

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS**

SUZANA DOS SANTOS DE SOUZA

**BIOLOGIA FLORAL E REPRODUTIVA DE *Petunia interior* T. Ando & Hashim.
(SOLANACEAE)**

**CERRO LARGO
2020**

SUZANA DOS SANTOS DE SOUZA

**BIOLOGIA FLORAL E REPRODUTIVA DE *Petunia interior* T. Ando & Hashim
(SOLANACEAE)**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Linha de Pesquisa: Qualidade ambiental

Orientadora: Prof^a Dr^a Mardiore Pinheiro

Coorientadora: Prof^a Dr^a Carla Garlet de Pelegrin

CERRO LARGO

2020

RESUMO

O gênero *Petunia* Juss é representado por espécies herbáceas caracterizadas, principalmente, por possuir flores hermafroditas com diferentes cores (brancas, vermelhas e tons púrpuros) e interações com diferentes grupos de polinizadores (mariposas, beija-flores e abelhas). Considerando a existência de interações especializadas entre espécies de *Petunia* e abelhas oligoléticas, e que a sobrevivência destes insetos depende da conservação de suas plantas preferidas, evidenciamos a necessidade de conhecer e divulgar informações sobre a biologia floral e reprodutiva de *Petunia interior*, uma espécie, cujas flores são polinizadas por abelhas. O estudo foi realizado em uma área pertencente a Universidade Federal da Fronteira Sul, no município de Cerro Largo (28°08'29.5"S; 54°45'42.2"W), Rio Grande do Sul, Brasil, onde ocorrem populações naturais de *P. interior*. Foram investigadas: a morfologia floral (medidas dos verticilos florais, número de óvulos e de grãos de pólen/flor, e substâncias presentes no fluido locular da antera), a biologia floral (número de flores abertas por hora, longevidade floral, período de deiscência das anteras, receptividade do estigma, autodeposição espontânea de pólen sobre o estigma, volume e concentração do néctar) e a biologia reprodutiva (modos de reprodução através de experimentos de polinização, e sucesso reprodutivo através da análise das varáveis dos frutos). As flores de *P. interior* são púrpuras e o pólen é violáceo e coberto por *pollenkitt*. Além disso, possuem um tubo floral largo e curto que mantém inclusos os estames heterodínamos e o estigma, que apesar de próximos raramente resultaram em autopolinização. A abertura e senescência das flores ocorreram de forma assincrônica e as plantas mantiveram um display floral diário de 16,8 flores/indivíduo. As flores apresentaram um longo período de receptividade estigmática, deiscência gradual das anteras e liberação contínua de baixos volumes de néctar. Quanto ao sistema reprodutivo, apesar do registro de frutos formados por autogamia (10%), o ISI de 0,9 classificou a espécie como xenogâmica obrigatória. Assim, diante da ausência de déficit de polinização e da qualidade equivalente dos frutos formados no tratamento de polinização cruzada e polinização controle, concluímos que as características florais de *P. interior* foram essenciais para garantir a atratividade e consequente eficiência dos polinizadores na reprodução dessa espécie. Por fim, ressaltamos que este estudo foi de fundamental importância para conhecer a biologia de *P. interior*, que por apresentar interações com abelhas especializadas, deve ser alvo de preservação em seus ambientes naturais.

Palavras-chave: Antese. Atributos florais. Apresentação de recursos. Polinização. Sucesso reprodutivo.

ABSTRACT

The genus *Petunia* Juss is represented by herbaceous species characterized mainly by having hermaphrodite flowers with different colors (white, red and purple tones) and interactions with different groups of pollinators (hawkmoths, hummingbirds and bees). Considering the existence of specialized interactions between *Petunia* species and oligolectic bees, and that the survival of these insects depends on the conservation of their favorite plants, we highlight the need to know and disseminate information about the floral and reproductive biology of *Petunia interior*, a species, whose flowers are pollinated by bees. The study was conducted at the Experimental Station of the Federal University of Southern Frontier, (28°08'29.5"S; 54°45'42.2"W), Cerro Largo, Rio Grande do Sul, Brazil, where natural populations of *P. interior* occur. Were investigated: floral morphology (measurements of floral whorls, number of ovules and pollen grains/flower, and substances present in the anther's locular fluid), floral biology (number of flowers opened per hour, floral longevity, dehiscence period of the anthers, receptivity of stigma, spontaneous self-deposition of pollen on the stigma, volume and concentration of nectar) and reproductive biology (modes of reproduction through pollination experiments, and reproductive success through the analysis of fruit variables). The flowers of *P. interior* are purple and the pollen is violet and covered with pollenkitt. In addition, they have a wide and short floral tube that keeps heterodynamic stamens and stigma included, which despite being close to each other rarely resulted in self-pollination. The opening and senescence of the flowers occurred asynchronously and the plants maintained a floral display of 16,8 flowers/individual. The flowers showed a long period of stigmatic receptivity, gradual dehiscence of the anthers and continuous release of low volumes of nectar. Regarding the reproductive system, despite the registration of set fruit by autogamy (10%), the ISI of 0.9 classified the species as obligatory xenogamous. Thus, given the absence of pollination deficit and the equivalent quality of the fruits formed in the treatment of cross-pollination and control pollination, we conclude that the floral characteristics of *P. interior* were essential to ensure the attractiveness and consequent efficiency of the pollinators in the reproduction of this species. Finally, we emphasize that this study was of fundamental importance to understand the biology of *P. interior*, which, due to its interactions with specialized bees, should be the target of preservation in its natural environments.

Keywords: Anthesis. Floral attributes. Presentation of resources. Pollination. Reproductive success

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Souza, Suzana dos Santos de
BIOLOGIA FLORAL E REPRODUTIVA DE *Petunia interior* T.
Ando & Hashim (SOLANACEAE) / Suzana dos Santos de Souza.
-- 2020.
53 f.

