizações intra-planta (geitonogamia) (Agostini et al. 2007). Outro aspecto que pode influenciar a produção de frutos está relacionado com a biologia floral, pois a polinização pode ser efetuada apenas no momento da abertura explosiva da flor, que ocorre uma única vez (Agostini et al. 2007). Assim, em *M. japura* a baixa produção de frutos pode estar relacionada com a baixa frequência do polinizador, o tipo de forrageamento alimentar e aspectos da biologia floral como, o mecanismo explosivo de abertura da flor e/ou com a alta taxa de abortos devido às características genéticas intrínsecas como, mecanismos de auto-incompatibilidade pós-zigóticos e/ou depressão endogâmica (Seavey & Bawa 1986).

Em *M. urens* não ocorre autopolinização espontânea e não houve formação de fruto após autopolinização manual, mas em 73,5% dos tratamentos de polinização cruzada resultaram frutos maduros (Tab. 1). Em polinização cruzada manual, a produção de frutos é maior ($\chi^2=17,7778$, $p<0,05$) (Tab. 1) do que em polinizações em condições naturais e a maioria dos frutos amadurece (Fig. 2). Numa inflorescência de *M. urens* podem ocorrer 36-54 flores (Fig. 2A), mas raramente há racemos com mais de dois frutos (Fig. 2D). Alguns estudos sugerem que o sucesso reprodutivo pode ser limitado pela quantidade de recursos necessários para a formação de frutos e sementes (Bawa 1979, Lloyd 1980). Este aspecto pode ser uma das causas da baixa produção de frutos para *M. urens* em condições naturais, uma vez que o fruto pode alcançar 30 cm de comprimento e 7 cm de largura, quando se desenvolvem as cinco sementes.

Houve grande diferença de formação de frutos após polinização cruzada manual entre *M. japira* e *M. urens*, pois embora houvesse início de formação de 36,4% de frutos de *M. japira*, a maioria foi abortada, ao passo que em *M. urens* houve formação de 73,5% dos frutos e todos amadureceram.

Em condições naturais a formação de frutos em *M. japira* inicialmente é semelhante à de *M. urens*, mas nesta a maioria dos frutos completa o desenvolvimento, enquanto que em *M. japira* os frutos iniciam o desenvolvimento, mas raramente o completam. De modo geral, a baixa produção de frutos nestas espécies em condições naturais pode também estar relacionada com baixa carga de pólen depositada no estigma. Outro fator que pode estar influenciando é a quantidade de flores, uma vez que em cada inflorescência de *M. urens* há 36-54 flores e em *M. japira* 12-15, então se compararmos o número de flores por inflorescência há maior probabilidade de formação de frutos em *M. urens*. O tamanho dos frutos, principalmente em *M. urens*, pode estar restringindo a formação de maior quantidade de frutos, uma vez que frutos de grandes dimensões necessitam de maior quantidade de nutrientes para se desenvolverem, fazendo com que a planta-mãe canalize os recursos maternos para o desenvolvimento de apenas alguns frutos.

Componentes de Fecundidade

As flores de *M. japira* têm duração de sete dias e antese simultânea (Fig. 1A), enquanto as flores de *M. urens* têm duração de apenas uma noite e a antese inicia-se na região basal da inflorescência, apresentando de 1 a 3 flores em antese por inflorescência por noite (Fig. 2A) (Agostini et al. 2007). O número médio de flores/indivíduo, para as duas espécies, é bem maior que o de frutos/indivíduo (Tab. 2). Em ambas as espécies o número de óvulos/ovário (n=5) é maior do que o número médio de sementes/fruto. (Tab. 2).

Em *M. japura* tanto a taxa de formação de frutos/flores como a de sementes/óvulos são extremamente baixas, o que torna necessária a discussão do aborto em dois níveis: flores que não originam frutos e óvulos que não originam sementes. Para *M. urens* também ocorre baixa produção de frutos em relação ao número de flores, mas a produção de sementes em relação ao número de óvulos é maior do que em *M. japura*. Segundo Bawa et al. (1989), de modo geral a taxa de produção de frutos/flores é extremamente baixa, mas a de sementes/óvulos é alta, como observamos em *M. urens*.

Não há diferenças significativas no número de frutos produzidos nas três posições das inflorescências de *M. japura* e de *M. urens* ($x^2 = 4,0$, $gl=2$, $p<0,05$) (Tab. 3). Também não há diferenças significativas ($x^2 = 0,347$, $gl=1$, $p<0,05$) entre as duas espécies quanto a posição do fruto na inflorescência (Tab. 3). Raramente ocorrem registros na literatura de espécies cuja produção de frutos e sementes é independente da sua posição na inflorescência (Zimmerman & Aide 1989).

Não há diferenças significativas na formação de frutos em determinada região da inflorescência para ambas as espécies (Tab. 3) e o número médio de sementes/frutos é baixo para *M. japura* (Tab. 2). Assim, as hipóteses de que o aborto dos frutos estaria relacionado com a ordem de maturação das flores na inflorescência e conseqüentemente ao tempo de fertilização e ao número de sementes/frutos são improváveis, uma vez que todas as flores de cada inflorescência de *M. japura* estão em antese simultaneamente. Mesmo que *M. japura* e *M. urens* possuam maturação floral diferenciada por inflorescência - na primeira espécie todas as flores estão em antese simultaneamente enquanto na segunda a maturação é acrópeta (Agostini et al. 2007), isto não influencia na posição de formação dos frutos. No caso de maturação acrópeta, encontrada na maioria das espécies de Leguminosae, as flores localizadas na base da inflorescência, por entrarem em antese antes

das demais, seriam as primeiras a serem fertilizadas e os frutos produzidos teriam mais chances de se desenvolverem, pois estariam mais próximos dos recursos maternos (Arista et al. 1999, Medrano et al. 2000). Entre os frutos num mesmo estágio de desenvolvimento, aqueles com maior número de sementes teriam vantagens sobre os demais (Nakamura 1986, Bawa et al. 1989). Em experimentos realizados com *Pancreatium maritimum* (Amaryllidaceae) quando algumas flores eram removidas de uma inflorescência, os frutos e sementes das flores restantes se desenvolviam, sugerindo que as flores podem competir por recursos dentro de uma inflorescência e as últimas a abrirem atuam com “ovários reservas” (Medrano et al. 2000).

Em *M. japura* das 335 possíveis sementes (67 frutos analisados x 5 óvulos) que poderiam desenvolver, 61,5% abortaram e o local de desenvolvimento no fruto estava atrofiado. Em *M. urens* das 500 possíveis sementes, 36,8% abortaram. Segundo Susko (2006) o período mais crítico do ciclo de vida de uma planta é a ontogenia da semente entre a fertilização e a maturidade da semente.

Mucuna japura e *M. urens* apresentaram menor taxa de aborto nas sementes que ocupam posições pedunculares (basais) em relação ao ovário. Este resultado concorda com os de Horovitz et al. (1976) para espécies de *Lupinus* e *Medicago*, nas quais as sementes das posições basais estariam mais próximas aos nutrientes disponíveis através da região vascular do fruto e, portanto, teriam mais chances de completarem seu desenvolvimento. Segundo Susko e Lovett-Doust (1999) sementes localizadas em posições pedunculares (basais) são as competidoras mais fortes por recursos devido à proximidade dos recursos maternos.

Tanto para *M. japura* como para *M. urens*, as sementes originadas dos óvulos mais próximos à posição estilar (apical) sofreram maior quantidade de aborto, embora tivessem

maiores chances de serem fertilizados primeiro, portanto não se aplica a hipótese da vantagem temporal (Jaronowsky 1962). Por outro lado, sementes que possuem melhor desenvolvimento em regiões do ovário próximas ao estilete foram verificadas em Leguminosae como, *Cassia fasciculata* (Lee & Bazzaz 1986), *Sophora japonica* (O'Donnell & Bawa 1993) e *Robinia pseudoacacia* (Susko 2006). Muitos estudos sugerem que os óvulos localizados próximos ao estilete podem ter vantagem temporal na competição intra-ovário devido à fertilização ocorrer primeiro por tubos polínicos mais vigorosos, assim estes óvulos podem ser fertilizados por gametófitos masculinos melhores do que os gametófitos que fertilizarão os óvulos que estão em posição mais distante do estilete (Susko 2006).

Herbivoria

Larvas de *Astraptes talus* (Lepidoptera, Hesperidae) alimentam-se das folhas de *M. japira*, por outro lado, a fase de pupa é desenvolvida nas flores, tendo ocorrido em 35% das flores (n=74 flores) (Agostini et al. 2006). Segundo Janzen & Hallwachs (1999) as larvas de *A. talus* alimentam-se especificamente das folhas de espécies de *Mucuna* e de acordo com Greeney & Jones (2003) as larvas constroem abrigos para se empuparem. A larva de *A. talus* é importante para a polinização de *M. japira*, uma vez que o polinizador *Cacicus haemorrhous* (Passeriformes, Icteridae) procura essa larva nas flores e ao retirá-la aciona o mecanismo de abertura da flor, realizando a polinização (Agostini et al. 2006). Portanto, esse herbívoro é um elemento-chave para a polinização de *M. japira*. Em *M. urens* não foi verificado processo de herbivoria acentuado em órgãos vegetativos ou reprodutivos.

Para *M. japira* a discussão sobre herbivoria pode ser apresentada em dois níveis:

- a) *Herbivoria diminui a fecundidade do indivíduo*

Como *M. japira* sofre alta taxa de aborto de frutos e sementes em diferentes fases do desenvolvimento, podemos sugerir que com a herbivoria pelas larvas de *A. talus*, os recursos das plantas são alocados para reconstituição das partes vegetativas para que a taxa de fotossíntese não seja diminuída consideravelmente comprometendo a sobrevivência do indivíduo. Deste modo ocorre a diminuição dos recursos disponíveis para o desenvolvimento de frutos e sementes ocasionando o seu aborto (Niesenbaun 1996). Muitos estudos formularam a hipótese da herbivoria afetar a fecundidade dos indivíduos, pois este processo pode interferir em outros processos ecológicos, como polinização e dispersão de sementes e também no desenvolvimento embrionário (Crawley 1983, Marquis 1992, Willson & Price 1977, Stephenson 1980, Niesenbaun 1993, 1996, Wise & Cummins 2006, Pellegrino & Musacchio 2006).

b) Herbivoria aumenta a fecundidade da planta

A maioria dos estudos enfatiza que a herbivoria foliar pode afetar negativamente direta ou indiretamente a fecundidade da planta. A herbivoria afeta diretamente a fecundidade, pois interfere no tamanho das pétalas; número de flores; número e tamanho dos óvulos; produção, tamanho e qualidade do pólen e produção e concentração do néctar (Strauss 1997). Como todas estas características serão afetadas, indiretamente haverá interferência na atração do polinizador, no número de flores visitadas e polinizadas e no tempo que cada polinizador permanece em cada flor durante o processo de polinização (Strauss 1997).

No caso de *M. japira* o processo de herbivoria foliar pode diminuir a fecundidade da planta, mas a presença do herbívoro nas flores atrai o polinizador e mantém as visitas, aumentando indiretamente a fecundidade da planta. Assim estamos diante de um “trade-off”, no qual a

herbivoria em *M. japura* pode diminuir diretamente a fecundidade (aborto de frutos e sementes por falta de recursos) ou aumentá-la indiretamente (atração do polinizador).

Pesquisas sobre diferentes tipos de interação planta-animal (como herbivoria, polinização e dispersão de sementes) progrediram em caminhos distintos, pois a maioria dos estudos enfatiza apenas um tipo de interação e a possibilidade significativa das outras. Esta compartimentalização conduz para uma simplificação que pode atrapalhar nossa compreensão da ecologia e evolução das interações planta-animal (Herrera et al. 2002).

A combinação da ação de herbívoros e polinizadores pode influenciar na ecologia reprodutiva e na evolução da polinização e das características relacionadas com este processo. Através de efeitos diretos e indiretos nas características florais, quantidade e qualidade do pólen e atração de polinizadores, os herbívoros modulam a natureza e a força adaptativa na interação entre plantas e seus polinizadores (Karban & Strauss 1993, Quesada et al. 1995, Lohman et al. 1996, Mutikainen & Delph 1996, Strauss et al. 1996, Lehtilä & Strauss 1997, Strauss 1997, Aizen & Raffaele, 1998, Mothershead & Marquis 2000, Hambäck 2001).

Além disso, herbívoros e polinizadores podem exercer pressões seletivas conflitantes em um determinado caráter, e certas características das flores ou inflorescências podem refletir as adaptações tanto para o mutualismo como para o antagonismo (Brody 1992, Strauss 1997, Brody & Mitchell 1997, Ehrlén 1997, Kudoh & Whigham 1998, Galen 1999, Fenner et al. 2002).

Bibliografia

- Agostini, K., Sazima, M. & Sazima, I.** Bird pollination of explosive flowers while foraging for nectar and caterpillars. *Biotropica* 38 (5): 674-678, 2006.
- Agostini, K., Castro, M. d. M. & Sazima, M.** 2007. Explosive flowers, bats and birds: the secrets of the floral biology and pollination of the *Mucuna* genus. *Annals of Botany* submetido
- Aizen, M. A. & Raffaele, E.** 1998. Flowering shoot defoliation affects pollen grain size and postpollination pollen performance in *Alstroemeria aurea*. *Ecology* 79: 2133-2142.
- Arista, M., Ortiz, P. L. & Talovera, S.** 1999. Apical pattern of fruit production in the racemes of *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Caesalpinioideae): role of pollinators. *Am. J. Bot.* **86**: 1708-1716.
- Arroyo, M. T. K.** 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill, R. M. & Raven, P. H. (eds.) *Advances in Legume Systematics, Part 2*. Royal Botanic Garden, Kew, 723 – 769.
- Arroyo, M. T. K. & Uslar, P.** 1993. Breeding systems in a temperature mediterranean-type climate montane sclerophyllous forest in Central Chile. *Bot. J. Linn. Soc.* **111**: 83 – 102.
- Bawa, K. S.** 1979. Breeding systems of trees in a tropical wet forest. *N. Z. J. Bot.* **17**: 521-524.
- Bawa, K. S., Perry, D. R. & Beach, J. H.** 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *Am. J. Bot.* **72**: 331 – 345.
- Bawa, K. S. & Webb, C. J.** 1984. Flower, fruit, and seed abortion in tropical forest trees: implication for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *Am. J. Bot.*: **71**: 736 – 751.
- Bawa, K. S., Hedge, S. H., Ganeshaiyah, K. N. & Shaanker, R. U.** 1989. Embryo and seed abortion in plants. *Nature* **342**: 625
- Bawa, K. S. & Buckley, D. P.** 1989. Seed: ovule ratios, selective seed abortion, and mating systems in Leguminosae. *Monog. Syst. Bot.* **29**: 243 – 262.

- Briggs, C. L., Westoby, M., Selkirk, P. M. & Oldfield, R. J. 1987.** Embryology of early abortion due to limited maternal resources in *Pisum sativum* L. *Ann. Bot.* **59**: 611 – 619.
- Brody, A. K. 1992.** Oviposition choices by a predispersal seed predator (*Hylemya* sp.), correspondence with hummingbird pollinators, and the role of plant size, density and floral morphology. *Oecologia* 91: 56-62
- Brody, A. K. & Mitchell, R. J. 1997.** Effects of experimental manipulation of inflorescence size on pollination and pre-dispersal seed predation in the hummingbird-pollinated plant *Ipomopsis aggregata*. *Oecologia* 110: 86-93
- Bruneau, A., Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1994.** Phylogenetic relationships in *Phaseoleae*: evidence from chloroplast DNA restriction site characters. In: Crisp M, Doyle JJ, eds. *Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny* Kew: Royal Botanic Gardens, 309 – 330.
- Bullock, S. H. 1985.** Breeding system in the flora of a neotropical deciduous forest. *Biotropica* **17**: 287 – 301.
- Crawley, M. J. 1983.** Herbivory: the dynamics of animal-plant interactions. University of California Press. Berkeley, California, USA.
- Doungyotha, Y. & Owens, J. N. 2002.** The reproductive biology and reproductive success of *Pterocarpus macrocarpus* Kurz. *Biotropica* **34**: 58 – 67.
- Ehrlén, J. 1997.** Risk of grazing and flower number in a perennial plant. *Oikos* 80: 428-434.
- Fenner, M., Cresswell, J.E., Hurley, R.A. & Baldwin, T. 2002.** Relationship between capitulum size and pre-dispersal seed predation by insect larvae in common Asteraceae. *Oecologia* 130, 72-77.
- Franco, A. L. M. 1995.** *Ecologia da polinização e biologia reprodutiva de sete espécies de Phaseoleae (Fabaceae)*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Galen, C. 1999.** Flowers and enemies: predation by nectar-thieving ants in relation to variation in floral form of an Alpine Wildflower, *Polemonium viscosum*. *Oikos* 85: 426-434.

- Gibbs, P. E. & Sasaki, R. 1998.** Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae – Papilionoideae) in SE Brazil: The effects of pistillate sorting on fruit-set. *Ann. Bot.* **81**: 735 – 740.
- Greeney, H. F. & Jones, M. T. 2003.** Shelter building in the HesperIIDae: A classification scheme for larval shelters. *J. Res. Lepid.* **37**: 27–36.
- Hambäck, P. A. 2001.** Direct and indirect effects of herbivory: Feeding by spittlebugs affects pollinator visitation rates and seedset of *Rudbeckia hirta*. *Ecoscience* **8**: 45-50.
- Heering, J. H. 1994.** The reproductive biology of three perennial *Sesbania* species (Leguminosae). *Euphytica* **74**: 143-148
- Herrera, C. M., Medrano, M., Rey, P. J., Sánchez-Lafuente, A. M., García, M. B., Guitián, J., & Manzaneda, A. J. 2002.** Interaction of pollinators and herbivores on plant fitness suggests a pathway for correlated evolution of mutualism- and antagonism-related traits. *PNAS* **99**(26): 16823-16828.
- Hersch, E. I. 2006.** Foliar damage to parental plants interacts to influence mating success of *Ipomoea purpurea*. *Ecology*. **87** (8): 2026-2036.
- Horovitz, A., Meiri, L. & Beiles, A. 1976.** Effects of ovule positions in fabaceous flowers on set and outcrossing rates. *Bot. Gaz.* **137**: 250-254
- Hossaert, M. & Valéro, M. 1988.** Effect of ovule position in the pod on patterns of seed formation in two species of *Lathyrus* (Leguminosae, Papilionoideae). *Am. J. Bot.* **75**: 1714 – 1731.
- Janzen, D. H. & Hallwachs, W. 1999.** Philosophy, navigation and use of a dynamic database (“ACG Caterpillars SRNP”) for an inventory of the macrocaterpillar fauna, and its food plants and parasitoids, of the Area de Conservacion Guanacaste (ACG), northwestern Costa Rica [on line]. URL: <http://janzen.sas.upenn.edu>.
- Jaronowsky, J. 1962.** Fertilization and embryo development in cases of autogamy. *Genet. Pol.* **3**: 209-242
- Karban, R & Strauss, S. Y. 1993.** Effects of herbivores on the growth and reproduction of their perennial host plant, *Erigeron glaucus*. *Ecology* **74**: 39-46.
- Kudoh, H. & Whigham, D. F 1998.** The effect of petal size manipulation on pollinator/seed-predator mediated female reproductive success of *Hibiscus moscheutos*. *Oecologia* **117**: 70-79.

- Lee, T. D. & Bazzaz, F. A. 1986.** Regulation of fruit maturation in an annual legume *Cassia fasciculata*. *Ecology* 63: 1374-1388.
- Lehtilä, K & Strauss, S. Y. 1997.** Leaf damage by herbivores affects attractiveness to pollinators in wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia* 111: 396-403
- Lloyd, D. G. 1980.** Sexual strategies in plants. 1. An hypothesis of sexual adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytol.* **86**: 69 – 79.
- Lohman, D. J., Zangerl, A. R. & Berenbaum, M. R. 1996.** The impact of floral herbivory by parsnip webworm (Oecophoridae, *Depressaria pastinacella* Duponchel) on pollination and fitness of wild parsnip (Apiaceae, *Pastinaca sativa* L.). *American Midland Naturalist* 136: 407-412.
- Marquis, R. J. 1992.** The selective impact of herbivores. Pages 301-325 in R. S. Fritz and E. L. Simms, editors. *Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution and genetics*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Martin, M. E. & Lee, T. D. 1993.** Self pollination and resource availability affect ovule abortion in *Cassia fasciculata* (Caesalpiaceae). *Oecologia* **94**: 503 – 509.
- Medrano, M., Guitián, P. & Guitián, J. 2000.** Patterns of fruit and seed set within inflorescences of *Pancreatium maritimum* (Amaryllidaceae): nonuniform pollination, resource imitation, or architectural effects? *American Journal of Botany*, 87: 493-501.
- Morgensen, H. L. 1975.** Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 62: 160-165.
- Mothershead, K. & Marquis, R. J. 2000.** Fitness Impacts of Herbivory through Indirect Effects on Plant-Pollinator Interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology* 81: 30-40.
- Mutikainen, P. & Delph, L. F. 1996.** Effects of herbivory on male reproductive success in plants. *Oikos* 75: 353-358.
- Nakamura, R. R. 1986.** Maternal investment and fruit abortion in *Phaseolus vulgaris* Am. *J. Bot.* **73**: 1049-1057.
- Niesenbaun, R. A. 1993.** Light or pollen: seasonal limitations on female reproductive success in the understory shrub *Lindera benzoin*. *Journal of Ecology* 81: 315-323.
- Niesenbaun, R. A. 1996.** Linking herbivory and pollination: defoliation and selective fruit abortion in *Lindera benzoin*. *Ecology* 77 (8): 2324-2331.

- O'Donnell, M. E & Bawa, K. S. 1993.** Gamete selection and patterns of ovule and seed abortion. *Current Science* 65: 214-219.
- O'Donoughuel, L. S. & Grant, W. F. 1988.** New sources of indehiscence for birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*, Fabaceae) produced by interspecific hybridization. *Genome* 30: 459 – 468.
- Pellegrino, G. & Musacchio, A. 2006.** Effects of defoliation on reproductive success in two orchids *Serapias vomeracea* and *Dactylorhiza sambucina*. *Ann. Bot. Fennici* 43: 123-128
- Quesada, M., Bollman, K. & Stephenson A. G. 1995.** Leaf damage decreases pollen production and hinder pollen performance in *Cucurbita texana*. *Ecology* 76: 337-443.
- Radford, A. E.; Dickinson, W. C.; Massey, J. R. & Bell, C. R. 1974.** *Vascular plant systematics*. Haper & Row, New York.
- Ramirez, N. & Brito, Y. 1990.** Reproductive biology of a tropical palm swamp community in the Venezuelan Llanos. *Am. J. Bot.* 77: 1260 – 1271.
- Ribeiro, J. E. L. S., Hopkins, M. J. G., Vicentini, A., Sothers, C. A., Costa, M. A. S., Brito, J. M., Souza, M. A. D., Martins, L. H. P., Lohmann, L. G., Assunção, P. A. C. L., Pereira, E. C., Silva, C. F. Mesquita, M. R. & Procópio, L. C. 1999.** *Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. INPA-DFID.
- Rim, Y. W.; Beusselinck, P. R.; Mcgran, R. L. & Somers, D. A. 1990.** Megagametophyte development in *Lotus corniculatus*. *L. conimbricensis* and their protoplast fusion hybrid. *Am. J. Bot.*: 77: 1084 – 1094.
- Seavey, S. R. & Bawa, K. S. 1986.** Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. *Bot. Rev.*: 52: 195 – 219.
- Sedgley, M. 1980.** Anatomical investigation of abscised avocado flowers and fruitlets. *Ann. Bot.* 46: 771 – 777.
- Stephenson, A. G. 1981.** Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annu. Rev.Ecol. Syst.* 12: 253 – 279.
- Strauss, S. Y. 1997.** Floral characters link herbivores, pollinators, and plant fitness. *Ecology* 78: 1640-1645.

