

AMANDA SOARES MIRANDA

**BIOLOGIA REPRODUTIVA EM *Ruellia subsessilis* (NEES) LINDAU
(ACANTHACEAE) EM INDIVÍDUOS DE POPULAÇÃO NATURAL E
CULTIVADOS SOB ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M672b
2010

Miranda, Amanda Soares, 1986-

Biologia reprodutiva em *Ruellia subsessilis* (Ness) Lindau (Acanthaceae) em indivíduos de população natural e cultivados sob estresse hídrico / Amanda Soares Miranda. – Viçosa, MG, 2010.

viii, 66f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Milene Faria Vieira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Ruellia subsessilis* - Fenologia. 2. *Ruellia subsessilis* - Reprodução. 3. Polimorfismo (Genética). I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 583.96

AMANDA SOARES MIRANDA

**BIOLOGIA REPRODUTIVA EM *Ruellia subsessilis* (NEES) LINDAU
(ACANTHACEAE) EM INDIVÍDUOS DE POPULAÇÃO NATURAL E
CULTIVADOS SOB ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Botânica, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de março de 2010.

Prof^a. Luzimar Campos da Silva
(Coorientadora)

Prof. Marco Antônio Oliva Cano
(Coorientador)

Prof^a. Rita Maria de Carvalho-Okano

Pesq. Kacilda Naomi Kuki

Prof^a. Milene Faria Vieira
(Orientador)

“A importância de uma coisa não se mede com fita métrica
nem com balanças
nem barômetros
etc.

Que a importância de uma coisa há que ser medida
pelo encantamento que a coisa produza em nós.”

Manoel de Barros

AGRADECIMENTOS

O olhar agora é de satisfação, aprendizado, saudade e humildade. Às pessoas mais iluminadas que um dia cruzaram meu caminho... vô Manoel, tio Zé e Arlete, flózinha Pedersoli!

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de fazer o curso de mestrado. A Capes pelo financiamento.

À professora Milene Faria Vieira pela orientação, amizade e pelo exemplo de profissional dedicada e competente.

Aos coorientadores e membros da banca pelas discussões e sugestões.

Aos amigos sempre imprescindíveis em minha caminhada! Em especial a Kacilda Kuki, ao Tiago Pires e a Vanessa Terra pelo grande suporte na realização desse trabalho.

Alan, Vinícius, Day, Dya, Rúbia e Noberto... muito grata pela ajuda!

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, do Horto Botânico e da Unidade de Crescimento de Plantas da UFV pelo auxílio sempre.

Aos colegas do herbário pelos momentos de descontração e alegria.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVO GERAL.....	3
JUSTIFICATIVA.....	4
METODOLOGIA.....	4
Áreas de estudo.....	4
Espécie estudada.....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
Capítulo 1: Polimorfismo floral, sistema reprodutivo e comportamento germinativo de sementes de <i>Ruellia subsessilis</i> (Nees) Lindau (Acanthaceae)	
Resumo.....	12
1.1. Introdução.....	13
1.2. Material e Métodos.....	15
1.2.1. Morfologia e biologia floral.....	15
1.2.2. Sistema reprodutivo.....	17
1.2.3. Pesagem, tamanho e comportamento germinativo de sementes oriundas da autopolinização e da polinização cruzada.....	18
1.2.4. Análise dos dados.....	19
1.3. Resultados.....	20
1.3.1. Morfologia e biologia floral.....	20
1.3.2. Sistemas reprodutivos.....	25
1.3.3. Comportamento germinativo das sementes.....	28
1.4. Discussões.....	29
1.5. Conclusões.....	33
1.6. Referências Bibliográficas.....	33
Capítulo 2: Fenologia reprodutiva em <i>Ruellia subsessilis</i> (Nees) Lindau (Acanthaceae) e interferência de fatores abióticos nas fenofases em indivíduos cultivados	
Resumo.....	37
2.1. Introdução.....	38
2.2. Material e Métodos.....	40
2.2.1. Monitoramento fenológicos de <i>R. subsessilis</i> em população natural....	40
2.2.2. Monitoramento fenológico de <i>R. subsessilis</i> e <i>R. brevifolia</i> em condições semi-controladas com imposição de escassez hídrica.....	41
2.3. Resultados.....	45
2.3.1. Monitoramento fenológicos de <i>R. subsessilis</i> em população natural....	45
2.3.2. Monitoramento fenológico de <i>R. subsessilis</i> e <i>R. brevifolia</i> em condições semi-controladas com imposição de escassez hídrica.....	48
2.4. Discussões.....	54
2.5. Conclusões.....	59
2.6. Referências Bibliográficas.....	60
CONCLUSÕES GERAIS.....	65
ANEXO 1.....	66

RESUMO

MIRANDA, Amanda Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2010. **Biologia reprodutiva em *Ruellia subsessilis* (Nees) Lindau (Acanthaceae) em indivíduos de população natural e cultivados sob estresse hídrico.** Orientadora: Milene Faria Vieira. Coorientadores: Luzimar Campos da Silva e Marco Antônio Oliva Cano.

No município de Viçosa, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, ocorrem três espécies de *Ruellia*, duas delas cleistógamas: *R. brevifolia* e *R. menthoides*. Na terceira espécie, *R. subsessilis*, não foi registrada cleistogamia típica (flores casmógamas e cleistógamas), mas foram observados botões florais em pré-antese com autopolinização espontânea, polimorfismo floral e alta frutificação, apesar da ausência de polinizadores, ressaltando a necessidade de estudos complementares sobre a sua reprodução. Os objetivos foram verificar a produção e sazonalidade de morfos florais distintos, as diferenças morfológicas e biológicas entre os morfos, a contribuição deles na produção de frutos, suas estratégias reprodutivas e a qualidade das sementes produzidas. Ainda, para melhor compreender a dinâmica reprodutiva, foram estudados aspectos fenológicos e a influência da disponibilidade hídrica na produção dos morfos em indivíduos de população natural e cultivados. Foram também cultivados indivíduos da cleistógama *R. brevifolia*, para fins comparativos. Os estudos foram conduzidos de janeiro/2009 a janeiro/2010 em indivíduos de populações naturais de *R. subsessilis* da Mata do Paraíso, fragmento de Floresta Atlântica, e do Horto Botânico e em indivíduos de *R. subsessilis* e *R. brevifolia* cultivados em casa de vegetação, em Viçosa. Nas estações seca e chuvosa, foram medidos os verticilos florais e contados os números de óvulos e de grãos de pólen, verificada sua viabilidade, a receptividade do estigma, a presença de nectários e de néctar e a longevidade das flores. Foram realizados testes de polinização e verificados o comprimento, o peso e a velocidade de germinação das sementes. Foram calculados os índices de atividade, para classificar a sincronia, e a intensidade de produção de flores e de frutos. Contaram-se os números de flores e de frutos por inflorescência aleatoriamente marcada. Nos indivíduos cultivados foram aplicados tratamentos de escassez hídrica no solo, medidas as alturas das plantas e calculadas as suas massas secas. Também foram contados os números de flores, de frutos e de sementes produzidas e a identificação de morfos foi através de morfometria floral em *R. subsessilis* e, por observação da presença de flores casmógamas ou de frutos em *R. brevifolia*. Constatou-se a produção sazonal de dois morfos florais: casmógamo reduzido (CR), na estação seca, e casmógamo normal (CN), na chuvosa. Foi observada

em baixa frequência (2,82%), na estação seca, um variante do morfo CR, que apresentou cleistogamia “pré-antese”. Morfos CR apresentaram menor comprimento de corola, estames, anteras e pistilo, menores números de óvulos e de grãos de pólen e maior longevidade das flores em relação aos CN. Os morfos CR parecem mais aptos à autogamia e os CN à alogamia, mas em ambos se verificou a autopolinização tardia. As sementes oriundas da autogamia foram mais pesadas e germinaram mais rápido que as oriundas de xenogamia. A floração e a frutificação foram contínuas com picos de intensidade máxima em janeiro e, mínima, em agosto, de forma que a distribuição foi sazonal e concentrada na estação chuvosa. A floração apresentou baixa sincronia ou assíncrona e a frutificação apresentou alta sincronia ou assíncrona. Foi encontrada relação significativa de aumento na intensidade da floração com o aumento da precipitação. A produção de flores por inflorescência foi significativamente maior na estação chuvosa, enquanto a produção de frutos por planta e por inflorescência não diferiu significativamente. Nos indivíduos cultivados, das espécies, foram observadas maior altura e massa seca das plantas sob maior disponibilidade hídrica. A produção de flores, frutos e sementes foram significativamente maiores nas plantas de *R. subsessilis* sob maior disponibilidade hídrica. Foram produzidos distintos morfos florais em *R. subsessilis*: CN sob maior disponibilidade hídrica e CR sob os tratamentos de escassez. Em *R. brevifolia*, flores cleistógamas foram produzidas sob escassez hídrica e flores casmógamas sob maior disponibilidade hídrica, condição em que se registrou maior produção de frutos. A partir desses resultados, pode-se inferir que *R. subsessilis* se mantém por autogamia no local de estudo, sem contudo excluir a possibilidade de xenogamia. O crescimento vegetativo e o sucesso reprodutivo de plantas cultivadas de ambas as espécies são influenciados pela disponibilidade hídrica no solo, o que também induz a produção de morfos florais distintos.

ABSTRACT

MIRANDA, Amanda Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2010. **Reproductive biology in *Ruellia subsessilis* (Nees) Lindau (Acanthaceae) in individuals from natural population and cultivated under water stress.** Advisor: Milene Faria Vieira. Co-advisers: Luzimar Campos da Silva and Marco Antônio Oliva Cano.

In Viçosa, Zona da Mata of Minas Gerais, there are three species of *Ruellia*; two are cleistogamous, *R. brevifolia* and *R. menthoides*. The third species, *R. subsessilis* was not registered cleistogamy typical (chasmogamous and cleistogamous flowers), but flower buds were observed in pre-anthesis with spontaneous self-pollination, floral polymorphism and high fruiting, despite the absence of pollinators, highlighting the need for further studies on its reproduction. The objectives were to investigate the production and seasonality of distinct floral morphs, the morphological and biological differences between morphs, their contribution for the production of fruits, their reproductive strategies and the quality of seed produced. Moreover, to better understand the reproductive dynamics, reproductive phenology were studied and the influence of water availability in the production of morphs in individuals from natural population and cultivated. Were also cultivated individuals of cleistogamous *R. brevifolia*, for comparative purposes. The studies were conducted on January, 2009 to January, 2010 in individuals from natural populations of *R. subsessilis* from Mata do Paraíso, that is part of Atlantic Forest, and from the Botanical Garden and individuals of *R. subsessilis* and *R. brevifolia* grown in a greenhouse in Viçosa. In the dry and rainy seasons, the flowers were measured and counted the numbers of ovules and pollen grains, its viability, stigma receptivity, the presence of nectaries and nectar and flowers longevity. Pollination tests were conducted and checked the seeds length and weight and their speed germination. Were calculated the indices of activity to classify the timing and intensity of production of flowers and fruits. Besides, were counted the numbers of flowers and fruits per inflorescence randomly selected. In individuals cultivated treatments were applied to water scarcity in the soil, plant heights measured and calculated their dry masses. Were also counted numbers of flowers, fruits and seeds produced and the identification of morphs was through floral morphometry in *R. subsessilis* and by observation of the presence of chasmogamous flowers or fruits in *R. brevifolia*. In *R. subsessilis* was found seasonal production of two floral morphs: chasmogamous reduced (CR), in the dry season, and chasmogamous normal (CN) in the rainy season. It was observed in low frequency (2.82%), in the dry season, a variant of

CR morph, which showed "pre-anthesis" cleistogamy. CR morphs had shorter length of corolla, stamens, anthers and pistil, smaller numbers of ovules and pollen grains and a higher floral longevity in relation to the CN. CR morph seems more able for autogamy and CN for allogamy, but in both occurred late self-pollination. Seeds from the autogamy were heavier and germinated faster than those from xenogamy. The flowering and fruiting were continuous with peak of maximum intensity in January and minimum in August, so that the distribution was seasonal and concentrated in the rainy season. Flowering had low synchronous or asynchronous and fruiting showed high synchrony or asynchronous. Significant relationship was found to increase in the intensity of flowering with increasing precipitation. The production of flowers per inflorescence was significantly higher in the rainy season, while the production of fruits per plant and inflorescence did not differ significantly. In cultivated individuals were observed greater height and dry weight of plants under higher water availability. The production of flowers, fruits and seeds were significantly higher in plants of *R. subsessilis* under greater water availability. *R. subsessilis* produced distinct floral morphs: CN under greater water availability and CR under the treatment of scarcity. In *R. brevifolia*, fruits were produced under water scarcity (from cleistogamous flowers) and under higher water availability (from flowers chasmogamous). In summary, the results of this study shown that *R. subsessilis* is maintained mainly by autogamy, resulting from early selfing in "pre-anthesis" cleistogamous flowers and late selfing from CR and CN chasmogamous flowers. The reproductive success of cultivated plants of both species are influenced by soil water availability, which also induces the production of distinct floral morphs.

INTRODUÇÃO GERAL

Acanthaceae é uma das maiores famílias de angiospermas tropicais com cerca de 4000 espécies de ervas e arbustos (Nees, 1847). É definida como monofilética devido à presença do retináculo, estrutura lignificada derivada do funículo que mantém a semente presa à cápsula (McDade *et al.*, 2000), além da presença de poucos óvulos e da deiscência explosiva do fruto (Scotland & Vollesen, 2000). Na maioria dos gêneros é comum a ocorrência de cristólitos, que são concreções de carbonato de cálcio, nas células epidérmicas dos órgãos vegetativos (Ezcurra, 1993). Outra característica importante e restrita à família, segundo Lindau (1895 *apud* Ezcurra, 1993) e Bremekamp (1965), é a presença de uma estrutura formada pela fusão entre os filetes e destes com a corola (adelfia + epipetalia), o que chamaram de filamento tipo “cortina”. Essa estrutura delimita duas cavidades no tubo da corola e sua função está relacionada à polinização (Manktelow, 2000).

O gênero *Ruellia*, o maior da família, apresenta cerca de 300 espécies distribuídas nos trópicos, sendo mais diverso no México, Brasil e oeste da América do Sul (Ezcurra, 1993; Tripp, 2007). Seus representantes ocupam diferentes tipos de habitats como aqueles com incidência de muita chuva e pouca luz, ambientes áridos, locais inundados e regiões de pequenas e grandes altitudes (Tripp, 2007).

No gênero ocorrem plantas invasoras com ampla distribuição e, por outro lado, endêmicas e, nesse caso, com distribuição restrita (Ezcurra, 1993). Algumas espécies são cultivadas como ornamentais por apresentarem flores vistosas e folhagem atrativa e têm-se relatos de espécie com potencial forrageiro na Argentina e de espécie utilizada na alimentação humana no México (Burkart, 1943).

As espécies de *Ruellia* apresentam grande diversidade morfológica de flores e, conseqüentemente, associação com diferentes polinizadores, o que resultou na evolução de distintas síndromes florais (Ezcurra, 1993). Essa diversidade, embora seja fonte de confusão taxonômica sobre o relacionamento entre as espécies, faz do gênero um interessante modelo para o estudo da evolução dos sistemas de polinização (Ezcurra, 1993; Tripp, 2007). Aliado a esse fato a ocorrência de cleistogamia, sistema reprodutivo que apresenta flores que nunca se abrem, mas que desenvolvem frutos. As flores cleistógamas constituem estruturas inconspícuas, difíceis de diferenciar dos botões florais (Uphof, 1938; Lord, 1981). As flores vistosas e que se abrem, por outro lado, são as casmógamas.

A produção combinada de flores casmógamas e cleistógamas tem sido interpretada como um meio de assegurar a fertilização e o consequente sucesso reprodutivo, nos casos em que a eficiência da polinização cruzada é reduzida, devido, por exemplo, a menor disponibilidade de polinizadores (Stebbins, 1970; Schemske & Lande, 1985). Assim, espécies de *Ruellia* que colonizam ambientes degradados podem a partir da produção de flores cleistógamas garantir a produção de sementes (Long, 1971; Piovano *et al.*, 1995; Sigrist & Sazima, 2002; Lima *et al.*, 2005).

A produção de flores casmógamas e cleistógamas é comumente sazonal, em resposta a variáveis ambientais, como ocorre, por exemplo, em *Stipa leucotricha* Trin. & Rupr. (Poaceae), em que a alta umidade desencadeia a produção de flores casmógamas e a baixa, a produção de cleistógamas (Brown, 1952). Além do regime hídrico, o fotoperíodo (Langer & Wilson, 1965), as variações na temperatura (Henslow, 1888) e a intensidade luminosa (Schemske, 1978) também são fatores que podem interferir na produção dos morfos florais. Assim, as variáveis ambientais podem interferir na expressão gênica ocasionando fenótipos que garantem a eficiência reprodutiva.

Em *Ruellia*, a autocompatibilidade parece ser frequente (Machado & Sazima, 1995; Piovano *et al.*, 1995, Lima & Vieira, 2006), especialmente devido às flores cleistógamas. Até o ano de 2005, foram descritas 13 espécies com essas flores (Lima *et al.*, 2005). Na área do presente estudo, um fragmento de Floresta Atlântica do município de Viçosa, Zona da Mata mineira, foram reconhecidas três espécies de *Ruellia* (*R. brevifolia*, *R. menthoides* e *R. subsessilis*), todas ocorrendo no sub-bosque em locais sombreados ou parcialmente sombreados (Braz *et al.*, 2002). Mas, dessas espécies Lima *et al.* (2005) e Lima & Vieira (2006) observaram cleistogamia apenas em *R. brevifolia* e *R. menthoides*.

Em *R. brevifolia* há ampla plasticidade floral, com produção de flores com formas intermediárias entre as flores casmógamas normais e as cleistógamas (casmógamas reduzidas e semi-cleistógamas; Lima *et al.*, 2005). Na espécie, a alternância de ciclos casmogâmicos e cleistogâmicos está relacionada às condições ecológicas e climáticas, sendo a ocorrência de flores cleistógamas predominante durante os meses com baixa precipitação e temperatura (Piovano *et al.*, 1995; Sigrist & Sazima, 2002), o que é comum nas espécies de *Ruellia* (Long, 1971).

R. subsessilis não apresentou flores cleistógamas típicas, apesar de também florescer e frutificar ao longo do ano (Lima *et al.*, 2005, Lima & Vieira, 2006). Essa espécie apresentou flores casmógamas com grande polimorfismo, com corola variando de 3,0 a 7,0 cm de comprimento e o tubo floral com diferentes graus de curvatura. Não foram registradas visitas legítimas de polinizadores às flores, apenas alguns pilhadores (Lima *et al.*, 2005). Apesar disso, Lima & Vieira (2006) constataram alta frutificação natural (62,07%).

O polimorfismo floral em *R. subsessilis* e sua frutificação constante, apesar da ausência de polinizadores e da ausência de cleistogamia, reafirmam a necessidade de estudos complementares sobre a reprodução dessa espécie, uma vez que incitam o questionamento: essa ampla plasticidade das flores casmógamas não estaria relacionada à ocorrência de flores cleistógamas? Em observações prévias à realização deste estudo, registraram-se botões florais com anteras deiscentes, estigmas receptivos e com deposição espontânea de pólen sobre os estigmas. Não seriam essas flores cleistógamas? Essa cleistogamia estaria relacionada às variações ambientais?

Assim, objetivou-se esclarecer aspectos adicionais sobre a biologia reprodutiva de *R. subsessilis*, visando conhecer melhor as suas estratégias reprodutivas sexuadas, o que pode subsidiar as estratégias de manejo de suas populações naturais.

OBJETIVO GERAL

Estudar a biologia reprodutiva de *R. subsessilis* tendo em vista:

- ✓ Esclarecer aspectos do comportamento fenológico, caracterizando a dinâmica de floração e frutificação ao longo do ano;
- ✓ Caracterizar, com base na morfometria floral, e classificar os morfos florais;
- ✓ Verificar em população natural a ocorrência de variação sazonal na frequência dos morfos florais e, em indivíduos cultivados, como a escassez hídrica estaria influenciando a produção dos morfos florais;
- ✓ Quantificar e verificar a viabilidade do pólen e a ocorrência e funcionalidade do nectário em diferentes morfos florais;
- ✓ Avaliar a participação da autopolinização e da polinização cruzada no sistema reprodutivo;

- ✓ Analisar o comportamento germinativo das sementes oriundas de diferentes sistemas de polinização.

JUSTIFICATIVA

No contexto atual da Floresta Atlântica fragmentada, restrita a pequenas áreas conservadas, se ressalta a importância dos fragmentos florestais para a manutenção da diversidade biológica (Zaú, 1998). Tendo em vista essa realidade há um crescente interesse em conservar os remanescentes florestais. Como exemplo, cita-se o fragmento da Estação de Pesquisa e Educação Ambiental da Mata do Paraíso (EPEAMP), no município de Viçosa, Zona da Mata de Minas Gerais, local do presente estudo. Há uma mobilização tardia no sentido de conservá-lo, pois até a década de 60 era local de extração de madeira e fonte de abastecimento de água para a cidade; hoje é uma floresta em processo de recuperação.

Na busca por conservar as espécies vegetais remanescentes dos fragmentos florestais, faz-se importante o conhecimento sobre a biologia reprodutiva, que envolvem estudos básicos sobre o ciclo reprodutivo das espécies. Entretanto, há ainda pouco interesse e investimento nesses estudos e essa realidade é ainda mais evidente em relação às plantas de sub-bosque, estrato onde se encontra maior riqueza de polinizadores (Kress & Beach, 1994), podendo esse desinteresse representar perdas substanciais da diversidade florística e faunística dos fragmentos.

METODOLOGIA – PARTE GERAL

Áreas de estudo

O presente trabalho foi realizado de janeiro de 2009 a janeiro de 2010, na Estação Experimental de Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (EPEAMP – Mata do Paraíso), fragmento florestal pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, sudeste brasileiro (Figura 1). O fragmento abrange uma área com cerca de 195 ha, em uma altitude média de 690 m localizada a 20°45'07''S e 42°55'31''O (Pezzopane, 2001).

Sua vegetação é definida segundo a classificação de Veloso *et al.* (1991) como Floresta Estacional Semidecidual Submontana ou Montana, estando inserida no

complexo vegetacional da Floresta Atlântica (Rizzini, 1997). A Mata do Paraíso desde 1966, quando foi doada pela prefeitura do município de Viçosa à UFV, não sofre maiores perturbações antrópicas por estar sob proteção dessa instituição e do Instituto Estadual de Florestas (IEF) (Volpato, 1994). Devido à intensa degradação no passado, com o cultivo de café, extração de madeira e formação de pastagens, o fragmento consiste hoje em uma floresta secundária residual que apresenta áreas em diversos estádios de recuperação (Pezzopane, 2001).