Orientadora: Doutora Mardiore Tanara Pinheiro dos Santos

Co-orientadora: Doutora Carla Maria Garlet de Pelegrin

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo, RS, 2020.

1. Antese. Atributos florais. Apresentação de recursos. Polinização. Sucesso reprodutivo.. I. Santos, Mardiore Tanara Pinheiro dos, orient. II. Pelegrin, Carla Maria Garlet de, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

SUZANA DOS SANTOS DE SOUZA

**BIOLOGIA FLORAL E REPRODUTIVA DE *Petunia interior* T. Ando & Hashim.
(SOLANACEAE)**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Área de Concentração: Monitoramento, Controle e Gestão Ambiental

Linha de Pesquisa: Qualidade Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mardiore Tanara Pinheiro dos Santos

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Carla Maria Garlet de Pelegrin

Esta Dissertação foi defendida e aprovada pela banca em: 01/09/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Mardiore Tanara Pinheiro dos Santos - UFFS



Prof. Dr. Vinicius Lourenço Garcia de Brito – UFU



Prof^a. Dr^a. Kayna Agostini - UFSCar

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Fronteira Sul. Agradeço pela oportunidade de estudar em uma instituição com ensino gratuito e de qualidade.

À Professora Dr^a Mardiore Pinheiro. Obrigada por orientar mais esta etapa da minha formação. Sou muito grata pela oportunidade de conviver e aprender com você!

À professora Dr^a Carla Garlet de Pelegrin. Obrigada por coorientar e auxiliar a construção deste trabalho.

Ao meu amigo Rodrigo Ferraz, por se dedicar ao processamento e análises estatísticas dos dados obtidos neste estudo.

Aos técnicos do laboratório, pelo auxílio prestado todas as vezes que necessitei.

Aos meus colegas e ajudantes: Neli, Adriel, Ágatha, Paulo, Adriani, Roberta e Antônio Augusto. Sem vocês a realização deste trabalho seria muito difícil!

Aos meus amados pais: Adão e Norma. Agradeço por todo apoio que sempre dedicaram a mim. Obrigada por tudo!

Ao meu querido irmão Diego. Obrigada por existir junto comigo! Obrigada pelos dias que cuidou da minha casa enquanto eu estudava!

Ao meu amor e companheiro Alex. Obrigada por me apoiar e compreender a minha ausência!

Aos meus cachorros: Fiona, Zulu e Madá. Obrigada por tanto carinho e companheirismo!

A todos meus amigos que me acompanharam e torceram por mim! Vocês são muito especiais!

Por fim, agradeço especialmente a Deus e aos bons espíritos. Obrigada pela oportunidade de estudar, aprender e evoluir! Obrigada por me conduzir ao caminho de pessoas tão especiais! Afinal:

“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão”.

Chico Xavier

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sucesso reprodutivo de <i>Petunia interior</i> por tratamento de polinização, durante o período de estudo.	30
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Flores de diferentes espécies do gênero <i>Petunia</i> . A) <i>Petunia interior</i> T.Ando & Hashim.; B) <i>Petunia integrifolia</i> (Hook.) Schinz & Thell.; C) <i>Petunia bonjardinensis</i> T.Ando & Hashim.; D) <i>Petunia bajeensis</i> T.Ando & Hashim.; E) <i>Petunia alti plana</i> T.Ando & Hashim.; F) <i>Petunia inflata</i> R.E.Fr.; G) <i>Petunia saxicola</i> L.B.Sm. & Downs; H) <i>Petunia reitzii</i> L.B.Sm. & Downs; I) <i>Petunia scheideana</i> L.B.Sm. & Downs; J) <i>Petunia mantiqueirensis</i> T.Ando & Hashim.; K) <i>Petunia secreta</i> Stehmann & Semir; L) <i>Petunia exserta</i> Stehmann; M) <i>Petunia axillaris</i> (Lam.) Britton et al.....	10
Figura 2- Morfologia floral de <i>Petunia interior</i> . A) Flor em posição lateral. B) Flor em posição frontal. C) Estruturas reprodutivas. D) Reação positiva para lipídios no fluido locular da antera (seta).....	26
Figura 3- Número de flores abertas por hora em plantas individuais de <i>Petunia interior</i> (N= 20).	27
Figura 4- Média do número de flores de <i>Petunia interior</i> abertas por hora, durante o período de estudo (N= 20 indivíduos x duas repetições). Letras maiúsculas diferentes denotam diferença significativa entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knnot com 5% de probabilidade de erro.	28
Figura 5- Volume e concentração do néctar acumulado de <i>Petunia interior</i> durante os três dias de antese. (A) Média do volume por turno nos três dias de antese; (B) Média do volume por dia; (C) Média da concentração por turno nos três dias de antese. (D) Média da concentração por dia. (N= 432 flores; 8 flores/hora/dia x duas repetições). Letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.	29
Figura 6- Volume e concentração do néctar disponível de <i>Petunia interior</i> nos turnos manhã, meio-dia e tarde. As médias não resultaram em diferenças significativas pela análise de variância (ANOVA) com $\alpha = 5\%$ (N= 360 flores; 20 flores/hora x duas repetições). ns (não significativo).....	30
Figura 7- Taxa de fecundação nos tratamentos de polinização cruzada manual e autopolinização manual em flores de <i>Petunia interior</i> . Os valores foram coletados em diferentes intervalos de tempo após a polinização (N= 10 flores/hora para cada tratamento).....	31
Figura 8- Variáveis dos frutos de <i>Petunia interior</i> nos tratamentos de polinização e controle, durante o período de estudo, (Média \pm sd). Letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. APM (autopolinização manual); PCM (polinização cruzada manual); PC (polinização controle).	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 GÊNERO <i>PETUNIA</i> JUSS.	9
2.1.1.1 Espécies, distribuição e importância	9
2.1.1.2 Características e síndromes florais	11
2.1.1.3 Biologia reprodutiva.....	13
2.1.1.4 Polinização e polinizadores.....	14
3 RESULTADOS	16
3.1 BIOLOGIA FLORAL E REPRODUTIVA DE <i>PETUNIA INTERIOR</i> (SOLANACEAE).....	17
3.1.1 INTRODUÇÃO	20
3.1.2 METODOLOGIA.....	21
3.1.2.1 LOCAL DE ESTUDO.....	21
3.1.2.2 MORFOLOGIA FLORAL	22
3.1.2.3 BIOLOGIA FLORAL	22
3.1.2.4 BIOLOGIA REPRODUTIVA	23
3.1.2.5 ANÁLISE DOS DADOS.....	24
3.1.3 RESULTADOS	24
3.1.3.1 MORFOLOGIA FLORAL	24
3.1.3.2 BIOLOGIA FLORAL	26
3.1.3.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA	30
3.1.4 DISCUSSÃO	32
3.1.4.1 MORFOLOGIA FLORAL	32
3.1.4.2 BIOLOGIA FLORAL	33
3.1.4.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA	35
3.1.5 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	38
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO GERAL