- Strauss, S. Y., Conner, J. K. & Rush, S. L. 1996.** Foliar herbivory affects floral characters and plant attractiveness to pollinators: implications for male and female fitness. *American Naturalist* **147**: 1098-1107.
- Susko, D. J. 2006.** Effect of ovule position on patterns of seed maturation and abortion in *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae). *Canadian Journal of Botany* **84**: 1259-1265.
- Susko D. J. & Lovett-Doust, L. 1999.** Effects of resources availability, and fruit and ovule position on components of fecundity in *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). *New Phytologist* **144**: 295-306.
- Tandon, R., Shivanna, K. R. & Mohan Ram, H. Y. 2003.** Reproductive biology of *Butea monosperma* (Fabaceae). *Ann. Bot.* **92**: 715-723
- Teixeira, S. P. 2001.** *O gênero Dahlstedtia Malme: embriologia, sistema reprodutivo e biossistemática.* Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Teixeira, S. P.; Pereira, R. A. S. & Ranga, N. T. 2006.** Components of fecundity and abortion in a tropical tree, *Dahlstedtia pentaphylla* (Leguminosae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49** (6): 905-913.
- Tozzi, A. M. G. A.; Agostini, K. & Sazima, M. 2005A** new species of *Mucuna* Adans. (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) from southeastern Brazil, with a key to Brazilian species. *Taxon* **54** (2): 451-455
- Van Leeuwen, W. M. D. 1938.** Observations about the biology of tropical flowers. *Ann. Jard. Bot. Buiten.* **48**: 27 – 68.
- Willson, M. F. & Price, P. W. 1977.** The evolution of inflorescence size in *Asclepias* (Asclepiadaceae). *Evolution* **31**: 495-511.
- Wise, M. J. & Cummins, J. J. 2006.** Strategies of *Solanum carolinense* for regulating maternal investment in response to foliar and floral herbivory. *Journal of Ecology* **94**: 629-636.
- Zar, J.H. 1999.** *Biostatistical analysis.* New Jersey: Prentice Hall.
- Zimmerman, J. K. & Aide, T. M. 1989.** Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *American Journal of Botany* **76**: 67-73.

Legenda das Figuras

Figura 1 – Inflorescência e frutos abortados e maduros de *Mucuna japura*. A. Inflorescência com 12 – 21 flores amarelas, grandes e sem odor (mais de 6,5 cm de comprimento), que estão em antese simultaneamente e permanecem abertas durante sete dias. B. ovário desenvolvido, provavelmente fertilizado e abortado (± 1.5 cm de comprimento). C. Fruto imaturo abortado (± 3.0 cm de comprimento), com todas as sementes abortadas. D. Fruto imaturo abortado (± 8.0 cm de comprimento), aparentemente apenas uma semente estava em desenvolvimento. E. Quatro frutos maduros que completaram o desenvolvimento, com diferentes quantidades de sementes desenvolvidas.

Figura 2 – Inflorescência, frutos em desenvolvimento, maduros e semente germinando de *Mucuna urens*. A. Inflorescência com 36-54 flores esverdeadas, com odor desagradável e apenas 1-3 flores estão em antese simultaneamente e permanecem abertas apenas uma noite. B. Um ou dois frutos em desenvolvimento por inflorescência. C. Raramente mais do que dois frutos completam o seu desenvolvimento em uma inflorescência. D. semente germinando, mostrando o sucesso da reprodução nesta espécie.

Tabela 1: Porcentagem de formação de frutos de *Mucuna japura* e *M. urens* nos tratamentos de autopolinização espontânea, autopolinização manual, polinização cruzada e condições naturais (número de frutos imaturos/total de cruzamentos). Porcentagem calculada considerando tanto frutos abortados como maduros.

Tratamentos	<i>M. japura</i> (2002/2003/2004)	<i>M. urens</i> (2003/2004)
Autopolinização espontânea	0,0% (0 / 31)	0,0% (0 / 30)
Autopolinização manual	8,6% (3 ¹ / 35)	0,0% (0 / 30)
Polinização cruzada manual	36,4% (19 ¹ 1 ² / 55)	73,5% (25 ² / 34)
Polinização em condições naturais (frutos que iniciaram o desenvolvimento)	11,8% (91 ¹ 27 ² / 997)	12,1% (6 ¹ 59 ² / 536)
Polinização em condições naturais (frutos que completaram o desenvolvimento)	2,7% (27 ² / 997)	11,0% (59 ² / 536)

¹ Frutos imaturos abortados

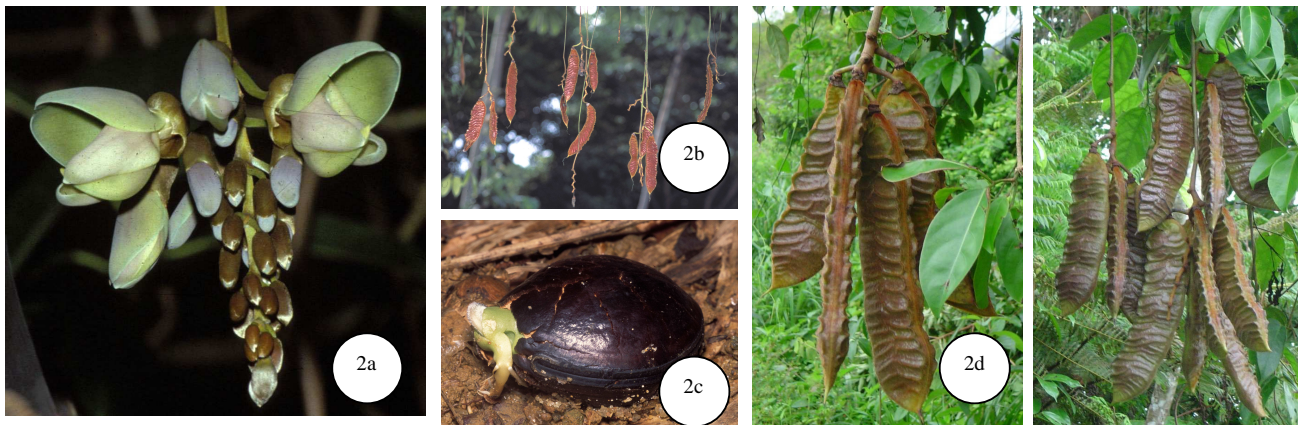
² Frutos que completaram o desenvolvimento.

Tabela 2 – Número de flores e frutos (Média \pm desvio padrão) produzidos por indivíduos de *Mucuna japura* (n=6 indivíduos) e por *M. urens* (n=10 indivíduos)

Espécies	Flores	Frutos	Sementes/frutos
M. japura	696 \pm 445,1337	11,2 \pm 6,0139	1,92 \pm 0,7650
M. urens	1485 \pm 980,1786	37,1 \pm 24,3559	3,07 \pm 1,2082

Tabela 3 = Média do número de frutos produzidos em três posições de inflorescências de *Mucuna japura* e *M. urens*.

Posição do fruto na inflorescência.	M. japura (n=51 infl.)	<i>M. urens</i> (n=79 infl.)
Apical	0,43	0,43
Mediana	0,47	0,47
Basal	0,41	0,37



**CAPÍTULO IV: “Microsporogenesis and pollen cytology in two *Mucuna* species
(Leguminosae, Faboideae)”**

Kayna Agostini

Eliana Regina Forni-Martins

Marlies Sazima

Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi

Short running title: Microsporogenesis and pollen cytology in *Mucuna*.

Author for correspondence: Kayna Agostini

Abstract

Microsporogenesis, chromosome number, meiotic behaviour and meiotic index were investigated in *Mucuna japura* and *M. urens*, two legume species, in order to ascertain whether pollen could limit fertilization events, once *M. japura* has a high rate of fruit and seed abortion. Flowers of both species have five long/glabrous and five short/hairy anthers. These anthers show different microsporogenesis development since, when the long/glabrous anthers are at tetrad phase, the short/hairy anthers present microspore mother cells in meiotic process. The microspore mother cells are vacuolated, with granulose cytoplasm, prominent nucleus and nucleolus and a callose wall. The chromosome number of both species is $n=11$, a number never reported previously. Tetrads are tetraedric with a thick callose wall. The meiotic index for both species is above 90.0. The most frequent abnormalities observed at the tetrad stage of both species were pentads, empty tetrads and irregular tetrads with cells of different sizes. Mature pollen grains are tricolpate, the exine sculpture is smooth and viability is 92.2% for *M. japura* and 97.8% for *M.urens*. Since microsporogenesis and pollen grain viability are normal, they are not related with the high rate of fruit and seed abortion of *M. japura*.

KEYWORDS: Chromosome number - fertilization success - meiotic abnormalities - microsporogenesis.

Introduction

As it is impossible to provide resources for all maturing fruits and seeds, plants are selected to abort those that contain embryos of lower genetic quality (Janzen 1977, Stephenson 1981, Bawa & Webb 1984). Fruits and seeds that are produced following strong pollen competition are most capable of reaching maturity because their pollen grains contain superior genotypes and are therefore more effective in fertilization (Janzen 1977).

Studies on early stages of microsporogenesis can indicate future male reproductive success for a taxon (Gibson & Diggle 1998, Ilarslan et al. 1999, Teixeira et al. 2002). Recently, abnormalities have been found in the division of sporogenous tissues, during both the meiotic process and tetrad separation (Loukides et al. 1995, Gibson & Diggle 1998, Ilarslan et al. 1999).

Low pollen quality has been commonly associated with irregularities of meiosis, as, for instance, asynapsis or aggregation of chromosomes to one or several poles, resulting in unbalanced microspores (Pell et al. 1997).

Responsible for microspore nutrition, tapetum cells have also been implicated in abortion, because they show certain anomalies in some stages of their cycle. Ilarslan et al. (1999) associated male sterility with rapid degenerative changes in both the tapetum and the parietal layer that prevent male cells from developing beyond the early tetrad stage.

During microspore maturation, problems in exine and intine development can also lead to pollen grain abortion (Kronstedt-Robards & Rowley 1989, Gibson & Diggle 1998).

Mucuna japura A. M. G. Azevedo, Agostini & Sazima and *M. urens* (L.) Medikus (Leguminosae, Faboideae, Phaseoleae) occur in the Brazilian Atlantic Forest. The former is restricted to Ubatuba, south-eastern Brazil, while the latter is more widely distributed, and

occurs even in Amazonia, northern Brazil. In their natural habitat, *M. japira* show low fruit and seed production, while *M. urens* produces vigorous fruits with more seeds. There are no records of microsporogenesis and pollen morphology for the genus. This study aims at investigating the pollen development and its cytology, since they might explain some of the questions involved in this study: How does the meiotic chromosome behave? Are these species meiotically stable? Does microsporogenesis occur in different periods in the two types of anthers? How does pollen grain develop? Are there abnormalities in the pollen and anther wall development? Is pollen release linked to male sterility?

Material and Methods

Both species were collected from natural populations in the State Park of Serra do Mar at Picinguaba (about 23° 20' S, 44° 52' W) in Ubatuba, São Paulo, south-eastern Brazil. Voucher of specimens were deposited at the Herbarium of the State University of Campinas (UEC 92288 and UEC 126881).

Developmental stages of pollen and anther tissue were examined from histological sections of anthers of a range of sizes. Serial sections were made after anther fixation in Karnovsky solution for 24h (Karnovsky 1965), gradual dehydration in an alcohol series and embedding in paraffin (Prakash 1986). The section thickness varied between 10 – 18µm. Safranin-Astra Blue was used to stain the sections (Prakash 1986), and permanent slides were mounted in Permaunt resin (Gerlach 1969).

Pollen and anther morphology was investigated with scanning electron microscopy. Anthers were preserved in FAA and stored in 70% alcohol, dissected in 95% alcohols, dehydrated in an ethanol-acetone series, and were then critical point dried in a Balzer's CPD 030 mounted on aluminium stubs and coated with gold in a Balzer's SCD 050 sputter

coater for 280s. Observations and photomicrographs were made with a Zeiss DSM 940 A scanning electron microscope at 10 kV.

Analyses of meiotic phases, meiotic index and chromosome number were performed on floral buds of several sizes, collected at different times of the day. Material was fixed in Carnoy (6:1:3 absolute alcohol – acetic acid – chloroform) for 24h and then stored in 70% alcohol. Temporary slides were prepared by squashing anthers in 1.2% aceto-carmin (Medina & Conagin 1964).

Meiotic indices [the number of normal tetrads/total number of cells] x 100 (Love 1949) were calculated from 200 tetrads per plant for each species (ten buds from ten inflorescences per individual). Five individuals of each species, collected in their natural habitat, were used. Tetrad shape and number were evaluated. The meiotic index for both species and for both anther types were compared using Duncan's Multiple Range Test (Zar 1996) using the program SAS system.

Results

Morphology

The flowers of both species present a vexillary free stamen and a staminal tube, where the proximal part of each filament is free. There are five long/glabrous and five short/hairy anthers (Figure 1A, one stamen of each anther type). The filaments of each anther group grow at different times: the filaments of the long/glabrous anthers grow before those of the short/hairy anthers (Figure 1B). The dehiscence of the anthers is longitudinal and precedes floral anthesis by three days. The long/glabrous anthers release their pollen first and the short/hairy anthers, then also opened, push all the pollen towards the keel apex,

due to the elongation process of their filaments. When flowers are in anthesis, the filaments of both anther types show almost the same length.

Development in anther

As the anthers release pollen at different times, the microsporogenesis development occurs as follows: once the long/glabrous anthers are in the tetrad phase, the short/hairy anthers still have microspore mother cells in the meiotic process.

Both types of anthers are two-locular, with a middle vascular bundle and four microsporangia (Figure 2A). All the anthers of each group develop synchronously within a flower.

Microspore mother cells are vacuolated, with granulose cytoplasm, a prominent nucleus and a callose wall (Figure 2B). At the beginning of meiosis, the microspore mother cell attains its maximum volume and acquires a more or less spherical shape, while the callose walls develop to their maximum thickness (Figure 2H arrow). Cytokinesis in microspore mother cells is simultaneous, resulting in microspore tetrads enveloped in a thick callose wall (Figure 2C arrow). After release from tetrads, microspores increase in size and develop a thick wall with small projections.

The tapetum is one layer thick, and its cells are uninucleate and glandular. These cells are more or less square or polygonal, with large nuclei (Figure 2D) and stain strongly (Figure 2E). The tapetum cells persist until meiosis, when they start to degenerate (Figure 2F).

The mature pollen grains are tricolpate, with large flat colpi (Figure 2F), and their exine sculpture is smooth (Figure 2G). Both species have a similar pollen grain

morphology, which is the same in the heteromorphic anthers, and pollen viability is 92.2% for *M. japira* and 97.8% for *M. urens*.

Analysis of meiosis

Several meiotic stages were observed: diakinesis, metaphase I and II, anaphase I and II and telophase II. The gametic chromosome number of both species is $n=11$. No meiotic irregularities were found before the tetrad stage (Figure 3A-D), although some bivalent chromosomes segregate before the others during metaphase I (Figure 3A-B). No abnormalities were recorded during the disjunction or during the other phases. The most frequent abnormalities observed for both species at tetrad stages were pentads, empty tetrads and irregular tetrads with cells of different sizes.

The average meiotic index of the long/glabrous anthers is higher than 90.0 for both species (Figure 4A), and that of the short/hairy anthers is higher than 90.0 except for one individual (J2) (Figure 4B). For this type of anthers, individuals of *M. japira* showed higher heterogeneity among the average of the individuals, but *M. urens* showed higher heterogeneity in individual values (Figure 4B).

The general tetrad meiotic index showed that individuals of *M. japira* are more heterogeneous than individuals of *M. urens*. One of the five individuals of *M. japira* presented a meiotic index value lower than 90% and all the individuals of *M. urens* had a meiotic index value higher than 90%. The meiotic index values of *M. japira* are not significantly different from those of *M. urens*, which indicates that both species are meiotically stable (Figure 4C).

The meiotic indexes comparing long/glabrous and short/hairy anthers within the same species were not significant for either species. In *M. japira*, $F = 0.51$, $p = 0.47$ and in

M. urens $F = 1.73$, $p = 0.1913$. The meiotic index comparing the glabrous anthers of both species and that comparing their hairy anthers were not significant, $F = 1.21$, $p = 0.2743$ and $F = 0.34$, $p = 0.5596$, respectively. A comparison of the general meiotic indexes of both species shows they were not significant $F = 1.42$, $p=0.2350$.

Discussion

Morphology

Different types of stamens and anthers are features of the genus *Mucuna*, which is probably derived from species that have pump mechanism of pollen presentation (Arroyo 1981). The different growing of the filaments is responsible for secondary pollen presentation (Yeo 1993), since pollen grain release occurs at bud phase.

Anther dehiscence at pre-anthesis stage means that pollen release cannot be considered a problem for either species, as has been described for male sterile lines of *Ocotea* by Gibson & Diggle (1998). According to these authors, the absence of thickenings in the endothecium cells can lead to male sterility because the non-dehiscent anthers prevent pollen release. Thickenings of endothecium at maturity are commonly found in legumes, as in *Dahlstedtia* (Teixeira et al. 2002) and are related to anther dehiscence (Prakash 1987).

Development in anther

The microsporogenesis of *M. japura* and *M. urens* is similar to that of other Faboideae, including tetrasporangiate anthers, glandular and uninucleated tapetal cells, simultaneous cytokinesis resulting in tetrahedral tetrads (Johansen 1950).

During the developmental stages of the anther vascular bundles, no anomalies were observed in *Mucuna*, and nutrient transportation is probably not a limiting factor in these species. Relationships between pollen sterility and abnormalities of anther vasculature have been reported, for example, in a sterile line of *Beta*, in which nutritional deficiency was due to reduced activity of the conducting strand in the anther (Bhandari 1984), while in *Sorghum* (Alam & Sandal 1967) and *Triticum* (Joppa et al. 1966), poorly developed stamen vasculature resulted in problems in nutrient transportation and inadequate accumulation of starch in the anther middle layers, tapetum and endothecium

During tapetum layer development, no anomalies were found in either species of *Mucuna*; their development follows the sequence described by Heslop-Harrison (1971). The morphology of the tapetum layer of these *Mucuna* species is similar to that of the *Dahlstedtia* species (Teixeira et al. 2002), and there is no evidence of hypertrophy of the tapetum cells, as has already been described for some *Erythrina* species (Cruz et al. 1976). Numerous investigations indicate that, through modified physical and physiological factors, the tapetum initiates the process of pollen abortion during the meiotic stage (Bhandari 1984). In *Capsicum* a change from a glandular to a plasmodial tapetum resulted in meiotic desynchronization of the pollen mother cells (Bhandari 1984). In *Erythrina corallodendron* and *E. sandwicensis*, sterility is related to the lack of degeneration of the tapetum layer (Cruz et al. 1976).

There are no anomalies in the development from the microspore mother cells stage to the pollen grain stage, especially considering the callose wall in the microspore mother cell and tetrad stages and in the mature pollen grain walls. Studies on the role of callose in the meiotic process of *Petunia* (Solanaceae) and *Tradescantia* (Commelinaceae) revealed that its premature dissolution, before the end of the meiotic process, is due to a precocious

increase in the activity of callase synthesis by the tapetum (Frankel et al. 1969), which is a result of a pH increase in the anther locule, leading to pollen sterility (Izhar & Frankel 1971). In some *Erythrina* species, sterility is also related to the variation in size of the mother cell and the presence of 2-4 nuclei in this cell (Cruz et al. 1976).

Histological comparisons of the microsporogenesis of *M. japura* and *M. urens* with previous studies of sterile lines in *Capsium*, *Lycopersicon* and *Petunia* (Solanaceae), *Sorghum* and *Triticum* (Poaceae) and *Dahlstedtia* and *Phaseolus* (Leguminosae) indicate that the two species of *Mucuna* do not show anomalies in their pollen grain development stages. In both species, the simultaneous events of tapetum and middle layer degeneration, premature dissolution of callose and pollen wall exine sculpture were constant in all the material examined. Investigations on the morphology, biochemistry and physiology related to the development of pollen and comparisons of microsporogenesis of non-economic species were not found in literature.

Analysis of meiosis

Chromosomal studies have revealed that most legume species have a base chromosome number $x=8$, and in most genera, this number is 11 (Goldblatt 1981) as recorded in *Mucuna*. The majority of tropical Faboideae have a base chromosome number between 10 and 12, and in most of the Phaseoleae tribe, this base number is 10 or 11. Tischler (1935) and Lackey (1980) noted the scarcity of polyploids in Phaseoleae and another feature detected by Faris (1964) and Fearing (1959) was that most chromosomes of this tribe are small, as in *Mucuna*. Erythrinae present no base number pattern, because the genera studied until now show different numbers. Prior to the present study, 14 *Mucuna* species (but seven were synonymous of *M. pruriens*) had been studied and $n=11$ and $2n=22$

were recorded. Two of these seven species showed polyploid individuals (Table 1). The chromosome numbers recorded for *M. japura* and *M. urens* are new for these species, but not for the genus. Another important remark is that these chromosome number values are the first ones to be reported for South American *Mucuna* species. The chromosome number of *M. urens* has recently been confirmed through mitotic analyses ($2n=22$) of individuals of the same population (Mata and Forni-Martins, unpubl. data)

Despite the tetrad anomalies indicated by pentads, empty tetrads and irregular tetrads with cells of different sizes, the analysis of the meiotic phases in both *Mucuna* species showed no problems of chromosome disjunction. Chromosome bridges, which could lead to pollen sterility, as in *Sesbania macrocarpa* (Zadoo 1984) and in the apomitic species of *Miconia fallax* and *M. stenostachya* (Goldenberg & Shepherd 1998) were not recorded.

The meiotic index of both species is similar to that of other Faboideae: nearly 97% in *Vigna* (Senff et al. 1992, Senff et al. 1995), 100% in *Arachis pintoii*, nearly 99% in *Desmodium* (Senff et al. 1995) and above 95% in *Adesmia* (Coelho & Battistin 1998).

The individuals of both *Mucuna* species were collected from natural populations, in Atlantic forest areas, suggesting that the environmental conditions may favour the microsporogenesis process or at least do not interfere in it. On the other hand, *Dahlstedtia pinnata* (Leguminosae, Faboideae) collected in the same site of the Atlantic forest presented low meiotic stability (Teixeira et al. 2002). In this case, environmental conditions could interfere in the microsporogenesis process.

The high rate of fruit abortion in *M. japura* is not related to problems in the anther development or in the meiosis process, differently from the three *Erythrina* species (Phaseolea, Erythrinae) studied by Cruz et al. (1976).

Taxonomic Considerations

Genus *Mucuna* includes perhaps 80 species of annual and perennial legumes but the chromosome number of only seven of them has been reported, generally $n=11$ (Table 1) (Goldblatt 1984, 1985, 1988, Goldblatt & Johnson 1990, 1991, 1994, 1997, 1998), except *Mucuna bennetti* and *M. gigantea*, with $n=11$ (Lackey 1980) and $n=14$ (Sastrapradja et al. 1974 apud Capo-chichi et al. 2001), respectively. *Mucuna* belongs to tribe Phaseoleae, subtribe Erythrinae. The chromosome number of Phaseoleae is generally $n = 10$ or $n = 11$, except for subtribe Erythrinae, where, since it varies between $n=9$ (*Spatholobus*) and 21 (*Erythrina*), it is an inconsistent taxonomic feature (Lackey 1980). The chromosome number thus corroborates the position of *Mucuna* in Phaseoleae, but its presence in subtribe Erythrinae should be investigated. In fact Erythrinae has been considered an unnatural group “subtribe of convenience” (Lackey 1981, Kajita et al. 2001, Lewis et al. 2005).

