



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



MARIANA CARVALHO CHAVES

MECANISMOS REPRODUTIVOS EM *Physalis angulata* L.

Feira de Santana - BA
2017

MARIANA CARVALHO CHAVES

MECANISMOS REPRODUTIVOS EM *Physalis angulata* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Dra. Adriana Rodrigues Passos

Co-orientador: Dr. Frederic Mendes Hughes

Feira de Santana - BA
2017

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado

C439m Chaves, Mariana Carvalho
Mecanismos reprodutivos em *Physalis angulata* L. / Mariana
Carvalho Chaves. - 2017.
63 f.: il.

Orientadora: Adriana Rodrigues Passos.
Coorientador: Frederic Mendes Hughes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de
Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,
2017.

1. *Physalis angulata* – Sistema reprodutivo. 2. Planta medicinal –
Melhoramento genético. I. Passos, Adriana Rodrigues, orient. II. Hughes,
Frederic Mendes, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana.
IV. Título.

CDU: 582.951.4

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Abílio de Queiroz
Universidade do Estado da Bahia - UNEB

Prof^a Dr^a Luciene Cristina Lima e Lima
Universidade do Estado da Bahia - UNEB

Prof^a Dr.^a Adriana Rodrigues Passos
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS
Orientadora e Presidente da banca

Feira de Santana, BA

2017

Aos meus pais, Ana e Agostinho, por todo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não foi fácil, durante a caminhada houve momentos de angústias e dificuldades, mas também de compreensão e apoio. Por isso, meus agradecimentos vão para todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o êxito desse trabalho.

Primeiramente agradeço a Deus, o mestre dos mestres, por me permitir chegar até aqui, e ter me tornado resiliente para resistir às provações da vida dando-me forças para continuar o meu caminho.

Aos meus pais Ana e Agostinho e minha irmã Juliana, obrigada é pouco por todo amor compartilhado, vocês são minha fonte inesgotável de amor, os que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todas as decisões, devo tudo que sou e o que tenho alcançado a vocês.

Ao meu marido Rafael, meu amor e companheiro que escolhi para dividir a vida, obrigada por estar ao meu lado em mais um momento importante, sem sua compreensão e seu apoio por todo esse tempo seria muito difícil a caminhada.

À toda minha família, exemplo de união e amor. Em especial, minha vó Mercedes que se foi e não pode ver a conclusão dessa etapa da minha vida, saudades eternas.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Adriana Passos, que durante esse tempo foi tão compreensiva e amiga, muito obrigada por todo apoio e dedicação desde a minha graduação.

Ao meu co-orientador Dr. Frederic Hughes por todo empenho e contribuição no meu trabalho, obrigada por ter sido tão disponível e disposto a me ajudar.

À amiga Keylla Souza, obrigada por sua amizade e companheirismos desde a graduação, a parceria de realizarmos juntas todas nossas atividades de produção acadêmica.

À Alismário Leite, por ter sido prestativo e ter me ajudado na prática.

Aos colegas da pós-graduação, em especial Mara Kallyne e Suzivany Almeida, pelos momentos divididos de preocupações e alegrias.

Aos profs. Dr. Manoel Abilio e Dr.^a Luciene Lima, pelas pertinentes contribuições ao meu trabalho.

Ao prof. Dr. Jucélio e Marcus Aragão pela identificação das espécies de visitantes florais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Universidade Estadual de Feira de Santana e ao Programa de Recursos Genéticos vegetais por terem propiciado a minha formação acadêmica.

E por fim, mas não menos importante toda equipe do horto, que desde o principio me acolheram e me fizeram sentir em casa. Em especial, os funcionários de campo pelo auxílio nos experimentos e aos colegas de laboratório pela parceria e momentos de descontração.

RESUMO

Physalis angulata L. (Solanaceae) é uma espécie medicinal tradicional podendo ser encontrada em todo o território brasileiro. A utilidade medicinal atribuída decorre da produção de substâncias complexas de interesse farmacológico como: vitaesteróides, fisalinas, flavonóides, esteróides, ácidos graxos, carotenóides, ácido ascórbico e alcalóides. Para a produção de fármacos, a indústria farmacêutica requer uma grande quantidade de matéria-prima, o que seria muito dispendioso e geraria impactos expressivos no ambiente natural. Desse modo, faz-se necessário o desenvolvimento de programas de melhoramento voltados para plantas medicinais, visando assegurar a produção industrial de metabólicos especiais. Para iniciar o melhoramento genético de uma espécie é necessário obter informações precisas sobre várias questões fundamentais e uma delas é o sistema reprodutivo. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo sobre o sistema reprodutivo de *Physalis angulata*, identificando o sistema de cruzamento preferencial por meio de experimentos de polinizações controladas, testes de viabilidade e germinabilidade dos grãos de pólen e observações dos visitantes florais. Todas as variáveis avaliadas para estimar o sistema preferencial de cruzamento de *P. angulata* indicaram que se trata de uma espécie auto-compatível, e segundo a relação pólen óvulo apresenta um sistema autógamo facultativo. Os corantes utilizados para estimar a viabilidade polínica não diferiram estatisticamente. A viabilidade polínica foi alta utilizando o método colorimétrico, entretanto não houve germinação dos tubos polínicos utilizando o método de germinação *in vitro*, sendo necessários mais estudos e ajustes dos meios de cultura. O fator hora influenciou a viabilidade dos grãos de pólen e alcançou 96% às 14 horas utilizando o corante tetrazólio. A antese das flores de *P. angulata* durou em média dois dias, iniciaram a abertura às 6 da manhã e o encerramento iniciou às 14 horas em condições de campo; no segundo dia reabrem e fecham no mesmo horário. Em casa de vegetação, as flores abriram no mesmo horário, mas o fechamento ocorreu por volta das 17 horas e reabriram no dia seguinte. Os insetos visitantes mais frequentes foram da ordem Hymenoptera (*Apis mellífera*).

Palavras-chave: Camapu. Melhoramento genético. Sistemas reprodutivos. Germinação dos grãos de pólen. Visitantes florais.

ABSTRACT

Physalis angulata L. (Solanaceae) is a traditional medicinal species that can be found all over Brazil. The medicinal utility attributed derives from the production of complex substances of pharmacological interest as: vitaesteroids, fisalinas, flavonoids, steroids, fatty acids, carotenoids, ascorbic acid and alkaloids. For pharmaceutical production, the pharmaceutical industry requires a large amount of raw material, which would be very expensive and would generate significant impacts on the natural environment. In this way, it is necessary to develop breeding programs aimed at medicinal plants, in order to ensure the industrial production of special metabolites. In order to initiate the genetic improvement of a species it is necessary to obtain accurate information on several fundamental questions and one of them is the reproductive system. In this sense, the objective of this work was to carry out a study on the reproductive system of *Physalis angulata*, identifying the preferential crossing system through experiments of controlled pollinations, viability tests and pollen grain germination and floral visitors observations. All variables evaluated to estimate the preferential cross-breeding system of *P. angulata* indicated that this is a self-compatible species, and according to the egg pollen ratio it presents a facultative autogamous system. The dyes used to estimate pollen viability did not differ statistically. The pollen viability was high using the colorimetric method, however, there was no germination of the pollen tubes using the in vitro germination method, and further studies and adjustments of the culture medium were necessary. The hour factor influenced the viability of the pollen grains and reached 96% at 14 hours using the tetrazolium dye. The anthesis of the flowers of *P. angulata* lasted on average two days, they began the opening at 6 in the morning and the closure began at 14 o'clock in the field conditions; on the second day they reopen and close at the same time. In a greenhouse, the flowers opened at the same time, but the closure occurred around 5 pm and reopened the next day. The most frequent insects were of the order Hymenoptera (*Apis mellifera*).

Key words: Camapu. Breeding. Reproductive systems. Pollen grain germination. Floral visitors.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

1.0 Recursos genéticos do gênero <i>Physalis</i>	1
2.0 Informações gerais da espécie <i>Physalis angulata</i> L.	2
3.0 Sistema reprodutivo em Solanaceae	5
4.0 Os grãos de pólen e a interação com o pistilo	7
5.0 Visitantes florais em Solanaceae	8
6.0 Melhoramento genético de plantas medicinais	8

REFERÊNCIAS	10
-------------	----

CAPÍTULO 1 – VIABILIDADE POLÍNICA, INTERAÇÃO PÓLEN-PISTILO E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE *Physalis angulata* L.

Introdução	19
Material e métodos	20
Resultados e discussão	25
Conclusões	34
REFERÊNCIAS	34

CAPÍTULO 2 – ASPECTOS DA BIOLOGIA FLORAL DE *Physalis angulata* L.

Introdução	41
Material e métodos	42
Resultados e discussão	43
Conclusões	49
REFERÊNCIAS	50

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Quantidade de grãos de pólen por flor, número de óvulos, razão pólen-óvulo (P / O) em *Physalis angulata* L.. 28

Tabela 2: Experimento de biologia reprodutiva realizado em flores de *Physalis angulata* L. em casa de vegetação da Unidade Experimental Horto Florestal, durante o mês de janeiro de 2017. 32

Tabela 3: Caracterização física dos frutos de *Physalis angulata* L. provenientes de diferentes polinizações. 32

Tabela 4: Germinabilidade (G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade da germinação (CUG) de *Physalis angulata*. 33

CAPÍTULO II

Tabela 5: Observação dos visitantes florais realizado em flores de *Physalis angulata* L. em casa de vegetação da Unidade Experimental Horto Florestal. 45

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Detalhes da planta de *Physalis angulata*. (A) Parte vegetativa de *Physalis angulata*; (B) Flor e folhas de *Physalis angulata*; (C) Frutos envoltos pelos cálices. UEFS/Horto Florestal, Feira de Santana-BA, 2016. 4

CAPÍTULO I

Figura 2: Método colorimétrico para determinar a viabilidade dos grãos de pólen de *Physalis angulata* L. (A) Anteras retiradas dos botões/flores e dispostas em lâminas; (B) Anteras com o corante carmin acético 1%, sendo cortadas para liberação do pólen; (C) Lâminas prontas sendo observadas para contagem dos pólenes. UEFS/Horto Florestal, Feira de Santana-BA, 2016.

21

Figura 3: Processo de obtenção dos extratos florais de *Physalis angulata* L. (A) Estigmas retirados dos botões/flores e dispostos em cadinhos para posterior maceração; (B) Ovários sendo macerados; (C) Amostra sendo agitada em vórtex. UEFS/Horto Florestal, Feira de Santana-BA, 2016. 22

Figura 4: (A) Experimento de sistema reprodutivo. (B) Coleta dos grãos de pólen. (C) Flor sendo polinizada para o tratamento de polinização cruzada 24

Figura 5: Fotomicrografias das leituras após 24 horas de inoculação dos pólenes sob o meio de cultura visualizadas por microscopia. (A) Pólenes submetidos ao meio de cultura 26

Figura 6: Viabilidade dos grãos de pólen de *Physalis angulata* L. utilizando os corantes carmin acético (CA) e tetrazólio (TTC). 27

Figura 7: Viabilidade polínica de *Physalis angulata* L. avaliada ao longo do dia utilizando os corantes carmin acético e tetrazólio. 28

Figura 8: Fotomicrografias das interações pólen-pistilo provenientes das polinizações realizadas no experimento de fertilização *in vivo* visualizadas por microscopia de epifluorescência. es= estigma; tt= tecido de transmissão; gp= grão de pólen; tp= tubo polínico; ov=óvulo 31

CAPÍTULO II

Figura 9: Antese de *Physalis angulata* L.. (A) Momento que iniciou a antese, às 6 horas. (B) Encerramento da antese, às 14 horas. UEFS/Horto Florestal, Feira de Santana-BA, agosto de 2016.

44

Figura 10: (A) Estádios após a polinização de *Physalis angulata* L. (UEFS/Horto Florestal, Feira de Santana-BA, março de 2017. 45

Figura 11: (A) Vista frontal da flor recém coletada e da flor após exposição ao hidróxido de amônia, respectivamente. (B) Vista lateral da flor recém coletada e da flor após exposição ao hidróxido de amônia, respectivamente. (C) Flores após serem submergidas na solução de vermelho neutro 0,1%. 47

Figura 12: Visitantes das flores de *Physalis angulata* L. (A) Diptera (B) Hymenoptera monopolizando a flor e provavelmente impedindo a visita do Diptera (C) Diferentes espécies de formigas. (D) Inseto coletando pólen. (E) Abelha acessando os órgãos reprodutivos da flor. 48

Figura 13: Visitantes das flores de *Physalis angulata* L. (A) Abelha acessando os órgãos reprodutivos da flor; (B) Corbícula. 49

INTRODUÇÃO GERAL

1.0 Recursos genéticos do gênero *Physalis*

Os recursos genéticos constituem a porção da biodiversidade que tem previsão de uso atual ou potencial. Assim, compreendem as variedades elites, variedades melhoradas obsoletas, variedades crioulas, linhas avançadas e espécies nativas. Dessa forma, os recursos genéticos são portadores de genes de grande significado para condução do melhoramento genético das espécies (QUEIRÓZ et al., 1999). Esses estudos permitem selecionar genótipos, com ampla distância genética ou com atributos previamente identificados, desenvolvendo práticas de pré-melhoramento, de clonagem e de multiplicação em massa de indivíduos que apresentam características favoráveis ou as suas diversas combinações (FISHER et al., 2005).

Os recursos genéticos apresentam importância para a humanidade, tendo em vista a variedade de culturas que estão em nossa mesa e que foram obtidas através da inserção do germoplasma nos programas de melhoramento de diversas espécies. Um dos óbices ao uso do germoplasma seria o conhecimento amplo acerca dos acessos que se encontram conservados em coleções diversas, e que poderiam servir de base para incrementos em diferentes programas, além de pesquisas básicas que antecedem os diferentes manejos que são corriqueiramente estabelecidos nos centros de pesquisas. De acordo com Peeters e Williams (1984), há uma grande quantidade de acessos sendo conservados em bancos de germoplasma, porém poucos são usados como esperado. Segundo Nass (2001) as atividades envolvidas nos bancos de germoplasma demandam diversas áreas do conhecimento, o que acarreta em um custo elevado e retorno em longo prazo. Dessa forma, as atividades que envolvem a correta definição do sistema reprodutivo e que são objeto de estudo no referido trabalho constituem informações importantes para posterior condução de programas de melhoramento.

Para o bom aproveitamento dos recursos genéticos do gênero *Physalis* é importante consolidar um banco de dados com informações sobre as diferentes coleções existentes, a fim de identificar possíveis duplicatas e variedades promissoras com base nas características morfológicas, químicas e agronômicas, para posterior seleção e reprodução de variáveis desejáveis, tais como rendimento, qualidade do fruto, resistência a doenças e composição química (FISHER et al., 2005).

Devido aos diversos usos, vem crescendo o interesse e os avanços nas pesquisas com essas espécies, o que têm permitido consolidar uma base de dados de coleções, visando à conservação da variabilidade genética de algumas espécies do gênero. Na Colômbia, a coleção Palmira representa a variabilidade da espécie *P. peruviana* L. (BONILLA e ESPINOSA, 2003). Por sua vez, a coleção Corpoica é composta de 35 introduções de *P. philadelphica*, provenientes da Guatemala, 24

introduções da Holanda (*P. peruviana* L., *P. angulata* L., *P. cortomati* Moc e Sesse, *P. floridiana* Rydb., *P. pruinosa* L., *P. alkekengi* L., *P. fuscomaculata* Dunal, *P. mendocina* Phil., *P. philadelphica*, *P. curassavica* L., *P. ixocarpa* Brot. e *P. aequata* J. Jacq.) e 39 entradas dos departamentos de Antioquia, Caldas, Cundinamarca e Nãrino (CORPOICA, 2004; LIGARRETO et al., 2005). A variabilidade genética de *Physalis* nos países da América Latina e do Caribe é representada por variedades tradicionais principalmente selvagens, exceto no Brasil, onde existem variedades melhoradas de *P. peruviana* (EMBRAPA) e no México de *P. philadelphica* (IPGRI, 2000).

Atualmente, a Universidade Estadual de Feira de Santana dispõe de uma coleção do melhorista de *Physalis angulata* oriunda de diferentes localidades dos estados da Bahia e Piauí, que estão sendo caracterizadas por descritores morfoagronômicos e moleculares para serem introduzidos no programa de melhoramento. Uma parte da variabilidade genética vem sendo estudada por pesquisadores na mesma instituição, com diferentes espécies do gênero *Physalis*, entretanto o maior volume de trabalhos obtidos foram executados com a *Physalis angulata*. Silva (2007), avaliando caracteres quantitativos e qualitativos em progênies de autofecundação da espécie *P. angulata*, obteve resultados satisfatórios no que se refere a padrões de herdabilidade de caracteres, como peso e número de frutos, altura da planta e aumento do teor de açúcares, concluindo-se que é possível obter avanços significativos na qualidade desses caracteres através do melhoramento. O mesmo autor constatou incrementos na produção de fisalinas, metabólito secundário, em plantas selecionadas geneticamente, quando comparadas às plantas não selecionadas. Araújo (2012) analisou a divergência genética de progênies de *P. angulata*, após um ciclo de seleção, bem como as correlações entre as variáveis estudadas e a caracterização dos cromossomos de *P. angulata* e *P. peruviana*. Tanan (2015) relatou o comportamento fenológico, a época de semeadura mais adequada para o crescimento e a produtividade de plantas cultivadas no semiárido baiano, bem como, as características físicas e bioquímicas dos frutos de *Physalis angulata*, *Physalis ixocarpa* e *Physalis philadelphica*. Santos et al. (2017) estudando o comportamento meiótico de *P. ixocarpa* relataram que a espécie é meioticamente estável e o processo de microsporogênese é normal, resultando na formação de grãos de pólen altamente viáveis.