O clima de Viçosa, de acordo com classificação de Köppen (1948), é definido como *Cwb*, apresentando chuvas mal distribuídas ao longo do ano, com verão quente e úmido e inverno frio e seco (Pezzopane, 2001). As médias anuais de precipitação, umidade relativa do ar e temperatura são 1221,4 mm, 81% e 19,4°C, respectivamente (Figura 2), sendo as médias das temperaturas máxima e mínima, 26,4°C e 14,8°C (Departamento Nacional de Meteorologia, 1992). Dados da última norma climatológica apontam que a estação seca pode ser definida no período de abril a setembro, meses com menos de 60 mm de precipitação e temperatura oscilando de 11,1 a 26,6°C, e a estação chuvosa estende-se de outubro a março, com mais de 100 mm de chuvas mensais e temperaturas entre 15,8 e 30°C.

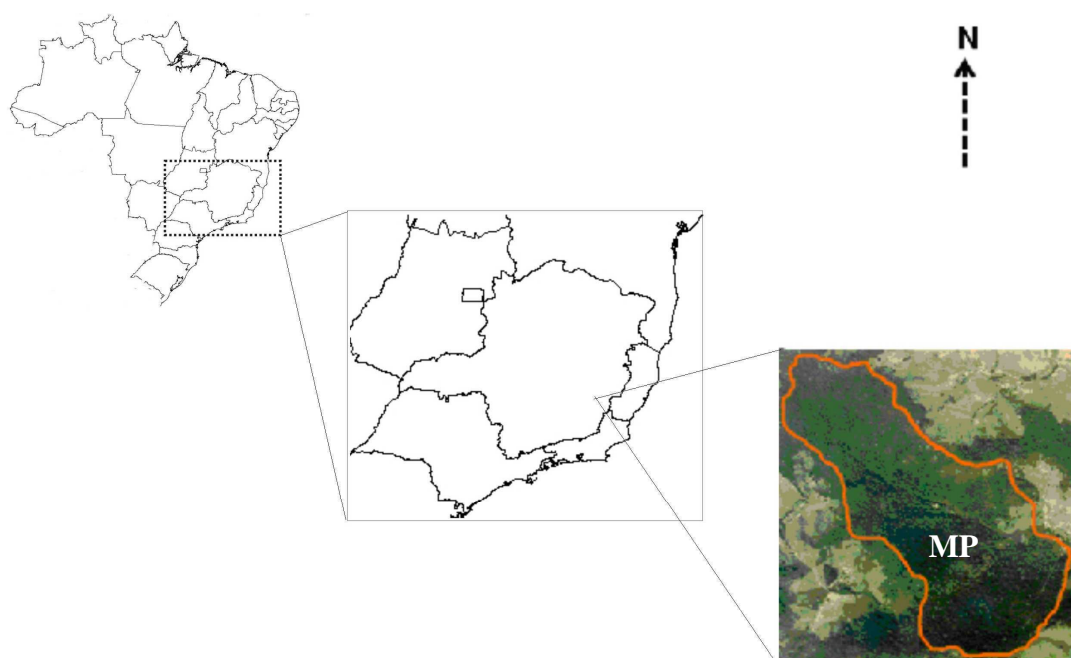


Figura 1: Localização geográfica e imagem aérea do fragmento florestal Mata do Paraíso, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Durante o ano de 2009, em setembro a precipitação (Figura 3) foi superior as normais climatológicas (Figura 2) e ao limite de 60 mm de chuva por mês usado para caracterizar mês seco. A estação seca em 2009, de janeiro a setembro, apresentou quantidades de chuva bem inferiores às normais climatológicas, sendo a média de precipitação por mês de 17,4 mm enquanto o valor das normais corresponde a 32,5 mm. As temperaturas mantiveram valores oscilando dentre os valores das normais climatológicas. Apesar das variações de precipitação e temperatura entre o período de estudo e as normais climatológicas, essas variáveis se correlacionaram positivamente e significativamente a 1% de probabilidade ($r_s = 0.8702$, $p = 0.0002$; $r_s = 0.9290$; $p < 0.0001$, respectivamente), ocorrendo aumento da temperatura e precipitação nos meses da estação chuvosa e redução desses valores na estação seca. Esses dados climatológicos do período de estudo foram obtidos na Estação Meteorológica da UFV.

A variação do comprimento do dia (duração astronômica do dia ou fotoperíodo) em Viçosa ao longo do ano (Figura 4) foi obtida a partir do desenvolvimento de uma equação como sugerido por Harakawa (2004), considerando a latitude do município a 20°45'S (ANEXO 1). Observa-se uma variação anual no fotoperíodo de 10,86 a 13,36h, sendo esses valores menores na estação seca cujos dias apresentam, em média, 11,33h enquanto na estação chuvosa, os dias possuem, em média, 12,91h de duração. Quanto ao tempo de brilho solar (Figura 4) não há diferenças entre as estações seca e chuvosa, sendo os valores máximo (7,21h) e mínimo (3,78h) observados no período chuvoso. Os dados de duração de brilho solar do período de estudo foram obtidos na Estação Meteorológica da UFV.

Além da Mata do Paraíso, estudos adicionais foram conduzidos no Horto Botânico (HB) da UFV, tendo em vista a necessidade de suporte laboratorial (Laboratório de Anatomia Vegetal e Unidade de Crescimento de Plantas). Nessa área alguns indivíduos de *Ruellia subsessilis* foram cultivados em 2000, a partir de sementes oriundas da Mata do Paraíso. Ao longo de nove anos (de 2000 a 2009), verificaram-se novos indivíduos estabelecidos, ocupando espontaneamente locais mais sombreados.

Indivíduos de *R. subsessilis* também foram cultivados em casa de vegetação a partir de enraizamento natural de estacas retiradas de plantas adultas na população da Mata do Paraíso. Foram cultivados ainda indivíduos de *Ruellia brevifolia*, espécie tipicamente cleistógama, para fins comparativos. Esse cultivo em casa de vegetação foi necessário para evitar o efeito das precipitações pluviométricas e, assim, pode-se avaliar a influência do estresse hídrico sob a produção dos morfos florais.

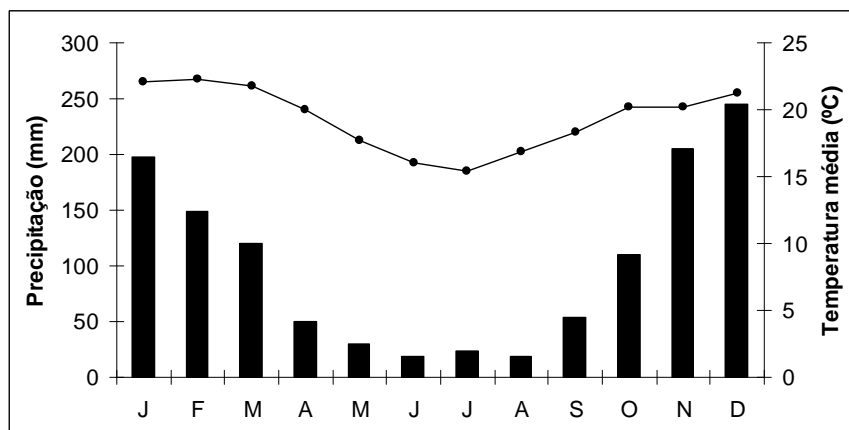


Figura 2: Diagrama climatológico dos anos de 1961 a 1990 (normais climatológicas) para o município de Viçosa, Minas Gerais. Colunas = precipitação (mm); Linha = temperatura (°C).

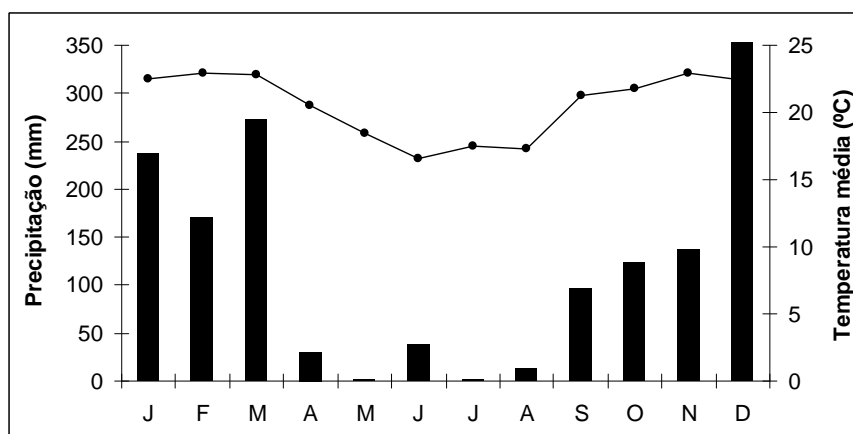


Figura 3: Diagrama climatológico do período de janeiro a dezembro de 2009 para o município de Viçosa, Minas Gerais. Colunas = precipitação (mm); Linha = temperatura (°C).

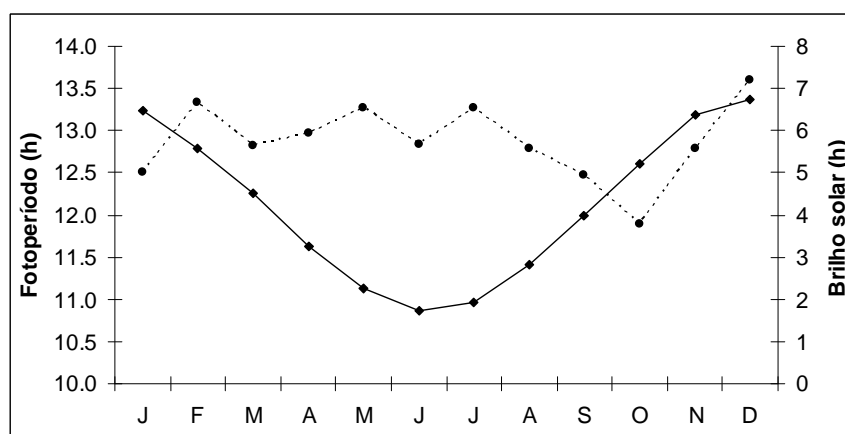


Figura 4: Diagrama com a duração astronômica do dia (fotoperíodo) e brilho solar para o município de Viçosa, Minas Gerais. Linha contínua = fotoperíodo (h); Linha tracejada = brilho solar (h).

Espécie estudada

Ruellia subsessilis (Nees) Lindau é subarbustiva, perene, com 0,7 a 1,5 m de altura. O caule, quando jovem, é quadrangular e os nós são geniculados. Apresenta um “rizoma” basal e propagação vegetativa por divisão do caule aéreo (Ezcurra, 1993). As folhas são opostas, pecioladas, com margem do limbo inteira. As inflorescências são cimas monocasiais axilares que sustentam flores rosa casmógamas com grande polimorfismo floral; o tubo da corola varia de 3,0 a 7,0 cm de comprimento (Figura 4) (Lima *et al.*, 2005). O fruto é uma cápsula, que, quando madura, apresenta comprimento aproximado de 2,0 cm. As sementes mantêm-se ligadas ao fruto antes da deiscência via retináculo e, na deiscência, são liberadas de forma explosiva (Nees, 1847; Ezcurra, 1993). *R. subsessilis* possui potencial para ser utilizada como planta ornamental (Braz *et al.* 2000).

R. subsessilis apresenta distribuição restrita ao Brasil, mais especificamente ao sudeste de Minas Gerais e centro-oeste do Espírito Santo (Braz *et al.*, 2002). Na Mata do Paraíso, é encontrada em áreas sombreadas do sub-bosque, geralmente formando agrupamentos de indivíduos. Indivíduos observados em locais mais perturbados podem apresentar as folhas levemente mais ásperas e escuras e flores um pouco menores (Braz *et al.*, 2002). Material botânico testemunho foi depositado no herbário VIC do Departamento de Biologia Vegetal da UFV (nº 25.213).



Figura 4: Indivíduo de *Ruellia subsessilis* com destaque para flor (à direita) e frutos (à esquerda), Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAZ, D.M.; CARVALHO-OKANO, R.M.; KAMEYAMA, C. 2002. Acanthaceae da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 495-504.

BRAZ, D.M.; VIEIRA, M.F.; CARVALHO-OKANO, R.M. 2000. Aspectos reprodutivos de espécies de Acanthaceae Juss. de um fragmento florestal do município de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres** **47**: 229-239.

BREMEKAMP, C.E.B. 1965. Delimitation and subdivision of the Acanthaceae. **Bulletin of Botanical Survey of India** **7**: 21-30.

BROWN, W.V. 1952. The relation of soil moisture to cleistogamy in *Stipa leucotricha*. **Botanical Gazette** **113**: 438-444.

BURKART, A. 1943. Acantaceas indígenas como forajeras de emergencia. **Darwiniana** **6**: 192-202.

CULLEY, T.M. & KLOOSTER, M.R. 2007. The cleistogamous breeding system: a review of its frequency, evolution, and ecology in angiosperms. **The Botanical Review** **73**: 1-30.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – DNMET. 1992. **Normais Climatológicas (1961-1990)**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 84p.

EZCURRA, C. 1993. Systematics of *Ruellia* (Acanthaceae) in southern South America. **Annals of Missouri Botanical Garden** **80**: 787-845.

HAMAKAWA, P.J. 2004. **Noções de Cosmografia**. Caderno Didático 36, AEAGRI/DEA/UFV, 37p.

HENSLOW, G. 1888. Cleistogamy. **Nature** **29**: 104-105.

KOEPPEL, W. 1948. **Climatologia**: com um estúdio de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Económica, 479p.

KRESS, W.J. & BEACH, J.H. 1994. Flowering plant reproductive systems. *In* **La Selva – Ecology and Natural History of a Neotropical Rain Forest** (L. A. MacDade, K. S. Bawa, H. A. Hespenheide & G. S. Hartshorn, eds.). University of Chicago Press, Chicago, p.161-182.

LANGER, R.H.M., & WILSON, D. 1965. Environmental control of cleistogamy in prairie grass (*Bromus unioloides* H. B. K.). **New Phytologist** **64**: 80–85.

LIMA, N.A.S. & VIEIRA, M.F. 2006. Fenologia de floração e sistema reprodutivo de três espécies de *Ruellia* (Acanthaceae) em fragmento florestal de Viçosa, Sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica** **29**: 681-687.

LIMA, N.A.S.; VIEIRA, M.F.; CARVALHO-OKANO, R.M.; AZEVEDO, A.A. 2005. Cleistogamia em *Ruellia menthoides* (Nees) Hiern e *R. brevifolia* (Pohl) C. Ezcurra (Acanthaceae) em fragmento florestal do Sudeste brasileiro. **Acta Botânica Brasilica** **19**: 443-449.

LONG, R.W. 1971. Floral polymorphy and amphimictic breeding systems in *Ruellia carolinensis* (Acanthaceae). **American Journal of Botany** **58**: 525-531.

LORD, E.M. 1981. Cleistogamy: a tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. **The Botanical Review** **47**: 421-449.

MACHADO, I.C.S. & SAZIMA, M. 1995. Biologia da polinização e pilhagem por beija-flores em *Ruellia asperula* Lindau (Acanthaceae) na caatinga, nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica** **18**: 24-33.

MANKTELOW, M. 2000. The filament curtain: a structure important to systematics and pollination biology in the Acanthaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** **133**: 129-160.

MCDADE, L.A.; MASTA, S.E.; MOODY, M.L.; WATERS, E. 2000. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from two genomes. **Systematic Botany** **25**: 106-121.

NEES, C.G. 1847. Acanthaceae. In **Flora Brasiliensis** (C. Martius, ed). Munchen. 164p.

PEZZOPANE, J.E.M. 2001. **Caracterização microclimática, ecofisiológica e fitossociológica em uma floresta estacional semidecidual secundária, em Viçosa, MG**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 255p.

PIOVANO, M.; GALETTO, L.; BERNARDELLO, L. 1995. Floral morphology, nectar features and breeding system in *Ruellia brevifolia* (Acanthaceae). **Revista Brasileira de Biologia** **55**: 409-418.

- RIZZINI, C.T. 1997. **Tratado de Fitogeografia do Brasil**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 747p.
- SCHEMSKE, D.W. 1978. Evolution of reproductive characteristics in Impatiens (Balsaminaceae): the significance of cleistogamy and chasmogamy. **Ecology** **59**: 596-613.
- SCHEMSKE, D.W. & LANDE, R. 1985. The Evolution of Self-Fertilization and Inbreeding Depression in Plants. II. Empirical Observations. **Evolution** **39**: 41-52.
- SCOTLAND, R.W. & VOLLESEN, K. 2000. Classification of Acanthaceae. **Kew Bulletin** **55**: 513-589.
- SIGRIST, M.R. & SAZIMA, M. 2002. *Ruellia brevifolia* (Pohl) Ezcurra (Acanthaceae): fenologia da floração, biologia da polinização e reprodução. **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 35-42.
- STEBBINS, G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: Pollination Mechanisms. **Annual Review of Ecology and Systematics** **1**: 307-326.
- TRIPP, E.A. 2007. Evolutionary Relationships within the Species-Rich Genus *Ruellia* (Acanthaceae). **Systematic Botany** **32**: 628-649.
- UPHOF, J.C. 1938. Cleistogamic flowers. **The Botanical Review** **4**: 21-49.
- VELOSO, H.P.; RANGEL-FILHO, A.L.; LIMA, J.C.A. 1991. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 584p.
- VOLPATO, M.M.L. 1994. **Regeneração natural em uma floresta secundária no domínio da Mata Atlântica: uma análise fitossociológica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 123p.
- ZAÚ, A.S. 1998. Fragmentação da Mata Atlântica: Aspectos Teóricos. **Floresta e Ambiente** **5**: 160-170.

CAPÍTULO 1

Polimorfismo Floral, Sistema Reprodutivo e Padrões Germinativos de Sementes de *Ruellia subsessilis* (Nees) Lindau (Acanthaceae)

Resumo

Ruellia subsessilis é autógama, produz flores casmógamas polimórficas ao longo de todo o ano e, apesar de não serem registradas visitas legítimas de polinizadores, a frutificação natural é alta. Em observações prévias, botões florais em pré-antese apresentaram anteras deiscuentes, estigmas receptivos e deposição espontânea do pólen sobre os estigmas, o que somado ao fato da cleistogamia ser comum no gênero, ressalta a necessidade de estudos complementares sobre a reprodução dessa espécie. Nesse intuito buscou-se responder às seguintes questões: Há produção de morfos florais distintos? A produção dos morfos é sazonal (estação seca e chuvosa)? Quais as diferenças morfológicas e biológicas entre os morfos? A contribuição dos morfos na produção de frutos é semelhante? A espécie é predominantemente autógama? Sementes oriundas da autogamia são distintas das oriundas da xenogamia? Para responder essas questões, de junho de 2009 (estação seca) a janeiro de 2010 (estação chuvosa), flores frescas coletadas em população natural foram avaliadas quanto à morfometria, número de óvulos, quantidade e viabilidade dos grãos de pólen, receptividade do estigma, presença de nectários e de néctar e longevidade. Realizaram-se polinizações manuais, em ambas as estações do ano, e analisaram-se sementes oriundas de autopolinização manual e polinização cruzada quanto ao comprimento, peso e velocidade de germinação. Constatou-se a produção sazonal de dois diferentes morfos florais: casmógamo reduzido (CR), na estação seca, e casmógamo normal (CN), na chuvosa. Foi observada em baixa frequência (2,82%), na estação seca, uma variante do morfo CR, que apresentou cleistogamia “pré-antese”. Morfos CR apresentaram menor comprimento de corola, estames, anteras e pistilo, menor número de óvulos e grãos de pólen e maior longevidade das flores em relação aos CN. Os morfos CR estariam mais aptos à autogamia enquanto os CN à alogamia, mas a espécie é prioritariamente autógama no local de estudo. Ambos os morfos têm contribuído significativamente com a mesma produção de frutos. As sementes oriundas da autogamia são mais pesadas e germinam mais rápido que as da xenogamia. A partir dos resultados, pode-se dizer que a espécie apresenta dinâmica reprodutiva adaptada à manutenção da população no local de estudo sem, contudo, excluir possibilidades de exploração de novos habitats.

1.1. Introdução

Os estudos sobre os sistemas reprodutivos em angiospermas fornecem subsídios para o entendimento da evolução dos mecanismos reprodutivos e possibilitam uma melhor compreensão da ocupação e manutenção das plantas nos mais diversos ambientes, incluindo os remanescentes vegetacionais, comuns nos dias atuais. Por exemplo, a autogamia é um dos mecanismos que possibilita a ocorrência de plantas em ambientes perturbados, pois, ao contrário da xenogamia, independe de polinizadores para a produção de frutos e sementes (Goodwillie *et al.*, 2005).

Em espécies autóгамas, o menor investimento em atração de polinizadores pode resultar em mais recursos para produção de sementes, além de ocorrer possibilidade de manutenção do complexo gênico adaptado ao ambiente em questão e eliminação dos alelos deletérios da população (Schemske & Lande, 1985). Contudo, pode haver redução da variabilidade genética, depressão endogâmica, quando os alelos deletérios não são expurgados, e aumento da competição entre as sementes dispersadas nas imediações da planta-mãe (Schemske & Lande, 1985; Goodwillie *et al.*, 2005).

Nas populações de plantas autóгамas podem ocorrer ainda algumas estratégias que possibilitam a fertilização cruzada, como a autopolinização tardia, na qual há produção de sementes por autogamia apenas em caso de falha na polinização cruzada (Lloyd, 1979). Há, portanto, a manutenção no sistema reprodutivo de um equilíbrio dinâmico entre autogamia e xenogamia, influenciado pelos fatores ambientais. Outra estratégia que permite a ocorrência desse sistema reprodutivo misto é a cleistogamia (Stebbins, 1970).

O termo cleistogamia, segundo Culley & Klooster (2007), foi utilizado pela primeira vez por Kuhn, em 1867, para descrever flores que nunca se abriam (“closed marriage”), as flores cleistógamas (CL), mas que desenvolviam frutos. Depois, em 1877, Darwin (*apud* Culley & Klooster, 2007) observou que algumas espécies produziam exclusivamente flores CL e outras produziam simultaneamente flores CL e casmógamas (CA), as quais se abrem (“open marriage”). Por isso, atualmente, cleistogamia é um termo utilizado para se referir a um morfo floral reduzido (flores CL) ou para designar espécies de plantas que produzem flores CL e CA (cleistogamia dimórfica). As flores CL caracterizam-se pela redução no tamanho da corola e do androceu e por relativa maturação precoce das anteras quando comparado às flores CA (Lord, 1981).