Mucuna present different forms of flower openings: explosive flowers in *M. japira* and *M. urens* ($n=11$ for both species) and non-explosive flowers in *M. bennetti* and *M. gigantea* ($n=14$ for both species). The genus *Strongylodon*, considered as *Mucuna*, also has non-explosive flowers and $n=14$ (Lackey 1980). Additionally, only the genus *Teramnus* (Phaseoleae) has $n=14$ (Lackey 1980). Recent cladistic analyses considered *Strongylodon* a sister group to Phaseolinae and Glycininae, where *Teramnus* is also included nowadays (Doyle et al. 2000, Kajita et al. 2001, Lewis et al. 2005).

Molecular evidence places *Mucuna* sister to tribe Desmodieae (Doyle et al. 2000, Kajita et al. 2001, Schrire 2005), in a different group of the Core-Phaseoleae *sensu strictu*. It is worth mentioning that, in these phylogenies, the analyses are based only on one or few genes, which does not allow to resolve all the issues by themselves, and the values of bootstrap and jackknife obtained are low (Kajita et al. 2001). Moreover, most phylogenetic

analyses are based on some species of the genera, which could provide a wrong positioning of some genera that need full revisions, as *Mucuna* (Schrire 2005).

Considering the morphological similarity, especially the floral one, and the chromosome data, additional studies are needed to evaluate the correct position and the phylogeny of *Mucuna* in relation to *Strongylodon*.

Acknowledgements

We thank Iara Bressan and Sebastião Henrique Militão for their technical assistance, the Instituto Florestal for its logistical support and opportunity to work at the Parque Estadual da Serra do Mar, Picinguaba; and CNPq and FAPESP for their financial support.

References

- Alam S & Sandal PC 1967 Relationships among free amino acids in male-sterile and male-fertile sudan grass *Sorghum vulgare* var. *sudanense*. *Bangl. J. Bot.* **1**: 199-204.
- Arroyo MTK 1981 Breeding systems and pollination biology in Leguminosae, In *Advances in legume systematics. Part 2* pp. 723 – 769 eds RM Polhill & PH Raven (Royal Botanic Garden: Kew, U.K.).
- Bairiganjan GC & Patnaik SN 1989 Chromosomal evolution in Fabaceae. *Cytologia* **54**: 51-64
- Bawa KS & Webb CJ 1984 Flower, fruit, and seed abortion in tropical forest trees: implications go to evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *Am. J. Bot.* **71**: 736-751.

- Bhandari NN 1984 The microsporangium, In *Embryology of angiosperms* pp. 53-121 ed BM Johri (Springer-Verlag: Berlin, Germany).
- Bir SS & Kumari S 1981 Evolution in certain legume genera from north Indian plains. *Proceeding of 3rd Indian Congress of Cytology and Genetics* **3**: 493-499.
- Capo-chichi LJA, Weaver DB & Morton CM 2001 AFLP assessment of genetic variation among velvetbean (*Mucuna* sp.) accessions. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 1180-1188.
- Coelho LGM & Battistin A 1998 Meiotic behaviour of *Adesmia* DC. (Leguminosae-Faboideae) species native to Rio Grande do Sul, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* **21**: 403-406.
- Cruz ND, Ungaro MRG & Medina DM 1976 Observações citológicas em três espécies de *Erythrina* L. *Bragantia* **35**: 133-139.
- Datta PC & Saha N 1973 Karyology of tribe Phaseoleae (Papilionaceae). *Genet. Iber.* **25**: 37-72.
- Doyle JJ, Chappill JA, Bailey CD & Kajita T 2000 Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data, In *Advances in legume systematics. Part 9* pp 1-20 eds PS Herendeen & A Bruneau (Royal Botanic Garden: Kew, U.K.).
- Faris DG 1964 The chromosome number of *Vigna sinensis* (L.) Savi. *Can. J. Genet. Cytol.* **6**: 255-258.
- Fearing OS 1959 A cytotaxonomic study of the genus *Cologania* and its relationship to *Amphicarpaea* (Leguminosae-Papilionoidae). Ph.D thesis. University of Texas, Austin.
- Frahm-Leliveld JA 1953 Some chromosome number in tropical leguminous plants. *Euphytica* **2**: 46-48.

- Frahm-Leliveld JA 1957 Observations cytologique sur quelques Legumineuses tropicales et subtropicales. *Rev. Cytol. Biol. Vég.* **18**: 273-287.
- Frankel R, Izhar S & Nitsen J 1969 The timing of callose activity and cytoplasmic male sterility in *Petunia*. *Biochem. Genet.* **3**: 451-455.
- Gerlach D 1969 *Botanische Mikrotechnik* (Georg. Thieme Verlag: Stuttgart, Germany).
- Gibson PJ & Diggle PK 1998 Flower development and male sterility in *Ocotea tenera*. *Int. J. Plant. Sci.* **159**: 405-417.
- Gill BS, Bir SS, Sidhu MS & Singhal VK 1984 Chromosome number reports LXXXIV. *Taxon* **33**: 536-539.
- Goldenberg R & Shepherd GJ 1998 Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in 'cerrado' vegetation. *Plant. Syst. Evol.* **211**: 13-29.
- Goldblatt P 1981 Cytology and the phylogeny of Leguminosae, In *Advances in legume systematics. Part 2* pp 427-463 eds RM Polhill & PH Raven (Royal Botanic Gardens: Kew, U. K.).
- Goldblatt P 1984 Index to plant chromosome numbers 1975-78. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **8**.
- Goldblatt P 1985 Index to plant chromosome numbers 1982-83. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **13**.
- Goldblatt P 1988 Index to plant chromosome numbers 1984-85. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **23**.
- Goldblatt P & Johnson DE 1990 Index to plant chromosome numbers 1986-87. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **30**: 90.
- Goldblatt P & Johnson DE 1991 Index to plant chromosome numbers 1988-89. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **40**.

- Goldblatt P & Johnson DE 1994 Index to plant chromosome numbers 1990-91. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **51**.
- Goldblatt P & Johnson DE 1997 Index to plant chromosome numbers 1992-94. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **61**.
- Goldblatt P & Johnson DE 1998 Index to plant chromosome numbers 1994-95. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **69**.
- Hardas MW & Joshi AB 1954 A note on the chromosome number of some plant. *Indian J. Genet. Pl. Br.* **14**: 47-49.
- Heslop-Harrison J 1971 *Pollen: development and physiology* (Butterworth & Co: London, England).
- Huang SF, Chen ZY, Chen SJ, Huang XX, Qi QY & Shi XH 1986 Plant chromosome count (3). *Subtr. For. Sci. Technol.* **4**: 50-56.
- Huang SF, Zhao ZF, Gu DX, Chen ZY & Huang XX 1987 Report on chromosome numbers of some species in Papilionaceae. *J. Nanjing Agri. Univ.* **1**: 12-17.
- Ilarslan H, Horner HT & Palmer RG 1999 Genetics and cytology of a new male-sterile, female-fertile soybean mutant. *Crop Sci.* **39**: 58-63.
- Izhar S & Frankel R 1971 Mechanism of male-sterility in Petunia I. The relationship between pH, callase activity in the anthers and the breakdown of microsporogenesis. *Theor. Appl. Genet.* **41**: 104-108.
- Janzen DH 1977 A note on optimal mate selection by plants. *Am. Nat.* **111**: 365-371.
- Johansen DA 1950 *Plant embryology: embryogeny of Spermatophyta* (Chronica Botanica Co, Waltham).
- Joppa LR, McNeal FH & Walsh JR 1966 Pollen and anther development in cytoplasmic male sterile wheat *Triticum aestivum*. *Crop Sci.* **6**: 296-297.

- Kajita T, Ohashi H, Tateishi Y, Bailey CD & Doyle JJ 2001 rbcL and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and Allies. *Syst. Bot.* **26**: 515-536.
- Karnovsky MJ 1965 A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**: 137A-138A.
- Kishikawa H 1954 On the chromosome number of *Mucuna hassjoo*, *Piper* and the artificial tetraploid. *Agric. Bull. Saga Univ.* **2**: 59-62.
- Kronstedt-Robards EC & Rowley JR 1989 Pollen grain development and tapetal changes in *Strelitzia reginae* (Strelitziaceae). *Am. J. Bot.* **76**: 856-870.
- Lackey JA 1980 Chromosome number in the Phaseoleae (Fabaceae: Faboideae) and their relation to taxonomy. *Am. J. Bot.* **67**: 595-602.
- Lackey JA 1981 Phaseoleae, In *Advances in legume systematics. Part 1* pp 301-327 eds RM Polhill & PH Raven (Royal Botanic Gardens: Kew, U.K.).
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B & M Lock 2005 *Legumes of the World*. (Royal Botanic Garden: Kew, U.K.).
- Loukides CA, Broadwater AH & Bedinger PA 1995 Two new male-sterile mutants of *Zea mays* (Poaceae) with abnormal tapetal cell morphology. *Am. J. Bot.* **82**: 1017 – 1023.
- Love RA 1949 Estudos Citológicos Preliminares de Trigos Riograndenses. *Circular 74*, Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Medina DM & Conagin CHTM 1964 *Técnica citológica* (Editora do Instituto Agrônômico: Campinas, Brasil).
- Peel MD, Carman ZWL & Wang RRC 1997 Meiotic anomalies in hybrids between wheat and apomitic *Elymus rectisetus*. *Crop Sci.* **37**: 717 – 723.
- Prakash N 1986 *Methods in plant microtechnique* (The University of New England: Armidale, Australia)

- Prakash N 1987 Embryology of the Leguminosae, In *Advances in legume systematics. Part 3* pp 241-278 ed CH Stirton (Royal Botanic Gardens: Kew, U.K.).
- Sampath S & Ramanathan K 1949 Chromosome numbers in Indian economic plants III. *Curr. Sci.* **18**: 408-409.
- Sanjappa M & Dasgupta A 1977 IOPB chromosome number reports LVI. *Taxon* **26**: 257-274.
- Sastrapradja S, Sastrapradja D, Aminah SH, Lubis I & Idris S 1974 Morphological and cytological investigations on some species. *Ann. Bogor.* **5**: 173-177.
- Senff MI, Hickenbick MCM & Paim NR 1992 Cytogenetic studies in species of the genus *Vigna* Savi (Leguminosae-Papilionoideae). *Rev. Bras. Genet.* **15**: 407-418.
- Senff MI, Schifino-Wittmann MT & Paim NR 1995 Cytogenetic studies of populations of *Arachis*, *Desmodium* and *Vigna* species (Leguminosae-Papilionoideae) from Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Genet.* **18**: 629-631.
- Stephenson AG 1981 Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **12**: 253-279.
- Teixeira SP, Forni-Martins ER & Ranga NT 2002 Development and cytology of pollen in *Dahlstedtia* Malme (Leguminosae: Papilionoideae). *Bot. J. Linn. Soc.* **138**: 461-471.
- Thombre MV 1958 Interspecific hybridization between *Mucuna pruriens* D. C. and *Mucuna cochinchinensis* A. Chev. *Curr. Sci.* **27**: 498-499.
- Thombre MV 1959 Chromosome numbers in some common flowering plants. *Curr. Sci.* **28**: 206-207.
- Thuan NV 1975 Contribution à l'étude caryo-taxinomique de Phaseolées. *Rev. Gen. Bot.* **82**: 157-214.

Tischler G 1935 Die Bedeutung der Polyploide für die Verbreitung der Angiospermen. *Bot.*

Jahrb. Syst. **67**: 1-36.

Yeo PF 1993 *Secondary Pollen Presentation: Form, Function and Evolution* (Springer-

Verlag: Wien, Austria).

Zadoo SN 1984 Cytogenetic observations on a monosomic in *Sesbania macrocarpa* Muhl.

(Leguminosae). *Experientia* **40**: 1414.

Zar JH 1996 *Biostatistical analysis* (Prentice Hall: New Jersey, USA).

Legends

Figure 1 A-B – External morphology of both types of anthers in two *Mucuna* species. **A.** Long/glabrous and short/hairy anthers of *M. japura*, showing longitudinal dehiscence. **B.** The filaments of *M. japura* have different length during bud phase. The filaments with long/glabrous anthers grow before those with short/hairy anthers.

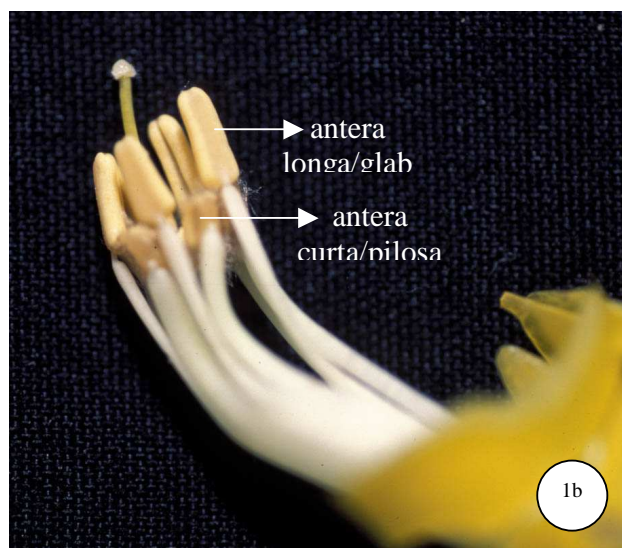
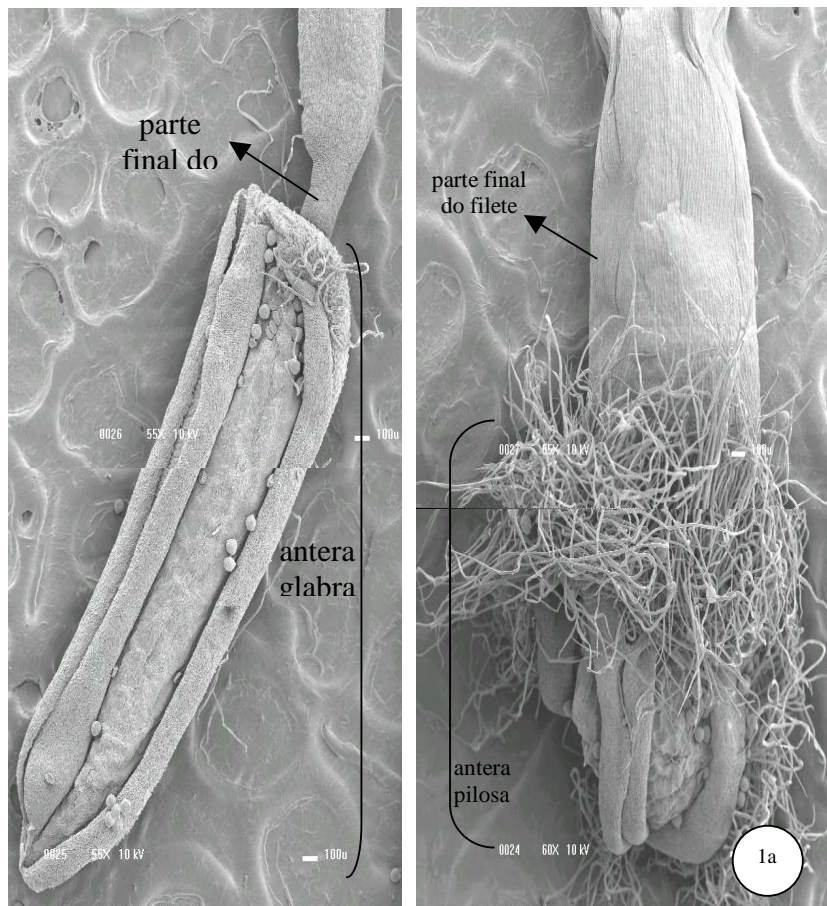
Figures 2 A-H – Microsporogenesis. Transverse sections. **A and H** *M. urens*; **B-G**, *M. japura*. **A.** Two-locular and tetrasporangiate anther with a vascular bundle (arrow); **B.** Microspore mother cell; **C.** Tetrads (arrow); **D.** Microsporangia with tapetal layer and glandular cells that do not start the secretory phase (arrow); **E.** Microsporangia and secretory tapetum cells (arrow); **F.** Tricolpate pollen grain and degeneration of the tapetal layer. In this phase pollen grains are one-nucleate; **G.** Pollen grain with sculptures in the exine layer; **H.** Microspore mother cell in meiotic process. Scale bars: Figs B and H = 15 μm ; Fig G = 20 μm ; Fig F = 25 μm ; Fig C = 30 μm ; Figs D and E = 40 μm ; Fig A = 50 μm .

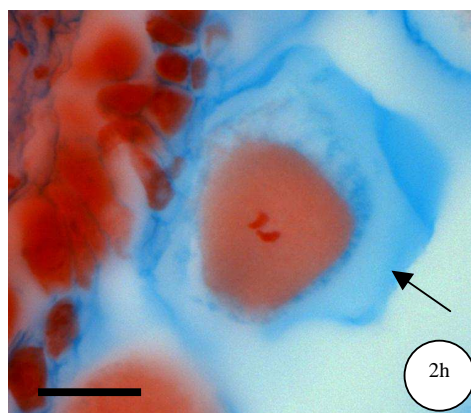
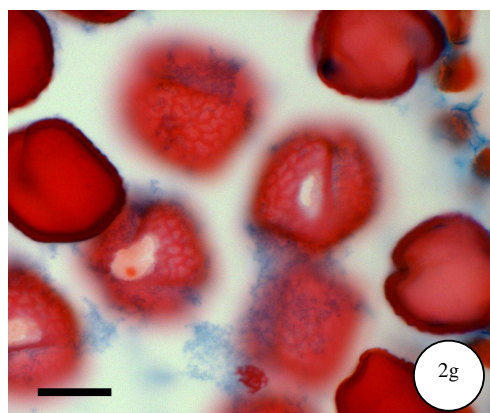
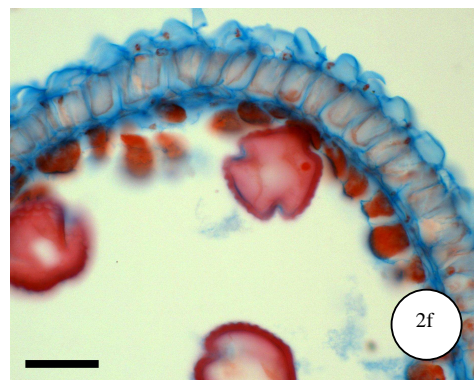
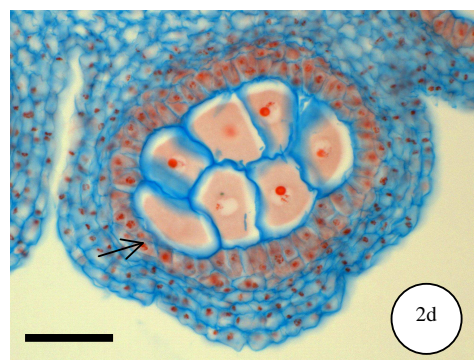
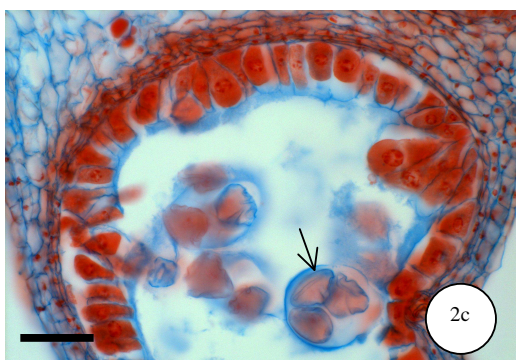
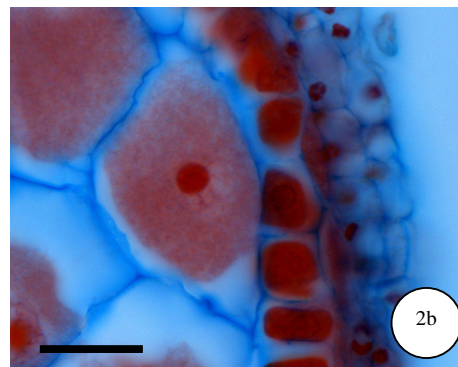
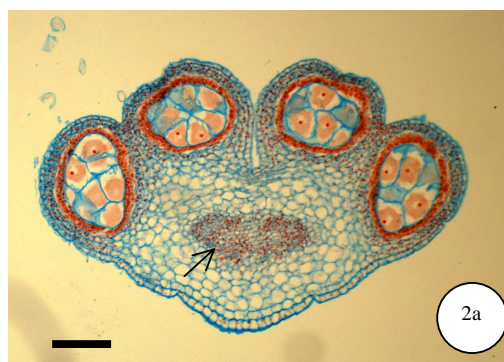
Figures 3 A-D – Meiosis in *M. japura*, **A-B.** Metaphase I; both figure show two bivalent chromosome with precocious separation **C.** Anaphase I; **D.** Telophase II. Scale bars: Figs A and B = 10 μm ; Fig C = 20 μm ; Fig D = 35 μm .

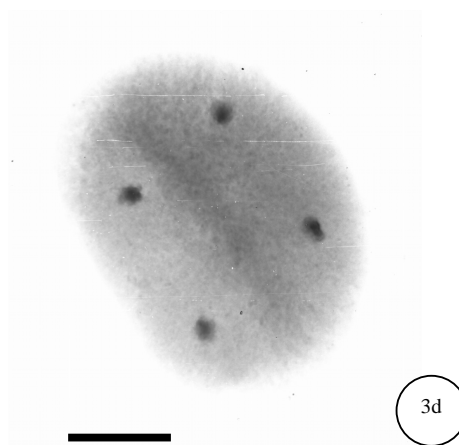
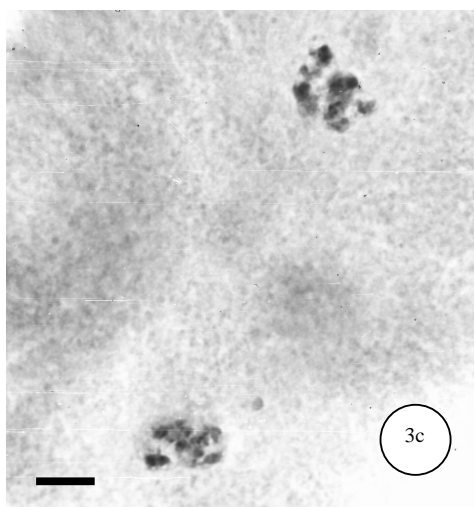
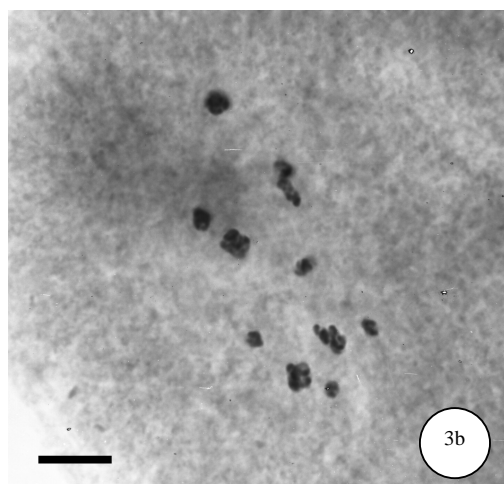
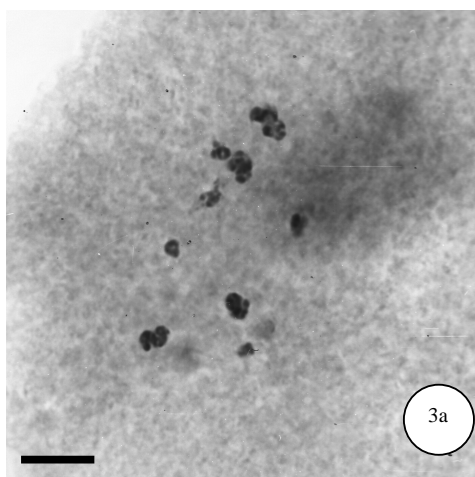
Figure 4 A-C – Meiotic index of both species of *Mucuna*. **A.** Meiotic index of long/glabrous anthers. J = *M. japura* individuals and U = *M. urens* individuals. **B.** Meiotic index of short/hairy anthers. J = *M. japura* individuals and U = *M. urens* individuals. **C.** Meiotic index independently of anther type. J = *M. japura* individuals and U = *M. urens* individuals.