2.0 Informações gerais da espécie *Physalis angulata* L.

O gênero *Physalis* L., descrito por Linneo em 1753, pertencente à família Solanaceae, é composto por cerca de 100 espécies distribuídas no continente americano. Ocorre nos Estados Unidos da América, México, América Central, do Sul e Caribe, tendo como único representante não americano a *Physalis alkekengi* L. que é euroasiática (D'ARCY, 1991; MARTINEZ, 1998;

HUNZIKER, 2001). Dois terços das espécies do gênero são endêmicas do México, sendo esta região considerada o seu centro de diversidade (RUFATO et al., 2008). Constitui um grupo representativo de plantas de ampla potencialidade. Há espécies que produzem frutos comestíveis, de alto valor nutricional e alta demanda de comercialização nos mercados internacionais, como a *Physalis peruviana* L., espécie de importância medicinal comprovada e com ampla utilização popular, destacando a *Physalis angulata* L., e de importância ornamental, a exemplo da *Physalis alkekengi* (CÁRDENAS, 1981; LIGARRETO et al., 2005).

O nome *Physalis* tem origem grega, o termo “Physa”, significa bolha ou bexiga, e refere-se ao cálice permanente que envolve o fruto (Figura 1), considerada a característica diagnóstica que define o táxon (HAWKES, 1991). As representantes do gênero são caracterizadas como ervas anuais, em sua maioria comestível e de cultivo fácil. Possuem androceu pentâmero com anteras com deiscência longitudinal, ovário com disco basal e fruto tipo baga, envolvido por um cálice, que varia na coloração a depender da espécie, apresentando cor verde, amarelo, laranja ou roxa, todos com muitas sementes (SILVA e AGRA, 2005; LIGARRETO et al., 2005).

Physalis angulata ocorre em todas as regiões e em quase todos os domínios do Brasil, exceto no Pampa, com predominância em ambientes cuja vegetação original foi alterada, como áreas ruderais, agropecuárias e urbanas (STEHMANN et al., 2015). É uma erva, e em que pese a literatura a classifique como autógama, não foram identificados estudos mais profundos para a definição concreta do seu sistema reprodutivo preferencial. Apresenta porte ereto, ciclo anual, relativamente curto e com produção de frutos que se inicia a partir do 3º e 4º meses, a partir da sua data de semeadura, estendendo-se por um período de aproximadamente seis meses (LORENZI e MATOS, 2002). O caule é do tipo aéreo, herbáceo, clorofilado, de ramificação simpodial com tricomas simples unicelulares nucleados, sendo este último importante estrutura adaptativa a temperaturas elevadas e ao combate a herbivoria, o qual também a caracteriza como planta invasiva (SILVA et al., 2015). Suas flores são solitárias, o cálice é soldado até a metade e permanece nos frutos. A corola é gamopétala amarelada e as anteras azuladas ou violetas, dorsifixas (GONEM et al., 2000; SILVA e AGRA, 2005). Os frutos são pequenos, redondos, de coloração alaranjada quando maduros (FREITAS e OSUNA, 2006). As sementes são elipsóides e comprimidas, castanho alaranjadas quando completamente maduras e esbranquiçadas imaturas (SOUZA et al., 2010).



Figura 1: Detalhes da planta de *Physalis angulata*. (A) Parte vegetativa de *Physalis angulata*; (B) Flor e folhas de *Physalis angulata*; (C) Frutos envoltos pelos cálices. UEFS/Horto Florestal, Feira de Santana-BA, 2016.

A espécie *P. angulata*, conhecida popularmente como balãozinho, camapú, mullaca, bucho-de-rã, é uma das mais representativas espécies pertencentes ao gênero, com ampla descrição na literatura, em decorrência dos atributos de importância medicinal. Ademais, diversos estudos químicos e farmacológicos têm sido realizados com a espécie, sendo largamente empregada na medicina popular de alguns países, a exemplo dos índios amazônicos que utilizam a infusão de suas folhas para indução de diurese (LORENZI e MATOS, 2008). Em que pese a literatura expresse o uso desta planta para fins medicinais, seus frutos apresentam qualidade nutricional com potencial de uso, também, na alimentação humana, assim como descrito para *P. peruviana*.

Muitos estudos demonstraram significativa atividade anti-inflamatória, anti-asmática, anti-diabética e anti-bacteriana, em decorrência da presença de fitoconstituintes, principalmente, de efeitos imunológicos (SHARMA, 2015). Um importante fitoconstituente são as fisalinas, derivados esteróides isolados de *Physalis* spp., com eficientes atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras. A atividade anti-inflamatória das fisalinas, também, foi demonstrada em modelos de isquemia intestinal e lesão por reperfusão, dermatite e artrite. No intuito de desenvolver analgésicos eficazes no controle de todas as síndromes de dor, Lima et al. (2014), constataram uma nova propriedade farmacológica, atividade antinociceptiva central para as fisalinas B, D, F e G isoladas da *P. angulata*. Pesquisadores do Instituto de Pesquisa Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), investigam a produção de um inseticida natural com extratos de *P. angulata* para combater o barbeiro, vetor transmissor da doença de chagas (MEIRA et al., 2015). Silva et al. (2015) avaliaram os efeitos do extrato aquoso de raízes de *Physalis angulata* sobre a proliferação e morfologia de *Leishmania* e constaram alterações importantes comprovando atividade antileishmania sem causar efeitos citotóxicos às células hospedeiras humanas. Ademais, essas propriedades terapêuticas da planta abrem possibilidade para ser utilizada como matéria-prima na indústria farmacêutica ou em

programa de fitoterapia, demandando estudos mais amplos, tendo em vista a recente pesquisa nesse campo (AMARAL e SILVA et al., 2003).

Diante das diversas potencialidades descritas para a *Physalis angulata*, acredita-se tratar de uma espécie promissora para ser melhorada geneticamente. Assim, há uma ampla margem para uma maior exploração científica, afim de estabelecer melhor sua eficácia terapêutica e exploração comercial. Para isto, são necessários estudos de pré-melhoramento da espécie a fim de estabelecer o programa de melhoramento visando seleção de materiais promissores. Desse modo, faz-se necessário a obtenção de conhecimentos sobre o sistema reprodutivo, que servirá de auxílio na definição das técnicas mais apropriadas a serem utilizadas em cruzamentos dirigidos (ALLARD, 1971; SHARMA, 2015).

3.0 Sistema reprodutivo em Solanaceae

As plantas podem utilizar exclusivamente um dos modos de reprodução assexual ou sexual, e adotar um sistema de cruzamento, autogamia ou alogamia. Entretanto, o mais comum é haver um modo de reprodução e sistema de cruzamento predominante, com eventos esporádicos do outro tipo (BODANESE-ZANETTINI e CAVALLI, 2003).

A maioria das plantas com flores são hermafroditas potencialmente autoférteis, mas um grande número de espécies exibem mecanismos que incentivam ou reforçam a fecundação cruzada (DARWIN, 1876). As vantagens da fecundação cruzada pode ter direcionado a evolução em direção a emergência de um sistema de auto-incompatibilidade (MCCLURE, 2009). Porém, análises feitas a partir de um banco de dados implicam que o sistema de incompatibilidade foi ancestral nas Solanáceas; as transições para sistemas compatíveis são comuns e irreversíveis, e que as espécies compatíveis atualmente são mais numerosas do que as espécies com sistemas incompatíveis (IGIC et al., 2003).

Historicamente, a auto-incompatibilidade em plantas tem sido associada a um único locus com múltiplos alelos, o locus S. Com os avanços decorridos da evolução das técnicas de biologia molecular, descobriu-se que na realidade haviam no mínimo dois produtos protéicos responsáveis por este mecanismo, codificados por genes fortemente ligados, de forma que um seja transcrito apenas no pistilo, enquanto que o outro transcrito na antera, no pólen ou ainda no tubo polínico. Esses sistemas de compatibilidade são baseados no reconhecimento de produtos celulares específicos, sendo usado para regular a aceitação ou rejeição do pólen depositado sobre o estigma. Assim, os grãos de pólen incompatíveis são reconhecidos e seletivamente inibidos (FRANKLIN-TONG e FRANKLIN, 2003).

A família Solanaceae, tem sido amplamente usada como modelo para estudos evolutivos da auto-incompatibilidade em plantas, pois constitui uma das famílias onde os mecanismos fisiológicos e bioquímicos têm sido melhor compreendidos (CORRÊA, 2015). O mecanismo de auto-incompatibilidade, nesta família, geralmente é gametofítico baseada em RNase, o que impede a fecundação de óvulos pelo pólen que combina o mesmo alelo (haplóide) do locus da auto-incompatibilidade (locus S) como um dos dois alelos transportados pela planta materna (DE NETTANCOURT, 1977).

Em Solanaceae, há basicamente dois grupos de proteínas S-RNases, um representado pelas S-RNases, as quais estão envolvidas com a rejeição do pólen na auto-incompatibilidade gametofítica e um outro grupo mais diverso que é denominado de S-like RNases, com funções muito diversificadas. As S-RNases se apresentam na forma de um gene multialélico, altamente polimórfico, que está contido no locus S. O locus S é composto por uma combinação de proteínas SLF (S-locus F-box), responsáveis pela determinação do fator polínico, e uma S-RNase produzida apenas no pistilo, de forma que estes genes estão fortemente ligados formando o haplótipo S. Esses produtos gênicos interagem possibilitando a rejeição do auto-pólen, num fenômeno denominado distinção colaborativa do pólen não próprio (CORRÊA, 2015).

Quando um grão de pólen compatível germina, ele produz proteína SLF (S-locus F-Box) que possui o domínio complementar àquelas S-RNases secretadas pelo pistilo. Uma vez que as duas proteínas se complexam, ocorre a poliubiquitinação da S-RNase, a ribonuclease não é mais capaz de realizar a degradação de RNAs e é direcionada para ser degradada no proteossomo. Contudo, se um tubo polínico incompatível penetra no pistilo, não ocorre a formação do complexo proteico e, conseqüentemente, as ribonucleases secretadas pelo mesmo penetram no tubo polínico causando o cessamento do crescimento em função da degradação do RNA ribossomal (MCCLURE et al., 2011).

Dentro do gênero *Physalis* há diferentes sistemas reprodutivos. *P. peruviana* possui reprodução mista, podendo ser polinizada pelo vento e insetos, entretanto, a autopolinização também ocorre (LAGOS et al., 2008; RUFATO et al., 2008). *Physalis viscosa* var. *cinerascens* tem um sistema obrigatoriamente xenogâmico e dependente de abelhas solitárias para polinização. A *Physalis angulata* segundo Lorenzi e Matos (2008) é autocompatível. *Physalis ixocarpa* é uma espécie com sistema de incompatibilidade gametofítica e, assim, se comporta como alógama obrigatória (FISCHER et al., 2005). Entretanto, existem poucos estudos relacionados à fenologia, biologia floral e mecanismos reprodutivos, aspectos importantes e decisivos para estabelecimento de estratégias de conservação, desenvolvimento e planejamento das espécies, e posterior seleção de métodos de melhoramento genético.

4.0 Os grãos de pólen e a interação com o pistilo

O grão de pólen é um corpúsculo de forma e estrutura variadas, sua formação ocorre dentro das anteras e compreende dois eventos: a microsporogênese e a microgametogênese (MASCARENHAS, 1992). O transporte dos grãos de pólen para a superfície estigmática pode se dar pela atuação de mecanismos abióticos (vento, água) e bióticos (insetos) (HORNER e PALMER, 1995).

Ao serem depositados na superfície estigmática de uma flor, se o estigma estiver receptivo, os grãos de pólen recebem sinais químicos para germinarem, formando tubos polínicos. Estes são formados por alongamentos da sua parede celular interna, a intina, que atravessa a mais externa, a exina, através das aberturas polínicas (CRESTI et al., 1992; MARCOS FILHO, 2005).

O tubo polínico (gametófito masculino) se desenvolve no interior do estilete, liberando enzimas responsáveis pela degradação de tecidos, para conduzir os gametas do pólen ao ovário, até penetrar no óvulo. Ao atingir o saco embrionário (gametófito feminino), o tubo polínico cresce em torno ou ao longo das células sinérgides e, antes de cessar o seu crescimento, o redireciona para o aparelho filiforme aproximando a ponta do tubo aos gametas femininos, já que as células espermáticas não são móveis. Antes de romper e liberar as células espermáticas, ocorre uma sinalização extracelular intensiva entre o tubo polínico e uma das ou das duas células sinérgides (CRESTI et al., 1992; MARCOS FILHO, 2005; HISCOCK e ALLEN, 2008).

As sinérgides são consideradas células do gametófito feminino glandulares, que regulam a atração do tubo polínico durante o último passo do seu trajeto e a sua recepção, que inclui a parada do crescimento e a liberação das células espermáticas. Ao liberar as duas células espermáticas, uma fertilizará o ovo, enquanto a outra se fundirá com os dois núcleos polares da célula central formando o endosperma triploide, tecido nutritivo que garante o crescimento do embrião que irá se desenvolver em sementes (HISCOCK e ALLEN, 2008).

Os mecanismos de pré-fertilização como a atração do esperma e do tubo polínico, a recepção das células espermáticas e o reconhecimento de gametas parecem altamente específicos para as espécies. Okuda et al. (2009) relataram que os polipéptidos ricos em cisteína (CRPs) são os quimioatrativos derivados das células sinérgides, mas outros segregados específicos da espécie também são necessários para a ativação do esperma.

Além disso, o íon Ca^{2+} é um importante mensageiro intracelular, envolvido em quase todos os mecanismos de fertilização, tais como a polarização e posterior germinação e o crescimento da ponta do tubo polínico, regulando as fibras de actina e outras proteínas mediados através de um gradiente (Ca^{2+}) concentrado na ponta. Outros íons, particularmente prótons (H^+), potássio (K^+) e

cloreto (Cl⁻), também, contribuem na regulação do crescimento do tubo polínico (OKUDA et al., 2009).

5.0 Visitantes florais em Solanaceae

Cada família de planta apresenta características morfológicas e fisiológicas específicas que podem atrair determinados grupos de visitantes e podem exprimir importantes implicações na relação planta–animal, e também no sucesso reprodutivo da espécie (BARBOSA, 1997). Os recursos florais mais procurados pelos animais polinizadores são pólen e néctar. Além destes, outros recursos também podem ser oferecidos, como: óleos, resinas, perfumes, gomas, locais para acasalamento e deposição de larvas (MACHADO e LOPES, 1998).

Segundo Albuquerque et al. (2006), dentre as diversas espécies de solanáceas, o tipo de polinização mais comum é a melitofilia, em função, principalmente, da estrutura floral. Suas anteras necessitam de uma vibração para a liberação mecânica dos grãos de pólen (“buzz pollination”), o que reduz o número de polinizadores efetivos, levando-se em consideração que algumas espécies não conseguem vibrar (VIANNA et al., 2007).

Como representante do gênero *Physalis*, a espécie *P. peruviana* possui a abelha *Apis mellifera* L. como principal polinizador. Porém espécies dos gêneros *Xilocopa* sp., *Bombus* sp., Diptera, dentre outros, também, visitam as flores de *Physalis peruviana* (MOSQUERA, 2002).

Outras espécies de solanáceas (p.e., berinjela), também são polinizadas por abelhas do gênero *Bombus* sp. (SLAA et al., 2006). Entretanto, Montemor (2009) relatou que dentre as abelhas que foram observadas visitando as flores da berinjela, apenas *Exomalopsis* sp., *Pseudaugochloropsis graminea* e *Bombus atratus* foram consideradas os mais importantes agentes polinizadores da cultura. Em pimenta malagueta, a *Apis mellifera* L. e abelhas solitárias de várias espécies foram os visitantes comuns, sendo, portanto, consideradas polinizadores potenciais dessa cultura (BOSLAND e VOTAVA, 1999). Na cultura do tomateiro, Dogterom et al. (1998) citam abelhas dos gênero *Bombus* como eficientes polinizadores, tais como *Bombus terrestris*, *Bombus vosnesenkii*. Freitas et al. (2006) mencionam, também, as abelhas do gênero *Exomalopsis*, *Epicharis* e *Centris* como boas polinizadoras do tomateiro.

6.0 Melhoramento genético de plantas medicinais

A produção de fármacos pela indústria farmacêutica requer uma grande quantidade de matéria-prima, principalmente por conta de algumas plantas fornecerem pequenas quantidades de princípios ativos, sendo necessária maior quantidade de material vegetal, o que seria muito dispendioso, além disso, esse material vegetal ao ser retirado diretamente da natureza poderia

causar diminuição das populações, perda de diversidade genética, extinções locais e degradação do habitat (AMARAL e SILVA, 2003; VINES, 2004). Esses compostos de interesse produzidos pelas plantas são majoritariamente metabólitos secundários, que funcionam como respostas adaptativas a condições de temperatura e luz variáveis (p.e., antioxidantes), estresse (p.e., prolina), infecção (p.e., flavanóides) ou herbivoria (p.e., alcalóides) (VINES, 2004).