A produção dos morfos florais na planta é, comumente, sazonal, desencadeada pelas condições climáticas (Schemske, 1978; Lord, 1981). Em espécies cleistógamas podem ocorrer morfos florais com características intermediárias entre as flores CL e CA, denominadas casmógamas reduzidas e semicleistógamas (Long, 1971). Os morfos florais podem apresentar ainda diferenças nas sementes relativas ao tamanho e peso (Sun, 1999) e ao comportamento de germinação (Waller, 1984; Cheplick, 1996); as sementes oriundas de flores CL são maiores e mais pesadas e germinam mais devagar se comparadas às oriundas de flores CA.

Além da cleistogamia dimórfica, alguns autores têm reconhecido a “cleistogamia em pré-antese” (Diaz & Macnair, 1999; Huang *et al.*, 2006) em algumas espécies. Nesse caso, alguns botões florais se autopolinizam e posteriormente se abrem. A vantagem seletiva dessa cleistogamia está associada ao aumento da atratividade das flores CA aos polinizadores e a frutificação garantida (Culley & Klooster, 2007). Foi verificada em *Mimulus nasutus* Greene (Scrophulariaceae; Diaz & Macnair, 1999) e *Omphalogramma souliei* Franch. (Primulaceae; Huang *et al.*, 2006). Porém, devido ao fato da flor se abrir e não apresentar redução drástica nos tamanhos da corola e do androceu, muitos autores não consideram as espécies com essas características reprodutivas como cleistógamas e suas flores são denominadas de “casmógamas autofertilizáveis”.

Culley & Klooster (2007) listaram 693 espécies cleistógamas típicas de angiospermas, distribuídas em 228 gêneros e cerca de 50 famílias, dentre elas, Acanthaceae. Nessa família, destacam-se as espécies de *Ruellia* com, pelo menos, 13 espécies cleistógamas, duas delas (*R. brevifolia* e *R. menthoides*) ocorrentes em Viçosa, Zona da Mata de Minas Gerais (Lima *et al.*, 2005).

Ruellia subsessilis, a terceira espécie ocorrente em Viçosa (Braz *et al.*, 2002), é autógama, floresce e frutifica ao longo do ano, assim como as duas outras espécies, mas possui apenas flores CA, altamente polimórficas (Lima *et al.*, 2005, Lima & Vieira, 2006). Não foram registradas visitas legítimas de polinizadores às suas flores e, apesar disso, a frutificação natural encontrada foi alta (62,07%) (Lima & Vieira, 2006).

Foi verificado em flores de *R. subsessilis*, em observações realizadas previamente ao presente estudo, que botões florais em pré-antese apresentam anteras deiscentes, estigmas receptivos e deposição espontânea do pólen sobre os estigmas. Essas observações somadas aos dados citados anteriormente e ao fato da cleistogamia

ser comum no gênero, demonstram a necessidade de estudos complementares sobre a reprodução dessa espécie.

Para tentar esclarecer aspectos adicionais da reprodução sexuada de *R. subsessilis*, buscou-se responder às seguintes questões: (1) Quais as diferenças morfológicas e biológicas entre os morfos florais? (2) A produção de morfos florais distintos é sazonal (estação seca e chuvosa)? (3) A contribuição dos morfos na produção de frutos é semelhante? (4) *R. subsessilis* é predominantemente autógama? (5) Sementes oriundas da autogamia são distintas (tamanho, peso e velocidade de germinação) das oriundas da xenogamia?

1.2. Material e Métodos

1.2.1. Morfologia e biologia floral

Foram utilizadas 353 flores frescas coletadas em indivíduos diferentes, de junho de 2009 a janeiro de 2010, de forma que o período de junho a setembro de 2009 cobriu a estação seca e, de outubro de 2009 a janeiro de 2010, a chuvosa. Foram feitas medições em 30 a 80 flores por mês, exceto julho, quando foi possível medir apenas 18 flores. Com auxílio de microscópio estereoscópico, as medições seguiram as ilustradas na Figura 1: (A) comprimento do cálice, (B) diâmetro da corola, (C) comprimento total da corola, (D) do tubo da corola, (E) dos estames maiores e (F) do pistilo. Também foram medidos o comprimento de uma antera escolhida aleatoriamente e os ramos do estilete, assim como foi contabilizado o número de óvulos em cada flor.

O número de grãos de pólen foi contado em uma antera em flores produzidas na estação seca (em julho) e chuvosa (em março). Para tanto, foram utilizados cinco botões em pré-antese de cinco indivíduos diferentes em cada estação, totalizando uma amostragem de 50 botões estocados em etanol 70%. De cada botão, foi feita uma lâmina com os grãos de pólen da antera escolhida aleatoriamente, macerando-a em carmim acético (Dafni *et al.*, 2005). Na contagem dos grãos de pólen totais foram separados os viáveis dos inviáveis. Foram considerados viáveis os grãos que apresentaram o protoplasma totalmente corado e mantiveram o formato esférico.

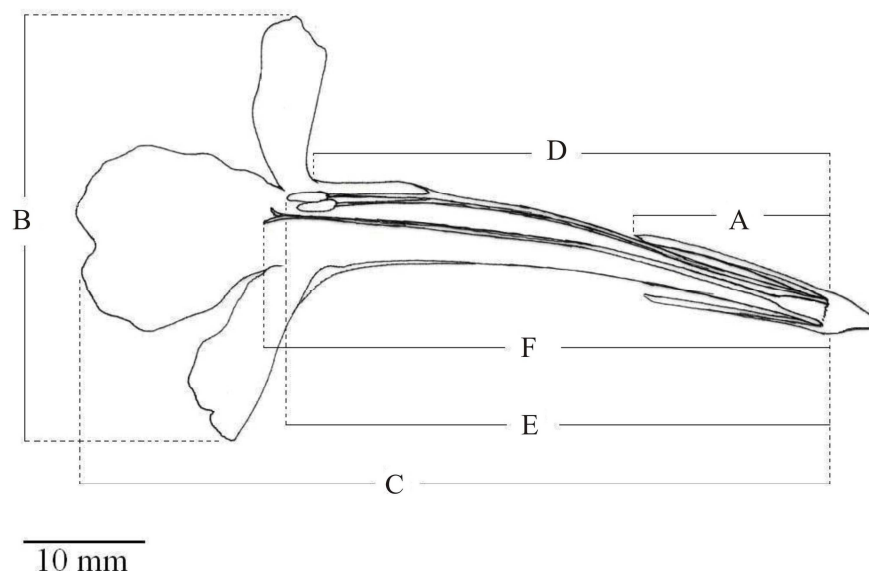


Figura 1: Flor de *Ruellia subsessilis*, em corte longitudinal, com indicações de medidas realizadas no estudo morfométrico. A = comprimento do cálice; B = diâmetro da corola; C = comprimento total da corola; D = comprimento do tubo da corola; E = comprimento dos estames maiores; F = comprimento do pistilo.

Para verificar a receptividade do estigma foi realizado o teste com peróxido de hidrogênio a 2% (Dafni *et al.*, 2005). Foram utilizadas 190 flores: 110 na estação seca e 80 na chuvosa. Foram dois horários na estação seca e na chuvosa (Figura 2) em que os testes foram realizados em botões florais, no dia anterior a antese, após o que foram realizados 10 repetições do teste em intervalo de uma hora até ocorrer senescência da flor.

A)	<u>18h</u>	<u>24h</u>	<u>7h</u>	<u>8h</u>	<u>9h</u>	<u>10h</u>	<u>11h</u>	<u>12h</u>	<u>13h</u>	<u>14h</u>	<u>15h</u>
B)	<u>18h</u>	<u>24h</u>	<u>7h</u>	<u>8h</u>	<u>9h</u>	<u>10h</u>	<u>11h</u>	<u>12h</u>			
	1º dia (botão floral)		2º dia (antese à senescência da flor)								

Figura 2: Horário dos testes de receptividade do estigma em morfos florais de *Ruellia subsessilis*. A) Estação seca; B) Estação chuvosa.

Para confirmar a localização dos nectários florais (segundo Moylan *et al.*, 2004) e verificar a sua funcionalidade, botões em pré-antese e flores abertas, produzidos na estação seca e chuvosa, foram fixados em FAA₅₀ e, posteriormente, estocados em etanol 70%. Seus pistilos foram desidratados em série etílica butílica, incluídos em parafina (Johansen, 1940) e seccionados em cortes transversais e longitudinais com 6µm de espessura. Algumas secções foram coradas com safranina xilólica e azul de astra e em outras foi aplicado o teste de PAS (reação de Schiff: O'Brien & McCully, 1981), que evidencia a presença de polissacarídeos. Fotografias foram confeccionadas em fotomicroscópio (Olympus AX 70) equipado com sistema U-Photo.

Adicionalmente, testou-se nas flores a presença de glicose com Tiras de Glicose® (Alamar Tecno Científica Ltda.), indicadoras de açúcares simples (Dafni *et al.*, 2005).

Algumas flores foram acompanhadas, desde a sua abertura até a senescência, na estação seca e outras na estação chuvosa, para verificar a sua longevidade.

Os dados climatológicos do período de estudo foram obtidos na Estação Meteorológica da Universidade Federal de Viçosa e, a última norma climatológica, disponibilizada pelo Departamento Nacional de Meteorologia (1992).

1.2.2. Sistema reprodutivo

Os tratamentos de polinização seguiram metodologia sugerida por Dafni *et al.* (2005) e foram realizados em junho de 2009 (estação seca) e em janeiro de 2010 (estação chuvosa).

Foram realizados os seguintes tratamentos: (1) Agamospermia – botões florais em pré-antese foram emasculados e ensacados; (2) Autopolinização espontânea - botões florais em pré-antese foram ensacados; (3) Polinização cruzada – botões florais em pré-antese foram emasculados, ensacados e, após a antese, as flores foram polinizadas com pólen de outra planta e reensacadas; (4) Polinização aberta em flores emasculadas - botões florais em pré-antese foram emasculados e, após a antese, as flores foram expostas à visitação; (5) Polinização aberta (controle) – flores marcadas foram expostas à visitação; (6) Autopolinização manual em botões florais – botões florais em pré-antese receberam o próprio pólen e foram ensacados; (7) Polinização cruzada em botões florais

– botões florais em pré-antese foram emasculados e polinizados com pólen de outra planta.

Na estação seca foram utilizadas 50 flores para cada tratamento, exceto os tratamentos 6 e 7 que foram apenas 30 flores. Na estação chuvosa foram utilizadas 30 flores por tratamento, exceto o de agamospermia que não foi realizado nessa estação, apenas na seca.

1.2.3. Pesagem, tamanho e padrão germinativo de sementes oriundas da autopolinização e da polinização cruzada

As sementes coletadas em setembro de 2009, oriundas de tratamentos de autopolinização e polinização cruzada em flores casmógamas foram pesadas em balança de precisão Adventurer Ohaus (Modelo AR2140). O peso das sementes, de cada tratamento, foi estimado a partir da pesagem de uma amostra com 200 sementes. O tamanho das sementes (do hilo ao ápice, maior comprimento) foi obtido com auxílio de paquímetro digital utilizando-se 30 sementes de cada tratamento. Para a realização do teste de germinação, as sementes foram armazenadas em sacos de papel a temperatura ambiente (21°C) por dois meses, quando se atingiu número suficiente de sementes.

Amostras de 40 sementes de polinização cruzada e de autopolinização, com três repetições de cada tratamento (total de 240 sementes), foram colocadas para germinar em caixas plásticas “gerbox”. Cada caixa continha camada tripla de papel de filtro (germitest) embebido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel, mantidas em luz e temperatura ambientes. Quando necessário, adicionou-se água para manter o papel úmido.

A observação da germinação foi feita durante 17 dias consecutivos, efetuada diariamente à mesma hora (17:00 h) e retirando as plântulas normais, ou seja, com raiz primária, hipocótilo e cotilédones completamente expandidos, para evitar que o desenvolvimento das plântulas interferisse na germinação das outras sementes (Brasil, 1992).

Para as sementes de cada tratamento, foi calculada a velocidade de germinação (VG) conforme sugerido por Vieira & Carvalho (1994), através da seguinte expressão:

$$VG = (G_1 \times N_1) + (G_2 \times N_2) + \dots + (G_n \times N_n) / G_1 + G_2 + \dots + G_n$$

Onde: VG = velocidade de germinação; $G_{1,2 \dots n}$ = número plântulas normais retiradas do experimento a cada dia de análise; $N_{1, 2 \dots n}$ = número de dias decorridos da semeadura até a respectiva contagem.

Finalizados os testes, as sementes que não germinaram foram contadas e observadas em microscópio estereoscópico, para verificar a presença ou ausência do embrião. Aquelas que continham embrião e que não germinaram foram testadas quanto à viabilidade, para verificar a presença de dormência, utilizando solução de tetrazólio a 0,075%, por aproximadamente uma hora, a 25°C. Os embriões com coloração rósea foram considerados dormentes e os não corados foram considerados mortos. A partir desses dados se estimou a taxa de germinação (% de sementes que germinaram) e de viabilidade das sementes (% de sementes viáveis).

1.2.4. Análise dos dados

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (Cochran C). Quando a distribuição foi normal e as variâncias iguais, foi realizada comparação entre duas médias a partir de teste de Student (teste t) e, apenas nos casos específicos do sistema reprodutivo realizado comparação através de teste de Chi-quadrado (teste X^2). Nos casos em que não ocorreu confirmação de normalidade e homogeneidade foi aplicado teste de Mann-Whitney (U) para comparar duas médias e, teste de Kruskal-Wallis (H), através de método de Dunn, quando se tratava de mais de duas médias. A correlação entre variáveis foi realizada através de Correlação de Spearman. Adotou-se significância padrão de 5% (Zar, 1996).

1.3. Resultados

1.3.1. Morfologia e biologia floral

Na Tabela 1 encontram-se os dados sobre a morfologia e biologia de flores de *R. subsessilis*. Nas medições, excetuando-se o cálice, as demais partes florais apresentaram valores com grande amplitude, sendo todos os valores mínimos registrados na estação seca e os valores máximos na estação chuvosa; os valores médios, obtidos nas estações, foram significativamente diferentes. As medidas de comprimento dos estames e do pistilo, nas duas estações, mostraram a hercogamia (barreira física entre anteras e estigma). Nesse caso, estigma acima das anteras.

Analisando as variações morfométricas mensalmente (de junho de 2009 a janeiro de 2010) verificou-se que o comprimento total da corola em setembro foi maior que o encontrado nos demais meses da estação seca e igual ao valor dos meses chuvosos (Figura 3). Os números de óvulos registrados não apresentaram diferenças significativas entre setembro e os demais meses da estação seca e, foi menor que o número encontrado nos meses chuvosos (Figura 4). Esses dados indicam que a corola responde mais prontamente às variações de umidade, visto que setembro apresentou precipitação superior aos outros meses secos. Adicionalmente, foi constatada correlação significativa apenas entre o comprimento da corola e os valores de precipitação do período de estudo ($r_s = 0,77$, $p < 0,01$). As demais características morfológicas não apresentaram diferenças significativas.

A quantidade estimada de produção de pólen foi maior na estação chuvosa se comparada à da estação seca ($t = 5,674$, $p < 0,01$) (Tabela 1). Entretanto, não foram constatadas variações significativas na porcentagem de grão viáveis ($t = -1,97$, $p = 0,054$) e inviáveis ($t = 1,97$, $p = 0,054$) entre as estações.

Os estigmas, localizados na porção ventral dos ramos do estilete, encontravam-se receptivos no botão floral, 12 horas antes da antese, até o momento de senescência da flor, em ambas as estações (Tabela 1). Foram identificados três tipos de ramos do estilete (Figura 5). Os assimétricos foram os mais frequentes (53,6%), seguidos pelos quase simétricos e grandes (34,9%), ambos observados nas duas estações. Os simétricos e pequenos apresentaram baixa frequência (11,4%) e ocorreram exclusivamente na estação seca.

Tabela 1: Morfometria, número de óvulos, quantidade e viabilidade dos grãos de pólen, receptividade do estigma, presença de nectários e de néctar e longevidade de flores de *Ruellia subsessilis*, na estação seca e chuvosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Características florais	Estações						
	Seca			Chuvosa			
Medições (cm) ¹	Min	M	Max	Min	M	Max	
Cálice	0,93	1,65	2,54	0,99	1,81	2,68	
Corola	Diâmetro	1,19	2,73*	3,78	2,24	4,03*	5,56
	Tubo	2,45	4,01*	5,68	3,31	5,05*	6,65
	Total	2,88	5,04*	6,04	4,20	6,60*	7,90
Estames	2,14	3,95*	4,95	3,46	5,12*	6,05	
Antera	0,24	0,36*	0,41	0,25	0,37*	0,44	
Pistilo	2,57	4,06*	4,90	3,53	5,17*	6,05	
Número de óvulos	10	13,56*	18	11	14,66*	18	
Grãos de pólen ²	Número	Viável	Inviável	Número	Viável	Inviável	
	394,72*	99%	0,94%	576,00*	98%	1,82%	
Estigma	Receptivo desde botão floral (12 h antes da antese) até queda da flor						
Nectário	Presente, logo abaixo do ovário, e funcional						
Produção de néctar ³	Confirmado com a glico-fita (1000 mg/dl)						
Longevidade das flores	Duração	Abertura	Queda	Duração	Abertura	Queda	
	7,5h	7:00h	14:30h	5h	6:00h	11:00h	

* = Significativamente diferente a 5%.

¹ Min = mínimo; M = médio; Max = máximo; valores em cm, exceto antera, em mm. n = 353 flores frescas.

² Total de grãos de pólen em uma antera.

³ Produção de néctar constatada por teste da concentração de glicose realizados com Tiras de Glicose® (Alamar Tecno Científica Ltda.).

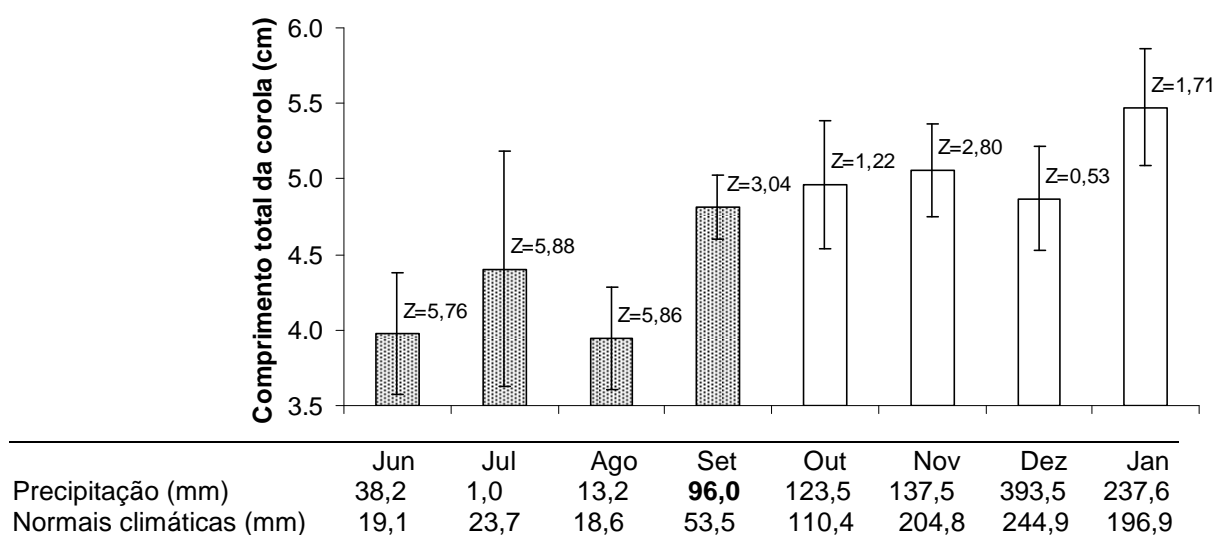


Figura 3: Variação no comprimento total da corola em *Ruellia subsessilis* de junho de 2009 a janeiro de 2010, em Viçosa, Minas Gerais. As colunas pontilhadas representam os meses da estação seca e as colunas em branco os meses da estação chuvosa. Barras = desvio padrão. Z Set = Z (0,05; 7).

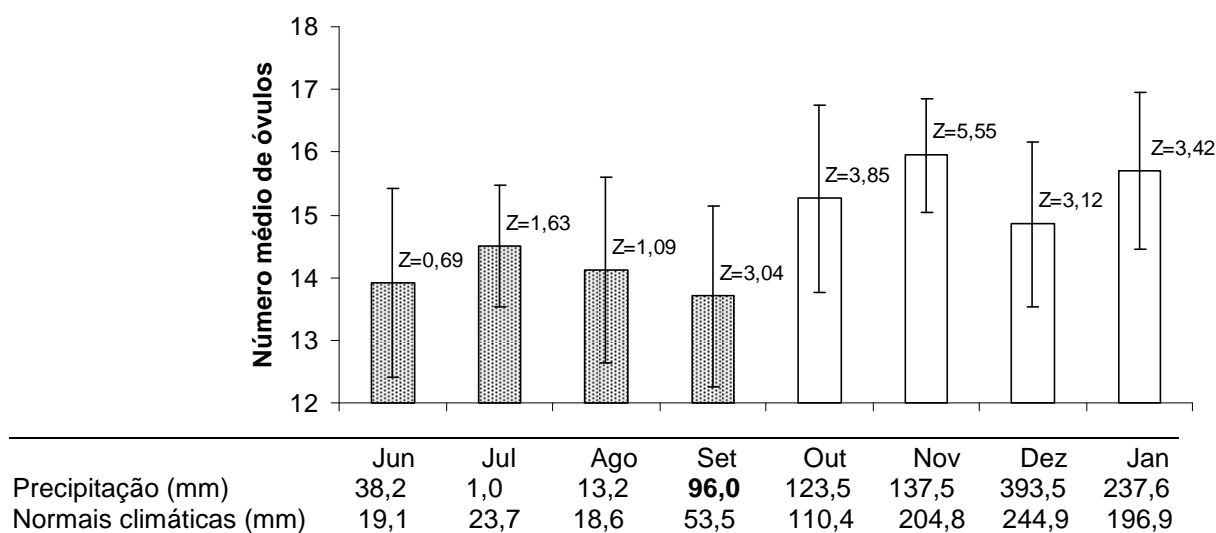


Figura 4: Variação no número médio de óvulos em *Ruellia subsessilis* de junho de 2009 a janeiro de 2010, em Viçosa, Minas Gerais. As colunas pontilhadas representam os meses da estação seca e as colunas em branco os meses da estação chuvosa. Barras = desvio padrão. Z Set = Z (0,05; 7).