Table 1 – *Mucuna* species with the accepted names, chromosome numbers, geographical records and references.

<i>Mucuna</i> species	Accepted name (Bisby et al. 2002)	Chromosome numbers		Geographical records	References
		n	2n		
<i>M. aterrima</i>	<i>M. pruriens</i>	-	22		Frahm-Leliveld (1957)
<i>M. cochinchinensis</i>	<i>M. pruriens</i>	-	22		Hardas & Joshi (1954), Thombre (1958)
<i>M. deeringiana</i>	<i>M. pruriens</i>	-	22	Africa, Australia, Asia, Central	Datta & Saha (1973)
<i>M. prurita</i>	<i>M. pruriens</i>	11	22	América, North	Sanjappa & Dasgupta (1977)
<i>M. hirsuta</i>	<i>M. pruriens</i>	11	-	América	Gill et al. (1984)
<i>M. nivea</i>	<i>M. pruriens</i>	11	22		Bairiganjan & Patnaik (1989)
<i>M. hassjoo</i>	<i>M. pruriens</i>	11	22 / 44		Kishikawa (1954)
<i>M. pruriens</i>	<i>M. pruriens</i>	-	22		Sampath & Ramanathan (1949), Frahm-Leliveld (1953)
<i>M. monosperma</i>	<i>M. monosperma</i>	-	22	Asia	Thombre (1959), Thuan (1975)
<i>M. benettii</i>	<i>M. benettii</i>	11 / 14	22	Asia, Australia	Thuan (1975), Sastrapradja et al. (1974)
<i>M. imbricata</i>	<i>M. imbricata</i>	-	22	Asia	Thuan (1975)
<i>M. nigricans</i>	<i>M. nigricans</i>	-	22	Asia	Bir & Kumari (1978)
<i>M. sempervirens</i>	<i>M. sempervirens</i>	-	22 / 44	Asia	Huang et al. (1986, 1987)
<i>M. gigantea</i>	<i>M. gigantea</i>	11 / 14	-	Africa, Asia, Australia	Sastrapradja et al. (1974)







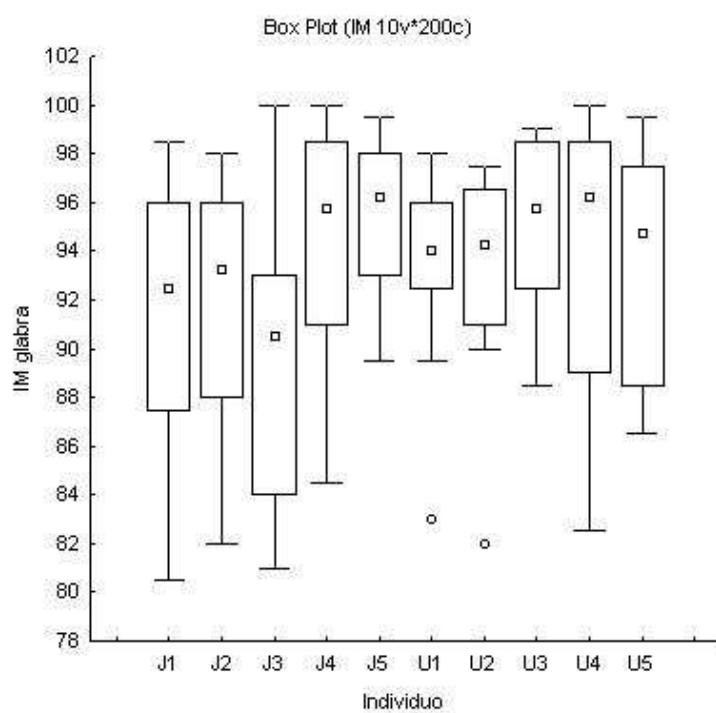


Figure 4A

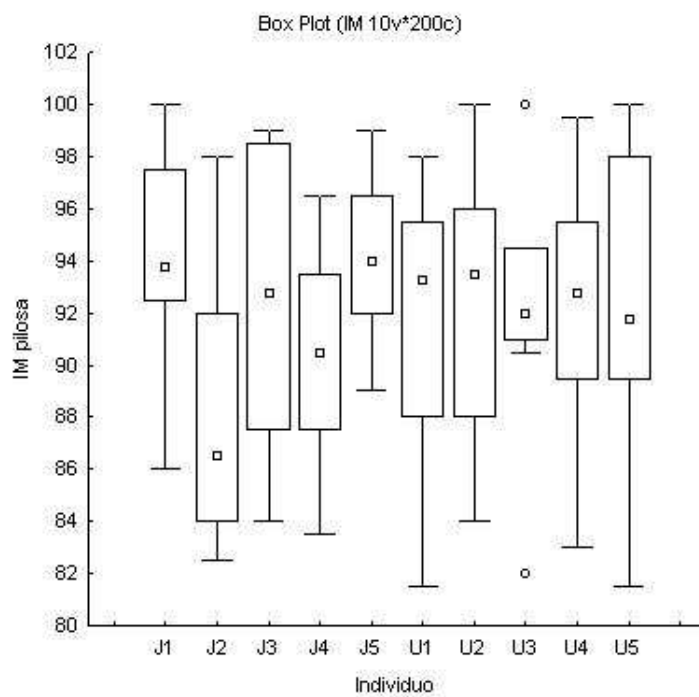


Figure 4B

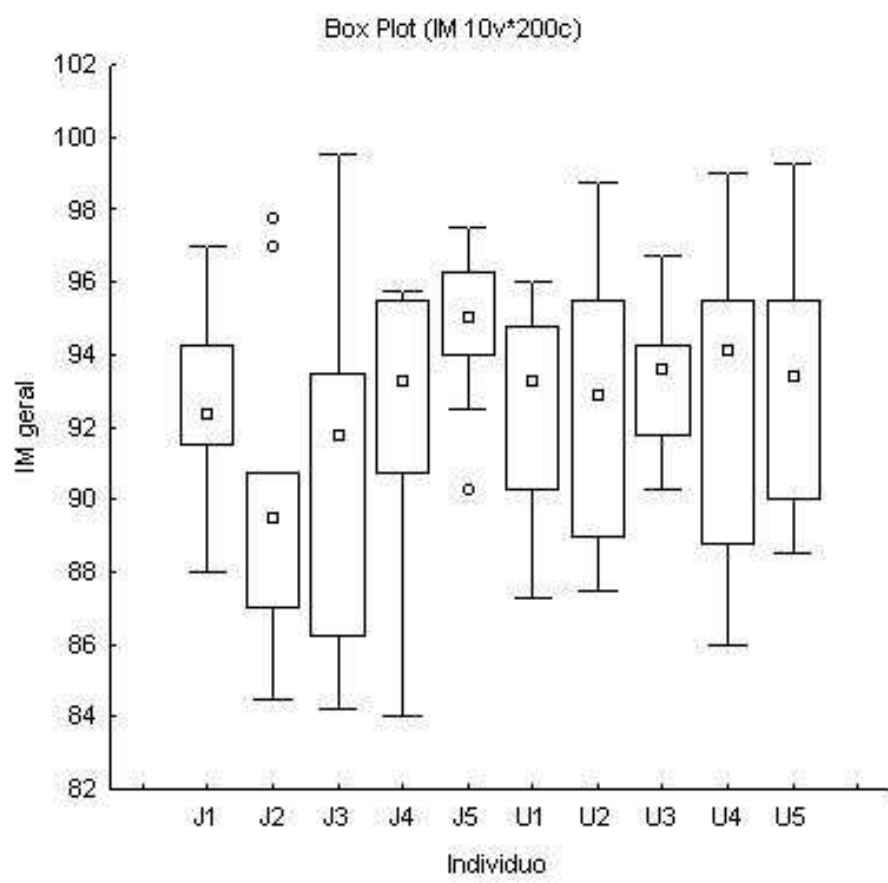


Figure 4C

CAPÍTULO IV: “Aspectos da embriologia e suas implicações na limitação de recursos maternos e no aborto de frutos e sementes em duas espécies de *Mucuna* Adans (Leguminosae, Faboideae)”

Kayna Agostini

Profa Dra. Marlies Sazima

Profa Dra. Simone de Pádua Teixeira

Introdução

Na maioria das Angiospermas poucas flores produzem frutos e sementes (Lloyd, 1980; Stephenson, 1981; Bawa & Webb, 1984). A regulação desta taxa é feita através do aborto de flores, óvulos e sementes, o que possibilita o ajuste no suprimento dos recursos maternos para a progênie, maximizando o sucesso reprodutivo da espécie (Briggs et al. 1987). Segundo Lersten (2004) há três explicações para que óvulos sejam abortados em diferentes estádios de desenvolvimento: 1) grande quantidade de óvulos é produzida; 2) alguns acidentes podem ocorrer durante o desenvolvimento do óvulo e a fertilização; 3) alguns óvulos são programados para abortar. Akhalkatsi et al. (1999) ainda sugerem que o aborto de frutos e sementes pode ser causado pela influência de predadores, patógenos e fatores abióticos desfavoráveis.

As plantas são selecionadas para abortar os embriões de baixa qualidade genética, pois são incapazes de fornecer recursos para todos os frutos e as sementes que são produzidos (Stephenson, 1981; Bawa & Webb, 1984). O aborto, no entanto, tem sido

considerado uma anomalia e não um processo adaptativo, resultando numa carência de estudos embriológicos a respeito (Briggs et al. 1987).

O estudo da morfologia e do desenvolvimento do óvulo antes, durante e após a fertilização, tem contribuído para o conhecimento da expressão do aborto de frutos e sementes nas Angiospermas. Plantas com altas taxas de aborto apresentam anormalidades no desenvolvimento do saco embrionário, do embrião e do endosperma (Pimienta & Polito 1983, Rim et al. 1990, Palupi & Owen 1997, Arathi et al. 1999, Sage et al. 1999), além de ausência de secreção micropilar no momento da penetração do tubo polínico (Herrero & Arbeloa 1989) e mudanças em alguns tecidos ovulares, como por exemplo, deposição de calose e lignina na região vascular (Briggs et al. 1987, Vishnyakova, 1991).

A nutrição dos óvulos e das sementes pode ser um dos principais fatores que ocasionam o aborto de frutos e sementes (Johri & Ambegaokar 1984). Para tanto, os óvulos possuem um aparato vascular funicular bem desenvolvido que, durante a maturação da semente, torna-se diferenciado. Além da vascularização há alguns tipos de haustório que absorvem e transportam nutrientes dos tecidos adjacentes para o endosperma e embrião (Johri & Ambegaokar 1984). Os haustórios podem ser provenientes dos megásporos, do saco embrionário, das sinérgides, das antípodas, do endosperma, do embrião ou suspensor. Os haustórios apresentam núcleos hipertrofiados e citoplasma denso (Johri & Ambegaokar 1984). Sinérgides haustoriais eram desconhecidas para monocotiledôneas e extremamente raras em dicotiledôneas (David 1966).

Em Leguminosae pouco se entende sobre a influência de processos embriológicos no aborto de frutos e sementes (Teixeira et al. 2001). Dentro da subfamília Faboideae, estudos embriológicos enfocando o aborto de frutos são raros (Teixeira et al. 2001,

Rodrigues-Riaño et al. 2006). A maioria dos estudos apenas realiza a descrição do processo de megasporogênese, megametogênese e início da embriogênese, não relacionando estes processos com a reprodução das espécies (Prakash 1987, Moço & Mariath 2003).

Mucuna japura ocorre em áreas restritas da Mata Atlântica do Estado de São Paulo, mais especificamente, no município de Ubatuba, enquanto *M. urens* possui distribuição mais ampla, ocorrendo inclusive em outros ecossistemas como a Amazônia (Ribeiro et al. 1999). Ambas as espécies são lianas, com flores papilionáceas dispostas em inflorescências pseudo-racemosas, contendo 12-15 e 36-54 flores, respectivamente em *M. japura* e *M. urens* (Tozzi et al. 2005, Agostini et al. 2007). Os frutos e sementes de *M. japura*, raramente completam o desenvolvimento e são abortados em diferentes fases, mas os frutos e semente de *M. urens* completam o desenvolvimento, gerando sementes que germinam.

O objetivo deste estudo é comparar aspectos da embriologia de duas espécies de *Mucuna* da Floresta Atlântica, a fim de verificar a ocorrência de anormalidades em seus processos reprodutivos. As características embriológicas aqui descritas também poderão ser discutidas sob aspecto taxonômico e filogenético para o grupo.

Material e Métodos

O desenvolvimento do óvulo, do saco embrionário e alguns eventos pós-fertilização foram estudados em botões florais, flores em antese e frutos nos estádios iniciais de desenvolvimento em *M. japura* e *M. urens*. As coletas foram realizadas em indivíduos de populações naturais no Parque Estadual da Serra do Mar em Pinciguaba, Ubatuba. Além disso, pistilos foram polinizados manualmente com grãos de pólen provenientes do mesmo indivíduo e de indivíduos de populações diferentes da mesma espécie, e coletados 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a polinização (Radford et al. 1974). Todos estes materiais foram

fixados em solução de Karnovsky por 24h (Karnovsky 1965) e estocados em álcool 70%. Os tricomas lignificados do ovário foram retirados com auxílio de pinça, para não prejudicarem a inclusão e o seccionamento. Após, foram submetidos à desidratação butílica gradual, incluídos em parafina (Gerlach 1969), seccionados em cortes seriados (10-16µm), corados com Safranina e Azul de Astra e montados em resina sintética Permount (Gerlach 1969). Fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio OlympusBX50 acoplado a uma câmera digital.

Resultados

Estilete e Estigma

O estilete possui um canal interno que ocupa grande parte do seu comprimento e este canal é revestido por uma camada epitelial não diferenciada (Figura 1-2, seta). No ápice do estilete há uma região sólida, formada por várias camadas de células, que conecta o estigma ao canal do estilete (Figura 3). O estigma é multisseriado e multicelular (Figura 4, seta) e em flores em antese é coberto por uma cutícula espessa, que ao ser rompida, libera o exsudato estigmático essencial para a germinação do pólen.

Desenvolvimento do óvulo até formação do saco embrionário

Em ambas as espécies ocorrem cinco óvulos, que se desenvolvem simultaneamente (Figura 2). Quando maduros são anátropos (Figura 11a) e bitegmentados (Figura 7-8, seta). O óvulo é originado como uma pequena protuberância da placenta marginal. No óvulo podemos reconhecer três zonas (I, II e III), assim é possível caracterizá-lo como trizonado (Figura 5, seta). Na camada dérmica (zona I) e na subdérmica (zona II) foram

observadas apenas divisões periclinais e no tecido adjacente à camada subdérmica (zona III) não há padrão regular de divisões celulares.

Nestas espécies, o megasporângio (nucelo nas angiospermas) desenvolve-se na porção apical do óvulo. No interior do nucelo, uma célula subdérmica na extremidade micropilar torna-se uma inicial arqueosporial (Figura 6). Há várias camadas de células entre a epiderme nucelar e a célula esporogênica, determinando uma posição mais aprofundada da célula esporogênica, sendo o óvulo denominado crassinucelado (Figura 7).

No início da megasporogênese células da camada subdérmica entram diretamente em processo de diferenciação pré-meiótica, isto é, tornam-se células arqueosporiais, apresentando citoplasma denso e núcleo proeminente (Figura 7). Uma das células torna-se célula mãe-de-megáspero, que é alongada, com citoplasma microvacuolado na porção calazal e com um núcleo proeminente na porção micropilar (Figuras 8-9, seta).

Tanto em *M. japura* como em *M. urens* ambos os tegumentos se diferenciam simultaneamente na fase de células esporogênicas (Figura 7, seta). O tegumento interno tem origem subdérmica e é composto por duas camadas de células (Figura 7, seta). O tegumento externo é de origem dérmica e é multisseriado (5-6 camadas de células) (Figura 7, seta). O tegumento externo se desenvolve mais rapidamente, envolvendo o tegumento interno. Assim a região micropilar é formada apenas pelo tegumento externo (Figura 8, seta).

Neste estudo conseguimos observar a primeira divisão meiótica da célula mãe-do-megáspero (Figura 9), e para ambas espécies de *Mucuna* apenas um saco embrionário é encontrado em cada óvulo (Figura 10). Este possui sete células e oito núcleos, derivados de um único megáspero, distribuídos em uma oosfera: duas sinérgides, uma célula central binucleada e três antípodas.

Cada sinérgide apresenta um aparato filiforme, citoplasma densamente corado e núcleo micropilar proeminente (Figura 11e, 12d). A oosfera apresenta núcleo calazal proeminente. A célula central apresenta dois núcleos polares que se fundem para formar o núcleo secundário antes da fecundação (Figura 11e).

No momento em que a célula mãe-do-megásporo sofre a primeira divisão meiótica, os grãos de pólen já estão maduros e o tegumento externo do óvulo, por meio de divisões anticlinais, já se expandiu em torno de quase todo o nucelo.

Quando as flores estão em antese, o saco embrionário já está alongado e possui as sete células, mas este período não é simultâneo nos óvulos do mesmo ovário (Figura 10).

Em ambas as espécies o nucelo não recobre totalmente o saco embrionário, sendo que a maior parte da região calazal do saco embrionário não é recoberta. Em *M. urens* este tecido aparentemente recobre mais o saco embrionário (Figura 10, 12a, 12b) e suas células possuem maior quantidade de grãos de amido (Figura 12h) do que em *M. japira*.

Desenvolvimento do óvulo após dupla fertilização em polinização cruzada

Mucuna japira

Decorridas seis horas após a polinização cruzada manual, poucas alterações no saco embrionário desta espécie são verificadas. A micrópila é extremamente fechada e aparentemente sem secreção (Figura 11a). O endotélio (camada mais interna do tegumento interno, em relação ao saco embrionário) recobre todo o nucelo e também a porção do saco embrionário que não é revestida pelo nucelo (Figura 11b-d). Os núcleos da célula central já estão fundidos (Figura 11e).

No tratamento de 48h após polinização cruzada manual é verificada a presença do zigoto, que possui núcleo calazal e vacúolo na região micropilar e parede celular espessa

(Figura 11f, seta). Mesmo após a formação do zigoto, as sinérgides persistem (Figura 11f). Nesta fase é observada a presença de grãos de amido em provável associação com compostos fenólicos nas células da região da micrópila e no tegumento interno (Figuras 11f-h). Nesta fase podemos observar a presença de núcleos endospermicos em divisão (Figura 11g).

Após 96h de polinização cruzada manual, ainda ocorre presença de grãos de amido em associação com compostos fenólicos nas células da região da micrópila e também notamos a presença de embrião em processo de degeneração (Figura 11h, seta). Nesta fase também é verificada a presença de núcleos endospermicos. Aparentemente a região nucelar sofre um isolamento proporcionado pela deposição de calose.

Mucuna urens

Após seis horas do tratamento de polinização cruzada, é verificado que a micrópila encontra-se mais aberta e com secreção (Figura 12a, seta), o nucelo recobre parte do saco embrionário, mas não foi evidenciada a associação da parede da célula média do saco embrionário com as paredes das células endoteliais, característica que ocorre em *M. japira* (Figura 12a).

Com 12h de polinização cruzada manual, foram verificadas células digitiformes do nucelo recobrando parte do saco embrionário (Figura 12b), um zigoto, com núcleo bem proeminente e com grãos de amido, sinérgides e núcleo endospermico (Figuras 12c-e).

Decorridas 72h após a polinização cruzada manual, as sinérgides assumem um papel haustorial, penetrando nos tegumentos interno e externo em direção a micrópila. Neste estágio ainda são observados os núcleos e o aparelho filiforme das sinérgides (Figura 12f).

Após 96h de polinização cruzada manual, as sinérgides já alcançaram o tegumento externo, o nucelo possui células em paliçada e já apresenta sinais de degeneração (Figuras 12g-h). Nas células do nucelo ocorre grande quantidade de grãos de amido e, aparentemente, a região nucelar sofre um isolamento proporcionado pela deposição de calose (Figura 12h).

Desenvolvimento do endosperma

O desenvolvimento do endosperma é do tipo nuclear para ambas as espécies de *Mucuna*. O núcleo endospermico primário divide-se originando dois núcleos livres. Após divisões sucessivas, os núcleos livres no citoplasma estão distribuídos por toda cavidade do saco embrionário.

Discussão

Estilete e Estigma

Para o canal interno do estilete destas espécies de *Mucuna* pode ser atribuída a denominação de lúmen (Endress 1994). Ainda, este tipo de estilete é classificado por Endress (1994) como tendo lúmen e superfície interna grandes. A maioria das Faboideae possui uma cavidade na porção central do estilete originada de forma lisogênica, mas uma porção sólida permanece logo abaixo do estigma (Endress 1994).

O estigma de ambas as espécies de *Mucuna* possui superfície úmida no período de antese, atributo que ocorre na maioria das angiospermas (Endress, 1994). Segundo Heslop-Harrison (1981) estigmas com superfície úmida possuem papilas receptoras que são secretoras, mas a estrutura anatômica das espécies de *Mucuna* estudadas mostra apenas a presença de células organizadas radialmente que nesta fase não apresentam secreção.

Desenvolvimento do óvulo e formação do saco embrionário.

Em Leguminosae os óvulos podem variar de anátropo, hemianátropo e campilótropo, sendo que em todas as espécies, os óvulos são bitegmentados (Prakash 1987). Para *Mucuna bennetti*, que foi estudada embriologicamente, verificou-se que os óvulos são bitegmentados e campilótropos (Hutomo 1967), diferenciando das espécies de *Mucuna* aqui estudadas cujos óvulos são bitegmentados e anátropos.

Bouman (1974, 1984) comparou a organização celular do primórdio do óvulo à estrutura de túnica e corpo, semelhante ao de ápices caulinares. Em geral, há uma correlação entre o tipo de óvulo e a dimensão final da semente, pois óvulos de origem trizonada apresentam um potencial ontogenético maior, dando origem a óvulos maiores, com funículos, rafes e nucelos bem desenvolvidos, em comparação aos bizonados (Mariath et al. 2003). Óvulos trizonados estão amplamente distribuídos em famílias consideradas basais, sendo os bizonados um estado de caráter derivado (Mariath et al. 2003). Segundo Moço & Mariath (2003), apenas uma espécie de legume foi estudada sob este aspecto (*Adesmia latifolia*) e mais investigações comparativas seriam necessárias para elucidar relações filogenéticas entre as subfamílias de Leguminosae.

Em Leguminosae a seqüência de desenvolvimento dos tegumentos é extremamente variável. Em algumas espécies, como *Adesmia latifolia*, *Medicago sativa*, *Trifolium pratense* e *Vicia americana*, o tegumento externo se desenvolve antes do interno (Martin, 1914), aspecto também observado nas duas espécies de *Mucuna*, enquanto que em outros taxa o tegumento interno desenvolve primeiro (Cooper, 1933; Pantulu, 1945; Smith, 1956; Lim & Prakash, 1994).

Outros caracteres são importantes, particularmente para Leguminosae, como o número de camadas de células em cada tegumento e a participação dos tegumentos na

formação da micrópila. Duas camadas de células no tegumento interno e várias camadas no tegumento externo é o padrão na maioria das Leguminosae (Cooper, 1933; Ashrafunnisa & Pullaiah, 1994, 1999), e também ocorre em ambas as espécies de *Mucuna*.

Óvulos crassinucelados são considerados padrão para Leguminosae (Prakash, 1987) e uma condição plesiomórfica em angiospermas (Sporne, 1969). Assim como para *M. japura* e *M. urens*, em *M. bennetti* os óvulos são crassinucelados (Hutomo 1967).

O tipo de tétrades lineares não é o mais comumente encontrado em Leguminosae, sendo considerado o tipo basal (Rembert 1966, 1969, 1971). A caracterização desta fase em futuros estudos será essencial para entender o desenvolvimento do saco embrionário de *Mucuna*.