As angiospermas possuem a maior diversidade dentre as embriófitas, com pelo menos 295.383 espécies conhecidas (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016). Embora a compreensão da diversificação dessas plantas continue sendo um dos grandes desafios da biologia (SAUQUET; MAGALLÓN, 2018), foi reconhecido que além de fatores climáticos, geográficos e genéticos, entre outros (VAMOSI; VAMOSI, 2011; VAMOSI et al. 2018), as interações com diferentes grupos de polinizadores resultaram na diversificação de várias linhagens das plantas com flores (FOREST et al. 2014).

Cerca de 78% das espécies de angiospermas em locais de clima temperado e 94% em regiões tropicais dependem de polinização biótica para reprodução (OLLERTON et al. 2011). Assim, para garantir a polinização, as plantas desenvolveram flores com diferentes formatos, tamanhos, cores e recursos para atrair e recompensar os polinizadores (FENSTER et al. 2004). A maioria das plantas oferecem recursos que devem preencher pelo menos uma necessidade do polinizador: alimentação, reprodução ou construção do ninho, sendo os recursos alimentares (principalmente o pólen e néctar) os principais responsáveis pela visitação (AGOSTINI et al. 2014). Além da oferta de recursos, as plantas costumam potencializar a taxa de visitação através de mecanismos florais, como por exemplo: liberação gradual de recursos, display e longevidade floral, dentre outros que podem ser identificados através do estudo da biologia floral de uma espécie.

Petunia Jussieu (Solanaceae) é um gênero endêmico da região sul-americana, composto por 14 espécies, que são dependentes de polinizadores para a reprodução (STEHMANN et al. 2009; FLORA DO BRASIL, 2020). Essas espécies são caracterizadas por apresentar flores vistosas com diferentes cores e formatos, e por oferecer pólen e néctar como recursos aos seus visitantes, além disso, as petúnias apresentam estreita relação com polinizadores específicos (abelhas, mariposas noturnas e beija-flores) (STEHMANN et al. 2009; GÜBITZ et al. 2009). Inclusive, algumas são consideradas espécies chaves para a conservação de abelhas oligoléticas, como por exemplo, *Hexanthesa missionica* (Colletidae) e *Callonichium petuniae* (Andrenidae), que são especializadas na coleta de pólen de algumas espécies púrpuras de *Petunia* (WITTMANN et al. 1990; CASTELLANI; LOPES, 2002; SOUZA et al. 2019).

Abelhas oligoléticas são definidas por coletar pólen de um único gênero ou família de planta para alimentar suas larvas (LINSLEY, 1958) e, em alguns casos, são os principais polinizadores das plantas que visitam (MILET-PINHEIRO; SCHLINDWEIN, 2010). Portanto, para que haja proteção dessas relações, faz-se necessário o conhecimento da biologia dos polinizadores e das plantas, bem como de suas interações.

Nesse sentido, através deste estudo objetivamos descrever a biologia floral e reprodutiva de *Petunia interior*, uma espécie do grupo das petúnias púrpuras, polinizada por abelhas, incluindo abelhas oligoléticas (SOUZA et al. 2019). Para isso descrevemos: a morfologia da flor, a biologia floral (duração da flor, número de flores abertas, período e sequência da antese) e a biologia reprodutiva (modo de reprodução e o sucesso reprodutivo em diferentes tratamentos de polinização).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *PETUNIA* JUSS.

2.1.1.1 Espécies, distribuição e importância

Petunia Juss é uma solanácea pertencente à Subfamília Petunioideae (APG IV, 2017) com 14 espécies reconhecidas (STEHMANN et al. 2009; FLORA DO BRASIL, 2020). De modo geral, as espécies são herbáceas, anuais e possuem corola pentâmera com pétalas fusionadas (Figura 1). Para a maioria das espécies, as corolas são púrpuras, zigomorfas de formato infundibuliforme e o pólen é violáceo (Figura 1, A – J). As demais espécies compartilham corolas actinomorfas de formato hipocrateriforme e pólen amarelo, enquanto diferem na coloração das flores (Figura 1, K – M).