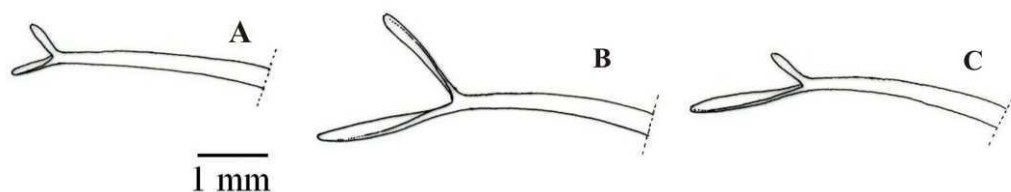


Figura 5: Tipos morfológicos de ramos do estilete em flores de *Ruellia subsessilis*: A = ramos simétricos e pequenos; B = ramos quase simétricos e grandes; C = ramos assimétricos.

A confirmação da produção de néctar, em ambas as estações (Tabela 1), foi obtida com a glicofita que acusou concentração de 1000 mg/dl de glicose na secreção (Figura 6). O nectário foi localizado abaixo do ovário, em forma de disco (Figuras 7A, B). É constituído por um tecido com conteúdo denso, que se corou com a safranina (Figura 7C, D). Nesse tecido, observou-se acúmulo de poucos grãos de amido. O néctar, provavelmente, é liberado via estômatos modificados (Figura 7F), pois esses foram observados apenas na porção do nectário situada ventralmente em relação à posição do pistilo (Figura 7B, E). O teste de PAS não atestou positivamente a produção de polissacarídeos no tecido nectarífero. Não foram constatadas diferenças na estrutura e nem na funcionalidade entre nectários dos morfos florais produzidos nas estações seca e chuvosa.

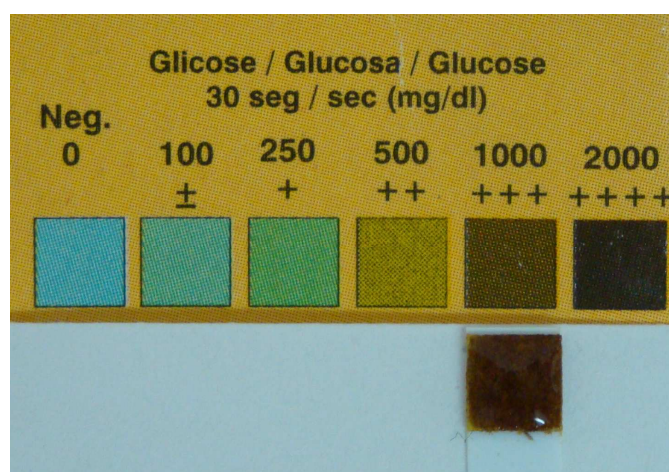


Figura 6: Teste com Tiras de Glicose® (Alamar Tecno Científica Ltda.), confirmando a produção de néctar (1000 mg/dl) em flores de *Ruellia subsessilis*.

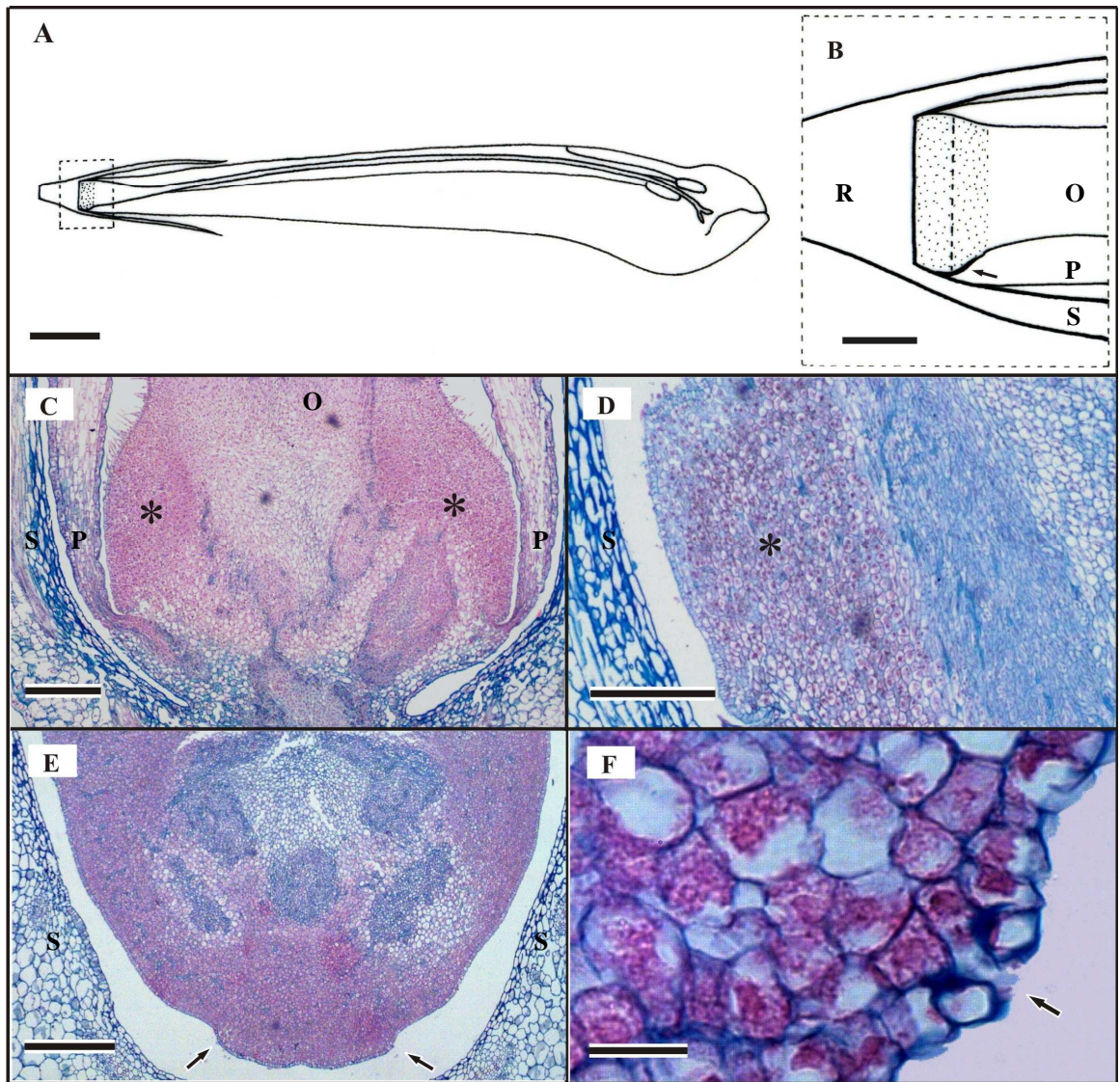


Figura 7: *Ruellia subsessilis*. A: Esquema de um corte longitudinal de botão floral em pré-antese. B: Ampliação da base do ovário onde se encontra o nectário, evidenciando um plano de corte (linha tracejada) e a região de liberação do néctar (seta). C: Corte longitudinal destacando o tecido nectarífero (asteriscos). D: Detalhe do tecido nectarífero com conteúdo denso corado pela safranina (asterisco). E: Corte transversal do tecido nectarífero, com a região de liberação do néctar indicada (setas). F: Detalhe do estômato modificado (seta) na região de liberação do néctar. R = receptáculo; S = sépala; P = pétala; O = ovário. Barras em A = 5mm; B = 1mm; C, D e E = 300 μ m; F = 20 μ m.

Foram observadas diferenças quanto à duração da flor entre as estações seca e chuvosa; as flores são mais longevas na estação seca (Tabela 1).

As diferenças morfológicas e biológicas registradas em flores de *R. subsessilis* evidenciam a existência de dois morfos florais, aqui denominados, flores casmógamas

normais (CN), produzidas na estação chuvosa, e casmógamas reduzidas (CR), na seca (Figura 8).

Foram ainda observados, na estação seca, botões florais com anteras deiscuentes e o pólen depositado sobre o estigma receptivo (autopolinização precoce) e, portanto, não hercogâmicos. Esses botões, posteriormente à deposição do pólen, se abriam e apresentavam morfologia semelhante ao outro morfo produzido na estação seca e, por isso, também foi denominado de CR. Essa variante do morfo CR (Figura 8A) é difícil de ser identificada, especialmente antes de ocorrer antese, ocasião em que se observaram as diferenças. Após a antese, a diferença está no grau de expansão dos lobos da corola: lobos pouco expandidos (Figura 8A) em flores com autopolinização precoce e lobos mais expandidos (Figura 8B) no morfo sem a autopolinização precoce. Além disso, esses morfos com autopolinização precoce foram observados em baixa frequência na estação seca (apenas cinco flores observadas, ou seja, 2,82% dos morfos CR).

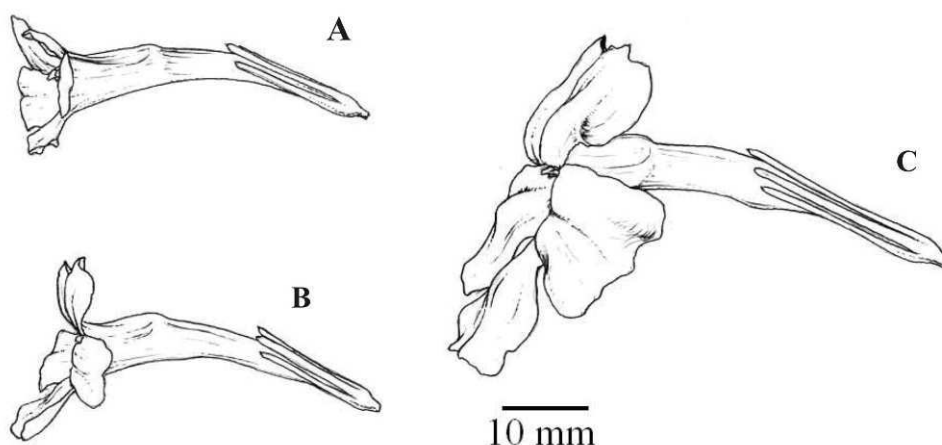


Figura 8: Morfos florais em *Ruellia subsessilis*. Na estação seca: A = flores casmógamas reduzidas com autopolinização precoce, B = flores casmógamas reduzidas sem autopolinização precoce; Na estação chuvosa: C = flor casmógama normal.

1.3.2. Sistemas reprodutivos

Os resultados dos testes de polinização foram obtidos cerca de 15 dias após sua realização, quando foram observados os frutos, os quais tiveram duração de 20 a 30 dias

na planta. Esses resultados, para flores CR na estação seca e, para flores CN, na chuvosa, encontram-se na Tabela 2. *R. subsessilis* não é agamospérmica.

Na estação seca, a polinização cruzada e a polinização aberta resultaram em altas frutificações, sem diferenças significativas ($X^2(0,05; 1) = 3,54; X^2 = 2,669$). A polinização aberta com emasculação também apresentou alta frutificação que não diferiu da polinização aberta ($X^2(0,05; 1) = 3,54; X^2 = 0,005$). Os testes de polinização realizados em botões florais resultaram em diferentes frutificações ($X^2(0,05; 1) = 3,54; X^2 = 5,26$); obteve-se maior frutificação na autopolinização em relação à obtida na polinização cruzada. Durante essa estação, principalmente em junho e julho, foram observadas abelhas da família Apidae, *Apis mellifera* Linnaeus e *Trigona spinipes* Fabricius, e uma da família Halictidae, *Augochlorella* sp., visitando as flores CR de forma esporádica, para coleta de pólen. Esses insetos contatavam anteras e estigmas e atuavam na polinização.

Na estação chuvosa, também a polinização cruzada e a polinização aberta resultaram em altas frutificações, sem diferenças significativas ($X^2(0,05; 1) = 3,54; X^2 = 0,001$). Entretanto, a polinização aberta com emasculação apresentou menor frutificação que a obtida na polinização aberta ($X^2(0,05; 1) = 3,54; X^2 = 17,84$). Os testes de polinização realizados em botões florais resultaram em frutificações que não diferiram significativamente ($X^2(0,05; 1) = 3,54; X^2 = 5,26$) entre si. Nessa estação, não foram observadas abelhas visitando as flores.

Entre as estações, obtiveram-se frutificações, em um mesmo teste, que diferiram significativamente: a polinização aberta com emasculação ($X^2(0,05; 1) = 3,54; X^2 = 35$) e a autopolinização manual em botões florais ($X^2(0,05; 1) = 3,54; X^2 = 16,05$). No primeiro teste, as diferenças parecem ser resultantes da visita de abelhas ocorrida exclusivamente na estação seca e, no segundo, a autopolinização pareceu ser um mecanismo mais efetivo também na estação seca.

Em ambas as estações os testes de polinização aberta (controle) não diferiram significativamente da polinização cruzada assim como não diferiram entre si entre as estações, o que indica que as flores CR e CN têm contribuído proporcionalmente com a mesma produção de frutos.

Tabela 2: Resultados de frutificação para os testes de polinização conduzidos na estação seca e chuvosa em flores de *Ruellia subsessilis* na Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais.

Testes de polinização	Estação seca		Estação chuvosa	
	Flores (n°)	Frutos(%)	Flores(n°)	Frutos(%)
Agamospermia	50	0,0	----	----
Autopolinização espontânea	50	89,0	20	95,0
Polinização aberta (controle)	50	87,5	30	77,8*
Polinização aberta com emasculação	50	75,0 ^a	30	14,8* ^b
Polinização cruzada	50	88,0	30	78,3
Autopolinização manual em botões florais	30	86,7* ^a	30	19,0 ^b
Polinização cruzada em botões florais	30	50,0*	30	40,9

* = Significativamente diferente a 5% na estação;

a, b = Significativamente diferente a 5% entre as estações.

Excetuando-se as flores que se autopolinizam no botão floral (autopolinização precoce), foi observado que a autopolinização espontânea ocorre em flores senescentes (autopolinização tardia) (Figura 9), caso o pólen não tenha sido depositado no estigma por algum vetor. A autopolinização tardia ocorre no momento de queda da corola e estames, quando se desprendem do receptáculo (Figura 9C). Durante a queda, as anteras contatam o estigma, momento em que há deposição do próprio pólen. Esse contato é assegurado devido à posição do estilete dentro da flor. O estilete encontra-se envolvido por uma bainha posicionada dorsalmente na flor, que o isola do tubo da corola (Figura 9B), e conduz a corola em abscisão a uma trajetória obrigatória, que resulta na autopolinização (Figura 9C). Essa bainha é formada pelos filetes, adelfos e epipétalos. Esse mecanismo e os resultados apresentados anteriormente mostram que *R. subsessilis* é uma espécie predominantemente autógama.

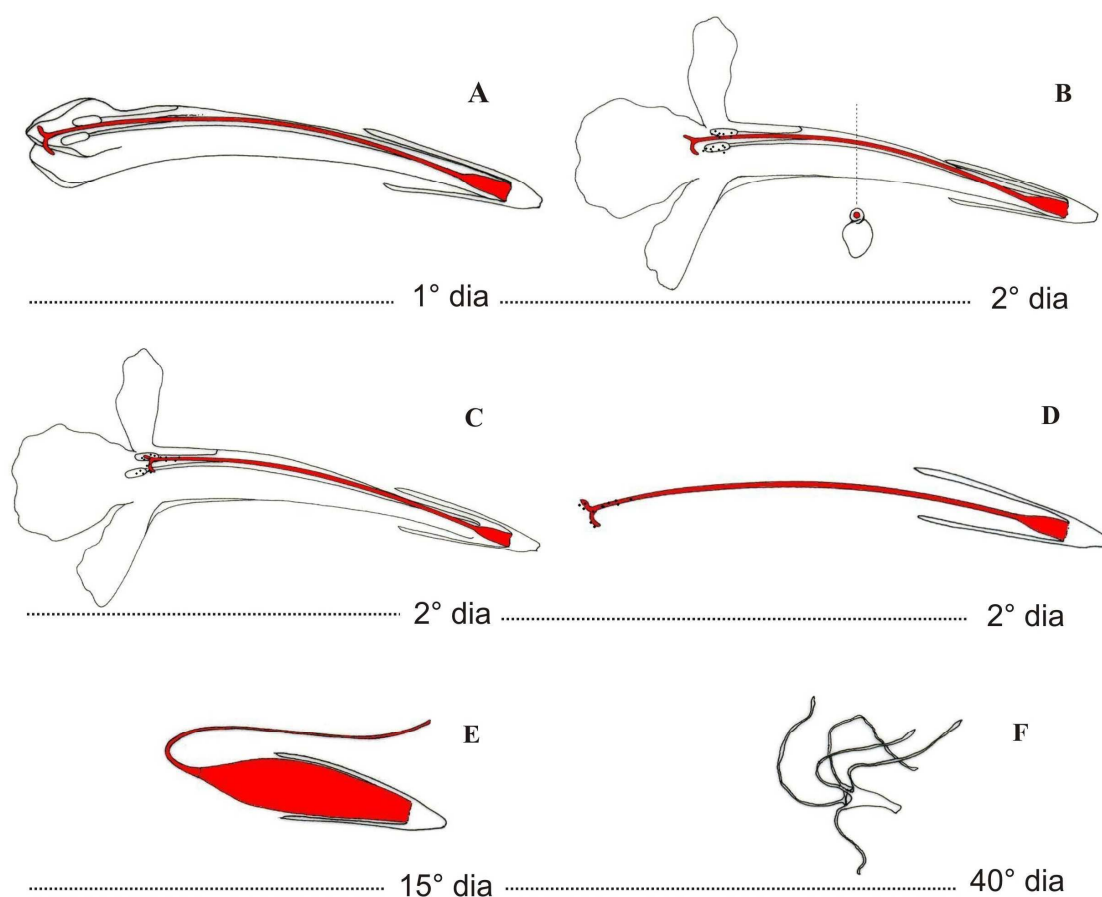


Figura 9: Mecanismo de autopolinização tardia em *Ruellia subsessilis*. A: Botão floral; B: Flor em corte longitudinal; note a posição das anteras em relação ao estigma. Observe, em corte transversal, o estilete (em vermelho) envolvido por uma bainha formada pelos filetes, isolando-o do tubo floral; C: Flor senescente (abscisão da corola e estames), em corte longitudinal. Observe o contato das anteras com o estigma; D: Pistilo e cálice. Observe a deposição de pólen no estigma/estilete após queda da corola e estames; E: Fruto totalmente desenvolvido e com estilete persistente e cálice; F: Cálice após dispersão das sementes. Intervalo de 40 dias, em média, entre a observação do botão floral até a dispersão das sementes.

1.3.3. Pesagem, tamanho e padrão germinativo de sementes oriundas da autopolinização e da polinização cruzada

O comprimento médio das sementes oriundas dos dois testes (autopolinização e polinização cruzada) foi de 3,6 mm. As sementes oriundas da autopolinização foram mais pesadas que as oriundas da polinização cruzada (4,195 e 3,725 mg, respectivamente) e germinaram significativamente mais rápido (VG = 9,60 dias e VG = 10,54 dias, respectivamente; $t = 3,18$, $p = 0,03$).

Das sementes oriundas de autopolinização, 99,2% apresentaram-se viáveis, dessas 95,8% germinaram e 3,34% permaneceram dormentes. As sementes de polinização cruzada apresentaram 98,3% de germinação; não foram verificadas sementes dormentes.

1.4. Discussões

Em *R. subsessilis* a produção dos morfos casmógamo reduzido (CR), na estação seca, e casmógamo normal (CN), na chuvosa, e a presença de flores cleistógamas “em pré-antese” são características inéditas em *Ruellia*. Nesse gênero, é comum a ocorrência da cleistogamia dimórfica (*sensu* Lord, 1981), que comumente está associada a um polimorfismo floral, tal como demonstrado por Lima *et al.* (2005) em *R. brevifolia*. Essas autoras registraram polimorfismo floral em *R. subsessilis*, mas não identificaram os dois morfos e nem verificaram sua ocorrência sazonal.

A produção sazonal dos morfos parece ser influenciada pelas condições ambientais, tais como disponibilidade hídrica e luminosa, conforme proposto por Long (1977) em outras espécies de *Ruellia*. Schemske (1978) observou em duas espécies de *Impatiens* (Balsaminaceae) que morfos florais que resultam em menor gasto energético pela planta, tais como as flores CR, teriam alto valor adaptativo quando produzidos em períodos com condições limitantes. Assim, de acordo com esse autor, a produção de flores reduzidas associada à estação seca seria vantajosa, pois maximizaria o sucesso reprodutivo da espécie por possibilitar uma frutificação ao longo de todo o ano, tal como ocorre em *R. subsessilis*.

A redução no tamanho dos verticilos florais, em resposta a fatores ambientais, e a consequente caracterização de morfos florais sazonais, também foram relatadas em *Mimulus nasutus* (Scrophulariaceae, Diaz & MacNair, 1998) e *M. guttatus* (Fenster & Carr, 1997). Nessas espécies, os morfos CR foram produzidos por plantas cultivadas sob baixa disponibilidade hídrica, e os CN, sob alta disponibilidade. Esses resultados e os do presente estudo mostram que a produção sazonal de morfos florais pode ser mais comum entre as angiospermas e representa uma estratégia reprodutiva de grande importância para a manutenção de algumas espécies de plantas. Assim, além da produção contínua de sementes que resulta da sazonalidade dos morfos, também o morfo CR não exclui possibilidades de ocorrência de alogamia, uma vez que apresenta antese normal e, portanto, pode produzir descendente através de cruzamento

xenogâmico, o qual seria mais adaptado às condições adversas por apresentar possivelmente maior variabilidade gênica (Schemske & Lande, 1985).

As variações contínuas no comprimento da corola e no número de óvulos, nas estações e, provavelmente, em resposta à precipitação, pode ocorrer sob controle distinto da expressão gênica, tal como sugerido por Fenster & Carr (1997). Esses autores analisaram flores de espécies de *Mimulus* com as mesmas variações encontradas no presente estudo; entretanto, avaliaram diferentes gerações e populações. A expressão da corola deve ser mais influenciada pelos fatores ambientais, considerando sua pronta resposta ao aumento da precipitação, enquanto, o número de óvulos, deve estar prioritariamente sob controle endógeno.

Menor número de grãos de pólen e óvulos no morfo CR, em relação ao CN, associado ao menor tamanho de corola, como registrado em *R. subsessilis*, foram características também observadas em espécies de *Mimulus* (Fenster & Carr, 1997). A maior frequência de amplos estigmas, simétricos ou assimétricos, deve aumentar as chances de deposição do pólen, oriundo da polinização cruzada ou da autopolinização tardia.