Em Leguminosae, diferentes aspectos da vida do saco embrionário, como tamanho e forma das células individuais, e a síntese e armazenamento de amido, não são apenas importantes para comparações sistemáticas, mas também para o conhecimento do processo de fertilização e desenvolvimento do embrião (Moço & Mariath 2004). O saco embrionário maduro descrito para a maioria das Leguminosae contém o aparato oosférico composto de duas sinérgides e a oosfera, três antípodas na porção calazal e dois núcleos polares na célula central. Este é um típico saco embrionário do tipo *Polygonum* e esta uniformidade no desenvolvimento do saco embrionário em uma família deste tamanho é pouco usual (Prakash 1987).

As duas sinérgides são em forma de gancho e exibem um aparato filiforme (Prakash 1987). Os núcleos polares geralmente se fundem antes da fertilização (Prakash 1987). Geralmente ocorre acúmulo de amido no saco embrionário (Prakash 1987). Em Leguminosae ocorrem três tipos de haustório: proveniente do saco embrionário, do endosperma e do suspensor (Mikesell 1990).

Portanto o desenvolvimento do saco embrionário em ambas as espécies de *Mucuna* segue os mesmos padrões encontrados nas Leguminosae, mas a morfologia do saco embrionário é diferenciada, principalmente pelo fato do nucelo não recobrir todo o saco embrionário. Esta característica deve ser estudada mais profundamente, pois poderá ser útil para a taxonomia do gênero.

Desenvolvimento do óvulo após dupla fertilização em polinização cruzada

Mucuna japura

Como houve a formação de zigoto após 48h no tratamento de polinização cruzada manual, provavelmente o aborto de frutos e sementes em *M. japura* está relacionado com algum processo posterior à fertilização. A reação de incompatibilidade de ação tardia pode ser descartada, uma vez que tratamentos de autopolinizações foram realizados e não resultaram na formação de frutos e sementes, devido à reação de autoincompatibilidade ocorrer em nível estigmático.

Em todos os ovários analisados após 96h de polinização cruzada manual, não foi observado embrião em desenvolvimento e nenhuma característica do óvulo indicava o desenvolvimento da semente. Os fatores que podem estar restringindo o desenvolvimento do zigoto serão abordados posteriormente.

Mucuna urens

Após 12h de polinização cruzada manual, foi observado o zigoto nesta espécie e isto confirma os resultados obtidos em campo, uma vez que flores que não eram fertilizadas caíam 24 h após a realização dos tratamentos para verificar o sistema reprodutivo (observações pessoais). Nesta espécie não conseguimos observar a presença do embrião,

mas há várias características do óvulo que indicam que este está se transformando em semente.

Características embriológicas do óvulo que podem estar associadas com o aborto de frutos e sementes em *M. japura*.

Sinérgides haustoriais

Um aspecto importante para ser analisado é a persistência das sinérgides após a fecundação, fenômeno raramente verificado (Johri & Ambegaokar 1984). Em *Mucuna urens* estas sinérgides tornam-se haustórios que penetram os tegumentos interno e externo em direção à micrópila. Sinérgides haustoriais têm sido descritas para Acanthaceae, Asteraceae, Crassulaceae, Poaceae e Santalaceae (Johri & Ambegaokar 1984, Philipson & Connor 1984, Mikesell 1990) com função de absorção e transporte de nutrientes (Philipson 1981). Em *M. japura* não ocorrem sinérgides haustoriais, o que pode ser um dos fatores que acarretam aborto de frutos e sementes, já que a translocação de nutrientes para o embrião seria menor. O relato de sinérgides haustoriais neste trabalho é inédito para Leguminosae e deve ser melhor estudado e compreendido para posterior utilização em análise filogenéticas.

Nucelo

Em ambas as espécies o nucelo não recobre totalmente o saco embrionário, mas em *M. urens* o nucelo aparentemente recobre mais o saco embrionário e possui maior quantidade de grãos de amido do que em *M. japura*. Isto pode ser um indicativo que *M. urens* possui mecanismos mais eficientes de adquirir nutrientes.

Micrópila

A micrópila em ambas as espécies de *Mucuna* é do tipo zig-zag, que é uma característica comumente encontrada entre as Leguminosae (Prakash 1987). Entretanto em *M. japura* o canal micropilar é estreito e não há presença de secreção (Figura 11), enquanto que em *M. urens* este é mais largo e apresenta secreção (Figura 12). A presença de secreção no canal micropilar pode facilitar a entrada do tubo polínico em direção ao saco embrionário (Herrero & Arbeloa 1989). Assim podemos sugerir que uma das causas da baixa taxa de produção de sementes de *M. japura* seria a ausência de secreção micropilar, dificultando a penetração do tubo polínico através da micrópila, impossibilitando a fertilização.

Grão de amido indisponível

Em *M. japura* foram observados muitos grãos de amido, provavelmente associados a compostos fenólicos, nas células que estão ao redor do canal micropilar. É possível que este amido estaria indisponível para nutrição do embrião. Já em *M. urens* não ocorrem grãos de amido nas células ao redor da micrópila, sugerindo que esta substância de reserva já teria sido translocada para o interior da cavidade seminal para fazer a nutrição do embrião (Tilton 1980, Bittencourt Jr. & Mariath 2002). Em *Tabebuia pulcherrima* (Bignoniaceae), a produção de amiloplastos também começa no endotélio, especialmente na porção micropilar, porém, durante o processo meiótico (Bittencourt Jr. & Mariath 2002). Outra função descrita para o acúmulo de amiloplastos em células ao redor do canal micropilar é de prover energia para o crescimento do tubo polínico (Galati & Strittmatter 1999).

Isolamento do nucelo por calose

A presença de calose é usual nos primeiros estádios da megagametogênese, principalmente em sacos embrionários do tipo “Polygonum”, mas tende a desaparecer nos estádios pós-meióticos (Pimienta & Polito 1983). A associação da presença de calose nos tecidos maternos ao processo abortivo foi amplamente discutida por Vishnyakova (1991). A deposição de calose, isolando o nucelo, pode resultar no aborto do óvulo fertilizado, uma vez que a calose estaria obstruindo o fluxo de nutrientes e causando a estivação dos elementos embrionários (Pimienta & Polito 1983) ou estaria impedindo a penetração haustorial do endosperma – o que não parece ser o caso de *Mucuna* (Briggs et al. 1987).

Considerações taxonômicas

Os dados obtidos sobre desenvolvimento do saco embrionário de *Mucuna japura* e *M. urens* associados com o aborto de frutos e sementes são inéditos para a subtribo Erythrinae, que é considerada um grupo artificial e necessita de dados para que relações filogenéticas mais coesas sejam elaboradas.

Hutomo (1967) estudou a embriologia de *Mucuna bennetti* e verificou características diferentes das encontradas para as duas espécies de *Mucuna* presentes neste estudo. Aparentemente, o saco embrionário maduro de *Mucuna bennetti* é recoberto pelo nucelo, diferente do encontrado no presente trabalho para *M. japura* e *M. urens*. Este autor não comenta sobre sinérgides haustoriais, apenas afirma que estas células se degeneram após a fecundação, aspecto que difere de *M. japura* e *M. urens*, pois em ambas as sinérgides persistem após a fertilização e em *M. urens* elas se tornam haustoriais.

Como é sugerido por Agostini et al. (2007) seria necessária uma revisão taxonômica para o gênero *Mucuna*. Neste trabalho os autores sugerem que *Mucuna bennetti* possui

características que a colocariam mais próxima do gênero *Strongylodon*, ao qual *Mucuna* pertencia anteriormente. Característica como o tipo de apresentação de pólen, o número cromossômico e a morfologia do saco embrionário, reafirmam a necessidade de uma ampla revisão para o gênero *Mucuna*.

Referências

- Agostini K, Castro M d M, Sazima M. 2008.** Explosive flowers, birds and bats: the secrets of the floral biology and pollination of the *Mucuna* genus. *Annals of Botany* (submetido).
- Agostini K, Forni-Martins ER, Sazima M, Tozzi AMGA. 2007.** Microsporogenesis and pollen cytology in two *Mucuna* species (Leguminosae: Faboideae). *Phytomorphology* (submetido).
- Akhalkatsi M, Pfauth M, Calvin CL. 1999.** Structural aspects of ovule and seed development and nonrandom abortion in *Melilotus officinalis* (Fabaceae). *Protoplasma* 208: 211-223.
- Arathi HS, Ganeshiah KN, Uma Shaanker R, Hegde SG. 1999.** Seed abortion in *Pongamia pinnata* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 86: 659-662.
- Ashrafunnisa J, Pullaiah T. 1994.** Embryology of *Galactia* (Fabaceae). *Phytomorphology* 44: 253-260.
- Ashrafunnisa J, Pullaiah T. 1999.** Embryology of *Teramnus labialis* (Fabaceae). *Phytomorphology* 49: 192-202.

- Bawa KS, Webb CJ. 1984.** Flower, fruit, and seed abortion in tropical forest trees: implications go to evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *American Journal of Botany* 71: 736-751.
- Bittencourt Jr NS, Mariath JEA. 2002** Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): megasporogenesis and integument development. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 103-115.
- Bouman F. 1974.** Developmental studies of the ovule integuments and seed in some angiosperms. PhD thesis, University of Amsterdam, Naarden.
- Bouman F. 1984.** The ovule. In: *Embryology of Angiosperms*. Johri BM (editor). Berlin: Springer-Verlag, 123-157.
- Briggs CL, Westoby M, Selkirk PM, Oldfield RJ. 1987.** Embryology of early abortion due to limited maternal resources in *Pisum sativum* L. *Annals of Botany* 59: 611-619.
- Cooper DC. 1933.** Macrosporogenesis and embryology of *Mellilotus*. *Botanical Gazette* 95: 143-155.
- Davis GL. 1966.** Systematic embryology of the angiosperms. New York: Wiley.
- Endress PK. 1994.** Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge: Cambridge University Press.
- Galati BG, Strittmatter LI. 1999.** Ovule ontogeny and megasporogenesis in *Jacaranda mimosifolia* D. Don. (Bignoniaceae). *Phytomorphology* 49: 67-74.
- Gerlach D. 1969.** Botanische Mikrotechnik. Stuttgart: Georg. Thieme Verlag.
- Herrero M, Arbeloa A. 1989.** Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *American Journal of Botany* 76:1441-1447.
- Heslop-Harrison Y. 1981.** Stigma characteristics and angiosperms taxonomy. *Nordic Journal of Botany* 1: 401-420.

- Hutomo W. 1967.** On the embryology of *Mucuna bennetti* F. Muell. *Annales Bogorienses* 4 (3): 201-211.
- Johri BM, Ambegaokar KB. 1984.** Embryology: Then and Now. In *Embryology of Angiosperms*. Johri BM (editor). Berlin: Springer-Verlag, 1-52.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137A-138A.
- Lerstern NR. 2004.** *Flowering Plant Embryology*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Lim AL, Prakash N. 1994.** Embryology and seed development in the winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* Gardens' Bulletin 46: 79-92.
- Lloyd DG. 1980.** Sexual strategies in plants 1: An hypothesis of sexual adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytologist* 86: 69-79
- Mariath JEA, Santos RP, Bittencourt NS. 2003.** Flor. In: *Anatomia Vegetal*. Apazzato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM (editors). Viçosa: Editora UFV, 329-373.
- Martin JN. 1914.** Comparative morphology of some Leguminosae. *Botanical Gazette* 58: 154-167.
- Mikesell J. 1990.** Anatomy of terminal haustoria in the ovule of plantain (*Plantago major* L.) with taxonomic comparison to other angiosperm taxa. *Botanical Gazette* 151: 452-464.
- Moço MCC, Mariath JEA. 2003.** Ovule ontogenesis and megasporogenesis in *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae). *Revista Brasileira de Botânica* 26: 495-502.
- Moço MCC, Mariath JEA. 2004.** Female gametophyte development in *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae). *Revista Brasileira de Botânica* 27: 241-248.

- Palupi ER, Owen JN. 1997.** Pollination, fertilization, and embryogenesis of teak (*Tectona grandis* Lf). *International Journal of Plant Science* 54: 158: 259.
- Pantulu JV. 1945.** Studies in the Caesalpinioideae. I. A contribution to the embryology of the genus *Cassia*. *Journal of Indian Botanical Society* 24: 10-24.
- Pimienta E, Polito VS. 1983.** Embryo sac development in almond (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb) as affected by cross, self and non-pollination. *Annals of Botany* 51: 469-479.
- Philipson MN. 1981.** The haustorial synergids of *Cortaderia* (Gramineae) at maturity. *Acta Soc. Bot. Pol.* 50: 151-160.
- Philipson MN, Connor HE. 1984.** Haustorial synergids in Danthonioid grasses. *Botanical Gazette* 145: 78-82.
- Prakash N. 1987.** Embryology of the Leguminosae. In: *Advances in legume systematics* Stirton CH (editor). Kew: Royal Botanic Gardens, part 3, 241-278.
- Radford AE, Dickinson WC, Massey JR, Bell CR. 1974.** *Vascular plant systematics*. New York: Haper & Row.
- Rembert Jr DH. 1967.** Development of the ovule and megagametophyte in *Wisteria sinensis*. *Botanical Gazette* 128: 223-229.
- Rembert Jr DH. 1969.** Comparative megasporogenesis in Papilionaceae. *American Journal of Botany* 56: 584-591
- Rembert Jr DH. 1971.** Phylogenetic significance of megaspore tetrad patterns in Leguminales. *Phytomorphology* 21: 317-416.
- Ribeiro JELS, Hopkins MJG, Vicentini A, Sothers CA, Costa MAS, Brito JM, Souza MAD, Martins LHP, Lohmann LG, Assunção PACL, Pereira EC, Silva CF,**

- Mesquita MR, Procópio LC. 1999.** *Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central.* INPA-DFID.
- Rim YW, Beusselinck PR, McGraw RL, Somers DA. 1990.** Megagametophyte development in *Lotus corniculatus*, *L. conimbricensis*, and their protoplast fusion hybrid. *American Journal of Botany* 77: 1084-1094
- Rodriguez-Riaño T, Valtueña FJ, Ortega-Olivencia A.. 2006.** Megasporogenesis, megagametogenesis and ontogeny of the aril in *Cytisus striatus* and *C. multiflorus* (Leguminosae: Papilionoideae). *Annals of Botany* 98: 777-791.
- Sage TL, Strumas F, Cole WW, Barrett SCH. 1999.** Differential ovule development following self- and cross-pollination the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 86: 855-870
- Smith BW. 1956.** *Arachis hypogea*: normal megasporogenesis and syngamia with occasional single fertilization. *American Journal of Botany* 43: 81-89.
- Sporne KR. 1969.** The ovule as an indicator of evolutionary status in angiosperms. *New Phytologist* 68: 555-566.
- Stephenson AG. 1981.** Flower and fruit abortion proximate causes and ultimate functions. *Annals Review of Ecology Systematics* 12: 253-279.
- Teixeira SP, Prakash N, Ranga NT. 2001.** Ovule and early seed development related to seed abortion in *Dahlstedtia pinnata* and *D. pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytomorphology* 51 (1): 41-50
- Tilton VR. 1980.** The nucellar epidermis and micropyle of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) with a review of these structures in other taxa. *Canadian Journal of Botany* 58: 1872-1884.

Tozzi AMGA, Agostini K, Sazima M. 2005. A new species of *Mucuna* Adans.(Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) from southeastern Brazil, with a key to Brazilian species. *Taxon* 54: 451-455.

Vishnyakova MA. 1991. Callose as an indicator of sterile ovules. *Phytomorphology* 41: 245 – 252.

Legendas

Figura 1 – Corte longitudinal (CL) do gineceu de *M. japira*. Seta = cavidade do estilete, com tecido epitelial não-diferenciado (4x).

Figura 2 – CL do gineceu de *M. japira* mostrando o interior do ovário com cinco óvulos (4x).

Figura 3 – CL da porção apical do gineceu de *M. urens*. Seta = região sólida que conecta a superfície do estigma à cavidade do estilete (20x).

Figura 4 – CL do estigma multisseriado e multicelular de *M. japira* (seta) (40x).

Figura 5 – CT do primórdio do óvulo trizonado de *M. japira*. Seta preta = Zona I, seta amarela = Zona II e seta vermelha = Zona III (20x). Nas zonas I e II há células em divisões anticliniais.

Figura 6 – CT do estágio inicial do desenvolvimento do óvulo de *M. urens* com células em diferenciação (seta) que se tornarão células arquespóricas (40x).

Figura 7 – Corte transversal (CT) do óvulo de *M. urens* com tegumento interno (seta preta) e tegumento externo (seta verde), havendo diferenciação simultânea neste estágio (40x).

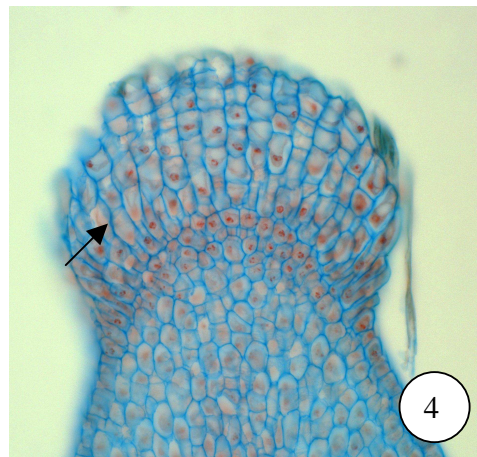
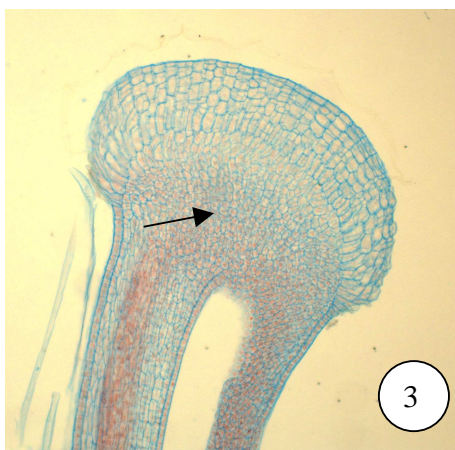
Figura 8 – CL do óvulo crassinucelado com tegumentos desenvolvidos de *M. urens*. ti = tegumento interno (2 camadas de células), te = tegumento externo (5-6 camadas de células) (40x).

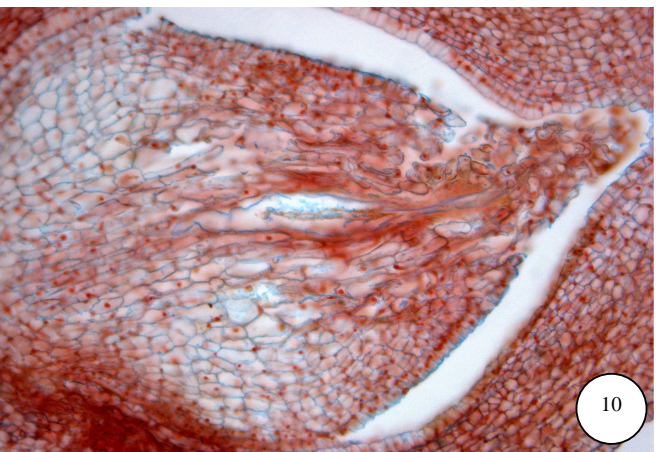
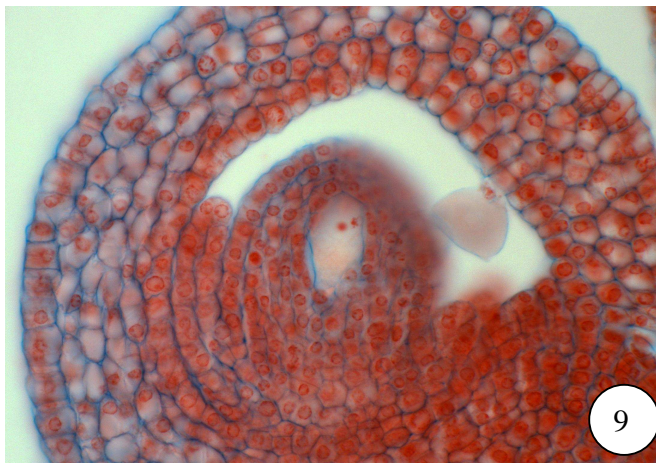
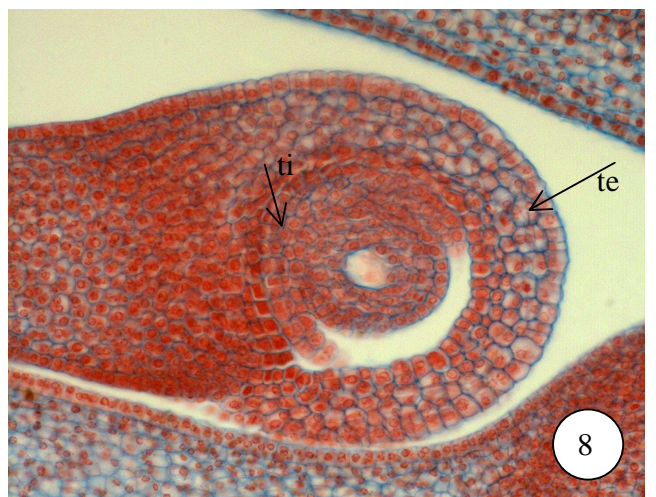
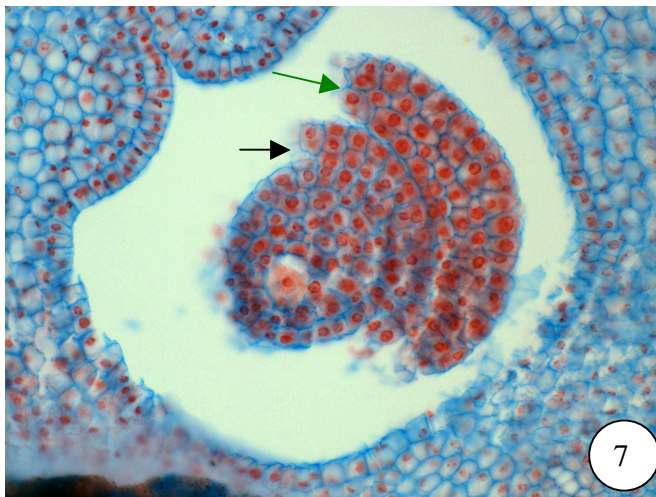
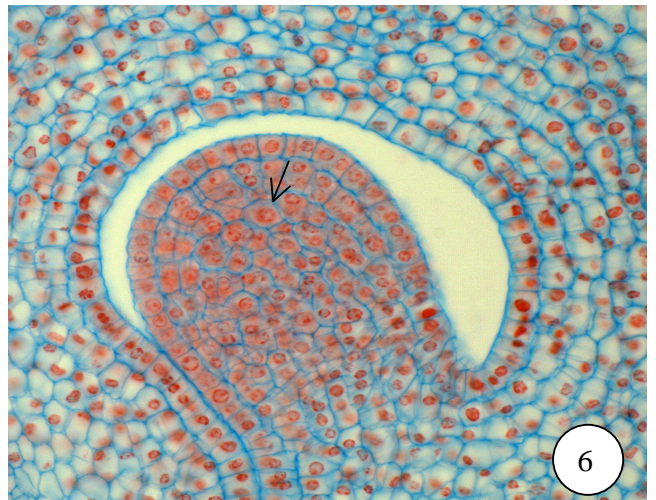
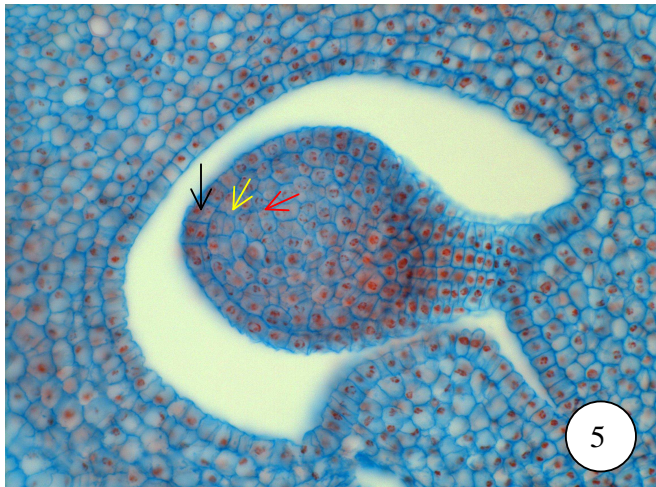
Figura 9 – CL do óvulo de *M. japira* evidenciando a primeira divisão meiótica da célula mãe-do-megásporo (40x).