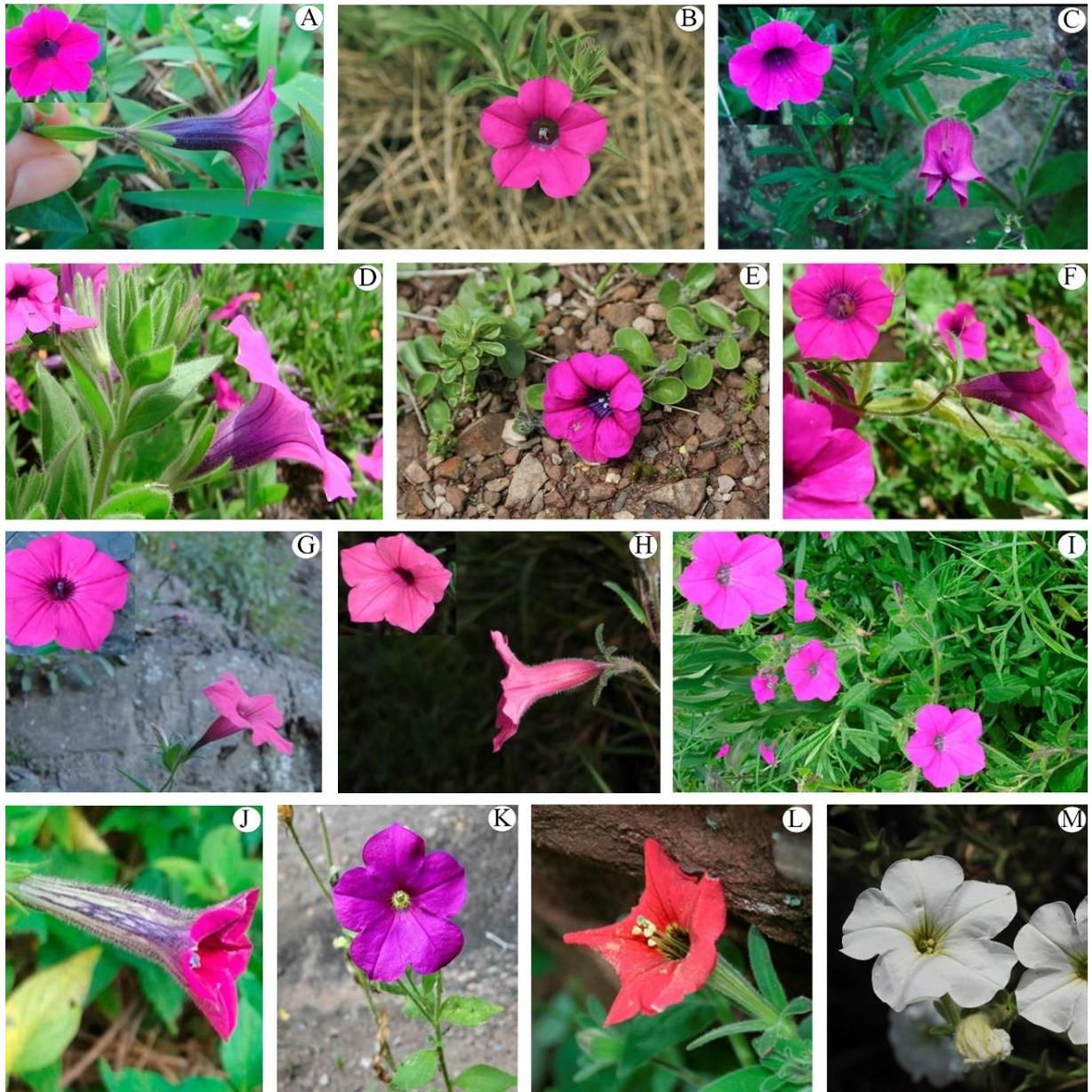


Figura 1- Flores de diferentes espécies do gênero *Petunia*. A) *Petunia interior* T.Ando & Hashim.; B) *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell.; C) *Petunia bonjardinensis* T.Ando & Hashim.; D) *Petunia bajeensis* T.Ando & Hashim.; E) *Petunia altiplana* T.Ando & Hashim.; F) *Petunia inflata* R.E.Fr.; G) *Petunia saxicola* L.B.Sm. & Downs; H) *Petunia reitzii* L.B.Sm. & Downs; I) *Petunia scheideana* L.B.Sm. & Downs; J) *Petunia mantiqueirensis* T.Ando & Hashim.; K) *Petunia secreta* Stehmann & Semir; L) *Petunia exserta* Stehmann; M) *Petunia axillaris* (Lam.) Britton et al.

Fonte. Elaborada pelo autor. Imagens adaptadas de Heck-kortmann et al. (2014); Araújo et al. (2019) e Flora digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina – UFSC

(*P. altiplana* e *P. exserta*, fotografadas por Eduardo L. Giehl; *P. axillaris*, fotografada por Sérgio Bordignon e *P. secreta*, fotografada por Daniel D. Saraiva).

A distribuição do gênero inclui às regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, que compreendem as planícies entre 0 e 500 m de altitude das regiões pampeanas do Uruguai, Argentina e Brasil, e o planalto sul-brasileiro nas regiões de 500 até 900 m de altitude dos estados Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (STEHMANN et al. 2009). Além disso, três espécies de *Petunia* ocorrem em áreas disjuntas: *P. occidentalis*, ocorrendo nas regiões sub-andinas da Bolívia e Argentina, *Petunia axillaris* ssp. *subandina*, que ocorre na região sub-andina da Argentina e *P. mantiqueirensis*, distribuída nos campos de altitude do estado de Minas Gerais (STEHMANN et al. 2009).