A receptividade do estigma de *R. subsessilis* em período anterior à antese era esperado, devido à autopolinização precoce em flores com cleistogamia “em pré-antese”. Resultado semelhante foi obtido em *Omphalogramma souliei* (Primulaceae) por Huang *et al.* (2006). Esses autores observaram a cleistogamia “em pré-antese” apenas em morfos florais com o estigma receptivo durante a fase de botão. Portanto, a receptividade do estigma no botão floral pode favorecer o morfo com cleistogamia “em pré-antese”, embora o mesmo tenha sido pouco observado em *R. subsessilis*. A receptividade prolongada até a senescência da flor possibilita a autopolinização tardia e, com isso, garante a produção de sementes. Devido a longa receptividade e em resposta a pressões seletivas distintas, o morfo CR com cleistogamia “em pré-antese” poderia ser favorecido na estação seca e o morfo CN, xenogâmico, na estação chuvosa, com a possibilidade de autopolinização tardia. Essa questão, entretanto, necessita de estudos adicionais envolvendo diferentes populações de *R. subsessilis*.

A presença de nectários funcionais em ambos os morfos florais pode significar um aumento das chances de xenogamia, exceto nos morfos com autopolinização precoce, tendo em vista que o néctar é um recurso para polinizadores (Proctor & Yeo, 1978). Contudo, essa possibilidade deve ser analisada em populações de *R. subsessilis*

com os polinizadores atuantes, provavelmente beija-flores Phaethorninae, com bico curvo e longo. No local do presente estudo, segundo Braz *et al.* (2000) e observações pessoais, os polinizadores foram extintos.

A maior duração das flores de *R. subsessilis* na estação seca ocorre possivelmente devido às menores temperaturas, uma vez que com o aumento da temperatura há aumento na produção de etileno, o que ocasiona uma queda mais rápida da corola (Aloni *et al.*, 1995; van Doorn & Stead, 1997). A maior duração dos morfos CR resulta em maior tempo de exposição das flores aos visitantes e aumenta as chances de polinização. Os resultados das polinizações abertas em flores CR emasculadas, na estação seca e ocasião em que foram observados visitantes florais (abelhas), reforçam essa afirmativa. Por outro lado, na estação chuvosa, flores maiores, embora menos duradouras, resultam em maior atratividade (Biernaskie & Cartar, 2004), o que aumenta das chances de xenogamia, na presença de polinizadores.

Em *R. subsessilis*, a baixa frequência do CR “em pré-antese” indica que esse morfo representa uma variação acidental do morfo CR, em função da deiscência precoce das anteras e receptividade do estigma no botão floral, tal como observado em *Omphalogramma souliei* (Huang *et al.*, 2006). Essa baixa frequência, entretanto, pode depender de fatores genéticos e ambientais, tal como sugerido por Diaz & Macnair (1998). Esses autores verificaram que a expressão do morfo cleistógamo “em pré-antese” em *Mimulus nasutus* é dependente desses fatores.

Long (1977) sugeriu uma base genética para a cleistogamia em três espécies estudadas de *Ruellia* (*R. tuberosa*, *R. nudiflora* e *R. brittoniana*), cuja expressão seria determinada por fatores genéticos e ambientais. Os fatores ambientais são considerados como uma das causas da cleistogamia desde Henslow (1888), que observou que a baixa temperatura nas estações frias induzia a produção de flores cleistógamas. Se as flores cleistógamas “em pré-antese” apresentam uma determinação genética em *R. subsessilis*, o nível de expressão nos indivíduos observados é bem baixo. Contudo, mesmo esse morfo sendo ocasional, não se exclui as possibilidades futuras de uma fixação genética, o que possivelmente ocorreu com o morfo cleistógamo típico (flores reduzidas que não se abrem). Nesse caso, além da maturação das anteras e polinização precoces, teria sido fixada a perda da expansão da corola (Lord, 1981).

A adaptação distinta dos morfos florais à autogamia e à xenogamia foi registrada no teste de polinização em botão floral: o morfo CR apresentou maior frutificação na

autopolinização manual que a obtida no CN. Diferentes sistemas reprodutivos também foram verificados em morfos florais de *Mimulus nasutus* (Diaz & MacNair, 1998). Em *R. subsessilis*, flores CR parecem apresentar maior adaptação à autogamia precoce (em botão), o que reforça o exposto anteriormente sobre uma possível fixação genética. Nas flores CN há um investimento maior na autogamia tardia, o que é vantajoso por não reduzir as chances de ocorrer xenogamia. Contudo, esse morfo tem apresentado reprodução quase que exclusivamente autógena devido à limitação de polinizadores na área de estudo, que resultou em baixa frutificação no teste de polinização aberta com emasculação.

Assim, pelos resultados obtidos na autopolinização em ambos os morfos florais, pode-se dizer que a autogamia é mais importante para a manutenção dos indivíduos de *R. subsessilis* no local de estudo. Além disso, não foi constatada depressão endogâmica tendo em vista, além da alta frutificação, uma alta viabilidade das sementes oriundas da autopolinização. Contudo, nos locais em que estão presentes os polinizadores, o predomínio da autogamia pode não ser vantajoso uma vez que esse sistema reprodutivo pode acarretar em uma menor variabilidade genética (Schemske & Lande, 1985).

Em relação ao possível dinamismo reprodutivo observado em *R. subsessilis*, pode ocorrer uma conseqüente dinâmica entre a manutenção da população no local de ocorrência e a exploração de novos habitats através da produção de sementes com diferentes estratégias de germinação (Schoen & Lloyd, 1984). Os resultados obtidos no presente estudo contradizem as predições teóricas de que as sementes autogâmicas germinam mais lentamente que as xenogâmicas (Schoen & Lloyd, 1984), o que pode ocorrer em função da germinação rápida ser seletiva no sentido de eficiente uso da água disponível para as sementes. Ainda, a dormência das sementes autogâmicas também pode ser uma estratégia à competição densidade-dependente entre plantas aparentadas além de contribuir para formação de um banco de sementes (Cheplick, 1996).

O maior peso das sementes autogâmicas pode determinar uma maior sobrevivência das plântulas de *R. subsessilis* nas imediações da planta-mãe, como observado em plântulas cultivadas de *Viola stagnina* (Violaceae) (Eckstein & Otte, 2005). Além disso, o maior peso das sementes também pode determinar maior tamanho das plantas, tal como em *Impatiens capensis* (Balsaminaceae), tendo importância significativa por aumentar a competitividade sob alta densidade (Waller, 1984). Assim, além do padrão de germinação das sementes autogâmicas em *R. subsessilis* que pode evitar a competição e um conseqüente menor sucesso reprodutivo, esse sistema pode

também ocasionar uma maior sobrevivência das plantas, o que tornaria a autogamia ainda mais importante para a manutenção dessa espécie.

1.5. Conclusões

R. subsessilis produz sazonalmente morfos florais distintos: casmógamos reduzidos (CR), na estação seca, e casmógamos normais (CN), na chuvosa.

Morfos CR apresentam menor comprimento de corola, estames, anteras e pistilo, menor número de óvulos e grãos de pólen e maior longevidade das flores em relação aos CN.

A espécie é prioritariamente autógama. Os morfos CR e CN têm contribuído significativamente com a mesma produção de frutos e, em ambos, ocorre autopolinização tardia, ocorrendo no CR, esporadicamente (cerca de 3%), a cleistogamia “em pré-antese”.

As sementes oriundas da autopolinização são mais pesadas e germinam mais rapidamente que as oriundas da polinização cruzada.

1.6. Referências Bibliográficas

ALONI, B.; KAMI, L.; RYLSKI, I. 1995. Inhibition of heat-induced pepper (*Capsicum annuum*) flower abscission and induction of fruit malformation by silver thiosulphate. **Journal of Horticultural Science** **70**: 215-20.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. 1992. **Regras para análise de sementes**. Brasília: DNDV/CLAV, 197p.

BRAZ, D.M.; CARVALHO-OKANO, R.M.; KAMEYAMA, C. 2002. Acanthaceae da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 495-504.

BRAZ, D.M.; VIEIRA, M.F.; CARVALHO-OKANO, R.M. 2000. Aspectos reprodutivos de espécies de Acanthaceae Juss. de um fragmento florestal do município de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres** **47**: 229-239.

CHEPLICK, G.P. 1996. Do Seed Germination Patterns in Cleistogamous Annual Grasses Reduce the Risk of Sibling Competition? **Journal of Ecology** **84**: 247-255.

CULLEY, T.M. & KLOOSTER, M.R. 2007. The cleistogamous breeding system: a review of its frequency, evolution, and ecology in angiosperms. **Botanical Review** **73**: 1–30.

DAFNI, A.; KEVAN, P.G.; HUSBAND, B.C. (eds.). 2005. **Practical pollination biology**. Cambridge: Enviroquest Ltd., 590p.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – DNMET. 1992. **Normais Climatológicas (1961-1990)**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 84p.

DIAZ, A. & MACNAIR, M.R. 1999. Pollen tube competition as a mechanism of prezygotic reproductive isolation between *Mimulus nasutus* and its presumed progenitor *Minulus guttatus*. **New Phytologist** **144**: 471–478.

DIAZ, A. & MACNAIR, M.R. 1998. The effect of plant size on the expression of cleistogamy in *Mimulus nasutus*. **Functional Ecology** **12**: 92–98.

ECKSTEIN, R.L. & OTTE, A. 2005. Effects of cleistogamy and pollen source on seed production and offspring performance in three endangered violets. **Basic and Applied Ecology** **6**: 339-350.

FENSTER, C.B. & CARR, D.E. 1997. Genetics of sex allocation in *Mimulus* (Scrophulariaceae). **Journal of Evolution Biology** **10**: 641-661.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C.G. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations and empirical evidence. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** **36**: 47–79.

HENSLOW, G. 1888. Cleistogamy. **Nature** **29**: 104-105.

HUANG, Y.; ZHANG, C.Q.; BLACKMORE, S.; LI, D.Z.; WU, Z.K. 2006. A preliminary study on pollination biology of *Omphalogramma souliei* Franch.

(Primulaceae), a species endemic to China. **Plant Systematics and Evolution** **261**: 89–98.

JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 523p.

LIMA, N.A.S. & VIEIRA, M.F. 2006. Fenologia de floração e sistema reprodutivo de três espécies de *Ruellia* (Acanthaceae) em fragmento florestal de Viçosa, Sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica** **29**: 681-687.

LIMA, N.A.S.; VIEIRA, M.F.; CARVALHO-OKANO, R.M.; AZEVEDO, A.A. 2005. Cleistogamia em *Ruellia menthoides* (Nees) Hiern e *Ruellia brevifolia* (Pohl) C. Ezcurra (Acanthaceae) em fragmento florestal do Sudeste brasileiro. **Acta Botanica Brasílica** **19**: 443-449.

LLOYD, D.G. 1979. Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. **The American Naturalist** **113**:67–79.

LONG, R.W. 1977. Artificial induction of obligate cleistogamy in species hybrids in *Ruellia* (Acanthaceae). **Bulletin of Torrey Botanical Club** **104**: 53-56.

LONG, R.W. 1971. Floral polymorphy and amphimictic breeding systems in *Ruellia carolinensis* (Acanthaceae). **American Journal of Botany** **58**: 525-531.

LORD, E.M. 1981. Cleistogamy: a tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. **The Botanical Review** **47**:421-449.

MOYLAN, E.C.; RUDALL, P.J.; SCOTLAND, R.W. 2004. Comparative floral anatomy of Strobilanthisinae (Acanthaceae) with particular reference to internal partitioning of the flower. **Plant Systematics and Evolution** **249**: 77-98.

O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. 1981. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Termarcaphi Pty, 280p.

PROCTOR, M.C.F. & YEO, P. 1978. **The pollination of flowers**. Great Britain: Willian Collins Sons & Co Ltd. Glasgow, 498p.

SCHEMSKE, D.W. & LANDE, R. 1985. The Evolution of Self-Fertilization and Inbreeding Depression in Plants. II. Empirical Observations. **Evolution** **39**: 41-52.

SCHEMSKE, D.W. 1978. Evolution of reproductive characteristics in *Impatiens* (Balsaminaceae): the significance of cleistogamy and chasmogamy. **Ecology** **59**: 596-613.

SCHOEN, D.J. & LLOYD, D.G. 1984. The selection of cleistogamy and heteromorphic diaspores. **Biological Journal of the Linnean Society** **23**: 303-322.

STEBBINS, G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: Pollination Mechanisms. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** **1**: 307-326.

SUN, M. 1999. Cleistogamy in *Scutellaria indica* (Labiatae): effective mating system and population genetic structure. **Molecular Ecology** **8**: 1285–1295.

VIEIRA, R.D. & CARVALHO, N.M. 1994. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 164p.

VAN DOORN, W.G. & STEAD, A.D. 1997. Abscission of flowers and floral parts. **Journal of Experimental Botany** **48**: 821-837.

WALLER, D.M. 1984. Differences in Fitness Between Seedlings Derived from Cleistogamous and Chasmogamous Flowers in *Impatiens capensis*. **Evolution** **38**: 427-440.

ZAR, J.H. 1996. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall International, 662p.

CAPÍTULO 2

Fenologia reprodutiva em *Ruellia subsessilis* (Nees) Lindau (Acanthaceae) e interferência de fatores abióticos nas fenofases em indivíduos cultivados

Resumo

No gênero *Ruellia* a cleistogamia típica é comum e a produção sazonal de flores cleistógamas e de casmógamas têm sido relacionada a fatores ambientais. *Ruellia subsessilis* produz dois morfos florais, o casmógamo reduzido, na estação seca, e o normal, na chuvosa, e sua floração e frutificação ocorrem ao longo do ano. Para melhor compreender a dinâmica da produção dos morfos florais e de frutos, foram estudados, de janeiro de 2009 a janeiro de 2010, a fenologia reprodutiva e os fatores associados à sazonalidade de produção dos morfos em *R. subsessilis*, em indivíduos de população natural e cultivados em casa de vegetação. Foram também cultivados indivíduos de *R. brevifolia*, espécie tipicamente cleistógama, para fins comparativos. Em população natural, as fenofases foram avaliadas pelos índices de atividade, calculado para a classificação da sincronia, e de intensidade, para determinação dos picos de produção. Foram contados os números de flores e de frutos em inflorescências marcadas aleatoriamente, na estação seca e chuvosa. Nos indivíduos cultivados das duas espécies foram aplicados os tratamentos hídricos. Em *R. subsessilis*: solo na capacidade de campo (CC; solo úmido), solo com 50% da CC e solo com 30 % da CC; e em *R. brevifolia*: solo na CC e solo com 50 % da CC. Para estimar o crescimento vegetativo foi medida a altura das plantas e calculada a massa seca e, para o sucesso reprodutivo, foram contados os números de flores, frutos e sementes. Os morfos florais foram identificados através de morfometria floral em *R. subsessilis* e por observação da presença de flores casmógamas ou apenas de frutos em *R. brevifolia*. Em população natural, a floração e a frutificação foram contínuas, com picos de intensidade máxima em janeiro e mínima em agosto, de forma que a distribuição foi sazonal ao longo do ano, concentrada na estação chuvosa. A floração apresentou baixa sincronia ou assincronia e a frutificação apresentou alta sincronia ou assincronia. Foi encontrada relação significativa de aumento na intensidade da floração com o aumento da precipitação. A produção de flores por inflorescência foi significativamente maior na estação chuvosa, enquanto a produção de frutos e a porcentagem de frutificação por inflorescência não diferiram significativamente entre as estações. Para os indivíduos cultivados de ambas as espécies foram observadas maior altura e massa seca das plantas sob maior disponibilidade hídrica. A produção de flores, frutos e sementes foram

significativamente maiores nas plantas de *R. subsessilis* sob 100% da CC (solo úmido). Essas produções, nas plantas de *R. subsessilis* sob 100% da CC, não foram relacionadas significativamente às variáveis temperatura, irradiância e fotoperíodo apesar de haver aumento na produção de sementes ao longo do experimento. Foram produzidos distintos morfos florais em *R. subsessilis*: casmógamo normal sob 100% da CC e camógamo reduzido sob 30 e 50% da CC. Não ocorreu sazonalidade de produção de morfos florais sob 100% da CC, mas foi observado no morfo casmógamo normal aumento significativo no comprimento total da corola e redução no número de óvulos ao longo do experimento. Em *R. brevifolia*, flores cleistógamas foram produzidos em indivíduos sob 50% da CC e as casmógamas em indivíduos sob 100% da CC; registrou-se maior produção de frutos nas plantas sob 100% da CC. Como conclusão, a floração e frutificação de *R. subsessilis* são contínuas e apresentam picos de intensidade ao longo do ano e distribuição sazonal concentrada na estação chuvosa. A floração apresenta maior intensidade com o aumento da precipitação. O crescimento vegetativo e o sucesso reprodutivo de ambas as espécies cultivadas são influenciados pela umidade do solo, que também afeta a produção de distintos morfos florais.

2.1. Introdução

A fenologia em florestas tropicais tem sido amplamente estudada e as fenofases (foliação, floração e frutificação) têm ocorrência comumente sazonal e estão geralmente relacionadas a fatores endógenos e ambientais, tais como fotoperíodo, temperatura e regime hídrico (Reich & Borchert, 1984; Wright, 1991; Sampaio & Almeida, 1994; Borchert, 1994; 2000). Contudo, esses estudos têm priorizado as espécies arbóreas de dossel (Njoku, 1963; Wright & van Schaik, 1994; Morellato & Leitão-Filho, 1990; Morellato *et al.*, 2000; Sakai, 2001; Bawa *et al.*, 2003) em detrimento das espécies de sub-bosque (Opler *et al.*, 1980; Martin-Gajardo & Morellato, 2003; Marques & Oliveira, 2004), estrato onde habitam os representantes florestais de Acanthaceae e, talvez por isso, estudos fenológicos envolvendo essa família ainda são escassos (Opler *et al.*, 1980; Batalha & Martins, 2004; Munhoz & Felfili, 2005).

Nessa família, soma-se ainda a ocorrência de espécies cleistógamas (*sensu* Lord, 1981). No gênero *Ruellia* foi registrada a ocorrência de cleistogamia em pelo menos 13 espécies (Lima *et al.*, 2005). As flores cleistógamas constituem estruturas inconspícuas

(Uphof, 1938; Lord, 1981), difíceis de serem visualizadas e, por isso, a floração dessas plantas passa às vezes despercebida.

Segundo Brown (1952), a produção de flores casmógamas e cleistógamas, em espécies cleistógamas, também segue uma tendência sazonal. Em *Stipa leucotricha* Trin. & Rupr. (Poaceae), esse autor relatou que solo com alta umidade desencadeia a produção de flores casmógamas e a baixa umidade, a produção de cleistógamas. Além do regime hídrico, o fotoperíodo (Langer & Wilson, 1965), as variações na temperatura (Henslow, 1888) e a intensidade luminosa (Schemske, 1978) também são fatores que interferem na produção sazonal de morfos florais. Assim, essas variações ambientais recorrentes agiriam como sinais externos, que por interferir nas rotas metabólicas levariam a expressão gênica diferenciada, o que, conseqüentemente, pode garantir a reprodução, resultando em eficiente exploração do ambiente e maior adaptabilidade da espécie em questão (Schemske, 1978).

Lima *et al.* (2005) e de Lima & Vieira (2006), em trabalhos realizados na área do presente estudo, um fragmento de floresta estacional, verificaram que a floração e a frutificação de três espécies de *Ruellia*, duas delas cleistógamas (*R. brevifolia* e *R. menthoides*), ocorreu ao longo de todo o ano. Piovano *et al.* (1995) e Sigrist & Sazima (2002) sugeriram que em *R. brevifolia* a produção de flores cleistógamas (CL) ocorre em período de menor disponibilidade de luz e água, sem fornecerem dados experimentais. Miranda (dados não publicados, capítulo 1) verificou que a terceira espécie, *R. subsessilis*, não produz flores cleistógamas típicas (*sensu* Lord, 1981), mas produz dois morfos florais: casmógama reduzida e casmógama normal. O primeiro morfo é produzido na estação seca e o segundo na estação chuvosa, possivelmente em decorrência da variação sazonal de água no solo.

Para melhor compreender as fases fenológicas reprodutivas em *Ruellia subsessilis* e os fatores climáticos associados à produção dos morfos florais, em população natural, o objetivo foi responder às seguintes questões: (1) Ocorrem períodos de maior intensidade (picos) de produção de flores e de frutos, ao longo do ano? (2) Picos de intensidade estão correlacionados à precipitação, temperatura e ao fotoperíodo? (3) Ocorre sincronia de floração e de frutificação entre indivíduos? (4) A produção de flores, frutos e a porcentagem de frutificação por inflorescência diferem entre as estações seca e chuvosa?

Para melhor compreender as respostas fenológicas em relação à disponibilidade hídrica, indivíduos de *Ruellia subsessilis* e de *R. brevifolia* foram cultivados em casa de vegetação. *R. brevifolia* foi utilizada para fins comparativos, pois trata-se de espécie cleistógama típica. Buscou-se responder: (1) O estresse hídrico interfere no crescimento vegetativo (altura média e massa seca das plantas) e no sucesso reprodutivo (produção de sementes) das espécies? (2) Em plantas de *R. subsessilis*, cultivadas em solo úmido, a produção de flores, frutos e sementes está correlacionada aos diferentes fotoperíodos, irradiâncias e temperaturas? (3) Há produção de morfos florais distintos nas espécies em resposta aos diferentes níveis de disponibilidade hídrica? (4) Há sazonalidade na produção dos morfos florais em indivíduos de *R. subsessilis*, cultivados em solo úmido, devido às variações no fotoperíodo, irradiância e temperatura?

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Monitoramento fenológico de *R. subsessilis* em população natural

As fenofases observadas foram: floração – presença de flores abertas; e frutificação – presença de frutos (ainda imaturo, estando fechado e verde). As observações foram realizadas semanalmente no período de janeiro a dezembro de 2009, totalizando de 48 episódios reprodutivos (24 na estação chuvosa, de janeiro a março e de outubro a dezembro; e 24 na estação seca, de abril a setembro). Foram utilizados 20 indivíduos na Mata do Paraíso, escolhidos aleatoriamente, e 10 indivíduos no Horto Botânico. Observou-se uma distância mínima de três metros entre os indivíduos marcados para evitar clones, de acordo com Fournier & Charpantier (1975) e d'Eca-Neves & Morellato (2004). Os padrões de floração e frutificação foram definidos segundo classificação de Newstrom *et al.* (1994).

Para obtenção do índice de intensidade dos eventos fenológicos foi calculada a média mensal de produção de flores e frutos por indivíduo (Optler *et al.*, 1980). Avaliou-se a partir desse índice a sazonalidade de distribuição da floração e frutificação ao longo do período reprodutivo.