O desenvolvimento de programas de melhoramento voltados para plantas medicinais, visa aumentar a potencialidade dos compostos de interesse, reduzir os níveis de toxinas e aumentar a uniformidade e previsibilidade dos extratos, assegurando assim a produção industrial dos metabólitos especiais, destinados a fins terapêuticos. Hoje em dia existe o interesse em manipular a via biossintética das plantas para produzir precursores de drogas (STEVENSON, 2004). Em *Mentha* spp (hortelã), caminhos biossintéticos foram projetados para modificar a produção de óleo essencial nos tricomas e para aumentar a resistência da planta para infecção fúngica e estresse abiótico (VERONESE, 2001). Em *Lotus corniculatus* a introdução de Sn (um gene de classe myc de milho) resulta na melhora do metabolismo fenólico, notável com a acumulação de antocianinas vermelhas em camadas de células subepidérmicas da base da folha e do pecíolo e indução da diferenciação de células que biosintetizam taninos condensados (ROBBINS et al., 2003).

No Brasil, a Embrapa Amazônia Ocidental conta com Bancos Ativos de Germoplasmas de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. Os trabalhos deram início em 1996, com a coleta dos materiais nos estados do Amazonas, Acre e Pará, objetivando a promoção da conservação *ex-situ* para uso futuro no melhoramento genético. As espécies que compõe o banco de germoplasma são: a sacaca, *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae), a sacaquinha, *Croton sacaquinha* Benth. (Euphorbiaceae), o crajiru ou pariri, *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae) e a pedra-hume-caá, *Myrcia sphaerocarpa* Mart. (Mirtaceae). Os materiais vegetais de plantas do BAG e da coleção vem sendo objeto de pesquisas e recentemente tem dado ênfase ao estudo fitoquímico dessas espécies. (FILHO et al. 2000; CHAVES et al. 2003).

Na Universidade Estadual de Feira de Santana, o programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, tem desenvolvido teses e dissertações com espécies do gênero *Physalis*, através da inserção dos acessos da coleção do melhorista, permitindo a obtenção de trabalhos de relevância para essas culturas. Entre muitos trabalhos, e considerando a importância fitoterápica destas espécies, destaca-se Silva (2007) através da identificação de variações na produção de fisalinas, substância de interesse farmacológico, entre plantas selecionadas pelo método da seleção massal. Atualmente, trabalhos de caracterização morfoagronômica, bioquímica e molecular estão em andamento, e poderão nortear as atividades de pesquisas para diferentes fins, tendo em vista a

potencialidade das espécies do gênero *Physalis*, e servindo de base para novos estudos que contribuirão significativamente para o futuro do programa de melhoramento dessas culturas.

Entretanto, para iniciar o melhoramento genético de uma dada espécie é necessário conhecer o seu sistema reprodutivo, pois a condução e escolha do método variam em função da natureza autógama, alógama ou mista do material a ser melhorado (ALLARD, 1971). Os estudos de biologia reprodutiva são fundamentais e constituem informações precisas de pré-melhoramento. Conhecer a viabilidade dos grãos de pólen auxilia na identificação de gametas masculinos com potencial para serem usados na hibridação, permitindo identificar o período máximo em que os grãos de pólen podem permanecer conservados sem perder a capacidade de germinar e o melhor momento para fertilizar. Dessa forma, são informações relevantes para o melhoramento, permitindo um maior direcionamento e segurança nos cruzamentos realizados, aumentando, por conseguinte, a eficiência do processo (DAMASCENO JUNIOR et al., 2008).

A viabilidade dos grãos de pólen é a medida da fertilidade masculina, e pode ser determinada por meio de diferentes técnicas (DAFNI, 1992; KEARNS e INOUE 1993). Os métodos diretos, como a indução da germinação *in vitro* (DUTRA et al., 2000; PIO et al., 2007), *in vivo*, pela observação do crescimento do tubo polínico sobre o estigma e o pistilo, e formação de sementes após a polinização (GALLETTA, 1983). Os métodos indiretos são baseados em parâmetros citológicos, como a coloração (KEARNS e INOUE, 1993).

Levando em consideração a importância das informações sobre a biologia reprodutiva para o estabelecimento eficiente do melhoramento genético da espécie, o presente trabalho teve com objetivo determinar a viabilidade dos grãos de pólen de *Physalis angulata*, utilizando diferentes métodos (histoquímicos e *in vitro*), bem como esclarecer o seu sistema reprodutivo e o modo preferencial de cruzamento, além de identificar os insetos visitantes das flores que possivelmente podem estar envolvidos na polinização da espécie.

REFERÊNCIAS

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Edgard Blucher - São Paulo, p. 381, 1971.

ALBUQUERQUE, L.B., VELÁZQUEZ, A.; VASCONCELLOS-NETO, J. Composição florística de Solanaceae e suas síndromes de polinização e dispersão de sementes em florestas mesófilas neotropicais. **Interciencia**. v. 31, n. 011, p. 807-816, 2006.

AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Rev. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. V. 30, n. 1, p. 55-59, 2003.

- ARAÚJO, F.L. **Estudo genético e citogenético de duas espécies do gênero *Physalis* (Solanaceae)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)– Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.
- BARBOSA, A. A. Biologia reprodutiva de uma comunidade de Campo Sujo, Uberlândia – MG. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, p.180, 1997.
- BODANESE-ZANETTINI M.H., CAVALLI, S.S. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: FREITAS, L. B., BERED, F. (eds) **Genética e Evolução Vegetal**. 1ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS. p. 177-188, 2003.
- BONILLA, M.L.; K. ESPINOSA. Colección, caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional de Colombia, Palmira. p.75, 2003.
- BOSLAND, P.W.; VOTAVA, E.J. **Peppers: vegetable and spice capsicums**. Wallingford: Cabi, 1999.
- CÁRDENAS, C. I. E. **Algunas técnicas experimentales com tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.)**. Dissertação de mestrado. Centro de Genética C. P. México, p.80, 1981.
- CHAVES, F.C.M. ; XAVIER, J.J.B.N.; ÂNGELO, P.C.S. Banco Ativo de Germoplasma Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares Embrapa Amazônia Ocidental. In: Workshop Internacional de Curadores de Bancos de Germoplasma, 2003, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.
- CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). Inventario de bancos de germoplasma. C.I. La Selva. Rionegro, Antioquia, 2004.
- CORRÊA, L. B. **Diversificação funcional em ribonucleases T2 na família Solanaceae. 2015. Tese (Doutorado em Ciências) - Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, Porto Alegre, 2015.**
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. p. 585.
- HAMRICK, J.L., GODT, M.J. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Phil Trans R Soc Lond B, Biological Sciences** 351, 1291-1298, 1996.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)**. New York: University Press, 1992. p. 250.
- DAMASCENO JUNIOR, P.C. et al. Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Ceres**. 55(5): 433-438, 2008.
- D'ARCY, W. G. The Solanaceae Since 1976 with a review of its biography. Hawkes, J.G., Taxonomy Chemistry and Evolution. Royal Bot. Gov. 1991.
- DARWIN, C. **The effects of cross- and self-fertilization in the vegetable kingdom**. London, UK: John Murray, 1876.

- DOGTEROM, M.H., MATTEONI, J.A.; PLOWRIGHT, R. C. Pollination of Greenhouse Tomatoes by the North American *Bombus vosnesenskii* (Hymenoptera: Apidae). **J. Rev. Econ. Entomol.** v. 91, n. 1, p. 71-75, 1998.
- DUTRA, G. A. P. et al. Viabilidade em grãos de pólen fresco e armazenado em acessos de pimenta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.729-730, 2000.
- FILHO, A.N.K. ; KALIL, G.P.C.; LUZ, A.I.R. **Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da amazônia brasileira para uso humano**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. p.1-4. (Embrapa Amazônia Ocidental. Comunicado Técnico).
- FISHER, G. et al. **Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva *Physalis peruviana* L. en Colombia**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2005.
- FRANKLIN-TONG, V.E.; FRANKLIN, F.C.H. The different mechanisms of gametophytic selfincompatibility. **Phil Trans R Soc Lond B** 358: 1025-1032, 2003.
- FREITAS, B.M.; MARTINS, C.F.; SCHLINDWEIN, C.P.; WITTMAN, D.; SANTOS, I.A.; CANE, J.H., RIBEIRO, M.F.; GAGLIANONE, M.C. Bumble bees and Solitary bees. In: IMPERATRIZ FONSECA, V.L., SARAIVA, A.M. & DE JONG, D. **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices**. Ribeirão Preto: Holos, p. 55-62, 2006.
- FREITAS, T.A. & OSUNA, J.T.A. Efeito do substrato e da luminosidade na germinação de sementes de *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Sitientibus** 6: 101-104. 2006.
- GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruits breeding**. Indiana: Purdue University Press. p.23- 47, 1983.
- GONEM, O.; YILDIRIM, A.; UYUGUR, F.N. A New Record for the Flora of Turkey *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Turk Journal Botanic**. 24: 299-301, 2000.
- HAWKES, J. G. Solanaceae III taxonomy chemistry evolution. Richmond, Surrey, UK. **The Royal Botanic Gardens New**, 1991.
- HISCOCK, S. J.; ALLEN, A.M. Diverse cell signalling pathways regulate pollen–stigma interactions: the search for consensus. **New Phytologist**.179: 286–317, 2008.
- HUNZIKER, A.T. The genera of Solanaceae. Ruggell, A.R.G. Gantner Verlag K.G. 2001.
- IGIC, B.; BOHS,L.; KOHN, J.R. Historical inferences from the self-incompatibility locus. **New Phytologist**. 161: 97–105, 2003.
- IPGRI (Instituto Internacional para os Recursos Fitogenéticos). Knudsen, H. (ed.). **Directorio de colecciones de germoplasma en America Latina y el Caribe**. Roma. p.350, 2000.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado,1993. p.579.
- LAGOS, T.C.B. et al. Biología reproductiva de la uchuva. **Acta Agronómica Colombiana**, v. 57, p.81-87, 2008.

- LIGARRETO, G. A.; LOBO, M.; CORREA, A. **Recursos genéticos del género *Physalis* em Colombia** In: FISHER, G. et al. Avances em cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva *Physalis peruviana* L. em Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, 2005.
- LIMA, M. S. et al. Antinociceptive Properties of Physalins from *Physalis angulata*. **Journal of Natural Products**. 77, 2397–2403, 2014.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil**. 2ª Ed. São Paulo: Nova Odessa. 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, São Paulo, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, M. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. 2. ed. Nova Odessa, SP: **Plantarum**, p.512, 2008.
- MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. A polinização biótica e seus mecanismos na Reserva Ecológica de Dois Irmãos. In: MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. e PORTO, K. C. (Orgs). **Reserva Ecológica de Dois Irmãos: Estudos em um remanescente de Mata Atlântica em área urbana**. Editora Universitária da UFPE, Recife, Brasil, p.166-187. 1998.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, p.495, 2005.
- MCCLURE, B. Darwin's foundation for investigating self-incompatibility and the progress toward a physiological model for S-RNase-based SI. **J. Exp. Bot.** 60: 1069-1081, 2009.
- MCCLURE, B.; CRUZ-GARCIA, F.; ROMERO, C. Compatibility and incompatibility in SRNase-based systems. **Ann. Bot.** 108: 647-658, 2011.
- MARTINEZ, M. Revisión de *Physalis* Sección Epetiorhiza (Solanaceae). **Anais...** Instituto de Biología Universidad Nacional de Frutales de Clima Frío Moderado. CDTF, Corpoica, 20-22. Nov. 2002. Medellín. p.389. 1998.
- MASCARENHAS, J. P. Pollen gene expression: Molecular evidence. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 140, p. 3-18.1992.
- MEIRA, C.S. et al. *In vitro* and *in vivo* antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**. 22: 969–974, 2015.
- MONTEMO, K. A.; SOUZA, D. T. M. Biodiversidade de polinizadores e biologia floral em cultura de berinjela (*Solanum melongena*). **Zootecnia Trop.**, 27(1): 97-103, 2009.
- MOSQUERA, C. Polinizacion entomofila de la uvilla (*Physalis peruviana* L.) v. 19, n. 1, **Rev. de Ciências Agrícolas**, 2002.
- NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C; MELO, I. S.; VALADARES-ILGLIS, M.C. Recursos genéticos e melhoramento de plantas. In: NASS, L. L. **Utilização dos Recursos Genéticos Vegetais no Melhoramento**. Rondonópolis, Fundação MT. 1183p. 2001.

OKUDA, S. et al. Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. V. 458. **Nature**, 2009.

PEETERS, J. P. e WILLIAMS, J. T. Towards better use of genebanks with special reference to information. **Plant Genetic Resources**. Newsletter, Rome, n.60, p.20-32, 1984.

PIO, L. A. S. et al. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.1, p.147-153, 2007.

PLINE, SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology**. A laboratory manual. Berlin/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. p.119, 1992.

QUEIRÓZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R., ed. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas pra o Nordeste brasileiro**. (online). Petrolina- PE: Embrapa Semi-Árido / Brasília-DF:Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

ROBBINS, M.P. et al. Sn, a maize bHLH gene, modulates anthocyanin and condensed tannin pathways in *Lotus corniculatus*. **J. Exp. Bot.** 54, 239–248, 2003.

RUFATO, A. R. et al. **Aspectos técnicos da cultura da *Physalis***. Lages: Série fruticultura CAV/UDESC, 2008.

SANTOS, K.S. et al. Microsporogenesis and Pollen Viability in *Physalis ixocarpa*. **Cytologia** 82(4): 1–5, 2017.

SHARMA, N. et al. A pharmacological comprehensive review on ‘Rassbhary’ *Physalis angulata* (L.) . **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.7, p.34-38, 2015.

SILVA, K.N. & AGRA, M.F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Rev. Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 4, João Pessoa, 2005.

SILVA, A. H. B. Seleção e variabilidade genética para caracteres qualitativos e quantitativos em progênies de *Physalis angulata* L. (Solanaceae). 2007. 76 f . Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.

SILVA, D. F.; STRASSBURG, R. C.; VILLA, F. Morfoanatomia do caule de espécies do gênero *Physalis*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 14, n. 1, p. 38-45, 2015.

SILVA-NETO, C.M. et al. Native bees pollinate tomato flowers and increase fruit production. **Journal of Pollination Ecology**, 11: 41-45p. 2013.

SILVA, R.R.P. et al. *In vitro* biological action of aqueous extract from roots of *Physalis ngulata* against *Leishmania amazonensis* (*Leishmania*). **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 15:249, 2015.

SLAA, E.J. et al. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, 37: 293-315, 2006.

SOUZA, C.L.M. et al. Morfologia de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Physalis angulata* L. **Acta bot. bras.** 24(4): 1082-1085. 2010.

STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILVA, M.; GIACOMIN, L.; RODRIGUES, I.M.C., 2015. *Solanaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14697>>. Acesso em: 25 de Julho de 2017

STEVENSON, R. Chemical harvest. **Chemistry & Industry**. p.16–18, 2004.

TANAN, T.T. **Fenologia e caracterização dos frutos de espécies de *physalis* cultivadas no semiárido baiano**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)– Feira de Santana, 2015.

TOMASSINI, T. C. B. et al. Gênero *Physalis*- uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**. v. 12, p. 47-57, 2000.

VALLEJO-MARÍN, M.; BRIEN’O, H.E. Correlated evolution of self-incompatibility and clonal reproduction in *Solanum*(Solanaceae). **New Phytologist**. 173:415-421, 2007.

VERONESE, P. et al. Bioengineering mint crop improvement. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 64, 133–144, 2001.

VIANNA, M. A., MARCO-JUNIOR, P.; CAMPOS, L.A.O. Manejo de polinizadores e o incremento da produtividade agrícola: uma abordagem sustentável dos serviços do ecossistema. Resumo do II Congresso Brasileiro de Agroecologia. **Rev. Bras. Agroecologia**. v. 2, n. 1, p.144-147, 2007.

VINES, G. Herbal harvests with a future: towards sustainable sources for medicinal plants, Plantlife International, 2004. Disponível em: <www.plantlife.org.uk>. Acesso em: 21 de Novembro de 2017

CAPÍTULO I

VIABILIDADE POLÍNICA, INTERAÇÃO PÓLEN-PISTILO E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE *Physalis angulata* L.

RESUMO

Physalis angulata L. é uma planta medicinal que produz também frutos ricos em vitaminas, com potencial para serem explorados economicamente. O entendimento dos mecanismos de compatibilidade intra e interespecíficos podem auxiliar na obtenção de variabilidade necessária à seleção de genótipos que otimizem a produção de metabólitos de interesse, características morfoagronômicas e formas de cultivo da planta. Nesse sentido, foi avaliado neste trabalho o sistema reprodutivo de *P. angulata* a partir da relação Pólen:Óvulo, experimentos de polinização envolvendo análise de pistilos por microscopia de epifluorescência, taxa de frutificação e germinação de sementes. Adicionalmente, foi estimado a viabilidade dos grãos de pólen, mediante métodos direto e indireto, e proposto o corante mais apropriado para a espécie. Os corantes utilizados para estimar a viabilidade polínica não diferiram estatisticamente, e a viabilidade polínica foi alta. A viabilidade dos grãos de pólen foi alterada com o passar das horas e alcançou 96% às 14:00h, utilizando o corante tetrazólio. Entretanto, não houve formação de tubos polínicos (i.e., germinação *in vitro*), sendo necessários mais estudos e ajustes dos meios de cultura. A partir dos parâmetros avaliados para determinar o sistema reprodutivo de *P. angulata* sugere-se que se trata de uma espécie auto-compatível (ISI=0,50) com sistema reprodutivo misto e razão P:O = $126,7 \pm 16,0$ (autógamo facultativo). Os aspectos reprodutivos encontrados, nesse trabalho, trazem informações inéditas para a espécie e primordiais para a escolha do melhor método a ser empregado em um programa de melhoramento.

Palavras-chave: Camapu. Carmim acético. Tetrazólio. Germinação *in vitro*. Epifluorescência. Autocompatibilidade.