As flores de petúnia são mundialmente conhecidas através do híbrido ornamental petúnia-de-jardim (*Petunia x hybrida*), obtido artificialmente através do cruzamento interespecífico entre *P. axillaris* e uma espécie púrpura do grupo *P. integrifolia* (SEGATTO et al. 2014). A ampla variedade de cores e tamanhos das flores faz do comércio desse híbrido um importante recurso econômico para muitos países (STEHMANN et al. 2009). Além disso, devido a características que incluem capacidade de cruzamento interespecífico, curto ciclo de vida, fáceis condições de cultura e alta capacidade de transformação genética, as petúnias têm uma longa história como plantas modelos em estudos de biologia molecular e genética de plantas (VANDENBUSSCHE et al. 2016). Além dessas características, a relação com diferentes grupos funcionais de polinizadores faz do gênero *Petunia* um excelente sistema modelo para estudar a evolução das síndromes de polinização (ou síndromes florais) (GALLIOT et al. 2006).

2.1.1.2 Características e síndromes florais

Conjunto de atributos florais (que incluem cores, formas, tamanhos, atrativos e recursos) associados a grupos específicos de polinizadores são conhecidos como síndromes florais ou de polinização (FAEGRI; VAN DER PJIL, 1971, RECH et al. 2014). Este conceito sugere que as plantas se especializam em determinados grupos de polinizadores ao longo do seu processo evolutivo (FENSTER et al. 2004). No entanto, o conceito é questionado quando flores correspondentes a uma síndrome de polinização específica são visitadas e, por vezes, polinizadas por outros

grupos de polinizadores (GÜBITZ et al. 2009; OLLERTON et al. 2009; ROSAS-GUERRERO et al. 2014).

Para o gênero *Petunia* são atribuídas três síndromes florais (melitofilia, esfingofilia e ornitofilia). A melitofilia (polinização por abelhas) é atribuída a maior parte das espécies de *Petunia*, as quais geralmente apresentam flores púrpuras, tubo floral largo e curto, pólen violáceo, baixa produção de néctar e quase nenhum perfume (STEHMANN et al. 2009; GÜBITZ et al. 2009; ARAÚJO et al. 2019). Essas características são incomuns apenas para a espécie melitófila *P. secreta*, que apresenta flores com pólen amarelo, maior produção de néctar e um tubo floral comprido e estreito (RODRIGES et al. 2018a). A esfingofilia (polinização por mariposas noturnas) é relatada para *P. axillaris*, que possui flores brancas, corola com tubo floral estreito, pólen amarelo, alto volume de néctar e produção de forte odor ao entardecer (GÜBITZ et al. 2009). Por fim, a ornitofilia (polinização por pássaros) é descrita para *P. exserta*, que apresenta flores vermelhas, corola com tubo floral estreito e comprido, pólen amarelo, estruturas reprodutivas que se sobressaem à corola e produção de grandes quantidades de néctar (GÜBITZ et al. 2009).

Embora diferentes síndromes florais tenham sido descritas para as espécies do gênero *Petunia*, conforme Rosas-Guerrero et al. (2014), o posicionamento das espécies como representantes de uma única síndrome pode mascarar a existência e importância de polinizadores secundários em algumas. Como exemplos em *Petunia*, Hoballah et al. (2007) observaram que além das visitas de mariposas noturnas, *P. axillaris* também foi visitada por besouros e abelhas durante o dia, e após isolar populações da planta e permitir que somente polinizadores diurnos ou noturnos realizassem visitas, constataram que ambos os grupos são polinizadores eficazes de *P. axillaris*. Segatto et al. (2014) registraram a ocorrência de híbridos naturais entre *P. exserta* (ornitófila) e *P. axillaris*, produzidos pelo compartilhamento da visita de beija-flores. Além desses, Rodrigues et al. (2018a) observaram que *P. secreta* (melitófila) possui alguns traços morfológicos e de composição do néctar característicos de polinização por aves e, ocasionalmente, a espécie recebeu visita de beija-flores. Nesse sentido, essas informações sugerem que as síndromes florais de *Petunia* foram definidas por conjuntos de traços florais associados aos principais e mais efetivos grupos de polinizadores (abelhas, mariposas noturnas e beija-flores),

mas que polinizadores secundários ocorrem e podem desempenhar um papel importante na reprodução dessas espécies.

2.1.1.3 Biologia reprodutiva

Dentre as 14 espécies do gênero *Petunia*, o sistema reprodutivo autógamo foi registrado para *P. exserta*, *P. secreta* e *P. axillaris*, enquanto a xenogamia obrigatória é considerada uma condição comum entre algumas populações de *P. axillaris* subespécie *axillaris* e as demais espécies (STEHMANN, 1999; KOKUBUN et al. 2006; RODRIGUES et al. 2018b; ARAÚJO et al. 2019).

O gênero *Petunia* apresenta sistema de autoincompatibilidade do tipo gametofítico, que se relaciona a interação de proteínas alélicas expressas no pólen e no estilete, as quais são codificadas por um único locus (locus S) multialélico (SIMS; ROBBINS, 2009). Nesse sentido, se o haplótipo formado no pólen corresponder a um dos haplótipos formados no estilete, o crescimento do tubo polínico é inibido (SIMS; ROBBINS, 2009). Conforme Shivanna e Sharma (1985), o pólen incompatível de *Petunia* germina normalmente na superfície estigmática, mas tem seu crescimento inibido na região logo abaixo do estigma (entre 2 e 3 mm). No entanto, mesmo na presença de um sistema reprodutivo autoincompatível pode ocorrer um baixo índice de formação de frutos por autogamia. Isto foi registrado em *Petunia inflata* (LEE et al. 1994) e *P. axillaris* subsp. *axillaris* (população autoincompatível) (TZUKAMOTO et al. 1999), devido a falha na expressão de um dos alelos S do pistilo, que teriam como função rejeitar o autopólen. Além disso, as espécies autoincompatíveis de *Petunia* podem formar sementes por autofecundação quando botões imaturos são polinizados, pois estiletos jovens ainda não expressam o gene S e permitem normalmente o crescimento do tubo polínico e fecundação (LEE et al., 1994).