O índice de atividade de floração e frutificação foi determinado a partir da porcentagem de indivíduos da população que manifestaram o evento fenológico. A sincronia foi classificada a partir desse índice conforme sugere Bencke & Morellato (2002), em que o evento fenológico é considerado: assíncrono, quando menos de 20%

dos indivíduos se apresentavam na fase fenológica; pouco assíncrono ou sincronia baixa, quando 20-60% dos indivíduos se apresentavam na fase fenológica; e sincronia alta, quando a fase fenológica foi representada por mais de 60% dos indivíduos.

Foi verificado ainda se os índices de atividade e intensidade mensais se apresentam correlacionados às variáveis precipitação, temperatura e fotoperíodo, ao longo do período de estudo.

A produção de flores e frutos por inflorescência, por estação, foi estimada em indivíduos da Mata do Paraíso, a partir da contagem de flores e frutos em 40 inflorescências marcadas aleatoriamente em fevereiro de 2009 (estação chuvosa) e 20 em agosto de 2009 (estação seca). Nessas inflorescências também se estimou a porcentagem de frutificação a partir de dois registros sequenciais (com intervalo de 10 dias) do número de flores e de frutos para cada estação.

Aos dados fenológicos, considerando os resultados das duas áreas de estudo em conjunto, foram aplicados testes de normalidade e homogeneidade (Kolmogorov-Smirnov e Cochran C, respectivamente). As comparações das quantidades de flores, frutos e sementes produzidos entre os meses foram realizadas a partir de teste de Krushal-Wallis. Para comparar essas produções entre as estações seca e chuvosa foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Foi calculada a correlação de Spearman (r_s) e aplicada regressão entre os índices de atividade e intensidade mensais e as variáveis, correspondentes ao mês anterior, climáticas (temperatura média e precipitação do período de estudo e, das normais climatológicas) e o fotoperíodo.

Para testar a sazonalidade de distribuição da floração e frutificação ao longo do período reprodutivo foi realizada uma análise de distribuição circular dos índices de intensidade mensais, o teste de Rayleigh (Zar, 1996), que permite calcular a concentração de cada evento fenológico em torno de uma data específica no ano e testa a uniformidade da distribuição dos eventos. Foi adotado nível de significância padrão de 5% (Zar, 1996).

2.2.2. Monitoramento fenológico de *R. subsessilis* e *R. brevifolia* em condições semi-controladas com imposição de escassez hídrica

Os experimentos foram realizados de maio de 2009 a janeiro de 2010, em casa de vegetação na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), Universidade Federal de

Viçosa. Plantas das espécies estudadas (30 de *R. subsessilis* e 20 de *R. brevifolia*) foram obtidas previamente por enraizamento natural de estacas retiradas de plantas adultas aleatórias, ocorrentes na Mata do Paraíso. As plantas de *R. subsessilis* foram mantidas sob sombrite para diminuir a intensidade de luz incidente e permitir melhor aclimação, o que não foi aplicado em *R. brevifolia* por esta espécie ocorrer naturalmente em locais com maior intensidade luminosa.

O cultivo foi realizado em vasos preenchidos com 3 Kg de substrato, preparado a partir de mistura do solo retirado no local de ocorrência das plantas e areia, na proporção de 2:1. Análises químicas preliminares desse substrato indicaram não haver nenhuma deficiência de nutrientes, sendo, portanto, adequado ao cultivo. Quanto à granulometria, o substrato foi considerado na classe textural areia-franca.

Após o estabelecimento das plantas, cerca de 50 dias após o plantio, e na presença de flores foram aplicados três tratamentos hídricos no solo: solo na capacidade de campo (CC) (solo úmido, controle), solo com 50% da CC e solo com 30 % da CC. Os indivíduos de *R. brevifolia* foram submetidos apenas aos tratamentos: solo na CC e solo com 50 % da CC. Em cada tratamento foi utilizado amostra de 10 plantas.

A capacidade de campo do solo foi determinada a partir de cinco amostras de 100g do substrato seco a 103°C por 48 horas, que foram saturadas com água até que o volume percolado de água fosse constante (Freire *et al.*, 1980). Os valores obtidos foram extrapolados para a quantidade de terra contida nos vasos e ajustados os valores de 30% e 50% da capacidade de campo para os tratamentos específicos. O controle da irrigação foi realizado pelo método gravimétrico (pesagem dos vasos), adicionando-se água até que a massa do vaso atingisse o valor prévio determinado, considerando a massa do solo e de água (Freire *et al.*, 1980).

Uma curva exponencial foi ajustada ($r^2 = 0,962$) a partir de dados de retenção de água e os respectivos potenciais hídricos do substrato de cultivo (Figura 1), o que possibilita inferências sobre o *status* hídrico do solo (ψ_w) nos tratamentos de 30 e 50% da CC. Para isso, mensalmente se estimou o teor de água nos vasos diminuindo do peso úmido de 100g de solo amostrado em um vaso o peso dessa mesma amostra após secagem a 103°C por 48 horas. Foram realizadas três amostragens mensais do teor de umidade do solo para cada tratamento e os valores substituídos na equação da curva de retenção para se obter os potenciais hídricos a que as plantas estiveram sujeitas.

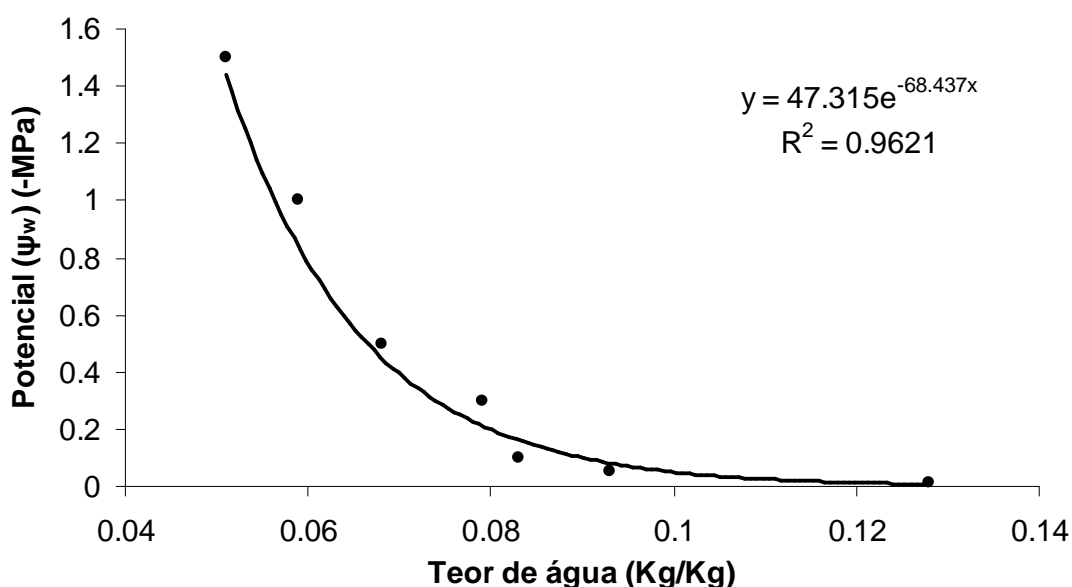


Figura 1: Curva de retenção de água ajustada a partir de dados de potencial hídrico do substrato de cultivo fornecidos por análise física realizada pelo Laboratório de Física do Solo (UFV), Viçosa, Minas Gerais. $p < 0,05$.

A produção de flores e de frutos em plantas de *R. subsessilis* sob os diferentes tratamentos hídricos foram contabilizadas semanalmente, de junho de 2009 a janeiro de 2010. A produção de sementes foi estimada multiplicando-se o número de frutos produzidos por planta, de cada tratamento hídrico, pelo respectivo número médio de sementes contadas em 30 frutos aleatoriamente amostrados em cada tratamento.

Para avaliar em *R. subsessilis* a influência da variação natural no fotoperíodo, irradiância e temperatura ao longo do experimento sobre a produção de flores, frutos e sementes considerou-se apenas plantas controle para eliminar da análise o efeito do estresse hídrico. Dados de temperatura e irradiância foram obtidos na Estação Meteorológica da UFV e o fotoperíodo foi calculado (ANEXO 1) conforme sugeriu Harakawa (2004), sendo que as três variáveis apresentaram valores crescentes de maio de 2009 a janeiro de 2010.

Para verificar a produção de diferentes morfos florais em *R. subsessilis* foi feita avaliação morfométrica das flores produzidas pelas plantas sob os diferentes tratamentos hídricos. Foram analisadas 30 flores frescas de cada tratamento hídrico de junho a dezembro de 2009. Essa análise foi feita com auxílio de microscópio estereoscópico considerando as seguintes medidas: comprimento do cálice, da corola

total, do diâmetro e tubo da corola, dos estames, das anteras, do pistilo, dos ramos do estilete e contabilizando o número de óvulos. Essas medidas foram comparadas às obtidas por Miranda (capítulo 1) para identificação de possíveis morfos florais.

Para verificar em *R. subsessilis* a possível ocorrência de sazonalidade na produção dos morfos florais em resposta a variação mensal no fotoperíodo, irradiância e temperatura, ao longo do experimento, considerou-se apenas os morfos produzidos nas plantas controle.

Em *R. brevifolia*, foi verificada a presença do morfo casmógamo através da simples observação de flores coloridas (vermelhas), em antese, uma vez que a espécie apresenta cleistogamia típica (*sensu* Lord, 1981). A presença do morfo cleistógamo, difícil de ser observado, foi inferida pela frutificação. Foram realizados dois registros de produção de frutos, em agosto (após dois meses de tratamento) e em dezembro de 2009 (após quatro meses de tratamento). A produção de sementes foi estimada para flores casmógamas e cleistógamas pela contagem do número de sementes em 20 frutos de cada morfo floral.

Para caracterizar se as plantas de *R. subsessilis* e *R. brevifolia* sob escassez hídrica (sob 30 e 50% da CC) estavam sob estresse hídrico, em janeiro de 2010, entre 8:00 e 10:30h, três plantas de cada tratamento foram avaliadas quanto a taxa de fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (Gs) e a transpiração (E). Para isso, utilizou-se um analisador de gases no infravermelho (Irga) – Licor 6400, com fontes luminosas fixas de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para *R. subsessilis* e $700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para *R. brevifolia*, valores esses determinados como pontos ótimos a partir da curva de luz.

Ao final do experimento, para avaliar o crescimento vegetativo foi medida a altura das plantas (da base ao ápice caulinar) de *R. subsessilis* e *R. brevifolia* e calculado o incremento de massa seca na parte aérea e na raiz. A massa seca foi determinada através de secagem em estufa a 60°C até peso constante das raízes e parte aérea envolvidas em sacos de papel separadamente.

Para as análises estatísticas procedeu-se aos testes de normalidade e homogeneidade (Kornolgorov-Smirnov e Cochran C, respectivamente). Aos dados não-paramétricos, foi aplicado teste de Mann-Whitney entre dois tratamentos e, teste de Krushal-Wallis para mais que dois. Aos dados normais e homogêneos, foi aplicado teste de Student para comparar dois tratamentos e, teste de Tukey para mais que dois.

Através de regressão foram testadas algumas hipóteses sobre crescimento vegetativo e sucesso reprodutivo em resposta a disponibilidade hídrica. No tratamento controle, a produção de flores, frutos, sementes e os dados morfométricos das flores foram relacionados através de regressão aos dados de temperatura, irradiância e fotoperíodo correspondentes ao mês anterior.

Foi adotada uma significância padrão de 5% de probabilidade (Zar, 1996).

2.3. Resultados

2.3.1. Monitoramento fenológico de *R. subsessilis* em população natural

Os indivíduos de *R. subsessilis* apresentaram floração e frutificação contínuas, com alguns picos. O pico máximo, para ambos os eventos, foi em janeiro (Figura 2). Entre os indivíduos da Mata do Paraíso (MP) e os do Horto Botânico (HB) foram observadas diferenças fenológicas. No HB, o pico de floração na estação chuvosa ocorreu em janeiro e em fevereiro e, na MP, se estendeu de janeiro a março. A frutificação apresentou pico em janeiro na MP e em janeiro e junho no HB.

Houve tendência de maior produção de flores, frutos e sementes nos meses da estação chuvosa (Figuras 2), mas sem diferenças significativas entre estações, mas as diferenças foram significativas entre os meses ($H = 24,439$, $p = 0,01$, $H = 53,158$, $p < 0,01$ e $H = 51,948$, $p < 0,01$; respectivamente): a maior produção em janeiro e a menor, em agosto. A Figura 2 mostra ainda números de frutos sempre maiores que os de flores por mês, o que deve ser reflexo da curta longevidade das flores (5,0 a 7,5 horas; Capítulo 1) em relação à dos frutos (20 a 30 dias; Capítulo 1).

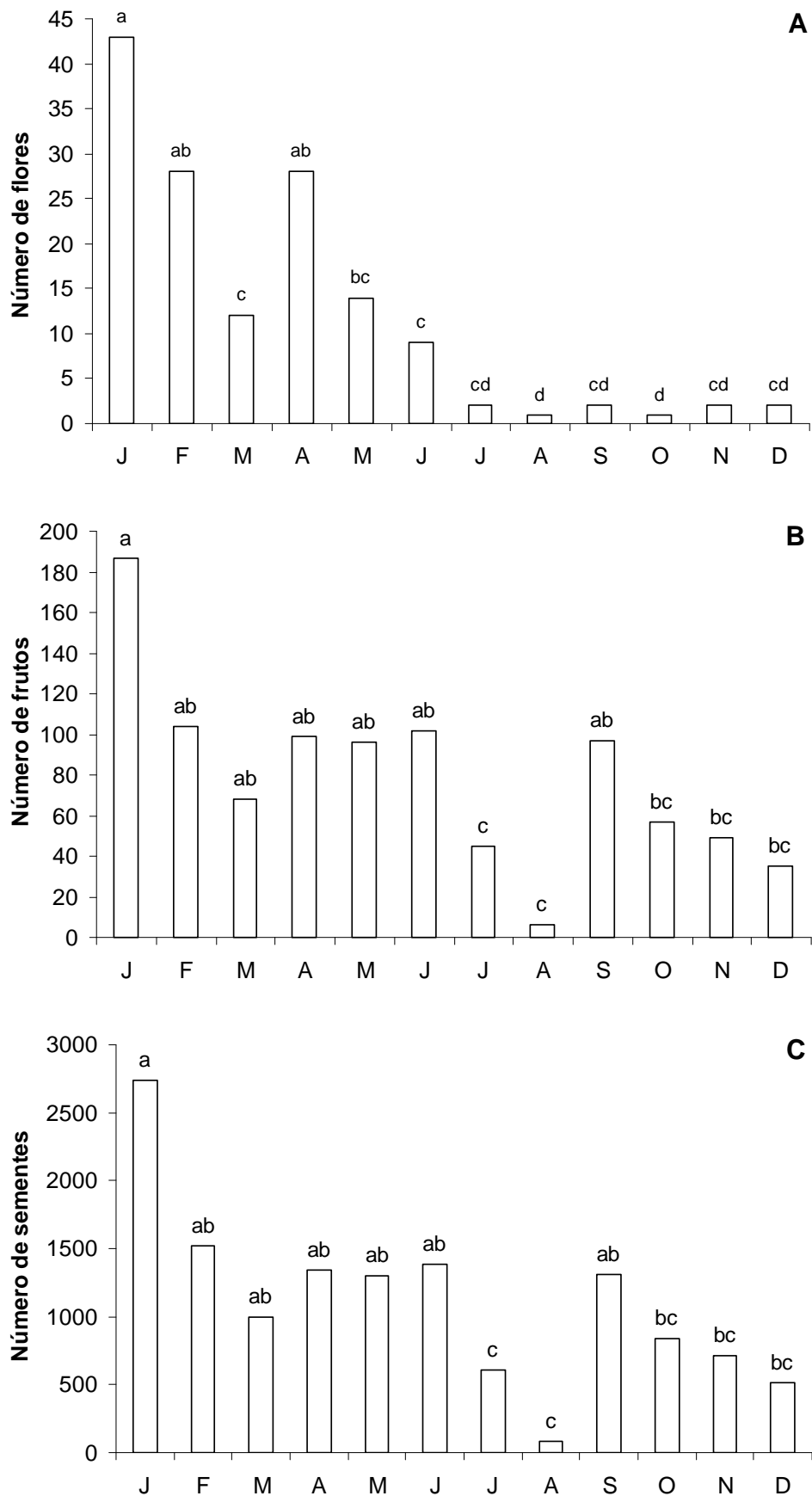


Figura 2: Fenologia reprodutiva de *Ruellia subsessilis*, de janeiro a dezembro de 2009, em Viçosa, Minas Gerais. A = número de flores; B = número de frutos; C = número de sementes. Meses com pelo menos uma mesma letra não diferiram a 5% de significância.

Os índices de intensidade de floração (Figura 3A) e frutificação (Figura 3B) apresentaram valores máximos em janeiro (1,43 e 6,23 flores/indivíduo, respectivamente) e mínimos em agosto (0,03 e 0,2 flores/indivíduo, respectivamente). Apesar da maior intensidade de produção de flores e frutos ocorrer na estação chuvosa, o período de outubro a dezembro apresentou valores baixos (0,56 e 1,57 flores/indivíduo em média, respectivamente). Essa maior intensidade na estação chuvosa apresenta uma distribuição sazonal ao longo do período de estudo ($r = 0,553$, $Z = 7,939$, $p < 0,01$; $r = 0,35$, $Z = 3,185$, $p < 0,05$; respectivamente), concentrando-se de dezembro a fevereiro.

A floração apresentou baixa sincronia em janeiro e fevereiro e de abril a junho, enquanto no restante do ano foi assíncrona (Figura 3A). Na frutificação, a sincronia foi alta em janeiro a junho e nos outros meses foi pouco sincrônica, exceto em agosto, quando se mostrou assíncrona (Figura 3B).

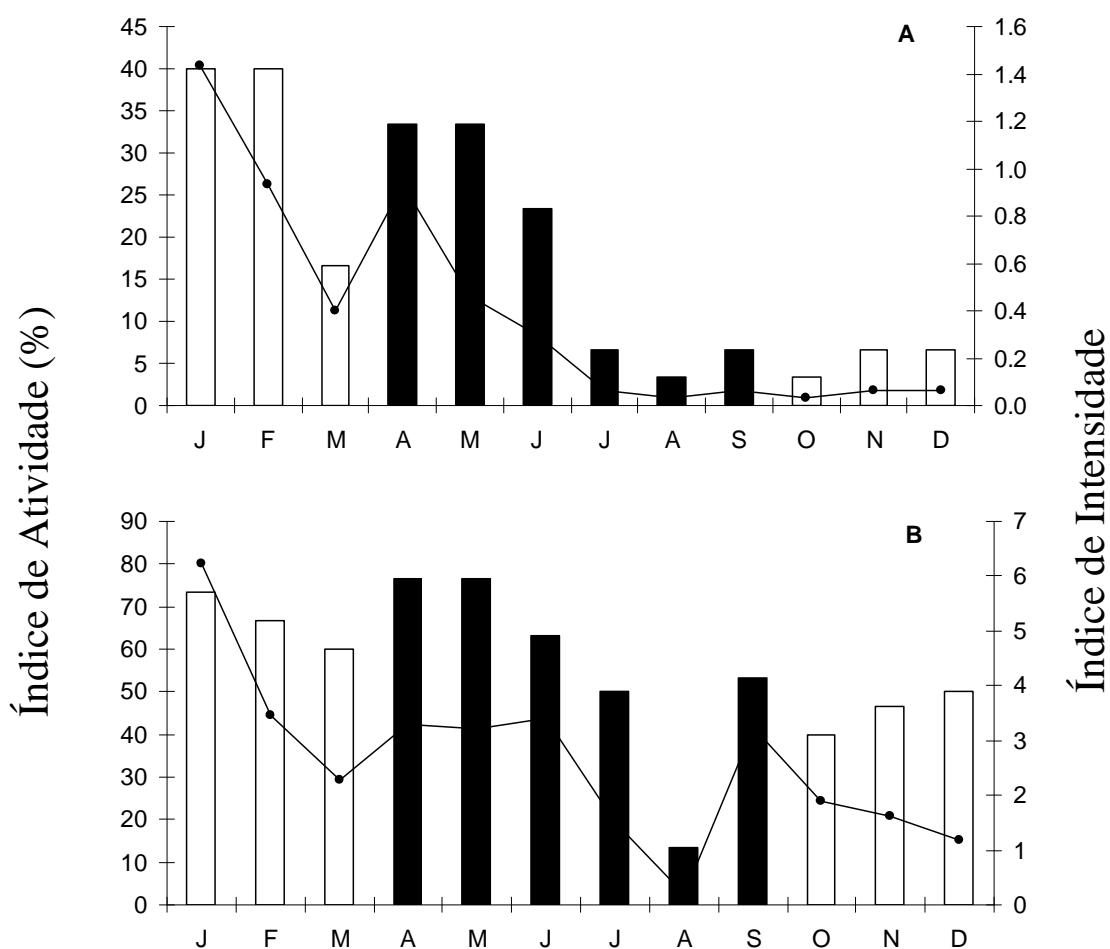


Figura 3: Índice de atividade e de intensidade de floração (A) e frutificação (B) de *Ruellia subsessilis*, de janeiro a dezembro de 2009, em Viçosa, Minas Gerais. Linhas = Índice de intensidade; Colunas em branco = Índice de atividade da estação chuvosa; Colunas preenchidas = Índice de atividade da estação seca.

A sazonalidade de distribuição da floração e frutificação ao longo do período de estudo ($r = 0,553$, $Z = 7,939$, $p < 0,01$; $r = 0,35$, $Z = 3,185$, $p < 0,05$; respectivamente) ocorreu na estação chuvosa, no período de dezembro a fevereiro.

Quanto à influência das variáveis climáticas e o fotoperíodo no comportamento fenológico, foi encontrada apenas uma relação significativa de aumento no índice de intensidade de floração e a precipitação (Figura 4).