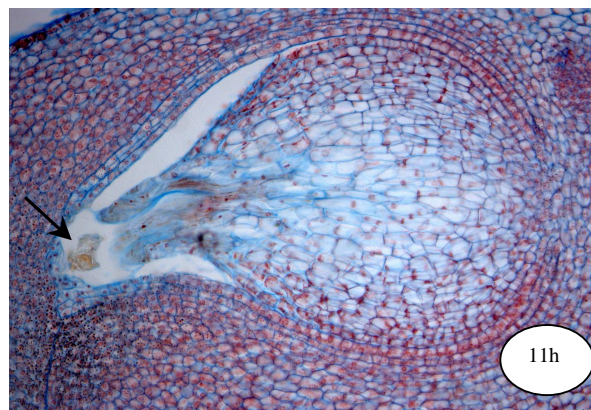
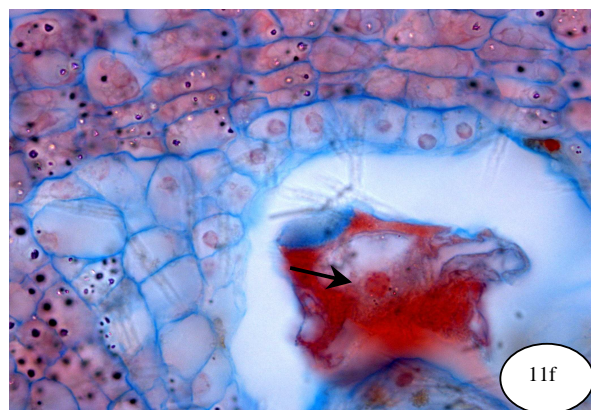
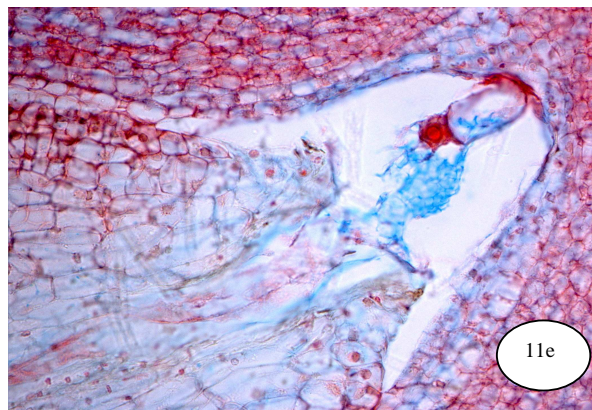
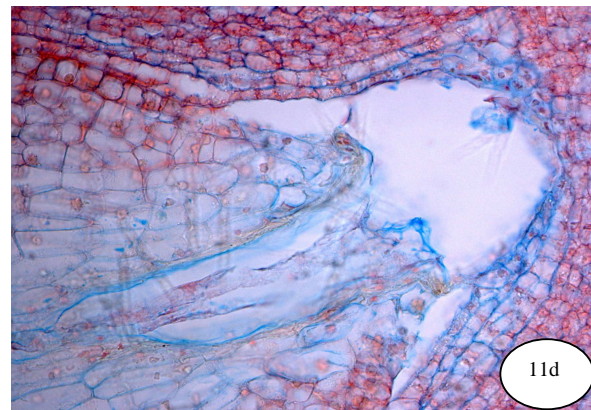
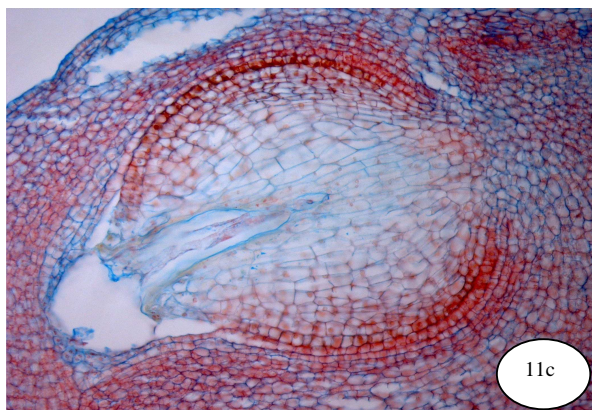
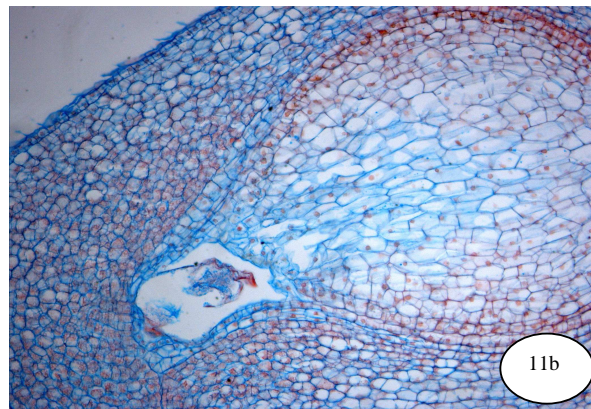
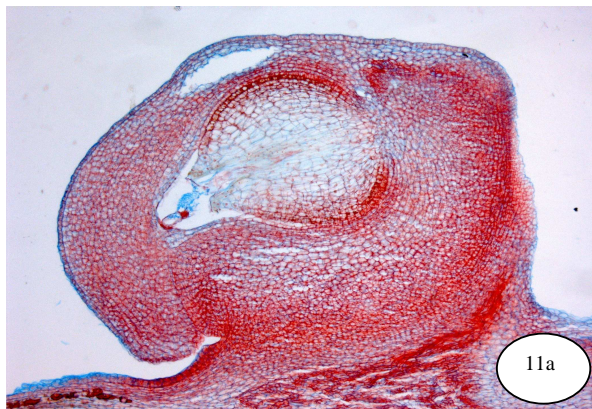
Figura 10 – CL do óvulo de *M. urens*, evidenciando saco embrionário alongado e não sendo totalmente recoberto pelo nucelo.

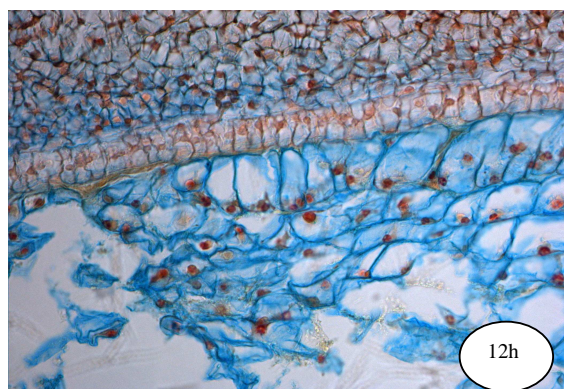
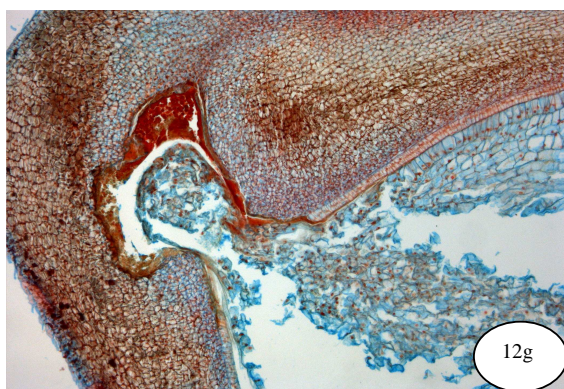
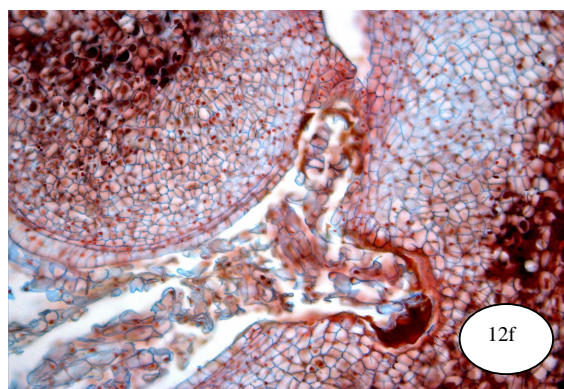
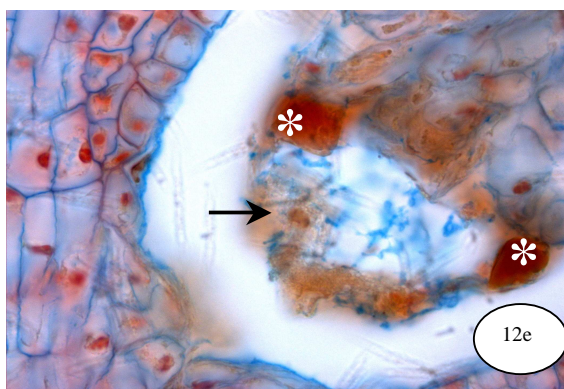
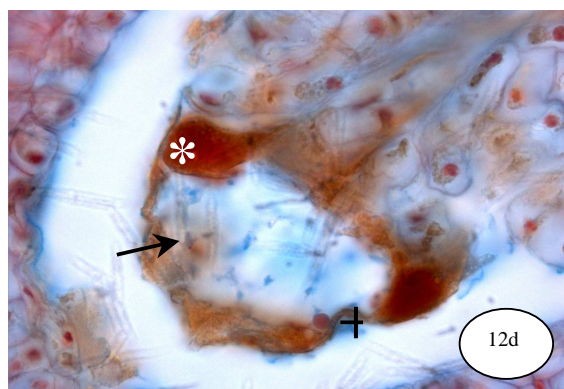
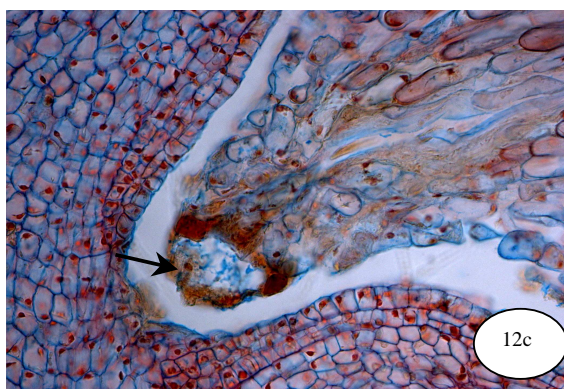
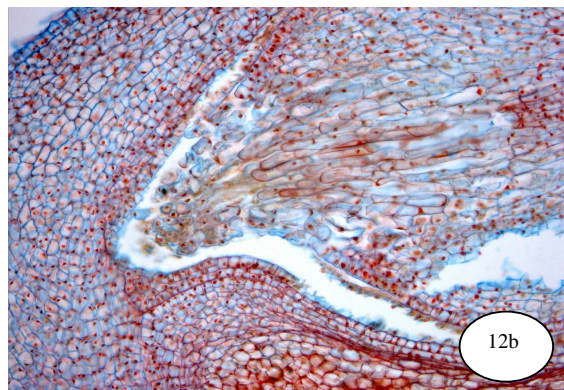
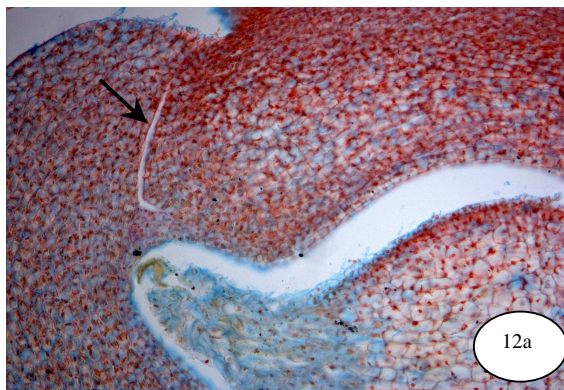
Figura 11 a-h. Desenvolvimento do óvulo após dupla fertilização em polinização cruzada manual em *M. japura*. Cortes longitudinais. **a-e.** Período de 6h após polinização cruzada manual (pcm). **a.** Micrópila fechada sem secreção. **b.** Endotélio recobrindo todo o nucelo e a porção do saco embrionário que não é revestida pelo nucelo. **c-d.** Ligação entre saco embrionário e endotélio. **e.** Núcleos da célula central fundidos. **f-g.** Período de 48h após pcm. **f.** Zigoto, sinérgides persistentes e amido em associação com compostos fenólicos. **g.** Endosperma nuclear. **h.** Período de 96h após pcm, amido em associação com compostos fenólicos na região da micrópila, embrião em degeneração e endosperma nuclear.

Figura 12 a-h. Desenvolvimento do óvulo após dupla fertilização em polinização cruzada manual em *M. urens*. Cortes longitudinais. **a-b.** Período de 6h após pcm. **a.** Micrópila aberta com secreção e nucelo recobrindo parte do saco embrionário. **b.** Células digitiformes do nucelo recobrindo o saco embrionário. **c-e.** Período de 12h após pcm, sinérgides persistem após fertilização. Seta = zigoto, * = sinérgides, + = núcleos endospermicos. **c.** Visão geral do aparato oosférico após fertilização. **d.** Núcleo endospermico. **e.** Zigoto com núcleo proeminente. **f.** Período de 72h após pcm, sinérgides haustoriais com aparelho filiforme penetrando no tegumento interno e externo. **g-h.** Período de 96h após pcm. **g.** Sinérgides invadindo tegumento externo. **h.** Nucelo com células em paliçada e em degeneração.









CAPÍTULO VI: “Variabilidade genética intrapopulacional em duas espécies de *Mucuna* (Leguminosae, Faboideae) e sua relação com mecanismos de polinização, sistema reprodutivo e aborto de frutos”

Kayna Agostini

Profa. Dra. Marlies Sazima

Prof. Dr. Pedro Luís Rodrigues de Moraes

Introdução

Os indivíduos, únicos geneticamente, formam populações que têm como uma de suas principais características a variabilidade. Segundo Snaydon (1987), uma população vista sob um contexto genético (população mendeliana) é um grupo de indivíduos da mesma espécie que interage reprodutivamente, ou seja, têm possibilidade real e potencial de troca de genes. Da mesma forma, vista sob um contexto ecológico, seria um grupo de indivíduos da mesma espécie que interage ecologicamente, habitualmente ocupando um mesmo hábitat, principalmente por competição (espaço, recursos etc).

Dados sobre os níveis da variabilidade genética dentro de uma população são de importância crucial para vários aspectos da biologia tropical. Estudos sobre a distribuição da variabilidade genética em plantas tropicais podem fornecer dados de como aspectos da história de vida, tais como, mecanismos de polinização, sistemas reprodutivos, dispersão de sementes e fecundidade interagem para moldar a estrutura genética das populações (BAWA 1976, LOVELESS & HAMRICK 1984, KAGEYAMA & CASTRO 1989, HAMRICK & GODT 1989, KAGEYAMA 1990, HAMRICK 1990, OHSAWA et al. 1993, BOOY et al. 2000, BORBA & SEMIR 2001, BORBA et al. 2001).

Polinizadores diferentes apresentam padrões característicos de forrageamento, alguns podem visitar sempre flores próximas enquanto outros realizam vôos de maiores distâncias entre visitas (LEVIN & KERSTER 1968, FEINSINGER & COLWELL 1978, SCHAAL 1980, SCHMITT 1980, WASER 1982, ELLSTRAND & MARSHAL 1985, FENSTER 1991, GODT & HAMRICK 1993).

Polinizadores que visitam flores próximas promovem a redução da heterozigosidade na população total e levam à sub-estruturação da população em pequenas manchas panmíticas, geralmente com elevada homozigosidade na qual a deriva genética pode atuar gerando diferenciação local (SCHAAL 1980, SCHMITT 1980, CRAWFORD 1984, LOVELESS & HAMRICK 1984, HAMRICK & GODT 1989, HAMRICK 1990, CAMPBELL 1991, OHSAWA et al. 1993). Por outro lado, espécies cujos polinizadores voam longas distâncias entre as visitas, geralmente apresentam áreas de vizinhança genética maiores, algumas vezes sendo toda a população panmítica devido à rápida migração de genes através da colônia, sendo necessárias pressões seletivas muito fortes para que ocorra a diferenciação local devido à força coesiva do fluxo polínico (SCHMITT 1980, LOVELESS & HAMRICK 1984, ELLSTRAND & MARSHALL 1985, HAMRICK & GODT 1989, HAMRICK 1990, OHSAWA et al. 1993, GANDARA 1996, LEPSCH-CUNHA 1996).

Loveless & Hamrick (1984) demonstraram que os sistemas reprodutivos têm forte influência sobre a distribuição da variação genética em plantas, assim as espécies autógamas apresentam baixa variabilidade dentro das populações e alta variabilidade entre as populações, enquanto que as espécies alógamas, especialmente as anemófilas, apresentam padrão oposto, ficando as espécies de fecundação cruzada e polinizadas por animais em níveis intermediários entre estes dois extremos. Assim estudos ecológicos

mesclados com estudos genéticos são essenciais para entender a dinâmica de regeneração das florestas tropicais (BAWA et al. 1990).

O conhecimento da estrutura genética de populações de plantas tropicais pode ajudar na explicação da evolução da alta diversidade encontrada nos trópicos e na elaboração de estratégias adequadas de conservação e manejo das florestas (EGUIARTE et al. 1992). Dentro do âmbito conservacionista, existe um consenso de que as reservas florestais e os parques das regiões tropicais devem ser estabelecidos e manejados de maneira a preservar a máxima variabilidade genética dentro das espécies (SOULÉ 1980, WHITMORE 1980, SCHIERENBECK et al. 1997). Porém, sem dados sobre a distribuição dessa variabilidade, decisões razoáveis sobre os meios mais efetivos para a sua preservação não podem ser tomadas (MARSHALL & BROWN 1975, ASHTON 1981, LOVELESS et al. 1998).

A análise eletroforética da variação isoenzimática propicia uma eficiente estimativa quantitativa de variabilidade genética dentro de populações naturais, bem como da divergência genética entre as mesmas (MARCON 1988, BRITTO & PRAVIN 2004). As isoenzimas são ferramentas eficientes para os estudos da variabilidade genética por exibirem herança mendeliana, expressão codominante, completa penetrância e ausência de interações pleiotrópicas e epistáticas, propriedades que facilitam a análise genética (WEEDEN & WENDEL 1990, CLEMENT et al. 1997).

Estudos sobre variabilidade genética geralmente são realizados em árvores para que sejam utilizados em planos de manejo e também em programas de reconstituição de matas (CATHARINO et al. 1982, CRESTANA et al. 1983, CRESTANA et al. 1985, RAMIREZ-CASTILHO 1986, KAGEYAMA 1990). Estudos sobre genética populacional em lianas de

florestas tropicais são raros, apesar da sua contribuição substancial para a diversidade das florestas tropicais (GENTRY 1991, HENDERSON et al. 1995, LUNA et al. 2005).

Estudos que quantificam a diversidade genética são importantes para demonstrar que a baixa diversidade genética pode aumentar os níveis de endogamia, o que pode diminuir o valor adaptativo do indivíduo e da população.

Mucuna japura e *M. urens* pertencem à família Leguminosae, sub-família Faboideae. Estas duas espécies são lianas lenhosas e possuem sistemas de polinização diferenciados (AGOSTINI et al. 2006, SAZIMA & SAZIMA 1978). Os sistemas isoenzimáticos serão utilizados para caracterizar a variabilidade genética em populações naturais e relacionar com os sistemas de polinização, sistema reprodutivo e verificar se a variabilidade genética pode ser responsável pelas altas taxas de aborto de frutos e sementes de *M. japura* em diferentes fases de desenvolvimento.

Material e Métodos

Coleta do material botânico

Folhas maduras de *M. japura* e de *M. urens* de 30 indivíduos distribuídos ao acaso, foram coletadas aleatoriamente em uma população natural de cada espécie, sendo acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em caixas de isopor com gelo para o transporte até o laboratório. Uma vez no laboratório, foram mantidos em geladeira (aproximadamente 5° C) até a extração e análise após aproximadamente dois dias em média. Os indivíduos coletados foram georeferenciados com GPS.

Eletroforese de isoenzimas

Para a extração das enzimas, foram empregadas amostras de aproximadamente 1 cm² do limbo foliar, seccionado em sua porção central a partir da nervura primária. Foi feita a maceração das amostras com auxílio de um bastão de vidro de extremidade esmerilhada, sobre placas de porcelana resfriadas, mantidas sobre um anteparo de alumínio com formas de gelo durante o processo de extração. Cada amostra, ao ser macerada, recebeu cerca de 0,03 ml de tampão de extração (MORAES 1997).

Na análise eletroforética empregou-se o sistema de eletroforese horizontal em gel de amido (ALFENAS et al. 1991). As soluções-tampão do gel variaram de acordo com o sistema.

A escolha dos sistemas enzimáticos para análise genética do material em laboratório foi precedida por uma série de testes, que tiveram o objetivo de indicar quais sistemas enzimáticos e procedimentos de amostragem forneceriam boa resolução e o máximo de informação. Foram testados 22 sistemas isoenzimáticos, a saber:

-álcool desidrogenase (ADH – E.C.1.1.1.1)

-catalase (CAT – E.C.1.11.1.6; ALFENAS et al. 1991, e SCANDALIOS 1965)

-diaforase (DIA – E.C.1.8.1.4)

-enzima málica (ME – E.C.1.1.1.40)

- α , β - esterase (Alfa-EST – E.C.3.1.1.1, Beta-EST – E.C.3.1.1.1)

-fosfatase ácida (ACP – E.C.3.1.3.2)

-fosfatase alcalina (ALP – E.C.3.1.3.1)

-6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH – E.C.1.1.1.44)

-fosfogluose isomerase (PGI – E.C.5.3.1.9)

- glucose desidrogenase (GLUDH – E.C.1.1.1.47)**
- glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH – E.C.1.1.1.49)**
- glutamato desidrogenase (GDH – E.C.1.4.1.3)**
- glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT – E.C.2.6.1.1)**
- isocitrato desidrogenase (IDH – E.C.1.1.1.42)**
- lactato desidrogenase (LDH – E.C.1.1.1.27)**
- leucina aminopeptidase (LAP – E.C.3.4.11.1)**
- malato desidrogenase (MDH – E.C.1.1.1.37)**
- manitol desidrogenase (MADH – E.C. 1.1.1.67)**
- peroxidase (PO – E.C.1.11.1.7)**
- sorbitol desidrogenase (SDH – E.C.1.1.1.14)**
- xiquimato desidrogenase (SKDH – E.C.1.1.1.25)**

Os sistemas isoenzimáticos selecionados juntamente com os tampões utilizados estão na tabela 1 e 2.

Tabela 1 – Sistemas isoenzimáticos e os tampões utilizados para análise da variabilidade genética.

Tampão Tris-Citrato (TC)	Tampão Lítio-Borato (LB)	Tampão Citrato-Morfolina (CM)
PO	ACP	IDH
GDH	PGI	6-PGDH
α – EST		
MDH		

Tabela 2 – Sistemas enzimáticos selecionados para análise da variabilidade genética em duas espécies de *Mucuna*.