Outra característica importante do sistema reprodutivo das petúnias é a compatibilidade interespecífica. A formação de híbridos neste gênero é conhecida desde o século XIX, quando o híbrido obtido do cruzamento de *P. axillaris* e uma espécie púrpura do grupo *P. integrifolia* já era amplamente utilizado como ornamental nos jardins europeus (STEHMANN, 1999). Ando et al. (2001) demonstraram que *P. axillaris* serve como progenitor de sementes híbridas, enquanto a espécie púrpura *P. integrifolia* raramente aceita o pólen interespecífico. Além dessas duas espécies, híbridos também ocorrem através do cruzamento entre

P. axillaris e *P. exserta* (LORENZ-LEMKE et al. 2006; SEGATTO et al. 2014). Esses autores relatam que estas espécies ocorrem em simpatria e, ao contrário das espécies também simpátricas *P. axillaris* e *P. integrifolia* (ANDO et al. 2001), formam híbridos naturalmente. Tais híbridos somente ocorrem se houver compartilhamento de polinizadores (ANDO et al. 2001; LORENZ-LEMKE et al. 2006).

2.1.1.4 Polinização e polinizadores

A reprodução sexual das angiospermas depende da deposição precisa de grãos de pólen sobre os estigmas coespecíficos e, para isso, dependem de vetores bióticos ou abióticos para promover a polinização (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2014). Em *Petunia* a polinização é biótica e realizada principalmente por abelhas, mariposas e beija-flores (GÜBITZ et al. 2009).

Os polinizadores são responsáveis pelo isolamento reprodutivo das espécies simpátricas de *Petunia* quando estas não dispõem de isolamento pré-zigótico (ANDO et al. 2001; HOBALLAH et al. 2007). Ao estudar as populações de *P. axillaris* e *P. integrifolia* que compartilham um mesmo local de ocorrência no Rio Grande do Sul, Ando et al. (2001) associaram a ausência de híbridos naturais ao fato de que as flores de *P. axillaris* foram exclusivamente visitadas pelas mariposas noturnas do gênero *Manduca*, enquanto as flores de *P. integrifolia* receberam apenas visitas de uma abelha diurna do gênero *Hexanthera*. Para populações naturais do Uruguai, Hoballah et al. (2007) também associaram a ausência de híbridos entre *P. axillaris* e *P. integrifolia* à visita de tipos específicos de polinizadores, no entanto, observaram que as espécies atraíram um espectro mais amplo de visitantes: as flores de *P. axillaris* receberam visitas de abelhas e besouros durante o dia e foram exclusivamente visitadas por mariposas durante a noite, enquanto as flores de *P. integrifolia* não receberam visitas noturnas e foram visitadas por abelhas e borboletas durante o dia. Estes autores ainda explicam que embora *P. axillaris* receba visitas de abelhas, as espécies registradas não foram as mesmas que visitam as flores de *P. integrifolia*.

Ao contrário das espécies anteriores, a formação de híbridos naturais entre *P. axillaris* e *P. exserta* em uma região onde essas espécies ocorrem em simpatria, ocorreu pelo compartilhamento de polinizadores, em que beija-flores foram registrados visitando flores de *P. exserta*, *P. axillaris* e híbridos destas espécies (LORENZ-LEMKE et al. 2006, SEGATTO et al. 2014).

Tratando das interações planta-polinizador, relações altamente especializadas são reportadas para *Petunia*, tais como a relação entre algumas espécies púrpuras e abelhas oligoléticas, dentre estas, *Hexanthesa missionica* (Colletidae) foi o principal polinizador de *Petunia integrifolia* (citada como *Petunia littoralis*) em Santa Catarina (CASTELLANI; LOPES, 2002) e *Callonichium petuniae* (Andrenidae) foi registrada em diferentes espécies de petúnias púrpuras, coletando pólen e utilizando as flores como um local de encontro e acasalamento (WITTMANN et al. 1990).

O fato de depender do pólen de um único gênero ou família de plantas para alimentar suas larvas, torna as abelhas oligoléticas vulneráveis frente à escassez de flores, podendo declinar significativamente suas populações, logo, estas interações devem ser alvos de conservação (PINHEIRO et al. 2014). Portanto, para qualquer esforço de conservação dos polinizadores, é necessário conhecer, além das suas fontes de recursos, a biologia de suas plantas preferidas.

3 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados na seção 3.1, em forma de um artigo científico intitulado “**Biologia floral e reprodutiva de *Petunia interior* T. Ando & Hashim. (Solanaceae)**”. Este artigo, que será submetido a uma revista científica para avaliação, aborda os seguintes aspectos estudados em *Petunia interior*: morfologia e biologia floral, biologia reprodutiva e sucesso reprodutivo em diferentes tratamentos de polinização.

3.1 BIOLOGIA FLORAL E REPRODUTIVA DE *PETUNIA INTERIOR* T. Ando & Hashim. (SOLANACEAE)

FLORAL AND REPRODUCTIVE BIOLOGY OF *PETUNIA INTERIOR* T. Ando & Hashim. (SOLANACEAE)

Autor¹: Suzana dos Santos de Souza, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Cerro Largo, R. Major Antônio Cardoso 590, 97900-000, Cerro Largo, RS, Brasil.

Autor²: Rodrigo Ferraz Ramos, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria – RS, Brasil.

Autor³: Carla Maria Garlet de Pelegrin, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Cerro Largo, R. Major Antônio Cardoso 590, 97900-000, Cerro Largo, RS, Brasil.