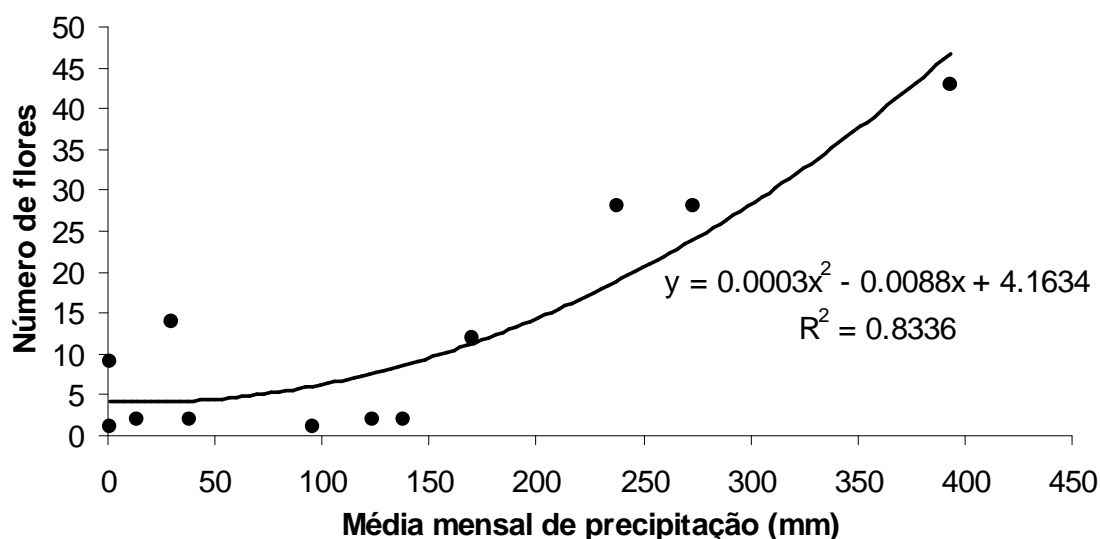


Figura 4: Relação entre a produção de flores em *Ruellia subsessilis* e a precipitação, de janeiro a dezembro de 2009, em Viçosa, Minas Gerais. $p < 0,05$.

A produção de flores por inflorescência foi maior na estação chuvosa (2,45 flores/inflorescência) que na seca (2,02 flores/inflorescência) ($U = 295,5$; $p = 0,05$). A produção de frutos por inflorescência não diferiu significativamente entre as estações: na chuvosa foram 5,6 frutos/inflorescência e, na seca, 5,3. A porcentagem de frutificação na estação seca foi de 79,3% e na chuvosa de 77,7%, o que também não diferiu significativamente.

2.3.2. Monitoramento fenológico de *R. subsessilis* e *R. brevifolia* em condições semi-controladas com imposição de escassez hídrica

As médias mensais estimadas dos potenciais hídricos do solo ao longo do experimento (Figura 5) mostraram que nos tratamentos de escassez hídrica o solo

apresentou menores potenciais hídricos, o que sugere que esses tratamentos provavelmente impuseram estresse hídrico nas plantas. Além disso, se observou certa constância no potencial hídrico em cada tratamento durante todo o período de experimento.

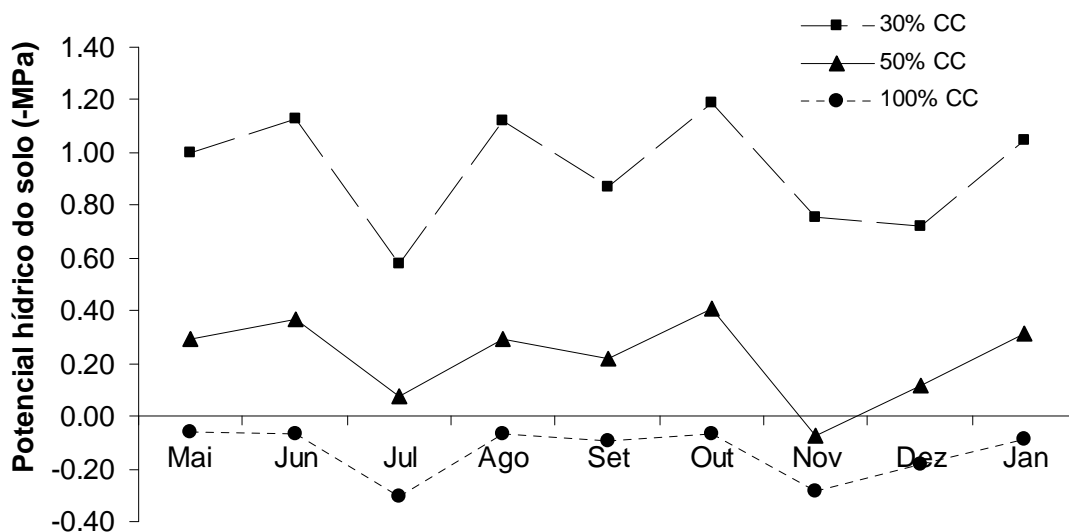


Figura 5: Potencial hídrico estimado para solo sob três tratamentos hídricos: 100% da capacidade de campo do solo (CC), 50% e 30% da CC, de maio de 2009 a janeiro de 2010, em Viçosa, Minas Gerais.

Em relação à taxa fotossintética, a transpiração e a condutância estomática, os maiores valores foram observados nas plantas controle de *R. subsessilis* (Figura 6A-C) e *R. brevifolia* (Figura 6D-F) em relação aquelas sob escassez hídrica, o que permite inferir que esses tratamentos de escassez impuseram estresse hídrico. Não se observou diferenças significativas entre plantas de *R. subsessilis* sob os tratamentos de 30% e 50% da CC (Figura 6A-C).

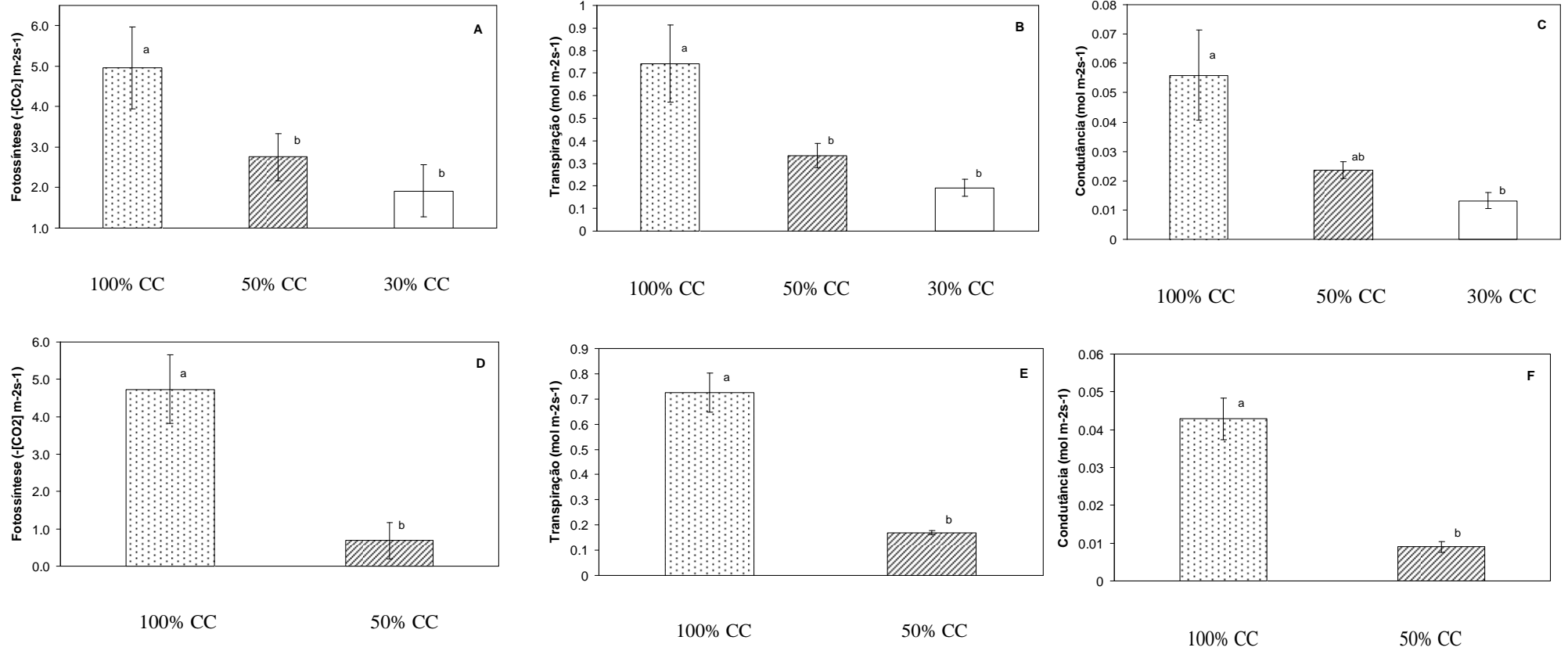


Figura 6: Taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática de plantas de *Ruellia subsessilis* (A-C) e *Ruellia brevifolia* (D-F) cultivadas em casa de vegetação sob diferentes tratamentos hídricos, de maio de 2009 a janeiro de 2010, em Viçosa, Minas Gerais. CC = capacidade de retenção de água do solo. Tratamentos com pelo menos uma mesma letra foram iguais e com letra diferente apresentaram diferenças significantes a 5% de probabilidade.

A altura média e a massa seca das plantas de *R. subsessilis* e *R. brevifolia* apresentaram variação significativa entre os diferentes tratamentos hídricos (Tabela 1). Foi observado para ambas as espécies uma maior altura das plantas sob maior disponibilidade hídrica ($r = 0,817, p < 0,01$; $r = 1,781, p < 0,01$ respectivamente). Quanto à massa seca, se observou maior massa da parte aérea e raiz sob maior disponibilidade hídrica apenas em *R. subsessilis* ($r = 0,944, p < 0,01$; $r = 0,908, p < 0,01$ respectivamente) e, a relação raiz/parte aérea não apresentou aumento sob menor disponibilidade hídrica ($r = 27,813, p = 0.91$).

Tabela 1: Comparação das alturas médias e massa seca de plantas de *Ruellia subsessilis* e *Ruellia brevifolia* cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos em casa de vegetação, de maio de 2009 a janeiro de 2010, em Viçosa, Minas Gerais.

Tratamentos	<i>R. subsessilis</i> (Teste de Tukey)			<i>R. brevifolia</i> (Teste t)		
	Altura (cm)	Massa seca (g)		Altura (cm)	Massa seca (g)	
		PA	R		PA	R
100% CC	98,86 ^a	30,47 ^a	4,84 ^a	47,99 ^a	10,86 ^a	2,37 ^a
50% CC	54,59 ^b	15,22 ^b	2,54 ^b	24,38 ^b	9,95 ^a	1,46 ^b
30% CC	28,04 ^c	7,28 ^b	1,09 ^b	----	----	----

CC = capacidade de retenção de água no solo; PA = parte aérea da planta; R = sistema radicular; ---- = Tratamento não aplicado. Tratamentos com pelo menos uma mesma letra foram iguais e com letra diferente apresentaram diferenças significantes a 5% de probabilidade.

A maior produção de flores em *R. subsessilis* sob os diferentes tratamentos hídricos foi em agosto e setembro de 2009 e a menor ocorreu em junho e julho de 2009. A maior produção de frutos e sementes foi em janeiro de 2010, em plantas sob os tratamentos 50 e 100% da CC e, em junho de 2009, em plantas sob 30% da CC. A menor produção de frutos e sementes ocorreu em janeiro de 2010, em plantas sob 30% CC, em outubro, em plantas sob 50% CC e, em junho, em plantas sob 100% CC (Figura 7).

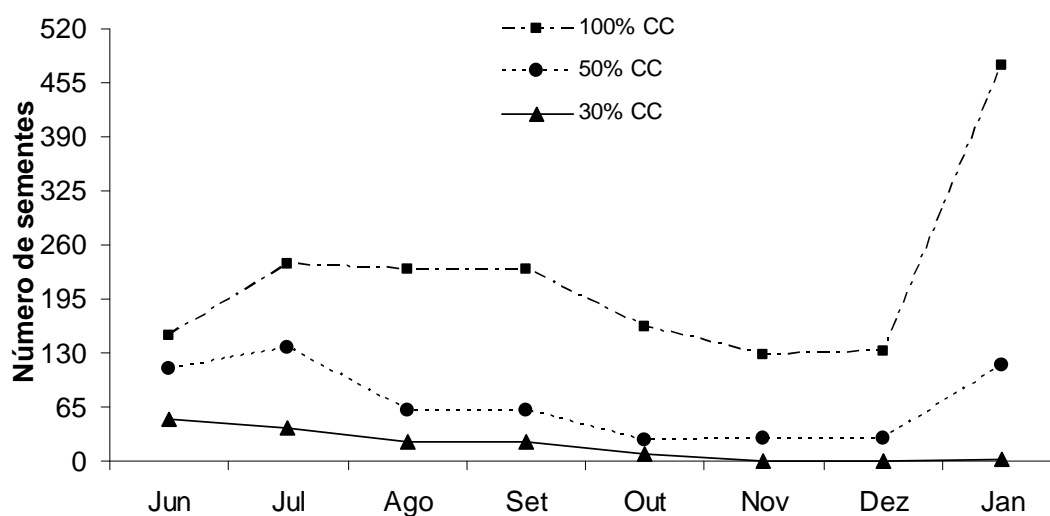


Figura 7: Produção mensal de sementes, de junho de 2009 a janeiro de 2010, em plantas de *Ruellia subsessilis* cultivadas em casa de vegetação, em Viçosa, Minas Gerais, sob diferentes tratamentos hídricos. CC = capacidade de retenção de água pelo solo.

A produção de flores, frutos e sementes (Tabela 2) encontradas foram significativamente maiores nas plantas controle de *R. subsessilis* que nas submetidas aos níveis de escassez hídrica ($U = 2477, p = 0,013$; $U = 1666, p < 0,01$; $U = 1881, p < 0,01$; respectivamente).

Tabela 2: Produção de flores, frutos e sementes em plantas de *Ruellia subsessilis* cultivadas em casa de vegetação, em Viçosa, Minas Gerais, sob diferentes tratamentos hídricos, de maio de 2009 a janeiro de 2010.

Tratamentos	Flor	Fruto	Semente
100% CC	$0,90 \pm 1,22^a$	$13,85 \pm 11,41^a$	$147,74 \pm 121,72^a$
50% CC	$0,68 \pm 1,43^b$	$4,55 \pm 4,09^b$	$51,97 \pm 46,75^b$
30% CC	$0,13 \pm 0,46^c$	$1,90 \pm 3,00^c$	$23,25 \pm 36,81^c$

CC = capacidade de retenção de água no solo. Valores médios por planta \pm desvio padrão. Teste de Mann-Whitney onde $a > b > c$ considerando 5% de significância.

Houve redução na produção de sementes em *R. subsessilis* com o maior tempo de tratamento de escassez hídrica (Figura 8), o que foi significativo apenas para as plantas submetidas a 30% da CC ($r = -4,457$, $p = 0,012$), enquanto, no controle, as plantas apresentaram aumento na produção de sementes à medida que se prolongou o tratamento ($r = 23,746$, $p < 0,01$).

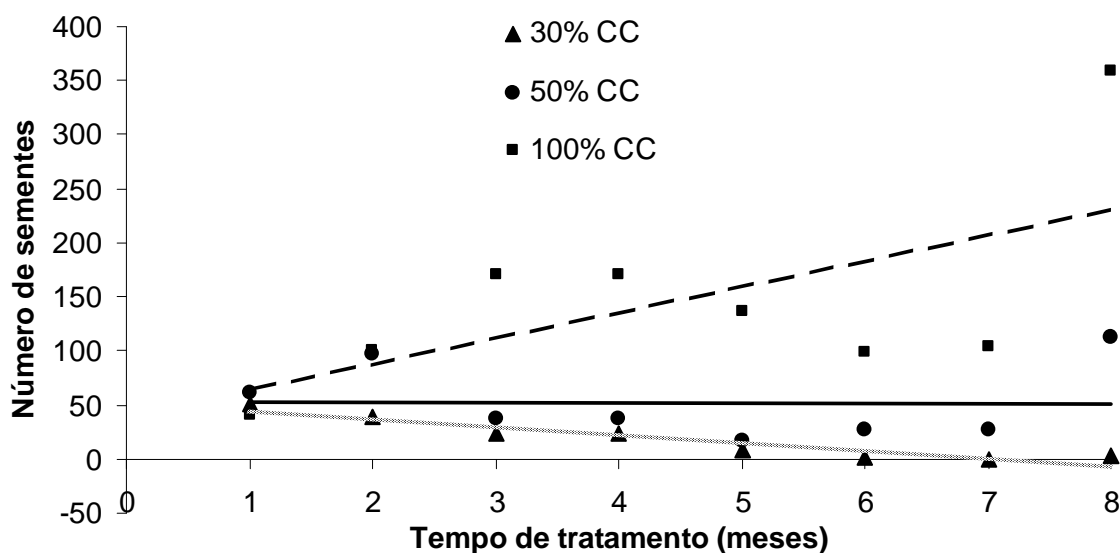


Figura 8: Produção mensal de sementes, de junho de 2009 a janeiro de 2010, em plantas de *Ruellia subsessilis* cultivadas em casa de vegetação, em Viçosa, Minas Gerais, sob diferentes tratamentos hídricos. CC = capacidade de retenção de água pelo solo. Linha de tendência tracejada = 100% CC; Linha de tendência contínua = 50% CC; Linha de tendência pontilhada = 30% CC.

Para as plantas controle de *R. subsessilis* não foi encontrada nenhuma relação significativa entre produção de flores, frutos e sementes e as variáveis fotoperíodo, irradiância e temperatura durante o período de experimento. Contudo, as flores produzidas apresentaram de junho a dezembro de 2009 aumento significativo no comprimento total da corola ($r = 0,134$, $p = 0,002$) e redução no número de óvulos produzidos ($r = -0,015$, $p = 0,015$).

Foram produzidos distintos morfos florais em *R. subsessilis* sob os diferentes tratamentos hídricos (Tabela 3). As flores de plantas sob 100% da CC foram

significativamente maiores que as produzidas por plantas sob os tratamentos de 30 e 50% da CC, exceto em relação às variáveis diâmetro da corola e o número de óvulos. Assim, pode se caracterizar a produção de morfos casmógamos normais (CN) sob 100% da CC e morfos camógamos reduzidos (CR) sob 30 e 50% da CC (veja Capítulo 1). Nos tratamentos de 50 e 30% da CC apenas o comprimento da antera diferiu entre suas flores (Tabela 3).

Tabela 3: Morfometria e número de óvulos em flores de *Ruellia subsessilis* sob diferentes condições hídricas, de junho a dezembro de 2009, em cultivo em casa de vegetação, Viçosa, Minas Gerais.

Comprimento (cm)	Tratamentos hídricos			
	100% CC	50% CC	30% CC	
Cálice	2,17 ± 0,31 ^a	1,59 ± 0,44 ^b	1,50 ± 0,43 ^b	
Corola	Diâmetro	4,37 ± 0,37 ^a	3,27 ± 0,65 ^a	3,01 ± 0,76 ^a
	Tubo	5,04 ± 0,50 ^a	4,34 ± 0,52 ^b	4,11 ± 0,58 ^b
	Total	6,93 ± 0,57 ^a	5,68 ± 0,73 ^b	5,41 ± 0,92 ^b
Estames	5,09 ± 0,54 ^a	4,36 ± 0,62 ^b	4,14 ± 0,67 ^b	
Antera*	0,38 ± 0,03 ^a	0,37 ± 0,03 ^b	0,35 ± 0,04 ^c	
Pistilo	5,17 ± 0,49 ^a	4,37 ± 0,56 ^b	4,23 ± 0,66 ^b	
Número de óvulos	15,09 ± 1,30 ^a	13,45 ± 1,60 ^a	13,57 ± 1,70 ^a	

CC = capacidade de retenção de água no solo. Valores médios ± desvio padrão; Teste de Tukey a 5% de significância, onde a > b > c. * = medida (mm).

Quanto aos tipos florais produzidos em *R. brevifolia*, plantas sob 50% da CC produziram apenas flores cleistógamas típicas (*sensu* Lord, 1981), enquanto plantas sob 100% da CC produziram flores casmógamas.

Em *R. brevifolia*, as plantas controle produziram mais frutos com diferença significativa entre os meses, 50 em agosto e 10,5 em dezembro ($t = 4,384$, $p < 0,01$), ao

passo que as plantas sob 50% da CC produziram 10,9 e 6,7 frutos, respectivamente, sem diferença significativa. A maior produção significativa de frutos nas plantas controle que sob 50% da CC ($t = 4,384$, $p < 0,01$) foi observada apenas no mês de agosto. Foram contabilizadas, em média, 5,93 sementes de frutos oriundos de flores casmógamas e 8,17 sementes oriundas de flores cleistógamas.

2.4. Discussões

O padrão de floração contínuo de *R. subsessilis*, com pico na estação chuvosa, corroborou as observações de Lima & Vieira (2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Opler *et. al.* (1976) para outros representantes de sub-bosque, em florestas úmidas. Porém, esses autores observaram floração contínua em apenas 7% das 154 espécies analisadas, demonstrando que esse padrão fenológico é incomum entre essas plantas. Floração e frutificação contínuas devem ser vantajosas por possibilitar a manutenção de um banco de plântulas de *R. subsessilis*, que é possível devido à constante produção de sementes não dormentes (Capítulo 1).

A diferença no comportamento fenológico entre os indivíduos de *R. subsessilis* da Mata do Paraíso e do Horto Botânico deve resultar das diferentes características locais (microhabitats). Em Floresta Atlântica, vegetação predominante nas áreas de estudo, ocorre comumente distintos microhabitats (Brown & Brown, 1992), com variações edáficas, climáticas e de disponibilidade de luz. Diferentes composições de solo podem acarretar diferenças na capacidade de retenção de água e disponibilidade de nutrientes, fatores que podem influenciar, segundo Morellato (1992), o comportamento fenológico. Opler *et. al.* (1980) sugeriram que variações na disponibilidade de luz também podem determinar comportamentos fenológicos diferentes entre populações.

A floração em *R. subsessilis* apesar de pouco sincrônica mostrou-se mais ativa na estação chuvosa, o que era esperado tendo em vista que a maior disponibilidade de recursos, tais como água e luminosidade, nesse período, possibilita provavelmente maior fotoassimilação por um maior número de plantas. Além disso, a maior sincronia aliada à maior produção de flores por inflorescência, na estação chuvosa, pode ser vantajosa por aumentar as chances de polinização cruzada em morfos casmógamos normais, que são

produzidos nessa estação e parecem mais adaptados à alogamia (Capítulo 1). A maior sincronia na estação chuvosa em relação à seca, segundo Bencke & Morellato (2002), é comum em florestas sazonais e seria determinada por ação conjunta de fatores endógenos e ambientais.

Estudos comparativos têm mostrado baixa sincronia de floração em espécies de sub-bosque (Martin-Gajardo & Morellato, 2003; Marques & Oliveira, 2004; Opler *et. al.*, 1980). Porém, em *R. subsessilis*, a baixa sincronia pode ter sido verificada em função da metodologia adotada. As flores de *R. subsessilis* apresentam curta duração, de 5,0 a 7,5 horas (Capítulo 1), o que pode ter afetado as contagens de flores, que tiveram intervalos semanais. A maior produção de frutos em relação à de flores, em todos os meses, reforçam a necessidade de estudos complementares com intervalos menores, para melhores esclarecimentos sobre a floração de *R. subsessilis* e o seu grau de sincronia.