Enzima	Código	Sigla	Método
Peroxidase	PO – E.C.1.11.1.7	PO	Brewbaker et al. 1968
Glutamato desidrogenase	GDH - E.C.1.4.1.3	GDH	Alfenas et al. 1991
Alfa-Esterase	Alfa-EST – E.C.3.1.1.1	α – EST	Scandalios 1969
Malato Desidrogenase	MDH – E.C.1.1.1.37	MDH	Alfenas et al. 1991
Fosfatase Ácida	ACP – E.C.3.1.3.2	ACP	Alfenas et al. 1991
Fosfoglucose isomerase	PGI – E.C.5.3.1.9	PGI	Alfenas et al. 1991
Isocitrato Desidrogenase	IDH – E.C.1.1.1.42	IDH	Alfenas et al. 1991
6-Fosfogluconato desidrogenase	6-PGDH – E.C.1.1.1.44	6-PGDH	Alfenas et al. 1991

Análise dos zimogramas

Após a fixação dos géis, foi feita a leitura e as bandas foram desenhadas sobre papel de acetato, mantendo-se as dimensões originais para a mensuração das distâncias de migração. As posições do marcador de Azul-de-Bromofenol também foram desenhadas, para comparações entre os géis e obtenção dos valores de Rf (mobilidade relativa) de cada banda (ALFENAS et al. 1991).

Análise dos dados de variabilidade genética

A partir da interpretação dos zimogramas e subsequente definição dos fenótipos de cada indivíduo estudado, para os marcadores empregados, foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas para cada população de cada espécie, bem como as principais medidas de variabilidade genética, a saber:

- número médio de alelos por loco (A_p)
- número efetivo de alelos (A_e)
- proporção de locos polimórficos (P), critério de 0,95
- homozigosidade observada e esperada (H_o)

- heterozigosidade observada e esperada (H_e)
- heterozigosidade média (H_{em})
- índice de fixação ou coeficiente de endogamia ($F(is)$ ou f)
- distância genética não-viesada de Nei (1978).

Para o cálculo destes parâmetros genéticos foram utilizados os softwares Genetix 4.02 (BELKHIR et al. 1996-2001), Popgene 1.31 (YEH et al. 1999) e TFPGA 1.3 (MILLER 1997).

Resultados e Discussão

Os zimogramas obtidos com os oito sistemas indicam a existência de 16 locos e no máximo três alelos por loco (Figuras 1-3).

Pela interpretação dos zimogramas, os sistemas GDH, α -EST, PO, MDH, 6PGDH, ACP e IDH mostraram-se monoméricos. Os sistemas GDH e α -EST possuem um loco com dois alelos tanto para *M. japura* como para *M. urens*. Os sistemas MDH, 6-PGDH e ACP possuem três locos. O sistema MDH possui dois alelos para todos os locos para ambas as espécies; 6-Pgdh-1 e 6-Pgdh-3 possuem um alelo/loco (monomórficos) e 6-Pgdh-2 dois alelos/loco para ambas as espécies; e Acp-1 e Acp-2 possuem dois alelos/loco e Acp-3 um alelo/loco (monomórfico) para ambas as espécies. O sistema PO possui dois locos com dois alelos/loco para Po-1 e um alelo/loco para Po-2 para ambas as espécies. O sistema IDH possui um loco com dois alelos para *M. urens* e para *M. japura* apenas foi considerado Idh-1 para as análises. O sistema PGI é monomérico com um alelo/loco para Pgi-1 que apenas está presente em *M. japura* e monomérico com três alelos/loco para Pgi-2 que está presente em ambas as espécies.

Na tabela 3, são apresentadas as frequências alélicas de 16 locos isoenzimáticos de *Mucuna japura* e *M. urens*. Para ambas as espécies houve a fixação alélica para alguns locos. Para *M. japura* houve fixação para os locos 6-Pgdh-1, 6-Pgdh-3, Po-2, Pgi-1, Acp-3, enquanto para *M. urens* houve fixação para todos os locos citados anteriormente, menos para Pgi-1. A ocorrência de completa fixação de alelos em cinco e quatro locos de *M. japura* e *M. urens*, respectivamente, podem sugerir uma insuficiência de amostragem.

Através de análises das frequências genotípicas foi verificada a rejeição da hipótese nula (locos estão nas proporções de Hardy-Weinberg) em 43,7% dos locos (Idh-1, Gdh-1, Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3, Pgi-2 e Acp-1) de *M. japura* e em 18,7% dos locos (6-Pgdh-2, Mdh-2 e Pgi-2) de *M. urens*. Para ambas as espécies estes locos não estão em EHW, pois ocorre um excesso de homozigotos (Tabela 4).

Os principais índices de diversidade gênica, bem como as homozigosidades e heterozigosidades observadas e esperadas são apresentados nas tabelas 5-7, enquanto os índices de fixação médios são apresentados nas tabelas 7. Em ambas as espécies ocorreram altas e iguais proporções de polimorfismo entre os 16 locos analisados ($n=11$, $P=68,75\%$ tanto para *M. japura* como para *M. urens*). O fato dos valores de locos polimórficos serem menores que 100% já era esperado, pois foram incluídos nas análises, também, os locos monomórficos. A proporção de locos polimórficos é alta quando comparada com a de outras espécies de Leguminosae (Faboideae), apenas três gêneros (*Myrospermum*, *Pterocarpus* e *Swartzia*) apresentam esta proporção mais alta do que nas duas espécies de *Mucuna* estudadas no presente trabalho (HAMRICK & LOVELESS 1986, LOVELESS & HAMRICK 1987, HAMRICK & MURAWSKI 1991, LIENGSIRI et al. 1995).

Tabela 3- Frequências alélicas de 16 locos isoenzimáticos em indivíduos adultos em uma população de cada espécie de *Mucuna*.

Loco/Alelo	Espécie	
	<i>M. japira</i>	<i>M. urens</i>
Idh-1	26	23
A	0,288	0,239
B	0,711	0,760
6Pgdh-1	29	26
A	1,000	1,000
B	0,000	0,000
6Pgdh-2	29	26
A	0,603	0,480
B	0,396	0,519
6Pgdh-3	30	9
A	1,000	1,000
B	0,000	0,000
Po-1	15	16
A	0,733	0,812
B	0,266	0,187
Po-2	24	28
A	1,000	1,000
B	0,000	0,000
Gdh-1	29	28
A	0,362	0,803
B	0,637	0,196
α -Est-1	16	17
A	0,156	0,176
B	0,843	0,823
Mdh-1	29	26
A	0,655	0,730
B	0,344	0,269
Mdh-2	30	28
A	0,166	0,428
B	0,833	0,571
Mdh-3	30	23
A	0,500	0,695
B	0,500	0,304
Pgi-1	25	0
A	1,000	-
B	0,000	-
Pgi-2	30	30
A	0,150	0,600
B	0,550	0,266
C	0,300	0,133
Acp-1	14	29
A	0,321	0,793
B	0,678	0,206
Acp-2	14	28
A	0,214	0,178
B	0,785	0,821
Acp-3	22	15
A	1,000	1,000
B	0,000	0,000

Tabela 4 – Teste de qui-quadrado (χ^2), considerando o número dos genótipos observados e esperados para *M. japira* e *M. urens*.

Loco	Genótipo	M. japira			M. urens		
		No	Ne	χ^2 P χ^2	no	ne	X ² P χ^2
Idh-1	AA	0	2,058	3,941	1	1,222	0,067
	AB	<u>15</u>	<u>10,882</u>	(1)	<u>9</u>	<u>8,555</u>	(1)
	BB	11	13,058	0,047 *	13	13,222	0,795 ns
6Pgdh-1	AA	29	29,000	-	26	26,000	-
	AB	0	0,000	-	0	0,000	-
	BB	0	0,000	-	0	0,000	-
6Pgdh-2	AA	11	10,438	0,190	12	5,882	23,111
	AB	13	14,122	(1)	1	13,235	(1)
	BB	5	4,438	0,662 ns	13	6,882	0,000 **
6Pgdh-3	AA	30	30,000	-	9	9,000	-
	AB	0	0,000	-	0	0,000	-
	BB	0	0,000	-	0	0,000	-
Po-1	AA	9	7,965	1,948	11	10,483	0,788
	AB	4	6,069	(1)	4	5,032	(1)
	BB	2	0,965	0,163 ns	1	0,483	0,375 ns
Po-2	AA	24	24,000	-	28	28,000	-
	AB	0	0,000	-	0	0,000	-
	BB	0	0,000	-	0	0,000	-
Gdh-1	AA	10	3,684	25,946	19	18,000	1,500
	AB	1	13,631	(1)	7	9,000	(1)
	BB	18	11,684	0,000 **	2	1,000	0,221 ns
A-Est-1	AA	0	0,322	0,427	0	0,454	0,635
	AB	5	4,354	(1)	6	5,090	(1)
	BB	11	11,322	0,513 ns	11	11,454	0,425 ns
Mdh-1	AA	9	12,333	7,567	12	13,784	3,236
	AB	20	13,333	(1)	14	10,431	(1)
	BB	0	3,333	0,006 **	0	1,784	0,072 ns
Mdh-2	AA	5	0,762	32,880	9	5,018	9,459
	AB	0	8,474	(1)	6	13,963	(1)
	BB	25	20,762	0,000 **	13	9,018	0,002 **
Mdh-3	AA	0	7,372	29,000	10	11,022	1,031
	AB	30	15,254	(1)	12	9,955	(1)
	BB	0	7,372	0,000 **	1	2,022	0,310 ns
Pgi-1	AA	25	25,000	-	0	-	0,000
	AB	0	0,000	-	0	-	(1)
	BB	0	0,000	-	0	-	1,000
Pgi-2	AA	2	0,610	8,008	7	10,678	8,268
	AB	5	5,033	-	14	9,762	-
	BB	7	8,949	-	1	2,033	-
	AC	0	2,745	(1)	8	4,881	(1)
	BC	14	10,067	-	0	2,169	-
	CC	2	2,593	0,046 **	0	0,474	0,041 **
Acp-1	AA	3	1,333	4,276	17	18,157	1,785
	AB	3	6,333	(1)	12	9,684	(1)
	BB	8	6,333	0,039 *	0	1,157	0,181 ns
Acp-2	AA	1	0,555	0,540	0	0,818	1,174
	AB	4	4,888	(1)	10	8,363	(1)
	BB	9	8,555	0,462 ns	18	18,818	0,278 ns
Acp-3	AA	22	22,000	-	15	15,000	-
	AB	0	0,000	-	0	0,000	-
	BB	0	0,000	-	0	0,000	-

P: probabilidade de ajuste para distribuição χ^2 , com os graus de liberdade entre parênteses. *P<0,05; **P<0,01; ns – não significativo.

Ambas as espécies apresentaram parâmetros de variabilidade genética similares: número médio de alelos observados (A_p) de 1,80 em *M. urens* e 1,76 em *M. japura*, número efetivo de alelos por loco (A_e) de 1,53 em *M. japura* e 1,49 em *M. urens*, que não foram significativamente diferentes. Cabe ressaltar que estes valores são similares aos encontrados para outras espécies de Leguminosae (Faboideae), mas um pouco menor quando comparado com algumas espécies de *Bauhinia*, *Mimosa* e *Pithecellobium* (HILL et al. 1978, O'MALLEY & BAWA 1987, SANTOS 1994). Também podemos ressaltar que estes valores dos índices de diversidade gênica são maiores para estas duas espécies de *Mucuna* do que para outras lianas (FOSTER & SORK 1997).

A heterozigosidade média foi um pouco maior em *M. urens* ($\hat{H} = 0,295$) do que em *M. japura* ($\hat{H} = 0,272$). Estes valores são os maiores entre as Leguminosae (Faboideae) estudadas até o momento e estão entre os maiores das Angiospermae tropicais (MORAES 1997).

O coeficiente de endogamia ($f = F_{IS}$) em *M. japura* foi $\hat{f} = 0,053$ e em *M. urens* $\hat{f} = 0,066$ (tabela 7), ambos foram não-significativos, indicando que a taxa de endogamia dentro das populações é baixa, portanto o excesso de homozigotos em alguns locus parece não estar relacionado com a depressão endogâmica. Assim o excesso de homozigotos pode estar relacionado com outros fatores como o efeito de Wahlund (mais de uma população amostrada), seleção natural, amostragem e/ou deriva genética (Freeland 2007). Coeficientes de endogamia relativamente baixos indicam que as espécies são predominantemente alógamas.

Tabela 5 - Índices de diversidade de cada loco de uma população de *M. japira*.

Loco	Tamanho da amostra	Ap	Ae	Ho	He	He, Média
Idh-1	52	2,000	1,696	0,576	0,418	0,387
6Pgdh-1	20	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000
6Pgdh-2	58	2,000	1,917	0,448	0,487	0,488
6Pgdh-3	60	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000
Po-1	30	2,000	1,646	0,266	0,404	0,347
Po-2	48	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000
Gdh-1	58	2,000	1,858	0,034	0,470	0,388
A-Est-1	32	2,000	1,358	0,314	0,272	0,277
Mdh-1	58	2,000	1,824	0,689	0,459	0,422
Mdh-2	60	2,000	1,384	0,000	0,282	0,383
Mdh-3	60	2,000	2,000	1,000	0,508	0,461
Pgi-1	50	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000
Pgi-2	60	3,000	2,409	0,633	0,594	0,568
Acp-1	28	2,000	1,773	0,214	0,452	0,382
Acp-2	28	2,000	1,507	0,285	0,349	0,315
Acp-3	44	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000
Média	47	1,750	1,523	0,279	0,294	0,276
Desvio Padrão		0,577	0,439	0,312	0,219	0,204

Ap=número médio de alelos observados

*Ae=número efetivo de alelos (Kimura & Crow 1964)

Ho=heterozigosidade observada

He=heterozigosidade esperada

Tabela 6 - Índices de diversidade de cada loco de uma população de *M. urens*.

Loco	Tamanho da amostra	Ap	Ae	Ho	He	He, Média
Idh-1	46	2,000	1,572	0,391	0,372	0,387
6Pgdh-1	52	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000
6Pgdh-2	52	2,000	1,997	0,038	0,509	0,488
6Pgdh-3	18	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000
Po-1	32	2,000	1,438	0,250	0,314	0,347
Po-2	56	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000
Gdh-1	56	2,000	1,461	0,250	0,321	0,388
A-Est-1	34	2,000	1,409	0,352	0,299	0,277
Mdh-1	52	2,000	1,648	0,538	0,401	0,422
Mdh-2	56	2,000	1,960	0,214	0,498	0,383
Mdh-3	46	2,000	1,734	0,521	0,432	0,461
Pgi-1	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Pgi-2	60	3,000	2,227	0,733	0,560	0,568
Acp-1	58	2,000	1,488	0,413	0,333	0,382
Acp-2	56	2,000	1,415	0,357	0,298	0,315
Acp-3	30	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000
Média	47	1,800	1,490	0,271	0,289	0,295
Desvio Padrão		0,561	0,386	0,231	0,197	0,196

Ap=número médio de alelos observados

*Ae=número efetivo de alelos (Kimura & Crow 1964)

Ho=heterozigosidade observada

He=heterozigosidade esperada

Tabela 7– Índices médios de diversidade de uma população de cada espécie de *Mucuna*.

	Tamanho da amostra	P	Ap	Ae*
<i>M. japura</i>	47	68,75	1,750±0,577	1,523±0,439
<i>M. urens</i>	47	68,75	1,800±0,561	1,490±0,386

P=proporção de locos polimórficos, critério de 95%

Ap=número médio de alelos observados

*Ae=número efetivo de alelos (Kimura & Crow 1964)

	Ho obs	Ho esp,	He obs	He esp	He media	F(is)
<i>M. japura</i>	0,721±0,312	0,706±0,219	0,279±0,312	0,294±0,219	0,276±0,204	0,053
<i>M. urens</i>	0,729±0,231	0,710±0,197	0,271±0,231	0,289±0,197	0,295±0,196	0,066

Ho obs=homozigosidade observada

Ho esp=homozigosidade esperada

He obs=heterozigosidade observada

He esp=heterozigosidade esperada

F(is)=coeficiente de endogamia

Ambas as espécies de *Mucuna* possuem flores hermafroditas com mecanismo explosivo de abertura da flor, dependem de vertebrados para a polinização e são alógamas.

Mucuna japura é ornitófila polinizada por um passeriforme *Cacicus haemorrhous* (AGOSTINI et al. 2006) que em uma única visita explora a maioria das flores em uma inflorescência, favorecendo a autogamia, mas nos experimentos controlados foi observado que os frutos eram resultantes de polinização cruzada. Esta espécie possui alta taxa de aborto e semente em diferentes estágios de desenvolvimento. Deste modo uma das hipóteses sugeridas para verificar as causas desta alta taxa de aborto, seria a depressão endogâmica. Como sugerido por GE et al. (2005) para duas espécies de Leguminosae desérticas do gênero *Ammopiptanthus*, a baixa variabilidade encontrada pode ser a quantidade de flores por inflorescência que favorece a geitonogamia.

Mucuna urens é quiropterófila polinizada pelo Glossophaginae *Glossophaga soricina* (SAZIMA & SAZIMA 1978) que visita e explora uma ou duas flores em cada inflorescência, favorecendo a polinização cruzada.

Segundo LOVELESS & HAMRICK (1984) plantas polinizadas por pássaros e morcegos, que são animais que podem carregar o pólen a longas distâncias, provavelmente possuem o tamanho efetivo da população e a área de vizinhança maiores e provavelmente menores diferenciações geográficas. Principalmente, no caso de *M. japura*, o polinizador pode carregar o pólen por longas distâncias, mas o sistema de antese simultânea das flores proporciona que o polinizador visite flores da mesma inflorescência, fazendo com que a polinização seja a curta distância.

O sistema reprodutivo das plantas tem sido identificado como o principal fator que influencia a estrutura genética populacional. Os níveis de heterozigosidade encontrado para ambas as espécies de *Mucuna* estão de acordo com os níveis de heterozigosidade sugeridos por LOVELESS & HAMRICK (1984) para espécies que são predominantemente alógamas, apresentando alta heterozigosidade dentro de populações.

Mucuna japura é endêmica da região do litoral norte de São Paulo enquanto *M. urens* é mais distribuída, estando presente em algumas regiões amazônicas (TOZZI et al. 2005). A distribuição geográfica pode ser um determinante ecológico que pode estar relacionado com a variabilidade genética das espécies. Segundo LOVELESS & HAMRICK (1984) e GITZENDANNER & SOLTIS (2000) espécies endêmicas são geneticamente debilitadas, podendo sofrer deriva genética, enquanto espécies mais distribuídas geograficamente possuem pouca variabilidade genética dentro da população. Esta hipótese não pode ser aplicada neste trabalho, pois como foi visto há pouca diferença nos índices de diversidade de ambas as espécies de *Mucuna*.

A preservação de espécies remanescentes da Mata Atlântica brasileira é importante por razões científicas e econômicas. Informações sobre características ecológicas e genéticas destas espécies são necessárias especialmente para espécies endêmicas com distribuição restritas, espécies raras e aquelas espécies que estão sob risco de extinção. Além disso, o estudo da diversidade genética é importante devido a implicações evolutivas e por possibilitar a conservação de espécies (JUCHUM et al. 2007).

Referências

- Agostini K, Sazima M, Sazima I. 2006.** Bird pollination of explosive flowers while foraging for nectar and caterpillars. *Biotropica* 38: 674-678.
- Alfenas AC, Peters I, Brune W, Passador GC. 1991.** Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Ashton PS. 1981** Techniques for the identification and conservation of threatened species in tropical forests. In: *The biological aspects of rare plant conservation*. Synge H (editor). New York: John Wiley & Sons, 155-164.
- Bawa KS. 1976.** Breeding of tropical hardwoods: an evaluation of underlying bases, current status and future prospects. In: *Tropical trees: variation, breeding and conservation*. Burley J, Styles BT. (editors.). London: Academic Press, 43 – 59.
- Bawa KS, Ashton, PS, Mohd S. 1990.** Reproductive ecology of tropical forest plants: management issues. In: *Reproductive ecology of tropical forest plants*. Bawa KS, Hadley M (editors). Paris: The Parthenon Publishing Group, 3-13.

- Belkhir K. 1996.** GENETIX, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Booy G, Hendriks RJJ, Smulders MJM, van Groenendael JM, Vosman B. 2000.** Genetic diversity and the survival of population. *Plant Biology* 2: 379-395.
- Borba EL, Semir J. 2001.** Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* 88: 75 – 88.
- Borba EL, Semir J, Sheferd GJ. 2001.** Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* 88: 89 – 99.
- Brewbaker JL, Upadhyya MD, Makinen Y, MacDonald T. 1968.** Isoenzyme polymorphism in flowering plants, III. Gel electrophoretic methods and applications. *Physiologia Plantarum* 21: 930-940.
- Britto AJ, Pravin AS. 2004.** Isozymes analyses of the genetic diversity within and between *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus debilis*. *Phytomorphology* 54: 223-227
- Campbell DR. 1991.** Comparing pollen dispersal and gene flow in a natural population. *Evolution* 45: 1965-1968.
- Catharino ELM, Crestana CSM, Kageyama PY. 1982.** Biologia floral da Bracatinga – *Mimosa scabrella* Benth. *Silvicultura em São Paulo* 16A: 525-531.
- Clement CR, Aradhya MK, Manshardt RM. 1997.** Allozyme variation in spineless pejibaye (*Bactris gasipaes* Palmae). *Economic Botany* 51: 149-157.
- Crawford TJ. 1984.** What is a population? In: *Evolutionary ecology*. Shorrocks B. (editor). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 135 – 174.

- Crestana CSM, Kageyama PY, Souza Dias I. 1983.** Biologia floral do Guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl.). *Silvicultura em São Paulo* 28: 35-38.
- Crestana CSM, Souza Dias I, Mariano G. 1985.** Ecologia da polinização de *Hymenaea stilbocarpa* Hayne, o jatobá. *Silvicultura em São Paulo* 19: 31-37.
- Eguiarte LE, Perez-Nasser L, Piñero D. 1992.** Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217-228.
- Ellstrand NC, Marshall DL. 1985.** Interpopulation gene flow by pollen in wild radish, *Raphanus sativus*. *American Naturalist* 126: 606-616
- Feinsinger P, Colwell RK. 1978.** Community organization among Neotropical nectar-feeding birds. *American Zoologist* 18: 779-795.
- Fenster CB. 1991.** Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae) I. Gene dispersal. *Evolution* 45: 398-409.
- Foster PF, Sork VL. 1997.** Population and genetic structure of the West African Rain Forest liana *Ancistrocladus korupensis* (Ancistrocladaceae). *American Journal of Botany* 84: 1078-1091.
- Freeland JR. 2007.** *Molecular Ecology*. England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Gandara FB. 1996.** Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo.
- Ge XJ, Yu Y, Yuan YM, Huang HW, Yan C. 2005.** Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert

regions of northwest China as revealed by ISSR analysis. *Annals of Botany* 95: 843-851.

Gentry AH. 1991. The distribution and evolution of climbing plants. In: *The biology of vines*. Putz F, Mooney HA (editors). Cambridge: Cambridge University Press, 3-49.

Gitzendanner MA, Soltis PS. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 777-786.

Godt MJW, Hamrick JL. 1993. Patterns and level of pollen gene flow in *Lathyrus latifolius*. *Evolution* 47: 98-110.

Hamrick JL. 1990. Isozyme and the analysis of genetic structure in plant populations. In: *Isozymes in plant biology*. Soltis DE, Soltis PS. (editors.). London: Chapman and Hall, 87 – 105.

Hamrick JL, Godt MJW. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, breeding and germplasm resources*. Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (editors). Sunderland: Sinauer Associates, 43 – 63.

Hamrick JL, Loveless MD. 1986. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. *Biotropica* 18: 201-207.

Hamrick JL, Murawski DA. 1991. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon Neotropical tree species. *Journal of Tropical Ecology* 7: 395-399.

Henderson A, Galeano G, Bernal R. 1995. *Field guide to the palms of the Americas*. New Jersey: Princeton University Press.

Hill RJ, Prance GT, Mori SA, Steward WC, Shimabukuru D, Bernardi J. 1978. Estudo eletroforético da dinâmica de variação genética em três taxa ribeirinhos ao longo do rio Solimões, América do Sul. *Acta Amazonica* 8: 183-199.