Autor⁴: Mardiore Pinheiro, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Cerro Largo, R. Major Antônio Cardoso 590, 97900-000, Cerro Largo, RS, Brasil.

RESUMO

Petunia é um gênero endêmico da América do Sul, cujas espécies apresentam flores com cores e formatos estreitamente relacionados a tipos específicos de polinizadores. Inclusive, interações altamente especializadas entre abelhas oligoléticas e flores púrpuras desse gênero são reportadas. Isso evidencia a necessidade de preservar as petúnias em seus ambientes naturais e, para tanto, é importante conhecê-las. Com este objetivo, neste estudo descrevemos a morfologia da flor, a biologia floral e a biologia reprodutiva de *Petunia interior*, uma espécie polinizada por abelhas. O estudo foi realizado em uma área pertencente a Universidade Federal da Fronteira Sul (28°08'29.5"S; 54°45'42.2"W), Cerro Largo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Petunia interior* apresentou órgãos reprodutivos inclusos e relativamente próximos, mas que não resultaram em autopolinização espontânea. Essa espécie dispõe de características florais, tais como: alto display floral, abertura assincrônica de flores, longo período de receptividade estigmática, liberação gradual do pólen e produção contínua de baixos volumes de néctar durante a antese. Quanto ao sistema reprodutivo, a espécie é xenogâmica obrigatória. A ausência de déficit de polinização e a equivalência da qualidade dos frutos formados em condições naturais e por tratamento de polinização cruzada, evidenciam que as características florais de *P. interior* são favoráveis a atração dos polinizadores e, conseqüentemente, à promoção da polinização cruzada.

Palavras-chave: Atributos florais. Apresentação de recursos. Recursos florais. Sucesso reprodutivo. Xenogamia.

ABSTRACT

Petunia is an endemic genus from South America, whose species have flowers with colors and shapes closely related to specific types of pollinators. Furthermore, specialized interactions between oligolectic bees and purple flowers of this genus have been reported. This highlights the necessity to preserve petunias in their natural environments and, therefore, it is important to know them. For this purpose, in this study we describe the morphology of the flower, as well as the floral and reproductive biology of *Petunia interior*, a species pollinated by bees. The study was conducted in an area belonging of the Federal University of Southern Frontier, (28°08'29.5"S; 54°45'42.2"W), Cerro Largo, Rio Grande do Sul, Brazil. *Petunia interior* presented reproductive organs included and relatively close, however they did not result in spontaneous self-pollination. This species presents floral characteristics, such as: high floral display, asynchronous flowering, long period of stigma receptivity, gradual release of pollen and continuous production of low nectar volumes during anthesis. As for the reproductive system, the species is obligatory xenogamy. The absence of pollination deficit and the equivalence of the quality of the fruits formed in natural conditions and by cross-pollination treatment, evidence that the floral characteristics of *P. interior* are favorable to attraction of pollinators and, consequently, for performing cross-pollination.

Keywords: Floral attributes. Presentation of resources. Floral resources. Reproductive success. Xenogamy.

3.1.1 INTRODUÇÃO

Para minimizar as chances de autopolinização, plantas com flores hermafroditas podem evitar a interação espontânea entre o pólen e o estigma através de estratégias, como separação espacial dos órgãos reprodutivos (hercogamia) e separação temporal da maturação dos mesmos (dicogamia) (WEBB; LLOYD, 1986; LLOYD; WEBB, 1986). A autopolinização ainda pode ser evitada pela presença de compostos lipídicos (*pollenkitt*, trífina ou elastoviscina) no fluido locular da antera, os quais funcionam como um adesivo para manter o pólen firmemente aderido às anteras (PACINI; HESSE, 2005). Além dessas estratégias florais, plantas com flores hermafroditas ainda podem dispor de sistemas reprodutivos de incompatibilidade (GIBBS, 2014), que impedem a autogamia.

Visto que a maioria das angiospermas são polinizadas por vetores bióticos (OLLERTON et al. 2011), as flores exibem atributos para promover a polinização. Recursos alimentares, por exemplo, são utilizados para atrair e recompensar polinizadores (FAEGR; VAN DER PJIL, 1971). Além disso, as plantas possuem mecanismos para otimizar a frequência e o comportamento dos visitantes às suas flores, tais como magnitude do display floral (MITCHELL et al. 2004; KARRON; MITCHELL, 2012) e liberação gradual do pólen (SIRIANI-OLIVEIRA et al. 2018) e do néctar. Assim, ao atrair polinizadores e influenciar no seu comportamento de visitas, facilitam a polinização cruzada e, conseqüentemente, o sucesso reprodutivo da espécie, que é intensificado quando os polinizadores são fiéis às plantas que visitam (ALVES-DOS-SANTOS et al. 2016).

Petunia Juss. (Solanaceae) é um gênero com flores hermafroditas, constituído por 14 espécies endêmicas de áreas subtropicais e temperadas da América do Sul, cujo centro de diversidade ocorre no sul do Brasil (STEHMANN et al. 2009). Essas espécies são caracterizadas por apresentar flores com diferentes cores, formatos e demais traços relacionados a tipos específicos de polinizadores, sendo três síndromes florais descritas para o gênero: esfingofilia para *P. axillaris*, ornitofilia para *P. exserta* e melitofilia para as demais espécies (GÜBITZ et al. 2009; STEHMANN et al. 2009), embora a espécie *P. secreta* também apresente traços ornitófilos, além de melitófilos (ver RODRIGUES et al. 2018a).