ABSTRACT

Physalis angulata L. is a medicinal plant that also produces fruits rich in vitamins, with potential to be exploited economically. The understanding of the intra and interspecific compatibility mechanisms can help to obtain the necessary variability in the selection of genotypes that optimize the production of metabolites of interest, morphoagronomic characteristics and forms of plant cultivation. In this sense, we evaluated the reproductive system of *P. angulata* from the relation Pollen: Ovum, pollination experiments involving the analysis of pistils by epifluorescence microscopy, fruiting rate and seed germination. In addition, the viability of *P. angulata* pollen grains was estimated by direct and indirect methods and the most appropriate dye for the species was proposed. The dyes used to estimate pollen viability did not differ statistically, and pollen viability was high. However, there was no formation of pollen tubes (i.e., *in vitro* germination), further studies and adjustments of culture media were required. The viability of the pollen grains was altered over the hours and reached 96% at 2:00 p.m. using the tetrazolium dye. From the parameters evaluated to determine the reproductive system of *P. angulata* it is suggested that it is a self-compatible species (ISI = 0.50; Zapata & Arroyo, 1978) with mixed reproductive system and P: O ratio = $126,7 \pm 16,0$ (optional automaton, Cruden 1977). The reproductive aspects found in this work bring unprecedented information to the species and are primordial for choosing the best method to be used in an improvement program.

Keywords: Camapu. Acetic carmine. Tetrazolium. *In vitro* germination. Epifluorescence. Autocompatibility

INTRODUÇÃO

No Brasil podem ser encontradas nove espécies do gênero *Physalis* (Solanaceae) (STEHMANN, 2015), por todo o país, sendo a Amazônia e o Nordeste as regiões de maior ocorrência (SOUZA, 2010). Dentre as espécies que compõe este gênero, evidencia-se a *Physalis angulata* L., uma planta medicinal que se destaca economicamente não só por conter substâncias de interesse farmacológico, mas, também, por apresentar frutos ricos em vitaminas A e C promissores para serem utilizados na alimentação humana. Estudos fitoquímicos demonstraram que esta planta contém flavonóides, alcalóides e vários fitoesteróis, alguns ainda desconhecidos pela ciência (LORENZI e MATOS, 2008).

Alguns trabalhos com a espécie vem sendo realizados na Universidade Estadual de Feira de Santana, e em parceria com a Fiocruz no sentido de extrair a fisalina para produção de substâncias farmacológicas, que poderão vir a ser utilizados no tratamento de doenças. Entretanto, há necessidade de se fazer mais estudos sobre a espécie para avançar no programa de melhoramento, e viabilizar obtenção de variabilidade necessária à seleção de genótipos com melhoria dos atributos biológicos e da forma de cultivo da planta. Entre as pesquisas com plantas, o estudo da biologia reprodutiva, associado aos mecanismos reprodutivos das espécies vegetais, constitui etapa de fundamental importância para o melhoramento genético de plantas, pois auxilia na definição de técnicas de seleção e hibridação mais apropriadas a serem usadas (ALLARD, 1971).

Assim, um dos requisitos para o sucesso do fitomelhoramento é o entendimento do processo reprodutivo (PEREIRA, 2007). Alexander (1980) relata que os estudos sobre a viabilidade polínica, por exemplo, fornecem informações básicas para a agricultura, bem como para o planejamento de programas de melhoramento ou cultivo, e é muito empregada na conservação do grão de pólen de modo a garantir a posterior fecundação, tornando possíveis os cruzamentos entre genótipos de potencial econômico com floração em épocas diferentes. Desse modo, trabalhos que permitam conhecer a capacidade germinativa do grão de pólen, são importantes para assegurar a eficiência no processo de hibridação artificial.

Os métodos mais adequados são determinados pelo sistema reprodutivo e, variam em função da natureza alógama, autógama ou mista da espécie a ser melhorada (FERREIRA et. al., 2006). As plantas podem adotar um sistema de cruzamento, autógamo ou alógamo, ou ainda um sistema de cruzamento misto, com um modo preferencial e eventos esporádicos do outro tipo (BODANESE-ZANETTINI e CAVALLI, 2003). As espécies alógamas tendem a manter a maior parte da sua variabilidade genética dentro da população, enquanto que, nas espécies autógamas, essa variação encontra-se entre populações (HAMRICK e GODT, 1989). O sistema misto de reprodução, por sua vez, prever variabilidade genética intermediária, sendo o potencial de diferenciação entre

populações variável em função do equilíbrio dessas duas formas de cruzamento (LOVELESS e HAMRICK, 1984).

A eficiência reprodutiva é definida pela porcentagem de fruto obtida por polinização aberta, comparado com a porcentagem de fruto obtida por polinização cruzada induzida (ARROYO, 1979). A eficiência reprodutiva a partir de sementes em tratamentos de polinização, também indica a eficácia do polinizador em espécies auto-incompatíveis e dióicas. A utilização desta variável no intuito de comparar a reprodução elimina o problema de variação na pós-fecundação (aborto de frutos) (ARROYO, 1979). Cruden (1977) sugeriu que a relação pólen/óvulo está integrada ao sistema de cruzamento das plantas, onde a relação P/O reflete a probabilidade de grãos de pólen de atingir cada estigma para resultar no conjunto máximo de sementes. Para tanto, quanto mais eficiente for a transferência de pólen, menor será a taxa dessa relação.

Com relação a capacidade germinativa do grão de pólen, várias técnicas são empregadas para estimar sua viabilidade. O método mais comum que garante resultados de forma rápida e com baixo custo é o de coloração e contagem direta (KELLY et al., 2002). Dentre os corantes mais utilizados destacam-se o carmim acético, azul de anilina em lactofenol, corante de Alexander e sais de tetrazólio (STANLEY e LINSKENS, 1974; DAFNI, 1992). Para Galletta (1983), esses métodos em que se utilizam corantes superestimam a viabilidade do pólen, já que grãos de pólen inviáveis podem ser corados devido à presença de enzimas, amido, ou outras substâncias. Dessa forma, a coloração, embora seja um procedimento simples e barato, não fornece informações sobre capacidade germinativa do pólen, o que pode ser obtido por meio de testes de germinação *in vitro*.

O método de germinação *in vitro* tenta através do meio de cultura, simular as condições do pistilo-estigma, induzindo a germinação do tubo polínico (NOGUEIRA et al., 2015; SILVA FILHO, 2007). Para isto, deve-se elaborar um meio de cultura composto por elementos orgânicos e inorgânicos, que reproduzam da forma mais similar possível, as condições oferecidas pela estrutura feminina da flor ao receber o grão de pólen, sendo desta forma diferente para cada espécie (SILVA et al., 2016).

O objetivo deste trabalho foi estimar a viabilidade polínica de *Physalis angulata*, mediante métodos direto e indireto, determinar o sistema reprodutivo a partir da relação P/O, polinizações *in vivo*, produção de frutos e germinação de sementes.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na unidade experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, localizada em Feira de Santana-Bahia. As plantas de *Physalis angulata* foram semeadas em bandejas de isopor na casa de vegetação e transplantadas com

aproximadamente 40 dias para vasos com capacidade de 10 litros, contendo terra vegetal e substrato comercial Techns Vivato® (casca de pinus bio-estabilizada, vermiculita, moinha de carvão vegetal, água e espuma fenólica) na proporção 3:1.

1) Viabilidade Polínica

1.1) Teste colorimétrico

A viabilidade de pólen foi determinada através da técnica colorimétrica, onde anteras dos botões florais foram coletadas e dispostas em lâminas contendo diferentes corantes: carmin acético 1% (DAFNI, 1992) e 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (KEARNS e INOUE, 1993). Para disponibilizar os grãos pólen foram realizados cortes nas tecas com lâmina de bisturi; posteriormente os materiais foram cobertos com lamínula, e observados em microscópio óptico (DIAG TECH) (Figura 2). A viabilidade do pólen foi determinada de acordo com o nível de coloração: pólen corado como viável e de forma irregular e incolor ou pouco corado como não-viáveis. A porcentagem de grãos de pólen viáveis foi determinada de acordo com a fórmula:

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de grãos de pólen corados}}{\text{N}^\circ \text{ de grãos pólen total}} \times 100$$

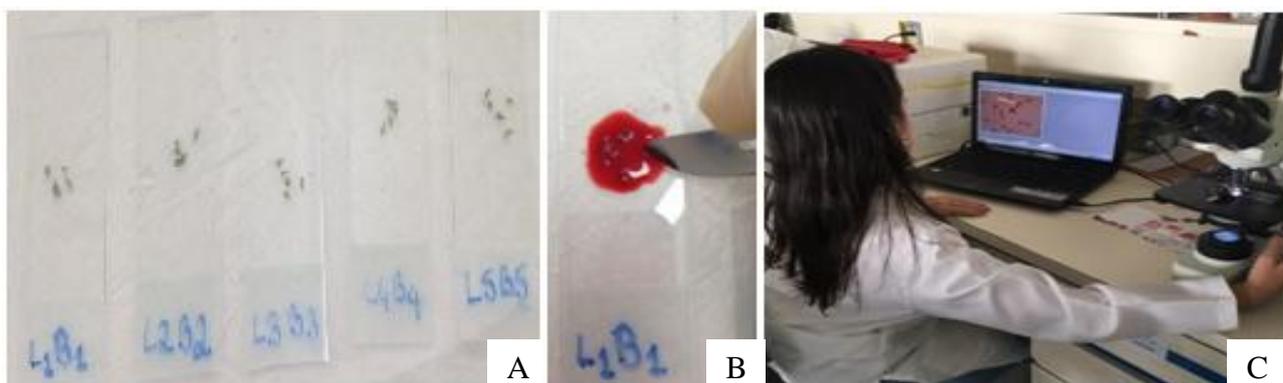


Figura 2: Método colorimétrico para determinar a viabilidade dos grãos de pólen de *Physalis angulata* L.. (A) Anteras retiradas dos botões/flores e dispostas em lâminas; (B) Anteras com o corante carmin acético 1%, sendo cortadas para liberação do pólen; (C) Lâminas prontas sendo observadas para contagem dos pólenes. UEFS/Horto Florestal, Feira de Santana-BA, 2016.

Foram coletadas flores de cinco indivíduos, escolhidos ao acaso, ao longo do dia, às 8, 11, 14 e 17h. As lâminas corresponderam às repetições, em que foram contabilizados quinhentos grãos de pólen por lâmina, perfazendo um total de dois mil e quinhentos pólenes para cada horário de coleta. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2 x 4, (corantes x horário). Os dados foram submetidos ao software R3.2 (R CORE TEAM, 2015) para a análise de variância (ANOVA) e teste de média Tukey a 0,05 de probabilidade. Os gráficos também foram feitos no software R3.2 (R CORE TEAM, 2015).

1.2) Teste germinativo *in vitro*

A fim de selecionar as melhores condições e meios de cultura para a germinação dos grãos de pólen de *Physalis angulata* foram realizados testes preliminares com o meio proposto por Soares (2008) e o meio proposto por Silva et al. (2017), mantidos sob diferentes condições em câmara seca ou úmida, pólen fresco ou dessecado por 24 horas. Foram, então, selecionados pólen frescos, em câmara úmida, com o meio de cultura proposto por Silva (2017). Os grãos de pólen foram coletados no estágio de antese sem qualquer processo de desinfestação, retirados das anteras e inoculados em cinco lâminas, contendo meio de cultura com a adição de dois extratos florais diferentes: estigma e ovário.

Os extratos foram obtidos seguindo a metodologia proposta por Soares (2008). Após a maceração dos órgãos reprodutivos, para cada 150 mg foram adicionados 1,5 mL de água. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto, e posteriormente centrifugadas a 12.500 rpm por 10 minutos. Após esse processo, os extratos foram filtrados e adicionados ao meio de cultura. Foram testados meios com 2,5%, 5% e 10% de concentração de cada extrato, bem como o controle, sem adição de extrato. Em cada lâmina com o meio de cultura, foram inseridos grãos de pólen oriundos de cinco anteras/flor. Em seguida, as lâminas foram colocadas em câmara úmida em placas de petri e encaminhadas para câmara de germinação para serem mantidas em condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (Figura 3).



Figura 3: Processo de obtenção dos extratos florais de *Physalis angulata* L. (A) Estigmas retirados dos botões/flores e dispostos em cadinhos para posterior maceração; (B) Ovários sendo macerados; (C) Amostra sendo agitada em vórtex. UEFS/Horto Florestal, Feira de Santana-BA, 2016.

Após 24 horas da inoculação, foi efetuada a contagem de pólen total, mediante observação em um microscópio óptico (DIAG TECH). Foram considerados grãos de pólen germinados aqueles cujo comprimento do tubo polínico ultrapassou o seu próprio diâmetro.

2) Sistema reprodutivo

2.1) Relação pólen/óvulo

Para associar a eficiência reprodutiva descrita por Cruden (1977), ou seja a relação pólen-óvulo, com a reprodução em *Physalis angulata*, foi realizada a contabilização de óvulos e grãos de pólen. Para estimar a quantidade de grãos de pólen produzido por flor, foram coletadas flores (n = 10) que foram mantidas em álcool a 70% até a preparação das lâminas. Para a contabilização dos grãos de pólen foram retiradas duas anteras de cada flor, em seguida, maceradas para liberação dos grãos de pólen, em um volume conhecido (1,5 mL de água destilada e 0,5 mL de carmim acético), posteriormente a solução foi homogeneizada e distribuída em quatro lâminas (125µL em cada). Foi contabilizado o número total de grãos de pólen de cada lâmina. Para estimar o número de grãos de pólen produzido por flor, os valores foram divididos por dois e multiplicados por cinco. Os ovários das dez flores foram retirados, e o número de óvulos foi quantificado a partir da observação direta sob estereomicroscópio.

No intuito de firmar indicadores dos sistemas reprodutivos com base na relação P/O, Cruden (1977) sugeriu cinco classificações: Cleistogamia (<5,4); Autogamia obrigatória (5,5-39,0); Autogamia facultativa (39,1–396,0); Alogamia facultativa (397,0-2588,0); Alogamia obrigatória (> 2588,0).

2.2) Polinização *in vivo*

Foram realizadas polinizações experimentais (Figura 4) com cinco tratamentos: autopolinização induzida (AI) com os grãos de pólen dos estames proveniente de flores dos próprios indivíduos, onde as flores após polinizadas foram cobertas com sacos de voal para evitar contato com visitantes florais e polinização não desejada; polinização cruzada (PC) com o pólen de outros indivíduos (mínimo três); as flores após polinizadas foram, também, ensacadas; apomixia (AP) emasculação dos botões que foram mantidos ensacados para verificar a ocorrência de agamosperma; autopolinização espontânea (AE), onde as flores foram apenas ensacadas. Foi estabelecido, também, um tratamento controle para verificar a formação de frutos por polinização livre (PL), neste as flores foram apenas marcadas.

O crescimento de tubo polínico foi examinado em 15 pistilos de cada tratamento de polinização (mencionado acima). Pistilos foram fixados em FAA 50% por 48 hs em diferentes intervalos após a polinização (i.e. 24, 48 e 72 hs) e transferidas para álcool 70%. Os pistilos foram colocados em NaOH 10N a 60 °C por 10 min. e posterior clareamento com hipoclorito de sódio por 1h. Após lavagem em água destilada, os pistilos foram corados com azul de anilina a 0,16%, em um intervalo de 24 hs, e posterior avaliação do crescimento do tubo polínico em microscópio de epifluorescência (MARTIN, 1959).

Os sistemas reprodutivos quanto a autoincompatibilidade, autocompatibilidade e autogamia foram estabelecidas utilizando três índices: 1) Índice de autogamia (IA), que mede os níveis de autogamia a partir da relação fruto/flor da autopolinização espontânea dividida pela relação fruto/flor por autopolinização manual (RUIZ-ZAPATA & ARROYO, 1978); 2) Índice de alogamia (IA), que mede a relação fruto/flor da autopolinização espontânea dividida pela relação fruto/flor por polinização cruzada (LLOYD & SCHOEN, 1992); 3) Índice de incompatibilidade (ISI), que mede os níveis de incompatibilidade genética pela relação fruto/flor da autopolinização manual a partir da relação fruto/flor da polinização cruzada (RUIZ-ZAPATA & ARROYO, 1978). Os índices que obtiverem valores maiores que 0,20 indicam autogamia e autocompatibilidade genética, e valores menores indicam autoincompatibilidade (RUIZ-ZAPATA & ARROYO, 1978; SOBREVILA & ARROYO, 1982).



Figura 4: (A) Experimento de sistema reprodutivo. (B) Coleta dos grãos de pólen. (C) Flor sendo polinizada para o tratamento de polinização cruzada.

2.3) Eficiência reprodutiva

Os tratamentos utilizados para determinação do sistema reprodutivo foram repetidos em número reduzido (4-15 flores) e mantidos em campo até a frutificação. Os frutos após serem coletados foram pesados, medido o diâmetro e o comprimento, e contabilizado o número de sementes. As sementes foram armazenadas em geladeira até o momento dos ensaios de viabilidade. Para isso, as sementes foram distribuídas em placas de Petri, com duas folhas de papel do tipo germitest (todo material utilizado foi semi-esterilizado em estufa de secagem a 105°C, por 4 horas). Para o umedecimento do papel, o volume de solução foi equivalente a 2,5 vezes do peso de todos os papéis secos. Para cada tratamento de polinização, foram avaliadas 50 sementes, distribuídas em duas repetições de 25.