- Juchum FS, Leal JB, Santos LM, Almeida MP, Ahnert D, Corrêa RX. 2007.** Evaluation of genetic diversity in natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research* 6 (3): 543-553.
- Kageyama PY. 1990.** Genetic structure of tropical tree species of Brazil. In: *Reproductive ecology of tropical forest plants*. Bawa KS, Hadley M. (editors). Paris: The Parthenon Publishing Group, 375 – 387.
- Kageyama PY, Castro CFA. 1989.** Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas. *IPEF* 41 – 42: 83-93.
- Kephart SR. 1990.** Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *American Journal of Botany* 77: 693-712.
- Lepsch-Cunha N. 1996.** Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari* spp. (Lecythidaceae) na Amazônia Central. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo.
- Levin DA, Kester HW. 1968.** The dependence of bee-mediated pollen and gene dispersal upon plant density. *Evolution* 23: 560 – 571.
- Liengsiri C, Yeh FC, Boyle TJB. 1995.** Isozyme analysis of a tropical forest tree, *Pterocarpus macrocarpus* Kurz. *Thailand Forest Ecology and Management* 74: 13-22.
- Loveless MD. 1992.** Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New Forests* 6: 67-94.
- Loveless MD, Hamrick JL. 1984.** Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematic* 15: 65 – 95.
- Loveless MD, Hamrick JL. 1987.** Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. *Revista de Biología Tropical* 35: 165-175.

- Loveless MD, Hamrick JL, Foster RB. 1998.** Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. *Heredity* 81: 134-143.
- Luna R, Epperson BK, Oyama K. 2005.** Spatial genetic structure of two sympatric neotropical palms with contrasting life histories. *Heredity* 95: 298-305.
- Marcon G. 1988.** Estrutura genética de populações de *Stylosanthes humilis* H. B. K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo.
- Marshall DR, Brown AHD. 1975.** Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Frankel OH, Hawkes JG. (editors). Cambridge: Cambridge University Press, 53-80.
- Miller MP. 1997.** Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. (www.marksgeneticssoftware.net/tfpga.htm).
- Moraes PLR de. 1997.** Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees & Martius ex Nees (Lauraceae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.
- Moraes PLR de, Derbyshire MTVC. 2004.** Genetic structure of natural populations of *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) from southeastern Brazilian Atlantic rain forest. *Biota Neotropica* 4: 29-44.
- Moraes PLR de, Monteiro R, Vencovsky R. 2002** Genetic differentiation and diversity of natural populations of *Cryptocarya* spp. (Lauraceae) from the Brazilian Atlantic rain forest. *Lundiana* 3: 99-109.

- Ohsawa R, Furuya N, Ukai Y. 1993.** Effect of spatially restricted pollen flow on spatial genetic structure of an animal-pollinated allogamous plant population. *Heredity* 71: 64-73.
- O'Malley DM, Bawa KS. 1987.** Mating system of a tropical rain forest tree species. *American Journal of Botany* 74: 1143-1149.
- Ramirez-Castilho CA. 1986.** Dispersão anemocórica de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*) na região de Bauru-SP. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo.
- Santos EMG. 1994.** Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link (Caesalpinaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo.
- Sazima I, Sazima M. 1978.** Polinização por morcegos em *Mucuna urens* (Leguminosae). Livros de resumos do SBPC: 419.
- Scandalios JG. 1965.** Genetic isozyme variation in *Zea mays*. Tese de Doutorado University of Hawaii. Honolulu. *Apud Marcon G. 1988.* Estrutura genética de populações de *Stylosanthes humilis* H. B. K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo.
- Scandalios JG. 1969.** Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. *Biochemical Genetics* 3: 37-79.
- Schaal BA. 1980.** Measurement of gene flow in *Lupinus texensis*. *Nature* 284: 450-451.
- Schierenbeck KA, Skupski M, Lieberman D, Lieberman M. 1997.** Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Molecular Ecology* 6: 137-144.

- Schmitt J. 1980.** Pollination foraging behavior and gene dispersal in *Senecio* (Compositae). *Evolution* 34: 934-943.
- Snaydon RW. 1987.** Population responses to environmental disturbance. In: *Disturbance in grasslands*. Andel J et al. (editors.). Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers. p. 15 – 31.
- Soulé ME. 1980.** Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In: *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*, Soulé ME, Wilcox BA eds. Sunderland: Sinauer Associates 151-169.
- Tozzi AMGA, Agostini K, Sazima M. 2005.** A new species of *Mucuna* Adans.(Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) from southeastern Brazil, with a key to Brazilian species. *Taxon* 54: 451-455.
- Waser, N. M. 1982.** A comparison of distances flown by different visitors to flowers of the same species. *Oecologia* 55: 251-257.
- Weeden NF, Wendel JF. 1990.** Genetics of plant isozymes. In: *Isozymes in plant biology* Soltis DE, Soltis PS. eds. London: Chapman and Hall 46-72.
- Whitmore TC. 1980.** The conservation of tropical rain forest. In: *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*, Soulé ME, Wilcox BA eds. Sunderland: Sinauer Associates 303-318.
- Yeh FC, Yang R, Boyle T. 1999.** Popgene version 1.31. Microsoft Windows – based Freeware for population genetic analysis.

Legendas

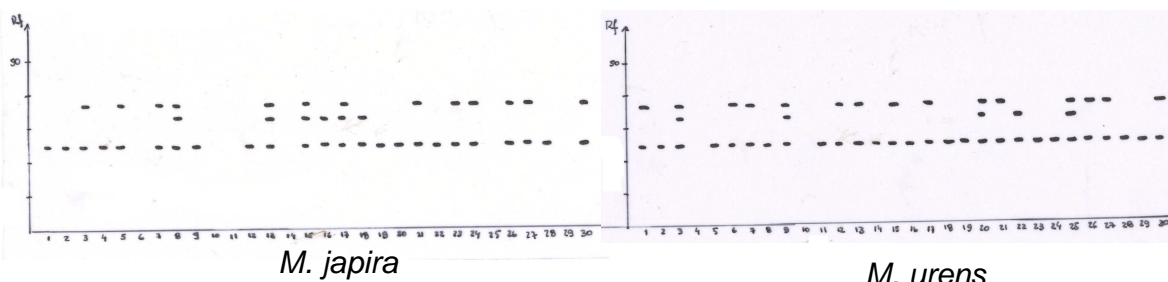
Figura 1 – Zimogramas dos sistemas isoenzimáticos revelados pelo tampão Tris-Citrato selecionados para o estudo de variabilidade genética de *M. japura* e *M. urens*.

Figura 2 - Zimogramas dos sistemas isoenzimáticos revelados pelo tampão Lítio-Borato selecionados para o estudo de variabilidade genética de *M. japura* e *M. urens*.

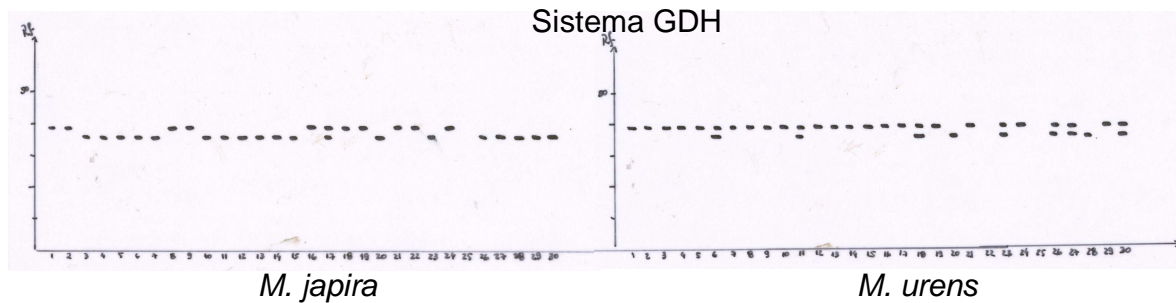
Figura 3 - Zimogramas dos sistemas isoenzimáticos revelados pelo tampão Citrato Morfolina selecionados para o estudo de variabilidade genética de *M. japura* e *M. urens*.

Sistemas do tampão TC

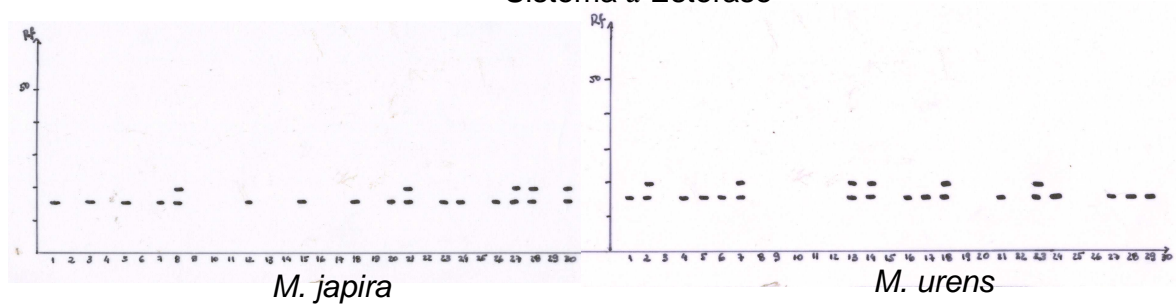
Sistema Peroxidase



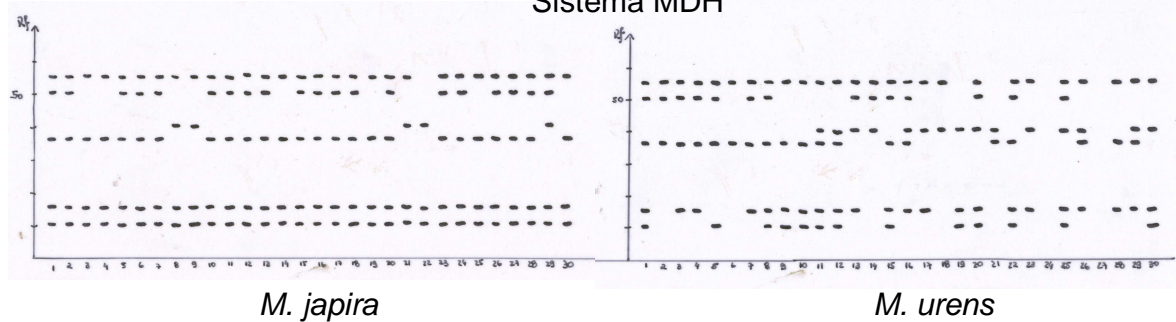
Sistema GDH



Sistema á-Esterase

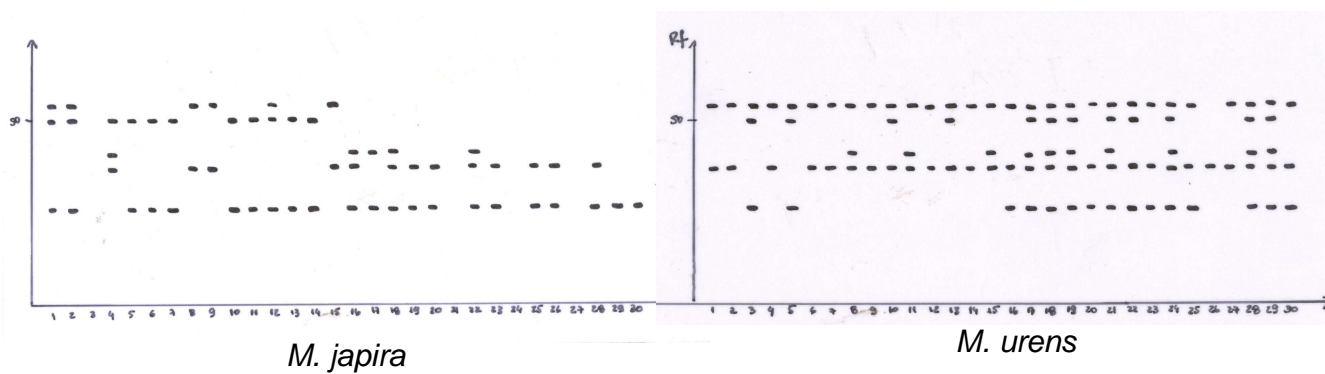


Sistema MDH

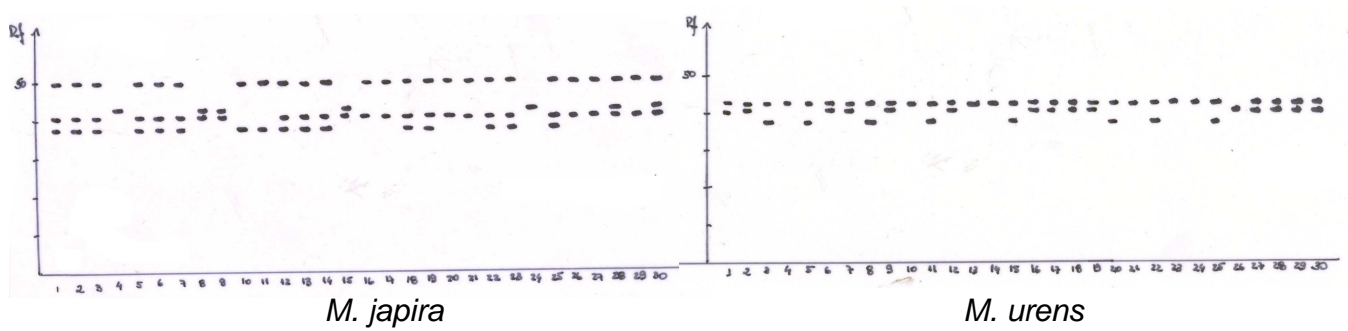


Sistemas do tampão LB

Sistema ACP

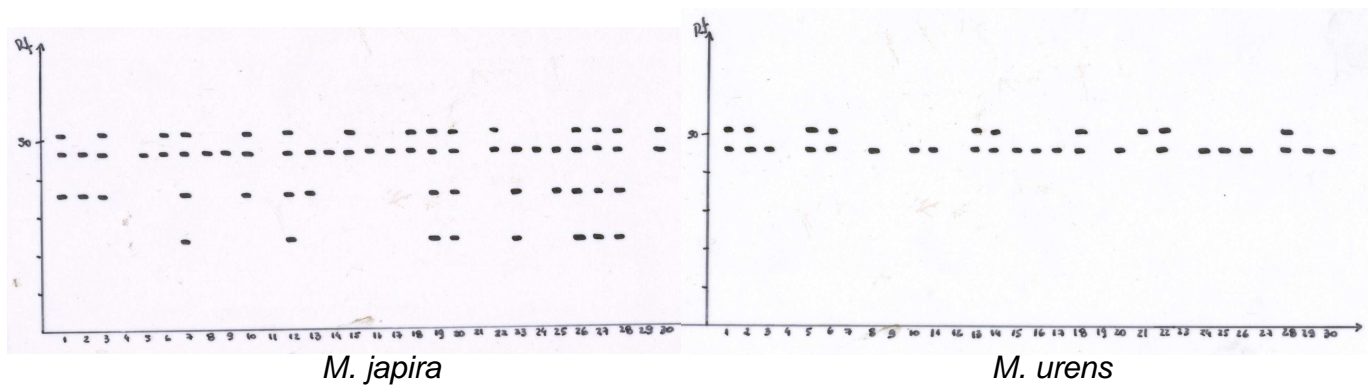


Sistema PGI

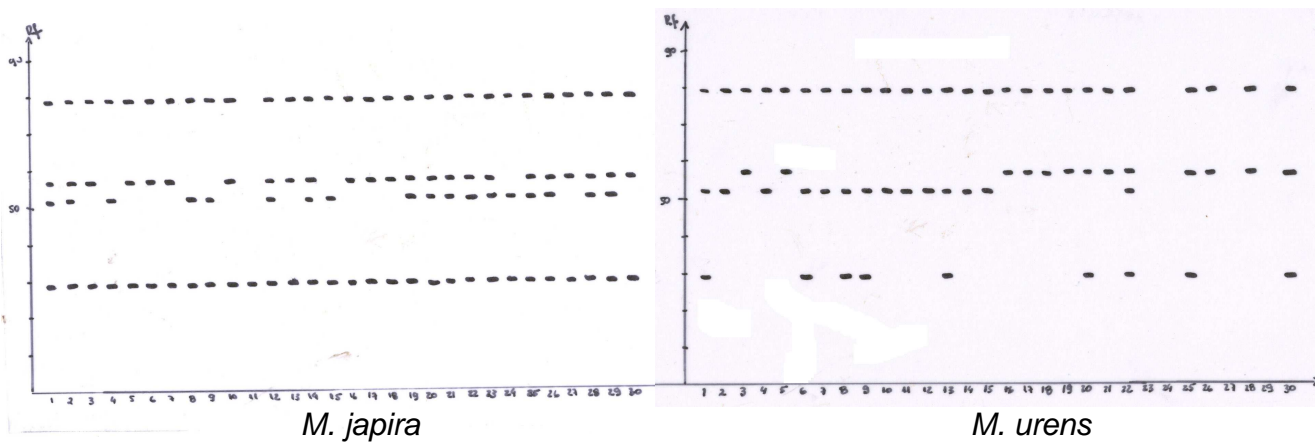


Sistemas do tampão CM

Sistema IDH



Sistema 6PGDH



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo apresentado é uma abordagem ecológica, embriológica e genética dos aspectos reprodutivos de *Mucuna japura* e *M. urens*, abrangendo itens desde biologia da polinização e morfologia floral até variabilidade genética para tentar esclarecer aspectos responsáveis pelo aborto de frutos e sementes de *M. japura* e contribuir com informações importantes que visem a conservação das espécies.

Segundo este estudo os fatores que podem estar influenciando no aborto de frutos e sementes em *M. japura* são:

1) Forrageamento dos polinizadores: ambas as espécies de *Mucuna* podem ser comparados de acordo com a rota de forrageamento do polinizador. Em *M. japura* todas as flores da inflorescência abrem simultaneamente, de modo que o pássaro *Cacicus haemorrhous* visita todas as flores favorecendo a geitonogamia (polinização intra-planta) o que, conseqüentemente, pode influir no aborto de frutos e sementes. Por outro lado, em *M. urens* abrem 1-3 flores/noite por inflorescência, de forma que o morcego *Glossophaga soricina* realiza as visitas em rotas de forrageamento do tipo “trap-line”, favorecendo a polinização cruzada e aumentando a variabilidade genética desta espécie.

2) Comportamento de visita dos polinizadores: quando *C. haemorrhous* visita *M. japura* mais pólen é desperdiçado no ambiente do que quando *G. soricina* visita *M. urens*. *C. haemorrhous* ao ativar o mecanismo explosivo de abertura da flor o pólen é liberado instantaneamente e parte adere na sua cabeça, mas boa parte do pólen se perde no ar. *G. soricina* abraça a flor durante a visita de modo que recebe todo pólen no ventre evitando que seja desperdiçado. Portanto, as flores de *M. japura* provavelmente recebem menos

pólen no estigma que as flores de *M. urens*, característica que pode interferir no processo reprodutivo destas espécies de *Mucuna*.

3) Reabsorção do néctar: a reabsorção de néctar ocorre em ambas as espécies de *Mucuna*. O período de reabsorção de néctar em *M. japura* ocorre durante cerca de dois dias enquanto em *M. urens* cerca de seis horas. A taxa de reabsorção de néctar em *M. japura* é cerca de 0,25 mg/h por flor e cerca de 4mg/h por inflorescência, enquanto em *M. urens* é cerca de 3 mg/h por flor e 3-9 mg/h por inflorescência. A reabsorção pode aumentar a disponibilidade de recursos para o desenvolvimento de sementes. Para *M. urens* que produz mais frutos e sementes do que *M. japura*, a reabsorção de néctar pode ser importante recurso para o desenvolvimento de sementes.

4) Herbivoria da larva *Astraptus talus* das folhas: como *M. japura* sofre alta taxa de aborto de frutos e sementes em diferentes fases do desenvolvimento, sugerimos que com a herbivoria das larvas de *A. talus* os recursos são alocados para a reconstituição das partes vegetativas para que a taxa de fotossíntese não seja diminuída consideravelmente comprometendo a sobrevivência do indivíduo. Deste modo pode ocorrer a diminuição dos recursos disponíveis para o desenvolvimento de frutos e sementes ocasionando o aborto. Muitos estudos formularam a hipótese que herbivoria pode afetar a fecundidade dos indivíduos, pois este processo pode interferir em outros processos ecológicos, como polinização e dispersão de sementes e também no desenvolvimento embrionário.

5) Recursos maternos não disponíveis para nutrição do embrião:

a) considerando características do nucelo: em ambas as espécies o nucelo não recobre totalmente o saco embrionário, mas em *M. urens* o nucelo aparentemente recobre mais o saco embrionário e possui maior quantidade de grãos de amido do que em *M. japira*. Isto pode ser um indicativo que *M. urens* possui mecanismos mais eficientes de adquirir nutrientes do que *M. japira*.

b) considerando a indisponibilidade de grãos de amido: em *M. japira* ocorrem muitos grãos de amido, provavelmente associados a compostos fenólicos, nas células que estão ao redor do canal micropilar. É possível que este amido estaria indisponível para nutrição do embrião. Por outro lado, em *M. urens* não ocorrem grãos de amido nas células ao redor da micrópila, sugerindo que esta substância de reserva teria sido translocada para o interior da cavidade seminal para nutrir o embrião.

c) considerando o isolamento por calose: a presença de calose é usual nos primeiros estádios da megagametogênese, principalmente em sacos embrionários do tipo “Polygonum”, mas tende a desaparecer nos estádios pós-meióticos. A deposição de calose, isolando o nucelo, pode resultar no aborto do óvulo fertilizado, uma vez que a calose estaria obstruindo o fluxo de nutrientes e causando a estivação dos elementos embrionários.

6) Ausência da sinérgide haustorial para captura de recursos para o desenvolvimento do embrião: um aspecto importante para ser analisado é a persistência das sinérgides após a fecundação, fenômeno raramente verificado. Em *M. urens* estas sinérgides tornam-se haustórios que penetram os tegumentos interno e externo em direção à micrópila.

Sinérgides haustoriais têm sido descritas para Acanthaceae, Asteraceae, Crassulaceae, Poaceae e Santalaceae com função de absorção e transporte de nutrientes. Em *M. japira* não

ocorrem sinérgides haustoriais, o que pode ser um dos fatores que acarretam aborto de frutos e sementes, uma vez que a translocação de nutrientes para o embrião seria menor. O relato de sinérgides haustoriais neste estudo é inédito para Leguminosae e deve ser melhor investigado e compreendido para posterior utilização em análises filogenéticas.

7) Análise da variabilidade genética: os dados deste trabalho indicam que as duas espécies estão dentro do Equilíbrio de Hardy-van Berg e possuem as maiores heterosigoidades dentro da família Leguminosae, assim o aborto de frutos e sementes provavelmente não está relacionado com a variabilidade genética das populações estudadas, mas se aumentarmos o número de indivíduos amostrados para cada espécie e também utilizarmos técnicas moleculares mais refinadas, talvez poderíamos analisar melhor a presença de endogamia e depressão endogâmica.

Este estudo fornece ampla gama de resultados sobre essas duas espécies da Mata Atlântica, um ecossistema que sofre com o processo de fragmentação e cujas espécies são carentes de dados sobre biologia reprodutiva. O conhecimento da biologia reprodutiva de plantas tropicais pode ajudar na explicação da evolução da alta diversidade encontrada nos trópicos e na elaboração de estratégias adequadas de conservação e manejo das florestas (Eguiarte *et al.*, 1992). Dentro do âmbito conservacionista, existe um consenso que as reservas florestais e os parques das regiões tropicais devem ser estabelecidos e manejados de maneira a preservar a máxima variabilidade dentro das espécies (Soulé, 1980; Whitmore, 1980; Schierenbeck *et al.*, 1997). Porém, sem dados sobre a biologia reprodutiva e a distribuição dessa variabilidade dentro ou entre populações, decisões

razoáveis sobre os meios mais efetivos para a sua preservação não podem ser tomadas (Marshall & Brown, 1975; Ashton, 1981; Loveless *et al.*, 1998).

Além de avaliar as diferentes causas de abortos de frutos e sementes, os resultados deste estudo evidenciam a importância de multi e interdisciplinares que são essenciais para responder perguntas complexas e que podem trazer soluções para vários problemas.