As precipitações nos primeiros meses da estação chuvosa devem ter desencadeado o pico de floração observado nesse período, uma vez que foi significativa a relação entre a quantidade de flores produzidas e a precipitação. Essa maior disponibilidade de flores, concentrando-se sazonalmente na estação chuvosa, também foi observada em outras espécies de sub-bosque (Martin-Gajardo & Morellato, 2003; Batalha & Martins, 2004; Munhoz & Felfili, 2005). É fato comum entre plantas de florestas sazonais, onde os processos reprodutivos são provavelmente desencadeados pelas chuvas (Opler *et. al.*, 1976). Além da maior floração, a precipitação parece afetar a produção de morfos florais distintos nas estações seca e chuvosa (Capítulo 1), o que pôde ser confirmado em cultivo protegido, pois a disponibilidade hídrica foi o principal fator de influência na floração.

A frutificação, por outro lado, deve ser regulada principalmente por fatores bióticos, visto que não se relacionou a nenhuma das variáveis ambientais analisadas. A produção de frutos e de sementes ao longo do ano sugere que a espécie é resiliente a certo nível de estresse hídrico, durante a estação seca. Entretanto, a reduzida produção em agosto (a menor produção do ano de frutos e de sementes) se deve possivelmente a limitação fisiológica decorrente desse estresse (Larcher, 2004).

A interferência da precipitação sobre a floração pôde ser confirmada em cultivo protegido *R. subsessilis*, em que a disponibilidade hídrica foi o principal fator que influenciou a fenologia reprodutiva; a temperatura e o fotoperíodo parecem não ter

interferido. Segundo Reich & Borchert (1984), temperatura e fotoperíodo são fatores de menor interferência por apresentar menor variação na região tropical. Outra possibilidade é a espécie apresentar floração cuja indução independe das variações de temperatura e fotoperíodo (Bernier *et al.*, 1993).

Em cultivo protegido de *R. subsessilis* e *R. brevifolia*, a menor disponibilidade hídrica imposta (30 e 50% da CC) induziram respostas ao estresse hídrico, como foi possível observar pelos baixos valores da taxa transpiratória e de condutância estomática e, conseqüentemente, baixa taxa fotossintética. Segundo Larcher (2004), a primeira resposta à deficiência hídrica é a redução da turgescência celular, o que afeta os processos metabólicos, levando à redução do crescimento vegetativo. Além disso, a mudança na umidade do solo pode alterar a disponibilidade de nutrientes como o nitrogênio (Birch, 1964), o que também afeta o crescimento das plantas, ou ainda, pode reduzir a absorção de outros nutrientes, como o fósforo, que é importante no processo de floração (Griffith, 1996). Para maiores esclarecimentos são necessários estudos envolvendo essas questões.

Segundo Garrido *et al.* (2000), a menor fotoassimilação pode levar também à redução na produtividade de sementes. Portanto, a menor produção de flores, frutos e sementes em plantas estressadas de *R. subsessilis* pode ser explicada em função da menor fotoassimilação, o que acarretou em menor quantidade de fotoassimilados destinada a esses drenos e, com isso, conseqüentemente houve redução no sucesso reprodutivo. A sugestão da menor produtividade como resultado da menor fotoassimilação apoiou-se ainda na tendência de maior na produção de sementes com o aumento da disponibilidade hídrica.

Quanto ao crescimento das espécies em termos de massa seca, os resultados contrariam o sugerido por Tilman (1988), uma vez que não ocorreu alocação diferencial em raiz e parte aérea. De acordo com esse autor, plantas sob estresse hídrico apresentam maior alocação de massa em raízes em relação à parte aérea, o que possibilita maior absorção de água e nutrientes do solo. Em *R. brevifolia*, a massa seca não se relacionou à disponibilidade hídrica devido possivelmente ao menor número de tratamentos hídricos.

A falta de correspondência entre o período de maior produção de flores e a maior produção de frutos e sementes, nos tratamentos de 50 e 100% da CC, não tem explicações biológicas. Possivelmente, esse resultado se deve a inadequação metodológica (intervalos

semanais na contagem de flores com curta duração), comentado anteriormente nos estudos conduzidos em população natural.

Das plantas de *R. subsessilis* sob estresse hídrico, observou-se redução na produção de sementes com o maior tempo de tratamento apenas sob 30% da CC, enquanto o tratamento de 50% da CC apresentou relação inversa, o que sugere uma resiliência ao estresse hídrico nesse nível. A resiliência se deve ao fato da resposta induzida pelo estresse hídrico não depender apenas de sua duração e severidade, mas também da capacidade genética de resposta das plantas (Larcher, 2004). Assim, essa resiliência a 50% da CC, pode também ser comum no gênero, visto que plantas de *R. brevifolia* também não apresentaram menor sucesso reprodutivo com a maior duração desse tratamento.

O aumento na produção de sementes em plantas controle de *R. subsessilis* com o avanço do tempo de experimento, apesar de não relacionado significativamente, pode ocorrer em resposta às variações no fotoperíodo, irradiância e temperatura, uma vez que esses também interferem na taxa de fotoassimilação (Larcher, 2004). Em outras espécies de plantas, a maior produção de flores, o que provavelmente conduz a uma maior produção de sementes, tem sido relacionada a esses fatores (Henslow, 1888; Schemske, 1978; Waller, 1980; Le Corff, 1993). Essa relação não pôde ser testada em *R. brevifolia* porque foram feitos apenas dois registros de sua floração, além de que segundo Lima & Vieira (2006) a floração, em população natural, se mostra reduzida no período do presente estudo. Apesar disso, se observou na espécie menor produção de sementes em plantas sob estresse hídrico.

O estresse hídrico interferiu ainda na produção de morfos florais em *R. subsessilis*, ocasionando morfos casmógamos reduzidos (CR), que parecem necessitar de menor gasto energético para a sua produção. A floração constituída exclusivamente de morfos casmógamos normais (CN) em plantas controle, ao longo do experimento, indicou a ausência da sazonalidade na produção de morfos florais distintos em resposta ao fotoperíodo, irradiância e temperatura. A expressão desses morfos parece ser induzida primariamente pela disponibilidade hídrica, sem descartar a possibilidade de todos esses fatores estarem agindo sinergeticamente.

A produção de distintos morfos florais sob diferentes condições de disponibilidade hídrica em *R. subsessilis* se assemelha ao observado por Diaz & MacNair (1998) em *Mimulus nasutus*. Esses autores observaram que em plantas cultivadas sob escassez hídrica

houve produção de morfos CR. Ainda em *M. nasutus*, os morfos CR apresentaram cleistogamia “em pré-antese”, raramente observada em *R. subsessilis* e restrita aos períodos da estação seca (Capítulo 1), provavelmente em resposta ao estresse hídrico. Portanto, esse estresse em *R. subsessilis* pode constituir condição indutora para a produção de flores cleistógamas “em pré-antese”, além das CR, semelhante ao observado por Diaz & MacNair (1998). Em espécie cleistógama típica (*sensu* Lord, 1981), a produção de flores cleistógamas também tido sido associada ao estresse hídrico (Brown, 1952).

Os morfos CR em *R. subsessilis* apresentaram menor antera (em comprimento) sob a menor disponibilidade hídrica, o que pode constituir apenas uma resposta direta à menor turgescência celular decorrente do estresse hídrico ou, segundo Minter & Lord (1983), pode ocorrer devido às diferentes proporções de ácido abscísico e giberélico produzido sob os diferentes níveis de estresse. Em contraste, a quantidade de óvulos entre os morfos CR e CN não variou significativamente, o que deve ocorrer em função da gametogênese feminina ser mais tolerante ao estresse hídrico. Entretanto, o menor influxo de fotoassimilados aos órgãos reprodutivos, segundo Saini (1997), deve levar ao aborto de óvulos fertilizados e, com isso, reduzir a produção de sementes, tal como observado em plantas estressadas de *R. subsessilis*.

O morfo CN apresentou contínuo aumento no comprimento da corola e redução no número de óvulos, com o avanço do tempo de experimento, o que deve ser influenciado pelo fotoperíodo, irradiância e temperatura, uma vez que esses fatores interferem nos ritmos reprodutivos endógenos e na síntese dos hormônios (Brown, 1952; Waller, 1980; Cortés-Palomec & Ballard Jr, 2006). E ainda, a redução no número de óvulos também poderia ser explicada em função da lixiviação dos nutrientes do solo nos vasos controle, pois, em população natural, foi observado aumento desse número em morfos CN, no mesmo período do ano (Capítulo 1).

A produção de flores cleistógamas em plantas de *R. brevifolia* sob escassez hídrica, indica que esse estresse é indutor da cleistogamia, tal como sugerido por Brown (1952) em *Stipa leucotricha* Trin. & Rupr. (Poaceae). O fato das plantas estressadas não produzirem flores casmógamas pode estar relacionado a sua maior sensibilidade ao estresse hídrico, que teria sido selecionada, segundo Wester & Grey (2008), devido ao maior custo de produção dessas flores. Quanto à redução na produção de flores casmógamas em plantas

controle com o avanço do tempo de experimento, pode constituir uma resposta ao crescente fotoperíodo, semelhante ao que ocorre em *Bromus unioloides* Kunth (Poaceae), em que flores casmógamas, segundo Langer & Wilson (1965), foram produzidas sob fotoperíodo inferior a um valor crítico. Essa redução também pode ocorrer devido a um controle endógeno, visto que Lima & Vieira (2006) mostraram que, em população natural, houve redução do número de flores casmógamas produzidas no mesmo período do presente estudo.

O maior número de sementes produzidas pelas flores cleistógamas em *R. brevifolia* deve-se ao eficiente processo de autopolinização, enquanto as flores casmógamas produziram menos sementes devido, provavelmente, à limitação de polinizadores em ambiente protegido. Essa espécie, segundo Sigrist & Sazima (2002), é polinizada por beija-flores. Apesar da maior quantidade de sementes oriundas das flores cleistógamas, a produção total de sementes por planta foi maior em plantas controle, o que confirmou o efeito negativo do estresse hídrico também no sucesso reprodutivo de *R. brevifolia*.

2.5. Conclusões

Em *R. subsessilis*, a floração e frutificação são contínuas e com picos de intensidade ao longo do ano.

A distribuição das fenofases é sazonal e concentrada na estação chuvosa.

A floração em *R. subsessilis* apresenta maior intensidade com o aumento da precipitação.

O crescimento vegetativo e o sucesso reprodutivo em plantas cultivadas de *R. subsessilis* e *R. brevifolia* são influenciados pela disponibilidade hídrica no solo, o que também afeta a produção de distintos morfos florais.

R. subsessilis cultivada sob solo úmido produz flores casmógamas normais e, em solo com escassez hídrica, produz casmógamas reduzidas. *R. brevifolia* em solo úmido produz flores casmógamas e em solo com escassez hídrica, produz flores cleistógamas.

2.6 Referências bibliográficas

BATALHA, M.A. & MARTINS, F.R., 2004. Reproductive phenology of the cerrado plant community in Emas National Park. **Australian Journal of Botany** **52**: 149-161.

BAWA, K.S.; KANG, H.; GRAYUM, M.G. 2003. Relationships among time, frequency, and duration of flowering in tropical rain forest trees. **American Journal of Botany** **90**: 877–887.

BENCKE, C.S.C. & MORELLATO, L.P.C. 2002. Estudo comparativo da fenologia de nove espécies arbóreas em três tipos de floresta atlântica no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 237-248.

BERNIER, G.; HAVELANGE, A.; HOUSSA, C.; PETITJEAN, A.; LEJEUNE, P. 1993. Physiological Signals That Induce Flowering. **The Plant Cell** **5**: 1147-1155.

BIRCH, H.F. 1964. Mineralization of plant nitrogen following alternate wet and dry conditions. **Plant Soil** **20**: 43–49.

BORCHERT, R. 1994. Soil and Stem Water Storage Determine Phenology and Distribution of Tropical Dry Forest Trees. **Ecology** **75**: 1437-1449.

BORCHERT, R. 2000. Climatic periodicity, phenology, and cambium activity in tropical dry forest trees. **IAWA Journal** **20**: 239-247.

BROWN, W.V. 1952. The relation of soil moisture to cleistogamy in *Stipa leucotricha*. **Botanical Gazette** **113**: 438–444.

BROWN JR., K.S. & BROWN, G.G. 1992. Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: **Tropical deforestation and species extinction** (WHITMORE, T. C.; SAYER, J. A. Eds). London: Chapman & Hall, p. 119-142.

CORTÉS-PALOMECA, A.C. & BALLARD JR, H.E. 2006. Influence of annual fluctuations in environmental conditions on chasmogamous flower production in *Viola striata*. **Journal of Torrey Botanical Society** **133**: 312–320.

D'ECA-NEVES, F.F. & MORELLATO, L.P.C. 2004. Métodos de amostragem e avaliação utilizados em estudos fenológicos de florestas tropicais. **Acta Botânica Brasílica** **18**: 99-108.

DIAZ, A. & MACNAIR, M.R. 1998. The effect of plant size on the expression of cleistogamy in *Mimulus nasutus*. **Functional Ecology** **12**: 92–98.

FOURNIER, L.A. & CHARPANTIER, C.O. 1975. El tamaño da amostra y la frecuencia de las observaciones en el estudio de las características fenológicas de los árboles tropicales. **Turrialba** **25**: 45-48.

FREIRE, J.C.; RIBEIRO, M.A.V.; BAHIA, V.G.; LOPES, A.S.; AQUINO, L.H. 1980. Resposta do milho cultivado em casa de vegetação a níveis de água em solos da região de Lavras (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **4**: 5-8.

GARRIDO, M.A.T.; DEL PINO, M.A.I.T.; SILVA, A.M.; ANDRADE, M.J.B. 2000. Crescimento, absorção iônica e produção do feijoeiro sob dois níveis de nitrogênio e três lâminas de irrigação. **Ciências Agrotécnica de Lavras** **24**: 187-194.

GRIFFITH, C.J. 1996. Distribution of *Viola blanda* in relation to within-habitat variation in canopy openness, soil phosphorus and magnesium. **Bulletin of Torrey Botanical Club** **123**: 281–285.

HAMAKAWA, P.J. 2004. **Noções de Cosmografia**. Caderno Didático 36, AEAGRI/DEA/UFV, 37p.

HENSLOW, G. 1888. Cleistogamy. **Nature** **29**: 104-105.

JANZEN, D. 1971. Seed predation by animals. **Annual Review of Ecology and Systematics** **2**: 465-492.

LANGER, R.H.M., & WILSON, D. 1965. Environmental control of cleistogamy in prairie grass (*Bromus unioloides* H. B. K.). **New Phytologist** **64**: 80–85.

LARCHER, W. 2004. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima, 531p.

LE CORFF, J. 1993. Effects of light and nutrient availability on chasmogamy and cleistogamy in an understory tropical herb, *Calathea micans* (Marantaceae). **American Journal of Botany** **80**: 1392–1399.

LIMA, N.A.S. & VIEIRA, M.F. 2006. Fenologia de floração e sistema reprodutivo de três espécies de *Ruellia* (Acanthaceae) em fragmento florestal de Viçosa, Sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica** **29**: 681-687.

LIMA, N.A.S.; VIEIRA, M.F.; CARVALHO-OKANO, R.M.; AZEVEDO, A.A. 2005. Cleistogamia em *Ruellia menthoides* (Nees) Hiern e *R. brevifolia* (Pohl) C. Ezcurra (Acanthaceae) em fragmento florestal do Sudeste brasileiro. **Acta Botânica Brasilica** **19**: 443-449.

LORD, E.M. 1981. Cleistogamy: a tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. **The Botanical Review** **47**:421-449.

MARQUES, M.C.M. & OLIVEIRA, P.E.A.M. 2004. Fenologia de espécies do dossel e do sub-bosque de duas Florestas de Restinga na Ilha do Mel, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** **27**: 713-723.

MARTIN-GAJARDO, I.S. & MORELLATO, L.P.C. 2003. Fenologia de Rubiaceae do sub-bosque em floresta Atlântica no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** **26**: 299-309.

MINTER, T.C. & LORD, E.M. 1983. Effects of water stress, abscisic acid, and gibberellic acid on flower production and differentiation in the cleistogamous species *Collomia grandiflora* Dougl. ex Lindl. (Polemoniaceae). **American Journal of Botany** **70**: 618–624.

MORELLATO, L.P.C. & LEITAO-FILHO, H.F. 1990. Estratégias fenológicas de espécies arbóreas em floresta mesófila na Serra do Japi. **Revista Brasileira de Biologia** **50**: 163- 173.

MORELLATO, L.P.C. 1992. Sazonalidade e dinâmica de ecossistemas florestais na Serra do Japi. *In*: **Historia Natural da Serra do Japi. Ecologia e preservação de uma área de floresta no sudeste do Brasil** (L. P. C. MORELLATO Ed.). Campinas: UNICAMP/ FAPESP, p.98-110.

MORELLATO, L.P.C.; TALORA, D.C.; TAKAHASI, A.; BENCKE, C.C.; ROMERA, E.C.; ZIPPARRO, V.B. 2000. Phenology of Atlantic Rain Forest Trees: A Comparative Study. **Biotropica** **32**: 811–823.

MUNHOZ, C.B.R. & FELFILI, J.M. 2005. Fenologia do estrato herbáceo-subarbustivo de uma comunidade de campo sujo na Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** **19**: 981-990.

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.

NJOKU, E. 1963. Seasonal periodicity in the growth and development of some forest trees in Nigeria. **Journal of Ecology** **51**: 617-624

OPLER, P.A.; FRANKIE, G.W.; BAKER, H.G. 1980. Comparative phenological studies of treelet and shrub species in tropical wet and dry forests in the lowlands of Costa Rica. **Journal of Ecology** **68**: 167-188.

OPLER, P.A.; FRANKIE, G.W.; BAKER, H.G. 1976. Rainfall as a factor in the release, timing and synchronization of anthesis by tropical trees and shrubs. **Journal of Biogeography** **3**: 231-236.

PIOVANO, M.; GALETTO, L.; BERNARDELLO, L. 1995. Floral morphology, nectar features and breeding system in *Ruellia brevifolia* (Acanthaceae). **Revista Brasileira de Biologia** **55**: 409-418.

REICH P.B. & BORCHERT R. 1984. Water Stress and Tree Phenology in a Tropical Dry Forest in the Lowlands of Costa Rica. **Journal of Ecology** **72**: 61-74.

SAINI, H.S. 1997. Effects of water stress on male gametophyte development in plants. **Sex Plant Reproduction** **10**:67–73.

SAKAI, S. 2001. Phenological diversity in tropical forests. **Population Ecology** **43**: 77–86.

SAMPAIO, E.S. & ALMEIDA, A.A. 1994. Influencia da temperatura e luminosidade na floração de *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae), na região urbana de Curitiba, Paraná. **Acta Biológica Paranaense** **23**: 79-88.

SCHEMSKE, D.W. 1978. Evolution of reproductive characteristics in *Impatiens* (Balsaminaceae): the significance of cleistogamy and chasmogamy. **Ecology** **59**: 596-613.

SCHOEN, D.J. & LLOYD, D.G. 1984. The selection of cleistogamy and heteromorphic diaspores. **Biological Journal of the Linnean Society** **23**: 303-322.

SIGRIST, M.R. & SAZIMA, M. 2002. *Ruellia brevifolia* (Pohl) Ezcurra (Acanthaceae): fenologia da floração, biologia da polinização e reprodução. **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 35-42.

TILMAN, D. 1988. **Plant Strategies and the Dynamics and Structure of Plant Communities. Monographs in Population Biology**. Princeton: University Press, p. 52-135.

UPHOF, J.C. 1938. Cleistogamic flowers. **The Botanical Review** **4**: 21-49.

ZAR, J.H. 1996. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall International, 662p.

WALLER, D.M. 1980. Environment determinants of outcrossing in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). **Evolution** **34**: 747-761.

WEBSTER, T.M. & GREY, T.L. 2008. Growth and reproduction of benghal dayflower (*Commelina benghalensis*) in response to drought stress. **Weed Science** **56**: 561-566.

WRIGHT, S.J. & van SCHAIK, C.P. 1994. Light and the Phenology of Tropical Trees. **The American Naturalist** **143**: 192-199.

WRIGHT, S.J. 1991. Seasonal Drought and the Phenology of Understory Shrubs in a Tropical Moist. **Ecology** **72**: 1643-1657.

CONCLUSÕES GERAIS

R. subsessilis produz sazonalmente morfos florais distintos: casmógamos reduzidos (CR), na estação seca, e casmógamos normais (CN), na chuvosa.

Morfos CR apresentam menor comprimento de corola, estames, anteras e pistilo, menor número de óvulos e grãos de pólen e maior longevidade das flores em relação aos CN.

A espécie é prioritariamente autógama, no local de estudo, e ambos os morfos contribuem na produção de frutos e sementes: o CR parece mais apto à autogamia e o CN à alogamia. Em ambos, ocorre a autopolinização tardia e em CR, esporadicamente (cerca de 3%), ocorre a cleistogamia “pré-antese”.

As sementes oriundas da autopolinização são mais pesadas e germinam mais rápido que as oriundas da polinização cruzada.

Em *R. subsessilis*, a floração e frutificação são contínuas, mas a distribuição das fenofases é sazonal e concentrada na estação chuvosa.

O crescimento vegetativo e o sucesso reprodutivo em plantas cultivadas de *R. subsessilis* e *R. brevifolia* são influenciados pela disponibilidade hídrica no solo.

R. subsessilis cultivada sob solo úmido produzem flores casmógamas normais e, em solo com escassez hídrica, flores casmógamas reduzidas. *R. brevifolia* sob solo úmido produzem flores casmógamas e em solo com escassez hídrica, produz flores cleistógamas.

ANEXO 1

De acordo com Harakawa (2004) faz-se o cálculo do fotoperíodo (N) a partir da seguinte fórmula, considerando a declinação solar (δ) nos dias 15 de cada mês e a latitude (ϕ) do município de Viçosa igual $-20,75^\circ$.

$$N = \frac{2 \cdot (H + 0,83^\circ)}{15}$$

onde: $H = \arccos [-\text{tg} (\phi) \cdot \text{tg} (\delta)]$;

sendo $\delta = 23,45^\circ \cdot \text{sen} [360^\circ (nj + 80) / 365]$

(nj = número de dias)

HAMAKAWA, P. J. 2004. **Noções de Cosmografia**. Caderno Didático 36, AEAGRI/DEA/UFV, 37p.