As placas contendo as sementes foram seladas com filme PVC, a fim de garantir a umidade, e conduzidas em germinador com fotoperíodo de 12 horas, ajustados na temperatura alternada 20-

30°C (SOUZA, 2015), por um período de até 20 dias. As avaliações foram realizadas diariamente, considerando-se germinadas as sementes que apresentarem protusão radicular com pelo menos 1 mm de comprimento (HADAS, 1976). As variáveis avaliadas foram: taxa de germinabilidade das sementes (G, %), índice de velocidade de germinação (IVG, sementes dias⁻¹), tempo médio de germinação (TMG, dias⁻¹) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG, sementes dias⁻²). Os dados foram submetidos ao software SISVAR para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

O nível de eficácia reprodutiva (RUIZ-ZAPATA e ARROYO, 1978), foi calculado pela divisão do percentual de frutificações advindas de polinização cruzada pelo percentual de frutificações por polinização livre. Foi determinado o nível de depressão endogâmica (δ), relação entre sementes produzidas de flores autopolinizadas (ws) e de flores de polinização cruzada (wc) (KEPHART et al. 1999), de acordo com a fórmula :

$$\delta = 1 - (ws / wc)$$

Quando os valores de depressão endogâmica são menores que 0,50 prevê que a autopolinização é favorável (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1) Viabilidade polínica

Teste de viabilidade *in vitro*

Não foi observada germinação *in vitro* em nenhum dos meios propostos (Figura 5). Esse fato, provavelmente, ocorreu devido aos grãos de pólen de *Physalis angulata* possuir necessidades intrínsecas específicas que não foram atendidas pelos meios avaliados. Uma hipótese provável é que há uma resposta diferencial dentro da espécie que pode estar sendo influenciada pela distribuição geográfica, já que o resultado do presente trabalho contrapõe ao que foi obtido por Silva et al. (2017) que utilizando o mesmo meio de cultura para espécie *P. angulata*, obteve germinação dos grãos de pólen. Entretanto, os autores não obtiveram resultados conclusivos, e consideraram que novos estudos a respeito da biologia floral, em especial a palinologia de espécies do gênero *Physalis* devem ser realizados.



Figura 5: Fotomicrografias das leituras após 24 horas de inoculação dos grãos de pólen sob o meio de cultura visualizadas por microscopia.

A germinação *in vitro* dos grãos de pólen é uma das formas de se verificar a fertilidade de grãos de pólen (NOGUEIRA et al., 2015). Para isto, o meio de cultura deve ser composto por elementos orgânicos e inorgânicos que reproduzam, da forma mais símile possível, as condições oferecidas pela superfície estigmática ao receberem o grão de pólen, sendo assim diferente para cada espécie. Além da composição do meio de cultura, o sucesso da germinação *in vitro* está relacionado a outros fatores, tanto endógenos quanto exógenos, tais como o estado nutricional das plantas, horário e método de coleta dos grãos de pólen, fotoperíodo, temperatura e período de incubação (SOARES et al., 2008; SOUZA et al., 2014). Contudo, diferentes meios de cultura para a germinação *in vitro* de grãos de pólen têm sido relatados para um grande número de espécies, com acentuada variação entre e dentro das espécies (PFAHLER et al., 1997).

Para solanáceas, poucos trabalhos são relatados usando este método de avaliação. Mercado et al. (1994), usando meio líquido composto por 5-10% de sacarose, 0,1 mM de ácido bórico e 1 mM de cloreto de cálcio, alcançou uma porcentagem de germinação próxima a 50% na Solanaceae *Capsicum annuum*. Em *Solanum macranthum* Dunal, com a adição de 100 mg L⁻¹ de ácido bórico ao meio de cultura, houve uma germinação de até 88% dos grãos de pólen (MONDAL e GHANTA, 2012). Na espécie *Physalis angulata* L., a adição de 626,58 mg de ácido bórico promoveu o incremento de 32% de germinação dos grãos de pólen (SILVA, 2017). Mas este número é insatisfatório, tendo em vista que, para apresentar uma taxa significativa de germinação, esse valor deveria ser acima de 50% (SCORZA e SHERMAN, 1995)

Teste colorimétrico

Constatou-se que não houve diferença significativa na viabilidade do pólen para os diferentes corantes utilizados (Carmim acético e TTC), o que significa dizer que ambos os corantes são apropriados para estimar tal parâmetro (Figura 6). Zambon (2015) utilizando o corante carmim acético obteve uma porcentagem média de viabilidade de aproximadamente 72%, em *Solanum melongena* L. Outros autores também têm relatado alta viabilidade polínica utilizando o corante TTC em diferentes espécies, *Carica papaya* L. (67,5%) (MUNHOZ et al., 2008), *Ipomea carnea*, (~70%) (DAMASIO et al, 2016), em diferentes espécies de *Passiflora* (51,4% a 96,2%) (SOARES, 2016).

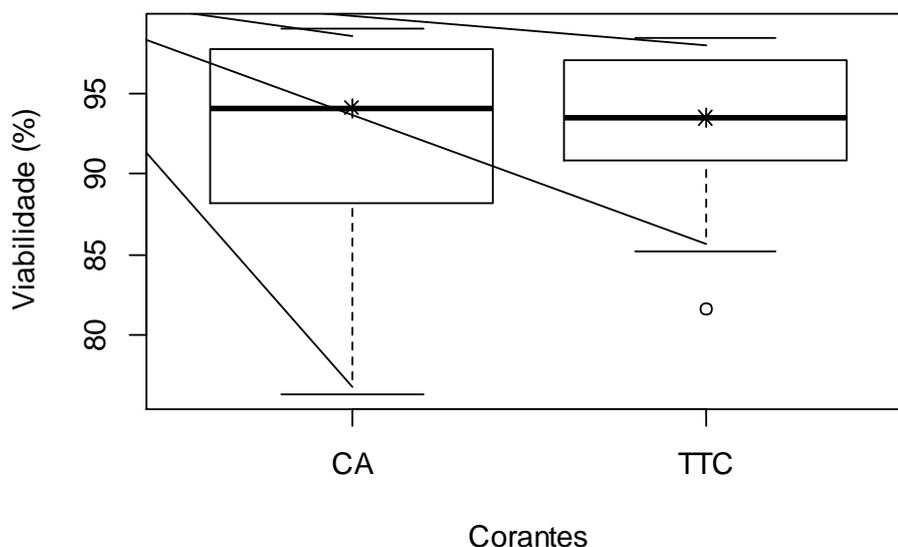


Figura 6: Viabilidade dos grãos de pólen de *Physalis angulata* L. utilizando os corantes carmim acético (CA) e tetrazólio (TTC).

Alguns autores argumentam que o teste com o TTC é uma estimativa confiável da viabilidade polínica, sendo próxima àquela fornecida pelos testes de germinação *in vitro*. Além disso, o TTC é muito utilizado por ser um método relativamente rápido e simples (JESUS et al., 2011). Porém, levando em consideração que o corante TTC demanda mais tempo para que a reação com a desidrogenase ocorra, durante a respiração celular, e nesse estudo não houve diferença significativa entre ele e o carmim acético, este seria o mais apropriado para estimar a viabilidade polínica em *Physalis angulata*, pois a reação com o tecido de reserva é mais rápida e os grãos de pólen viáveis e inviáveis são mais contrastados.

Com relação, ao desdobramento da interação viabilidade ao longo do tempo houve diferença significativa. A viabilidade polínica alcançou 96% às 14 horas, utilizando o corante TTC, e um decréscimo às 17 horas expressando as menores taxas em ambos os corantes (Figura 7). Dessa forma, a espécie tem potencial para ser doadora de pólen em programas de melhoramento. A

viabilidade do pólen em *P. peruviana* é relativamente elevada, atingindo os 85% (PUENTE et al., 2011). Contudo, as percentagens de viabilidade do pólen desta espécie variam muito de variedade para variedade, indicando que dentro da espécie poderá haver alguma variabilidade genética relacionada com a distribuição geográfica (ALMANZA e ESPINOSA, 1995).

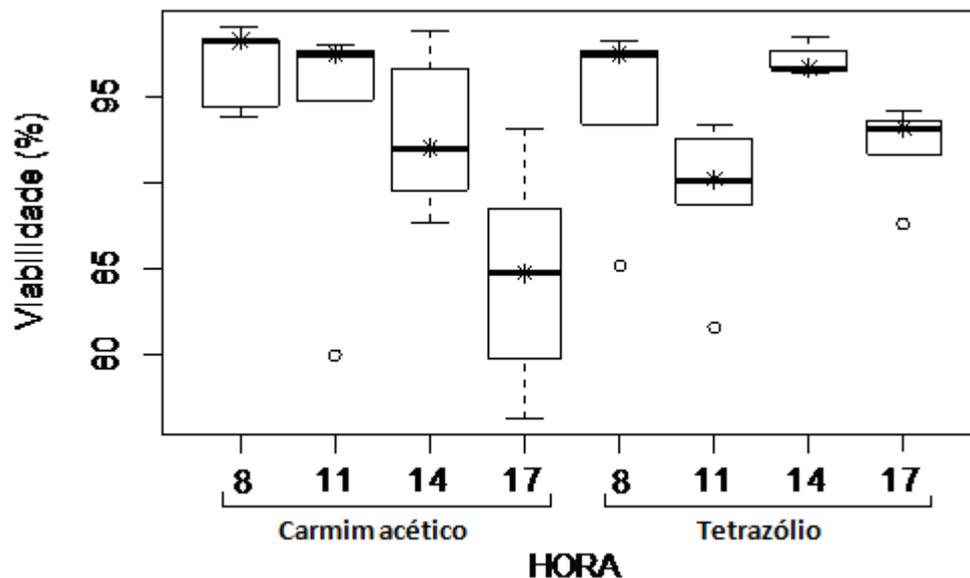


Figura 7: Viabilidade polínica de *Physalis angulata* L. avaliada ao longo do dia utilizando os corantes carmim acético e tetrazólio.

2) Sistema reprodutivo

Na contabilização dos grãos de pólen e de óvulos, variáveis que determinam a relação pólen-óvulo, foi observada pouca variação entre os indivíduos amostrados (Tabela 1). A quantidade de óvulos que foram produzidos por flor, foi em média 108, a de pólen por flor 13.668 e a razão pólen/óvulo= $126,7 \pm 16,0$. Nesse caso, a espécie *P. angulata* é considerada autógama facultativa segundo as classificações de Cruden (1977). Silva et al., (2017) afirmam que existe variação no número de grãos de pólen por antera e por flor entre as espécies do gênero *Physalis*, e para *Physalis angulata* obtiveram, em média, 11.300 polens por flor. Essa variação na quantidade de óvulo e grãos de pólen também foram descritas em tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (SILVA-NETO, 2013) e pimentão (*Capsicum* sp.) (FARIA-JÚNIOR et al., 2008).

Tabela 1: Quantidade de grãos de pólen por flor (Nº GP/flor), número de óvulos (Nº de óvulos), razão pólen-óvulo (P / O) em *Physalis angulata* L.

Indivíduo	Nº GP/flor	Nº de óvulos	P/O
1	10050	83	121,1
2	16440	123	133,7

3	15360	115	133,6
4	15250	116	131,5
5	13780	131	105,2
6	13530	106	127,6
7	9270	100	92,7
8	14360	96	149,6
9	11590	81	143,1
10	17050	132	129,2
\bar{X}	13668	108,3	126,7
DP	2484,9	17,3	16,0
CV	18,2	16,0	12,6

O resultado obtido na relação P/O corrobora ao que foi afirmado por Mione e Anderson (2014) que o parâmetro em questão rastreia o sistema de reprodução, sendo que as espécies auto-incompatíveis têm taxas de pólen-óvulo significativamente maiores que as espécies autocompatíveis. Duas espécies de Solanaceae com sistemas autocompatíveis (*Solanum canense* e *Solanum suaveolens*) são anuais, autógamas e ruderais, ocorrendo preferencialmente em habitats perturbados (ANDERSON, 1977). A evolução da auto-compatibilidade com uma produção relativamente alta de óvulos e sementes, nessas duas espécies, pode estar associada e ser derivada ao ciclo de vida e ao habitat delas. Já a espécie *S. trachycarpum* é autógama, mas distante filogeneticamente de *S. canense* e *S. suaveolens*. A autocompatibilidade nessa espécie, cujo ciclo de vida é perene, talvez esteja associada à baixa densidade populacional nos habitats xéricos que ocupa (ANDERSON, 1975).

A classificação reprodutiva descrita por Cruden (1977) foi criticada por alguns autores, por ser um método que leva em consideração apenas o *fitness* individual em termos de limitação de grãos de pólen e suas implicações para a produção de sementes (ETCHEVERRY et al., 2012). O pepino é autocompatível, mas tem uma razão pólen-óvulo, como ao do seu progenitor silvestre auto-incompatível e mostra ampla variação na produção de sementes e na qualidade do pólen (MIONE e ANDERSON, 2014). Por conta disso, complementando os resultados obtidos pela relação P/O, foram realizadas polinizações *in vivo*. De maneira geral, houve crescimento dos tubos polínicos após 24 horas das polinizações.

No tratamento de autopolinização induzida, após 24 horas da polinização houve germinação dos grãos de pólen na superfície estigmática, formação de tubos polínicos sem crescimento errático ao longo de todo o estilete, e adentrando o ovário e alcançando os óvulos, sugerindo que não há autoincompatibilidade esporofítica, gametofítica e tardia, respectivamente. Após 48 horas e 72 horas foi observado o mesmo padrão (Figura 8).

No tratamento de autopolinização espontânea, após 24 horas da polinização, a maior parte dos tubos polínicos limitou-se à porção média do estilete, não alcançando o ovário e o depósito de pólen foi maior nas extremidades, região mais próxima das anteras, sugerindo interferência intrafloral entre pólen-pistilo. Após 48 horas, alguns tubos polínicos conseguiram alcançar o ovário, mas poucos conseguiram fecundar os óvulos. O atraso e a ausência de grãos de pólen na superfície estigmática de alguns pistilos submetidos a autopolinização espontânea sugere que o transporte de pólen seja mediado por agentes polinizadores (Figura 8).

Numa espécie congênica (i.e., *P. peruviana*) suas flores são facilmente polinizadas por insetos e pelo vento, mas apesar de prevalecer a alogamia, também, apresenta níveis de autopolinização (DALLOS, 2010). Puente et al. (2011) relatam, também, que as flores de *P. peruviana* podem ser facilmente polinizadas por fatores bióticos e abióticos, mas que a autopolinização é frequente.

No tratamento de polinização cruzada, houve deposição de pólen por toda superfície estigmática e crescimento de tubos polínicos, após 24 horas, alcançado o ovário e atingindo a micrópila, após 48 horas da polinização, seguindo o mesmo padrão, e após 72 horas de polinização houve alta formação de tubos polínicos ao longo de todo estilete, formando feixes entrelaçados que não podiam ser individualizados (Figura 8).

Quanto as flores que não foram polinizadas manualmente e ficaram sem proteção sendo assim exposta a livre visita dos polinizadores, isto é, o tratamento de polinização livre, com 24 horas havia pólen depositado e germinando no estigma, assim como tubos polínicos formados ao longo do estilete alcançando o ovário e fecundando parte dos óvulos, com 48 horas seguiu o mesmo padrão. Após 72 horas foi possível verificar o desenvolvimento do embrião. Silva et al. (2005) avaliando os requerimentos de polinização do pimentão por quatro formas de polinização notaram que não houve diferença entre os tratamentos com e sem visita das abelhas, sugerindo que a autopolinização das flores do pimentão precisa ser mais bem explicada, pois a liberação de pólen só ocorre após a abertura das flores, quando o estigma da flor já se encontra acima dos estames.

Para o tratamento apomixia não houve formação de frutos, o que demonstra que o isolamento das flores, ainda em botão, foi eficiente. Dessa forma, foi possível detectar que *P. angulata* é uma espécie autocompatível (ISI=0,50) (Figura 8). Porém, há desenvolvimento de tubos polínicos, na polinização cruzada, o que a classifica como uma espécie autógama facultativa. O mesmo foi confirmado pela relação pólen/óvulo proposta por Cruden (1977). Os resultados sugerem, também, que a fertilização ocorre aproximadamente um dia após a polinização.

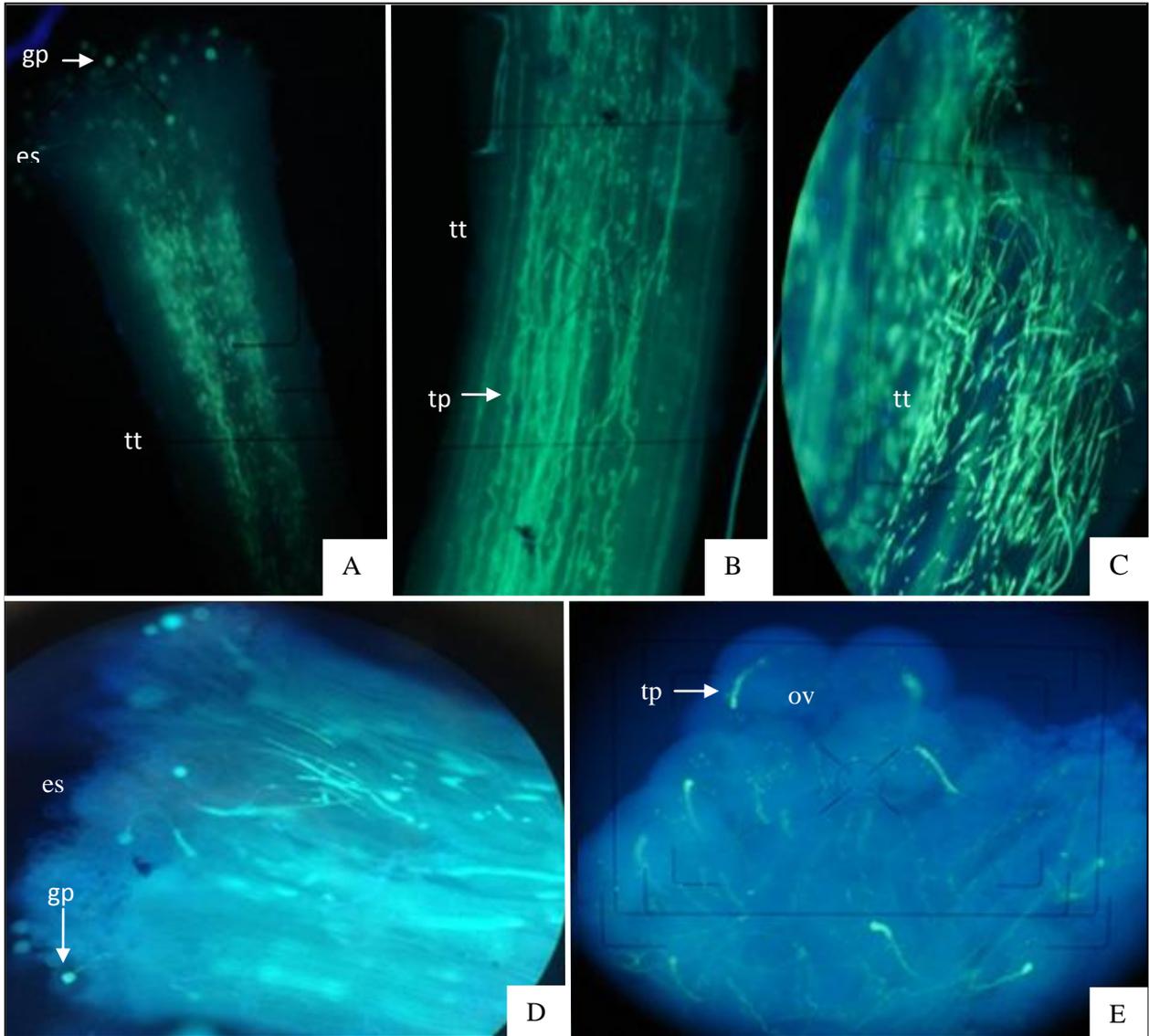


Figura 8: Fotomicrografias das interações pólen-pistilo provenientes das polinizações realizadas no experimento de fertilização *in vivo* visualizadas por microscopia de epifluorescência. es= estigma; tt= tecido de transmissão; gp= grão de pólen; tp= tubo polínico; ov= óvulo

O sucesso reprodutivo das polinizações foi medido a partir taxa de frutificação, que variou de 20 a 86%, e o nível de eficácia reprodutiva foi de 0,66 (Tabela 2). A autopolinização espontânea obteve a maior taxa, e o índice de autogamia foi 4,3 o que demonstrou, mais uma vez, que a espécie é autocompatível. De acordo com Chautá-Mellizo et al. (2012) a autocompatibilidade, também, ocorre em *P. peruviana* e a auto-polinização é recorrente devido à grande quantidade de pólen liberado e grande compatibilidade para com o mesmo. Contudo, estudos indicam que frutos que derivam de gametas de diferentes plantas têm tendência a possuir um maior tamanho e massa, sendo a presença de polinizadores como *A. mellifera*, fundamental para este processo.

Tabela 2: Experimento de biologia reprodutiva realizado em flores de *Physalis angulata* L. em casa de vegetação da Unidade Experimental Horto Florestal, durante o mês de janeiro de 2017.

Tratamentos	Flores/Fruto (n)	Sucesso reprodutivo (%)
Autopolinização induzida	5/1	20
Autopolinização espontânea	15/13	86
Polinização cruzada	5/2	40
Polinização livre	15/9	60
Apomixia	5/0	0

Além do sucesso das polinizações foram avaliadas as características físicas dos frutos e das sementes para os tratamentos de autopolinização espontânea e polinização livre. Os tratamentos de autopolinização induzida e polinização cruzada não foram analisados devido ao tamanho amostral reduzido (≤ 1). Com exceção do tratamento apomixia, todos os cruzamentos realizados tiveram a formação de frutos e sementes. O tratamento que se destacou, alcançando melhores médias para todas as variáveis analisadas, foi o de autopolinização espontânea.

Souza (2015) relatou um diâmetro de 13,9 mm nos frutos de *P. angulata*. Os frutos avaliados por Oliveira et al. (2011) tiveram um comprimento médio de 2,17 cm. Mas, essa diferença é aceitável, pois não foram encontrados dados referenciados em artigos científicos sobre as características físico-químicas do camapu provenientes de diferentes polinizações para comparação. Além disso, houve a não formação de frutos e os que foram abortados precocemente nos tratamentos de autopolinização induzida e polinização cruzada.

O tratamento que obteve a maior produção de sementes foi o de autopolinização espontânea, média de 156 sementes/fruto, abaixo do que foi encontrado por Souza (2015) para a mesma espécie, média de 197 sementes/fruto. Entretanto, Rodrigues et al. (2014) obtiveram para *P. peruviana* uma média de 135 sementes em casa de vegetação (Tabela 3).

Tabela 3: Caracterização física dos frutos de *Physalis angulata* L. provenientes de diferentes polinizações.

Tratamentos	Peso (g)	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Número de sementes (média)
Autopolinização espontânea	12,659	1,183	11,983	156,384
Polinização livre	6,400	1,155	10,455	110,727

*Valores referentes a médias

Dentre variáveis analisadas para as sementes que foram produzidas, germinabilidade (G%), tempo médio (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade da germinação (CUG), a germinabilidade foi o único que diferiu estatisticamente (Tabela 4). Normalmente são encontradas em pesquisas relacionadas ao gênero uma alta taxa de germinabilidade de sementes (CAMACHO et al., 2008; RUFATO, 2008; SOUZA et al., 2014). Nesta pesquisa, esses dados obtiveram uma significativa diferença entre os tratamentos, cujo valor mínimo obtido foi de 28% para os tratamentos autopolinização induzida e autopolinização espontânea, e o valor máximo foi de 96% para a polinização livre. Uma hipótese provável dessa diferença é à ineficiência no depósito de pólen na superfície estigmática, bem como ausência de polinizadores externos para os tratamentos que foram induzidos, tendo em vista que tais apresentaram menores taxas, diferentemente da polinização livre que obteve a maior taxa. Quanto a razão de depressão endogâmica prediz que a autopolinização não é favorável ($\delta=0,6$).

Kevan e Phillips (2001) afirmaram que mesmo em culturas que possuem a capacidade de se autofecundarem, como tomate e berinjela, ao serem polinizadas por vetores bióticos, a qualidade do fruto (peso e número de sementes), bem como o número de frutos produzidos pode aumentar significativamente, aumentando conseqüentemente a rentabilidade da cultura. Em culturas, como pimentão e morango, a polinização biótica diminuiu em até 43% a má formação de frutos e em oleaginosas aumentou em até 27% o teor de óleo nas sementes (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT, 2007).

Tabela 4: Germinabilidade (G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade da germinação (CUG) de *Physalis angulata*.

Tratamentos	G (%)	TMG	IVG	CUG
Autopolinização induzida	28a	4,125 ^a	1,908a	1,575 ^a
Autopolinização espontânea	28a	4,928 ^a	1,525a	0,001 ^a
Polinização cruzada	70ab	4,279a	4,225a	1,867 ^a
Polinização livre	96b	4,854 ^a	5,180 ^a	0,971 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p < 0,05$, ns= não significativo.

CONCLUSÕES

1. A *Physalis angulata* apresentou alta viabilidade polínica utilizando o método colorimétrico, sendo assim, espécie de potencial para uso como progenitor masculino em programas de hibridação, exibindo viabilidade de grãos de pólen com percentual de 96% às 14 horas.
2. O corante sugerido para estimar a viabilidade dos grãos de pólen foi o carmim acético, pois a reação é mais rápida e os grãos de pólen ficaram mais contrastados, o que facilita a análise.

3. O método de germinação *in vitro* para estimar viabilidade dos grãos de pólen não foi eficiente, sendo necessários maiores ajustes dos meios propostos.
4. A *P. angulata* é uma espécie autocompatível e autógama facultativa. Todos os parâmetros que foram avaliados reforçam essa autocompatibilidade, pela relação pólen/óvulo classificada como autógama facultativa.
5. Esse estudo forneceu informações úteis e inéditas para a espécie e auxiliará na escolha do método a ser empregado no programa de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technol.**, Baltimore, 55 (1) 13-18, 1980.
- ALMANZA, P. ; C. ESPINOSA. **Desarrollo morfológico y análisis físico químico de frutos de uchuva *Physalis peruviana* L. para identificar el momento óptimo de cosecha.** Tese de pós-graduação, Faculdade de Agronomia, UPTC, Tunja, 1995.
- ANDERSON, G. J. The variation and evolution of selected species of *Solanum* section *Basarthurum*. **Brittonia** 27: 209-222, 1975.
- ANDERSON, G. J. The variation and evolution of selected species of *Solanum* section *Basarthurum* (Solanaceae). II. **Brittonia** 29: 116-128, 1977.
- ARROYO, M. T. K. Comments on breeding systems in Neotropical forests. p. 371- 380. In: Larsen, K.; Holm-Nielsen, L. B. (ed.) **Tropical Botany**. Academic Press, London. 1979.
- BODANESE-ZANETTINI M.H., CAVALLI, S.S. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: FREITAS, L. B., BERED, F. (eds) **Genética e Evolução Vegetal**. 1ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS. p. 177-188, 2003.
- CAMACHO, I.P. et al. Efecto de desarrollo y secado de semillas de *Physalis ixocarpa* Brot en germinación, vigor y contenido de azúcares. **Interciencia**, v. 33, p. 762-766, 2008.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. A model for the evolution of distyly. **The American Naturalist**, 4(114):467-498. 1979.
- CHAUTÁ-MELLIZOA, A. et al. Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. **Basic and Applied Ecology**. p.524–532, 2012.
- CRESTI, M., BLACKMORE, S., VAN WENT, J.L. **Atlas of Sexual Reproduction in Flowering Plants**, Springer, Berlin, p.249, 1992.
- CRUDEN, R.W. Pollen–ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**. p.32–46, 1977.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. Oxford University Press Inc. New York. 1 ed. 1992.

- DALLOS, M.P. et al. Uchuva *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). **Bioteecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales**. p.466-490, 2010
- DAMASIO, J.F. et al. Uso do 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio na estimativa da viabilidade polínica de algodão-bravo. **Ciência e Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal**, v. 8, n.1, 2016.
- ETCHEVERRY, A.V. et al. Pollen: ovule ratio and its relationship with other floral traits in Papilionoideae (Leguminosae): na evaluation with Argentine species. **Plant. Biol.** 14, 171–178, 2012.
- FARIA-JÚNIOR, L. R. R.; BENDINI, J. N. L.; BARRETO, M. R. C. Eficiência polinizadora de *Apis mellifera* L. e polinização entomófila em pimentão variedade cascadura ikeda. **Bragantia**, 67(2): 261-266, 2008.
- FERREIRA, M.A.J.F.; VENCOVSKY,R.; QUEIRÓZ,M.A.; VIEIRA,M.L.C.; BORGES, R.M. **Sistema reprodutivo e suas implicações no melhoramento genético de uma população de melancia**. SBMP – Resumo, 2006. Disponível em < <file:///D:/area2/02Resumo64.htm>>. Acesso em: 19 ago. 2017.
- GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. **Methods in fruits breeding**. Indiana: Purdue University Press., p.23- 47, 1983.
- HADAS, A. Water uptake and germination of leguminous seeds under changing external water potencial in osmotic solution. **Journal Express Botany**, 27: 480-9, 1976.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D. et al. (eds.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland, MA, Sinauer Associates, 1989. p. 43-63.
- JESUS, O. N.; SOARES, T. L.; OLIVEIRA, E.D.; MARTINS, C.A.D.; SANTOSSEREJO, J.N. Comportamento germinativo e viabilidade polínica de Passifloras oriundos de flores coletadas em diferentes estádios e horários. IN: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, V.6, 2011, Búzios-RJ. **Anais...**Campos dos Goytacazes-RJ: SBMP, p.1-4, 2011.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado,1993.
- KELLY, J.K., RASCH, A., KALISZ, S. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. **American Journal of Botany**, 89 (6):1021-1023, 2002.
- KEPHART, S. R.; BROWN, E.; HALL, J. Inbreeding depression and partial selfing: evolutionary implications of mixed-mating in a coastal endemic, *Silene douglasii* var. *oraria* (Caryophyllaceae). **Heredity**, v. 82, p. 543-554, 1999.
- KEVAN, P. G. E PHILLIPS, T. P. The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. **Conservation Ecology**, (5) 1: 8, 2001.
- LLOYD, D. G.; SCHOEN, D. J. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. **International Journal of Plant Sciences**, v. 153, p. 358–369, 1992.

- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.
- MALAGODI-BRAGA, K. S.; KLEINERT, A. de M. P. Como o comportamento das abelhas na flor do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) influencia a formação dos frutos? **Bioscience Journal**, 23: 76-81, 2007.
- MASCARENHAS, J.P. Pollen gene expression: Molecular evidence. **Int. Ver. Cytol.** 140, 3-18, 1992.
- MARTIN, F. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology**, Baltimore, v.34, p.125, 1959
- MIONE, T. e ANDERSON, GJ.. Source Pollen-Ovule Ratios and Breeding System Evolution in Solanum Section Basarthrum (Solanaceae). **American Journal of Botany**, Vol. 79, No. 3 (Mar., 1992), pp. 279-287 Published by: Botanical Society of America Stable. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2445016>> . Acesso em: 4 set. 2016
- MONDAL, S.; GHANTA, R. Effect of sucrose and boric acid on in vitro pollen germination of *Solanum macranthum* Dunal. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 2, n. 2, p. 202-206, 2012.
- MOORE, P.D., WEBB, J.A. **An illustrated guide to pollen analysis**. 1. ed., New York: A Halsted Press Book, 1978. p.133.
- MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Rev. Brasil. Bot.**, V.31, n.2, p.209-214, 2008.
- NOGUEIRA, P. V. et al. Germinação de pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. **Bragantia**, v. 74,n. 1, p. 9-15, 2015.
- OLIVEIRA, J.A.R. et al. Caracterização física, físico-química e potencial tecnológico de frutos de camapu (*Physalis angulata* L.). **Rev. Brasil. de Tecn. Agroind.**, v. 5, p. 573-583, 2011.
- PEREIRA, D. A.; BRITO, A. C.; AMARAL, C.L.F.. Biologia floral e mecanismos reprodutivos do Mussambê (*Cleome spinosa* Jacq) com vistas ao melhoramento genético. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v.20, n. 4, p.27-34, 2007.
- PFAHLER, P. L.; PEREIRA, M. J.; BARNETT, R. D. Genetic variation for *in vitro* sesame pollen germination and tube growth. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 1218-1222, 1997.
- PUENTE, L. A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: a review. **Food Research International**. 44, 1733–1740, 2011.
- R CORE TEAM (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 27 set. 2017

- RODRIGUES et al. Caracterização física, química e físico-química de *Physalis* cultivada em casa de vegetação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.8, p.1411-1414, 2014.
- RUFATO, L. et al. **Aspectos técnicos da cultura da *Physalis***. Lages: CAV/UEDESC; Pelotas: UFpel, p.100, 2008.
- RUIZ-ZAPATA, T.; ARROYO, M. K. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. **Biotropica**, v. 10, p. 221-230, 1978.
- SCORZA, R.; SHERMAN, W.B.; In: JANIK, J., MOORE, J.N. (Eds.), **Fruit Breeding**. John e Sons, New York, p. 325–440, 1995.
- SILVA, D. F. et al. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 2, p. 365-373, 2017.
- SILVA, E.M.S. et al. Biologia floral do pimentão (*Capsicum annuum*) e a utilização da abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) como polinizador em cultivo protegido. **Revista Ciência Agronômica**, v.36, n.3, p. 386-390, 2005.
- SILVA FILHO, J. G. **Avaliação da temperatura e do período de armazenamento na conservação de grãos de pólen de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), visando a produção de sementes híbridas**. 2007. 32p. Monografia (Especialização em Biotecnologia vegetal) - Faculdade JK, Brasília, 2007.
- SOARES, T. L. et al. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.8, p.111-118, 2008.
- SOBREVILA, C.; ARROYO, M. K. Breeding system in a montane tropical cloud forest in Venezuela. **Plant Systematics and Evolution**, v. 140, p. 19-37, 1982.
- SOUZA, C.L.M. **Armazenamento de sementes e caracterização morfofisiológica de espécies do gênero *Physalis***. 88p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.
- SOUZA, C.L.M. et al. Morfologia de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Physalis angulata* L. **Acta Bot. Bras.** 24(4): 1082-1085. 2010.
- SOUZA, E. H. et al. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor*(Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. **Euphytica**, v. 44, p. 37-42, 2014.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry, management**. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1974. p.307.
- TECHIO, V.H., LISETTE, C.D., PEREIRA, A.V. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, 29 (2):35-42, 2006.
- ZAMBON, V. **Biologia da polinização e eficácia de polinizadores em *Solanum melongena* L. (Solanaceae)**. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente)- Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2015.

CAPÍTULO II

ASPECTOS DA BIOLOGIA FLORAL DE *Physalis angulata* L.

RESUMO

Destaca-se no gênero *Physalis* a espécie *Physalis angulata* L., conhecida popularmente no Brasil como camapú, balãozinho, juá-de-capote. Atualmente, há um crescente interesse dos consumidores e produtores, devido ao potencial econômico dos frutos, além da presença de substâncias com potencial farmacológico na planta. Por conta disso, há necessidade de realizar estudos preliminares a fim de estabelecer o melhoramento genético da espécie, bem como aprimorar a forma de cultivo da planta, para potencialização de seus atributos e uso. Sabe-se da importância da participação dos visitantes florais no processo de polinização, inclusive no incremento da qualidade e quantidade de frutos produzidos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo conhecer e registrar os insetos visitantes das flores e a longevidade floral de *Physalis angulata*, afim de, gerar informações importantes e iniciais sobre a espécie. A antese das flores de *P. angulata* durou em média dois dias, iniciaram a abertura às 6 da manhã e o encerramento iniciou às 14 horas em condições de campo. Em casa de vegetação, o fechamento ocorreu por volta das 17 horas e reabriram no dia seguinte. A deiscência das anteras é longitudinal e ocorre logo após a antese, contrapondo ao que foi evidenciado em literatura, no que diz respeito à dependência da vibração para liberação dos grãos de pólen. Os insetos visitantes foram da ordem Diptera e Hymenoptera, sendo que os Hymenoptera foram os visitantes mais frequentes.

Palavras-chave: Solanaceae. Camapú. Visitantes florais. Longevidade floral. Recursos florais.

ABSTRACT

The *Physalis angulata* L. species, popularly known in Brazil as camapú, balãozinho, juá-de-capote, have aroused the interest of consumers and producers due to the economic potential of fruit production, rich in vitamins A and C, in addition to the presence of substances with pharmacological potential. Because of this, it is necessary to carry out preliminary studies in order to establish the genetic improvement of the species, as well as to improve the way of cultivating the plant, to enhance its attributes and use. It is known the importance of the participation of floral visitors in the pollination process, including the increase in the quality and quantity of fruits produced. Thus, the present work had as objective to know and to register the visiting insects of the flowers and the floral longevity of *Physalis angulata*, in order to generate important and initial information on the species. The anthesis of the flowers of *P. angulata* lasted on average two days, they began the opening at 6 in the morning and the closure began at 14 o'clock in the field conditions. In a greenhouse, the closure occurred around 5 pm and reopened the next day. The dehiscence of the anthers is longitudinal, and occurs soon after the anthesis, in contrast to what was evidenced in the literature, regarding the dependence of the vibration to release the pollen. The insects were of the order Diptera and Hymenoptera, with Hymenoptera being the most frequent visitors.

Key words: Solanaceae. Camapu. Floral visitors, Floral longevity. Floral resources.

INTRODUÇÃO

A espécie *Physalis angulata* L., conhecida popularmente no Brasil como camapú, balãozinho, juá-de-capote, vêm despertando interesse dos consumidores e produtores, devido ao potencial econômico que apresenta, por produzir frutos ricos em vitaminas A e C e pela presença de substâncias com atividades farmacológicas (SILVA, 2007).

Esta espécie é uma das mais comuns do gênero, por sua fácil adaptação, sendo considerada como ruderal, e facilmente vista em campos semeados de diferentes cultivos (LIGARRETO, 2005). Estudos relacionados à fenologia, modo de reprodução e visitantes florais são escassos para espécie. Sabe-se que a depender das condições ambientais onde as plantas estão crescendo pode alterar seu sistema de reprodução, ampliando ou reduzindo a variabilidade genética, a partir de mecanismos variados, incluindo adaptações estruturais, fenológicas e fisiológicas, tais como o controle do fluxo de pólen, o crescimento de tubos polínicos e a alocação de recursos para a progênie (RECH, 2014)

Independente do seu modo reprodutivo preferencial, as plantas não apresentam mobilidade, e na maioria das vezes dependem de vetores bióticos ou abióticos para promover a polinização, ou seja, o transporte de pólen até a superfície estigmática, sendo este um evento fundamental para que o processo de fertilização dos ovários e a reprodução sexuada ocorram. Quando os agentes de polinização são animais, geralmente é atribuída uma interação mutualística, isto é, proporciona benefícios para os participantes, aumentando o valor adaptativo (*fitness*) de ambos. Os parceiros, desta interação, tentam maximizar sua sobrevivência e o seu sucesso reprodutivo, o que exige um equilíbrio entre os custos e os recursos. Porém, essa relação de cooperação, também, pode não ocorrer, observando que a visita resulta, apenas, em retirada do recurso oferecido pelas flores, comumente denominado de pilhadores (RECH, 2014)

A relação entre flor e visitante floral é estabelecida, por meio de um atrativo (recurso), na maioria das vezes, como fonte de alimento, que pode ser o próprio pólen, néctar ou óleo. Quando a mediação é efetuada por um agente polinizador pode favorecer a polinização cruzada, mecanismo que possibilita às plantas um aumento da variabilidade genética de seus descendentes. Desse modo, a perda de espécies que realizam o serviço de polinização pode desencadear prejuízos e graves consequências para a manutenção da biodiversidade em geral, assim como para a produtividade de culturas agrícolas (RECH, 2014; FAEGRI, 1980; KEVAN, 2001).

Grande parte das angiospermas apresentam flores bissexuadas, onde ocorre a presença de carpelos e estames em uma única flor, característica que proporciona uma otimização das visitas dos polinizadores, que podem coletar e depositar o pólen em uma única parada (RAVEN, 2007). Entretanto, essa característica pode, também, facilitar a ocorrência do processo de autogamia. Embora a autogamia apresente determinadas vantagens reprodutivas, como a manutenção de

caracteres importantes para a sobrevivência da espécie, também contribui para a diminuição da variabilidade genética (BORGES, 2000). Dessa forma, algumas estratégias reprodutivas são apresentadas pelas plantas como mecanismos para a redução da autofecundação e, conseqüentemente da autogamia. A apresentação de algumas características específicas, como a hercogamia e a autoincompatibilidade, podem otimizar a reprodução cruzada e, conseqüentemente, aumentar a taxa de variabilidade genética (BARRET, 2000).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo, conhecer a e registrar a longevidade floral, os recursos florais bem como os insetos visitantes das flores, a fim de gerar informações importantes para a espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Morfologia floral

Foram coletadas cinco flores abertas para realização da descrição floral, que foi desenvolvida a partir da observação direta sob estereomicroscópio segundo a metodologia de (VIDAL e RODRIGUES, 2000).

Longevidade floral, desenvolvimento e maturação dos frutos

Para conhecer a duração das fenofases, 15 botões de flores foram marcados e avaliados diariamente, e registadas as mudanças nas diferentes partes da flor, desde o momento da antese até a queda das pétalas e formação dos frutos.

Visitantes florais

Para o estudo de visitantes florais foram realizadas observações na área experimental da Unidade Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, em agosto de 2016, janeiro de 2017 e agosto de 2017 durante o período de antese das flores. Foram totalizadas vinte e cinco horas de observações em dias não consecutivos entre 7 horas e 16 horas. Foi efetuado o horário de visita e a permanência dos animais visitantes. Em seguida, foi realizada a coleta de alguns insetos em seus períodos de atividade, com auxílio de rede entomológica, e posteriormente foram mortos com auxílio da câmara mortífera, onde se utilizou acetato de etila como substância tóxica. Posteriormente, foi feita a identificação dos espécimes com consulta a especialistas.

Reflexão de luz ultravioleta

Dados sobre a reflexão de luz ultravioleta de cinco flores recém coletadas foram obtidos utilizando-se hidróxido de amônia (NH₄OH) por cinco minutos, segundo a técnica de (GERTZ, 1938).

Osmóforos

Para detecção de osmóforos foram submergidas cinco flores recém coletadas, por cinco minutos, em solução de vermelho neutro 0,1%, e posteriormente lavando-as com água destilada e em seguida observadas (VOGEL, 1978).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Physalis angulata* apresentou floração e frutificação ao longo de todo ciclo vegetativo e reprodutivo, havendo emissão de botões florais logo após a emergência da plântula até a senescência. Foi evidenciada, uma sobreposição do período de desenvolvimento da planta com o período de floração, sendo assim diferentes estádios de desenvolvimento florais foram encontrados em um indivíduo ao longo de todo ciclo.

São plantas monóclinas, com flores completas, hermafroditas, pentâmeras, diclamídeas, cujo cálice acrescente apresenta coloração verde, a corola tem coloração amarela e quanto à fusão de suas peças é classificado como gamopétala. Quanto ao verticilo floral masculino, são isostêmone, dialiestêmone, isodínamo podendo apresentar algumas vezes um estame de tamanho reduzido, epipétalos e antera basifixa de deiscência longitudinal. O gineceu é gamocarpelar com estilete ginobásico, sendo o ovário súpero com placentação axial e multiovulado. Os grãos de pólen são tricolporados.

Os botões florais de *Physalis angulata*, em condições de campo, iniciaram a abertura às 6 da manhã. A duração da abertura floral foi de aproximadamente duas horas, e às 8 da manhã todas estavam abertas (Figura 9), diferindo da representante do gênero *Physalis peruviana*, que segundo Lagos et al. (2008) inicia a antese entre às 7 e 10 horas da manhã. Com relação ao fechamento, as duas espécies apresentaram o mesmo padrão, às 14 horas. Lago et al. (2008) observou uma diminuição significativa da antese depois das 14 horas, horário que apresentou o menor percentual (11,76%). Porém, os indivíduos também foram acompanhados em casa de vegetação, e foi constatada uma mudança nesse padrão, com fechamento foi mais tardio, por volta das 17 horas. Provavelmente esse comportamento esteja relacionado a incidência solar, que diferiu muito nos dois locais.

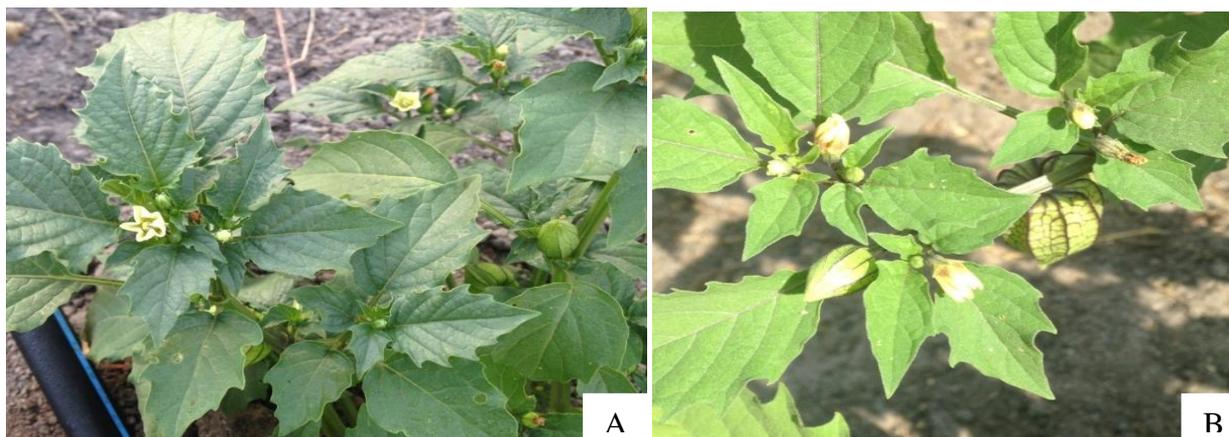


Figura 9. Antese de *Physalis angulata*. (A) Momento que iniciou a antese, às 6 horas. (B) Encerramento da antese, às 14 horas. UEFS/Horto Florestal, Feira de Santana-BA, agosto de 2016.

A antese de *P. angulata* durou em média dois dias, mas as flores se fecharam ao entardecer, por volta das 17 horas e, reabriram no dia seguinte, às 6 horas. O fechamento da flor a noite ocorreu, provavelmente, para proteger os elementos reprodutivos da flor de polinizadores noturnos. O mesmo comportamento fenológico de antese no início da manhã, fechamento noturno e senescência floral após dias foi relatado por Silva Neto (2013), em *Solanum lycopersicum*, cujas flores têm duração de aproximadamente três dias, em que no primeiro dia a flor disponibilizava os grãos de pólen, e no segundo e terceiro dia a flor ofertava o estigma para receber grãos de pólen de outras flores, aumentando as chances da polinização cruzada.

Observou-se que em *Physalis angulata* dois a três dias, após a antese, as flores fecundadas se fecham, a corola seca e, no dia seguinte, é totalmente perdida, juntamente com as anteras. O filete, também, se desprende, permanece apenas o ovário e o cálice, que com o passar dos dias se fecha e começa a inflar a medida que o fruto vai sendo formado (Figura 10). A deiscência das anteras ocorre logo após a antese, contrapondo ao que foi evidenciado em literatura, no que diz respeito a dependência da vibração para liberação dos grãos de pólen. Entretanto, além do tamanho dos estames variar há uma frequente assincronia na abertura das anteras, tendo em vista que dos cinco estames pelo menos um encontrava-se com a antera fechada e com tamanho reduzido, sugerindo que o pólen não é oferecido totalmente no primeiro dia da antese. Já em *Physalis peruviana*, é encontrado o mecanismo de barreira heterostilia, um indicativo de incompatibilidade heteromórfica, em que o pistilo é mais alto que o androceu (Lagos, 2008).



Figura 10: Estádios após a polinização de *Physalis angulata*. UEFS/Horto Florestal, Feira de Santana-BA, março de 2017.

Através das observações para se conhecer os insetos visitantes, constatou-se a presença de espécimes das ordens Diptera e Hymenoptera visitando as flores de *Physalis angulata* (Tabela 5). Referindo-se ao comportamento e permanência de cada visitante, o mais frequente foi a abelha *Apis mellifera*. Três espécies de formigas, não identificadas, foram encontradas ao longo de todo o período de observação (Figura 12). Sabe-se que as formigas não são boas polinizadoras, porque as substâncias antibióticas produzidas pela glândula metapleurial inibem a germinação e/ou crescimento do tubo polínico (BEATTIE, 1995).

Tabela 5: Observação dos visitantes florais realizado em flores de *Physalis angulata* em casa de vegetação da Unidade Experimental Horto Florestal.

Visitante	Horário	Permanência (segundos)
Hymenoptera (<i>Polybia sericea</i>)	8:15	4
Hymenoptera (<i>Polybia ignobilis</i>)	15:30	8
Hymenoptera (<i>Polybia gr occidentales</i>)	10:21	7
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	16:00	5
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	08:50	7
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	09:00	4
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	09:15	4
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	09:28	10
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	09:30	13
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	10:09	16
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	10:44	17
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	10:48	7
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	11:22	20
Hymenoptera (<i>Apis mellifera</i>)	11:27	7

Hymenoptera (Halictidae sp.1)	09:49	21
Hymenoptera (Halictidae sp.1)	09:15	20
Hymenoptera (Halictidae sp.1)	11:00	15
Hymenoptera (Halictidae sp.1)	11:26	7
Hymenoptera (Halictidae sp.1)	11:57	6
Hymenoptera (Halictidae sp.1)	14:09	7
Hymenoptera (Halictidae sp.1)	15:13	18
Diptera sp.1	9:45	2
Diptera sp.1	10:35	5
Diptera sp.1	11:05	10

Insetos da ordem Diptera, visitaram as flores no período das 9 h às 14 h, porém não tiveram contato com os órgãos reprodutivos da flor e muitas vezes os insetos se aproximavam, mas não realizavam a visita, provavelmente devido ao monopólio das flores por formigas, pois elas impedem que os visitantes se aproximem (ALBUQUERQUE et al. 2006; FILHO e LEAL, 2007).

Representantes da família Solanaceae, necessitam de vibração (“*buzz pollination*”) para a liberação do pólen. Devido a esse padrão, era esperado que determinadas espécies de abelhas fossem as polinizadoras efetivas de *Physalis angulata*. Porém, as espécies de abelhas que visitaram as flores de *Physalis angulata* são incapazes de exibir o comportamento de vibração. Rodriguez (2006) relatou que *Physalis peruviana* possui abelhas como polinizadores potenciais, sendo a *Apis mellifera* e espécies do gênero *Bombus* spp. e *Xylocopa* spp. os principais visitantes florais. Gaglianone et al. (2015) afirmam que abelhas-de-mel (*Apis mellifera*) apesar de não fazerem a vibração, conseguem polinizar as flores do tomateiro, mas o fazem com menor eficiência. A flor de *S. melongena* também recebeu visitas de polinizadores que não apresentam tal comportamento, no caso da *Apis mellifera* e da *Trigona snipes*. Zambon (2015) afirma que isso demonstra a existência de um processo de aprendizagem na manipulação das estruturas florais por parte dessas espécies. No presente estudo foi observado que as abelhas *Apis mellifera*, em suas visitas coletaram pólen e os depositavam na corbícula. Durante as visitas, parte ventral do abdome e do tórax entravam em contato com o estigma e as anteras das flores, estruturas que estavam localizadas na mesma posição e altura na flor, ocasionando a transferência do pólen para o estigma, além disso, pousavam em mais de uma flor ocorrendo, provavelmente, a polinização cruzada (Figura 13).

Mellizo (2012), avaliando os efeitos das polinizações naturais por abelhas *Bombus impatiens* e *Apis mellifera*, e polinizações artificiais na qualidade dos frutos de *Physalis peruviana*, constatou que a quantidade e a qualidade do pólen são fatores importantes que afetam não apenas frutos e

sementes, mas, também, o desenvolvimento da prole e a resistência a herbívoros. A *Physalis peruviana* quando polinizada por *A. mellifera* e *B. impatiens* obteve melhoria na qualidade dos frutos, sugerindo que a adequada polinização pelo inseto deve ser considerada na gestão de estratégias para *P. peruviana*.

Em diferentes variedades de tomates, também, evidenciaram que a visita de abelhas que vibram às flores nas áreas de cultivo pode incrementar ainda mais as taxas de polinização. Houve um aumento de até 7% na taxa de frutificação após as visitas de abelhas (SILVA NETO et al., 2013; DEPRÁ et al., 2014). Além disso, comparando-se áreas de cultivo com diferentes taxas de visitação de abelhas, foram observadas taxas de frutificação até 12% maiores nas áreas onde as abelhas eram mais frequentes (GAGLIANONE et al., 2015)

Nas flores de *Physalis angulata* foi constatado que além do pólen outro recurso que é oferecido é o néctar. A partir da análise com vermelho neutro notou-se a presença de estruturas produtoras de odor, destacando os pontos pigmentados na corola (Figura 11). As moscas e as formigas que visitaram as flores provavelmente buscaram néctar, devido o comportamento de forrageamento (Figura 12). Nas flores do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) não há néctar e os seus visitantes florais buscam exclusivamente pólen. Além disso, as anteras soldadas em um cone com deiscência poricida restringe os visitantes florais desta planta. Assim, para a exposição do pólen, os visitantes precisam ser capazes de liberar este recurso floral, no caso as abelhas fêmeas dos gêneros *Melipona*, *Exomalopsis*, *Augochloropsis* e *Bombus* que são capazes de realizar o comportamento de vibração (GAGLIANONE et al., 2015).

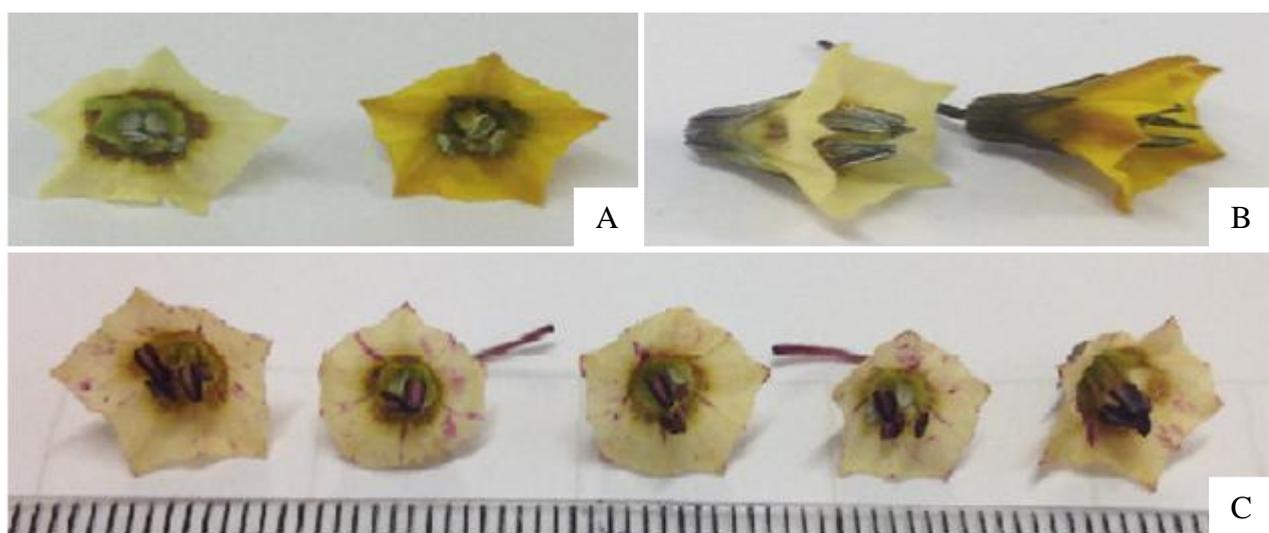


Figura 11: (A) Vista frontal da flor recém coletada e da flor após exposição ao hidróxido de amônia, respectivamente. (B) Vista lateral da flor recém coletada e da flor após exposição ao hidróxido de amônia, respectivamente. (C) Flores após serem submergidas na solução de vermelho neutro 0,1%.

A qualificação do visitante em termos de sua eficiência como polinizador não foi feita e em função disso, a denominação ficou restrita a visitantes florais. Quanto aos eventos de interação, insetos das ordens Hymenoptera foram os que mais visitaram as flores de *Physalis angulata*. A abelha *Apis mellifera*, foi a mais freqüente ao longo dos períodos de observação. Santos et al. (2016) afirmam que um polinizador ideal precisa de constância floral.

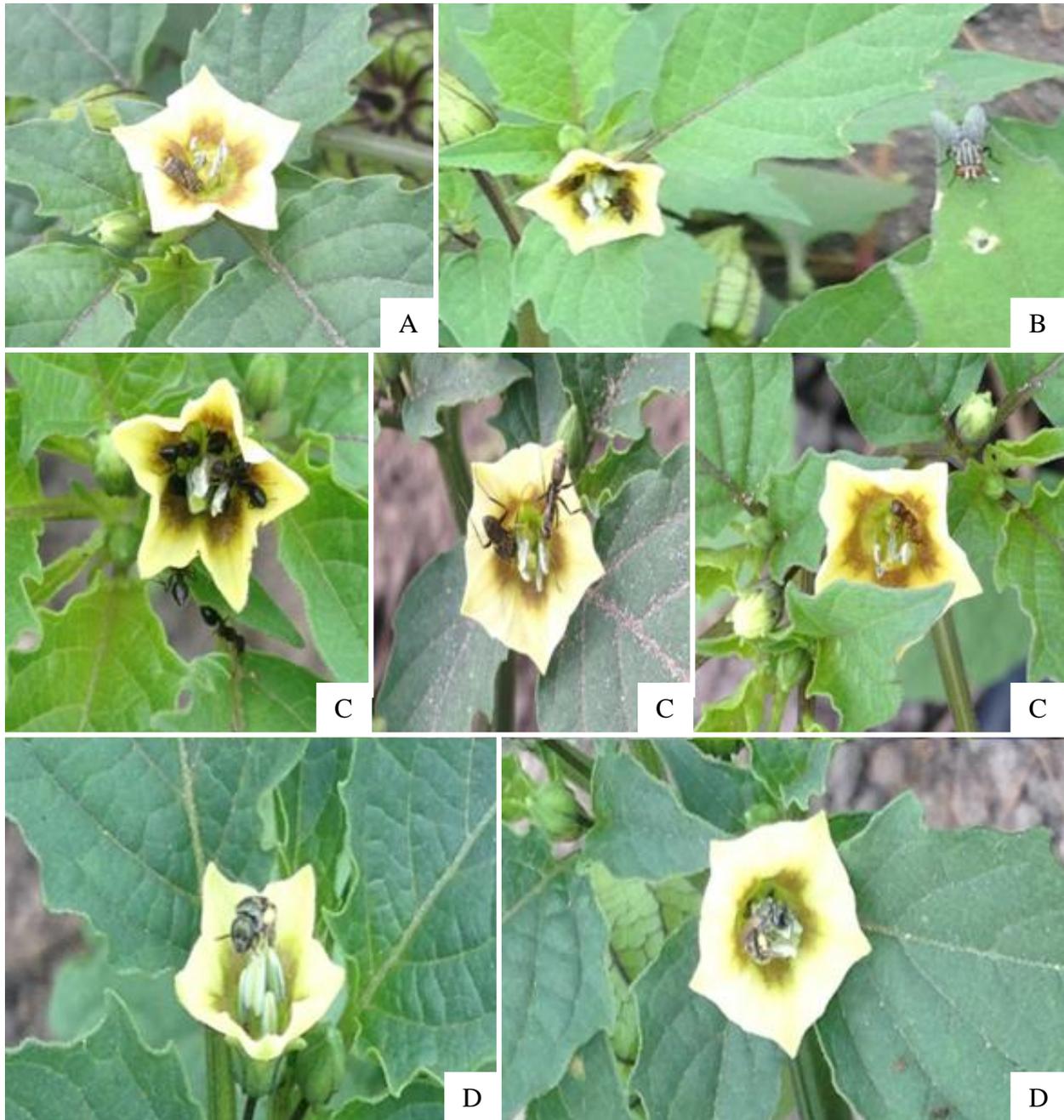


Figura 12: Visitantes das flores de *Physalis angulata*. (A) Diptera (B) Hymenoptera monopolizando a flor e provavelmente impedindo a visita do Diptera (C) Diferentes espécies de formigas. (D) Inseto coletando pólen.

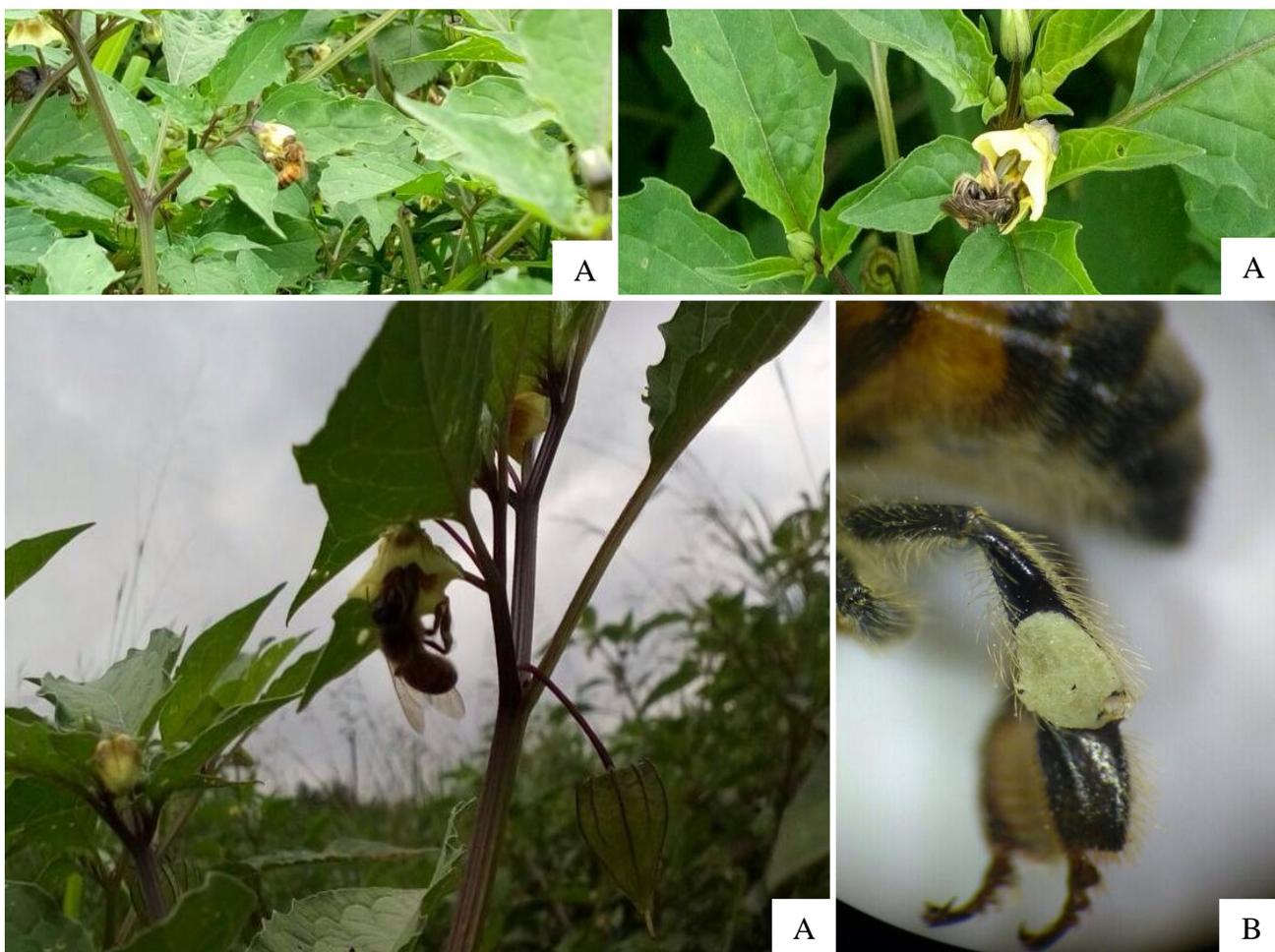


Figura 13: Visitantes das flores de *Physalis angulata*. (A) Abelha acessando os órgãos reprodutivos da flor; (B) Corbícula

CONCLUSÕES

1. A antese de *P. angulata* inicia às 6 horas e dura em média 2 dias, sendo que o ambiente em que elas vivem influência no horário de encerramento.
2. As flores de *P. angulata* secreta odor pela corola.
3. A *Physalis angulata* oferece polens e néctar como recursos florais.
4. Os insetos que mais visitaram as flores de *Physalis angulata* foram da Ordem Hymenoptera, sendo a espécie *Apis mellífera* a mais frequente.
5. O levantamento de visitantes florais é inédito para a espécie e precisa ser melhor estudado a fim de conhecer seus os polinizadores efetivos.
6. Devido a sua morfologia floral e os insetos mais frequentes, a síndrome de polinização provável é a melitofilia.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L.B., VELÁZQUEZ, A.; VASCONCELLOS-NETO, J. Composição florística de solanaceae e suas síndromes de polinização e dispersão de sementes em florestas mesófilas neotropicais. **Interciencia**. v. 31, n. 011, p. 807-816, 2006.
- BEATTIE, A.J. **The evolutionary ecology of antplant mutualisms**. Cambridge: Cambridge University Press., 1985.
- BARRET, S. C. H.; JESSON, L. K.; BAKER, A. M. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. **Annals of Botany**, 85, p. 253-265, 2000.
- BORGES, H. B. N. 2000. **Biologia reprodutiva e conservação do estrato lenhoso numa comunidade do Cerrado**. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- DEPRÁ, M.S.; DELAQUA, G.C.G.; FREITAS, L.; GAGLIANONE, M.C. Pollination déficit in open-field tomato crops (*Solanum Lycopersicum* L., Solanaceae) in Rio de Janeiro state, Southeast Brazil. **Journal of Pollination Ecology**, 12(1): 1-8., 2014.
- FAEGRI, K. ; VAN DER PIJL, L. **The principle of pollination ecology**. New York: Pergamon Press., 1980.
- FILHO, G. M. T.; LEAL, I. R. Influência da presença de formigas na ocorrência de visitantes florais em *Calotropis procera* ait. r. b **Anais...** VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Minas Gerais: 2007.
- GAGLIANONE, M.C., CAMPOS, M.J.O., FRANCESCHINELLI, E., DEPRÁ, M.S., SILVA, P.N., MONTAGNANA, P.C., HAUTEQUESTT, A.P., MORAIS, M.C.M. E CAMPOS, L.A.O. 2015. Plano de manejo para os polinizadores do tomateiro. Funbio, Rio de Janeiro.
- GERTZ, O. Ueber die Verbreitung des Anthochlors bei den Compositen. Kgl. Fysiogr. Sällsk. Lund. Förh., 8: 62-70. (Apud Scogin, R.; Young, D.A.; Jones Jr., C.E. 1977. Anthochlor pigments and pollination biology. II. The ultraviolet floral pattern of *Coreopsis gigantea* (Asteraceae). Bulletin of the Torrey Botanical Club, 104: 155-159), 1938.
- KEVAN, P. G.; BAKER, H. G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. **Ann. Ver. Entomol.** 28: 407-453, 1983.
- LAGOS, B. T. C.; CABRERA, F.A.V.; ESCOBAR, H.C.; FLÓREZ, J.E.M. **Biología reproductiva de la uchuva** ACTA AGRON (PALMIRA). 57 (2), 2008.
- LIGARRETO, G. A.; LOBO, M.; CORREA, A. **Recursos genéticos del género *Physalis* em Colombia** In: FISHER, G. et al. Avances em cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva *Physalis peruviana* L. em Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, 2005.
- MELLIZO, A. C. et al. Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. **Basic and Applied Ecology**. 13 524–532, 2012.

- MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; FILHO, P. E. M.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.2, p.209-214, 2008.
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F. E EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.856, 2007.
- RECH, A.R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P.E.; MACHADO, I.C. Recursos florais. In: Agostini, K.; Lopes, A.V.; Machado, I.C. **Biologia da polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014.
- RODRIGUEZ, F. **Identificación de la entomofauna benéfica asociada al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*)**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. p. 50, 2006.
- SILVA, A. H. B. Seleção e variabilidade genética para caracteres qualitativos e quantitativos em progênies de *Physalis angulata* L. (Solanaceae). 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.
- SILVA, E.M.S. et al. Biologia floral do pimentão (*Capsicum annuum*) e a utilização da abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) como polinizador em cultivo protegido. **Revista Ciência Agronômica**, v.36, n.3, p. 386-390, 2005.
- SILVA- NETO, C. M. **Biologia reprodutiva do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e influência das abelhas na produção de frutos**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2013
- SILVA-NETO, C.M.; LIMA, F.G.; GONÇALVES, B.B.; BERGAMINI, L.; BERGAMINI, B.A.R.; ELIAS, M.A.S.; FRANCESCHINELLI, E.V. Native bees pollinate tomato flowers and increase fruit production. **Journal of Pollination Ecology**, 11: 41-45p. 2013.
- VIDAL, W. N.; RODRIGUES, M. R. **Botânica: Organografia**. 4. ed. Viçosa: UFV. p.124, 2000.
- VOGEL, S. **The role of scent glands in pollination: On the structure and function of osmophores**. Rotterdam. A. A. Balkema. p. 202,1990.
- ZAMBON, V. **Biologia da polinização e eficácia de polinizadores em *Solanum melongena* L. (Solanaceae)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, 2015.