Além disso, interações com polinizadores especialistas são reportadas para esse gênero, tais como as interações com as abelhas oligoléticas *Callonichium*

petuniae e *Hexanthera missionica*, ambas descritas como principais polinizadoras de *Petunia integrifolia* (WITTMANN et al. 1990; CASTELLANI; LOPES, 2002) e *Petunia interior* (SOUZA, S. et al. 2020, dados não publicados). Larvas dessas abelhas são dependentes de fontes específicas de pólen para a alimentação, portanto, as interações desses insetos com suas fontes de pólen deve ser alvo de conservação (PINHEIRO et al. 2014), para isso, tais interações devem ser esclarecidas.

Considerando que o estudo da biologia da flor é uma parte fundamental para compreensão e descrição das interações entre planta-polinizadores, neste estudo investigamos a biologia floral e reprodutiva de *Petunia interior* T. Ando & Hashim., que ocorre naturalmente no Sul do Brasil e na província de Misiones (Argentina) (ANDO; HASHIMOTO, 1996; ANDO et al. 2005). Para tanto, examinamos e descrevemos os seguintes aspectos: 1- morfologia floral (medidas dos verticilos florais; número de óvulos e de grãos de pólen/flor; substâncias presentes no fluido locular da antera); 2- biologia floral (número de flores abertas por hora; longevidade floral; período de deiscência das anteras; receptividade do estigma; autodeposição espontânea de pólen sobre o estigma e volume e concentração do néctar); 3- biologia reprodutiva (modo de reprodução), 4- sucesso reprodutivo (massa, diâmetro e número de sementes/fruto em diferentes tratamentos de polinização e flores controle).

3.1.2 METODOLOGIA

3.1.2.1 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado entre os meses de setembro e dezembro de 2019 na estação experimental e laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul (28°08'29.5"S; 54°45'42.2"W) no município de Cerro Largo, Rio Grande do Sul, onde ocorrem populações naturais de *Petunia interior*. A vegetação natural do município é representada pela Floresta Estacional Decidual (IBGE, 2012). Conforme a classificação climática de Köppen, o clima é do tipo Cfa, subtropical úmido, com verões quentes e sem estação seca definida. A precipitação anual varia de 989,3 a 2748,7 mm (RIBEIRO et al. 2012). O solo predominante é classificado como Latossolo Vermelho Distroférico (STRECK et al. 2018) e é caracterizado por

apresentar um perfil profundo de coloração vermelha escura, boa drenagem, textura argilosa com predominância de argilominerais e óxi-hidróxidos de ferro e alumínio (SANTOS et al. 2013).

3.1.2.2 MORFOLOGIA FLORAL

Foram registradas as medidas do diâmetro da corola (limbo) aberta, comprimento do tubo floral e câmara nectarífera em 20 flores (uma flor/indivíduo). O número de óvulos foi registrado em 30 gineceus dissecados sob estereomicroscópio. O número de grãos de pólen por flor foi estimado através da contagem de 30 anteras de botões em pré-antese de diferentes indivíduos (uma antera/botão/indivíduo), com uso de câmara de Neubauer (MOURA et al. 1987) e microscópio óptico. Além disso, anteras deiscuentes foram esmagadas entre lâmina e lamínula com Sudan III (SASS, 1951), e levadas sob microscopia óptica para a verificação da presença de compostos lipídicos no fluido locular.

3.1.2.3 BIOLOGIA FLORAL

O número de flores abertas/hora na população foi verificado através da contagem das flores abertas de 20 plantas, durante dois dias consecutivos, das 7:30 às 18:30, sendo que uma destas repetições foi utilizada para mostrar o padrão de abertura e senescência das flores/indivíduo. A abertura da corola e deiscência das anteras foi registrada em 20 flores protegidas, anotando-se, a cada 30 minutos, o estágio de abertura da corola e das anteras. A longevidade floral foi determinada em 10 flores ensacadas em botão e 10 flores disponíveis aos visitantes.

A receptividade do estigma foi testada através do método de atividade peroxidásica (DAFNI, 1992) em seis flores ensacadas/hora (entre 8:00 e 16:00) e duas repetições (N= 108 flores analisadas/dia de antese). A presença de autodeposição de pólen no estigma foi verificada a campo em oito flores ensacadas/hora (entre 8:00 e 16:00), em duas repetições (N= 144 flores analisadas/dia de antese).

O volume e a concentração do néctar acumulado e disponível foram verificados de hora em hora, das 8:00 às 16:00 com uso de uma microsseringa (10 µL) e um refratômetro de mão [®] Instrutherm, modelo RT-30ATC. Foram realizadas

duas repetições e utilizou-se oito flores/hora (N= 144 flores analisadas/dia de antese) (ensacadas em botão) para néctar acumulado, e 20 flores/hora (N= 183 flores/repetição) para néctar disponível. Para descrição dos resultados, os dados do néctar acumulado e disponível foram divididos em turnos: manhã (das 8:00 às 10:00), meio-dia (das 11:00 às 13:00) e tarde (das 14:00 às 16:00).

3.1.2.4 BIOLOGIA REPRODUTIVA

O modo de reprodução foi verificado através de testes de polinização, com flores numeradas e previamente ensacadas em botão (N= 30 flores/tratamento) conforme metodologia descrita por Radford et al. (1974): polinização cruzada manual (PCM) – estigmas polinizados com pólen retirado de flores de indivíduos diferentes; autopolinização manual (AP) – estigmas polinizados com pólen da mesma flor e autopolinização espontânea (AE) – flores protegidas e não manuseadas. Todas as flores foram mantidas ensacadas até o registro da formação ou não formação de frutos (período de uma semana). Após a maturação (aprox. 30 dias) os frutos foram coletados e para cada tratamento foram registrados o número de frutos formados, diâmetro longitudinal e equatorial dos frutos, massa dos frutos e número de sementes por fruto. Estas variáveis também foram registradas para os frutos formados em condições naturais (controle) (PC) (N= 30).

O índice de autoincompatibilidade (ISI) foi classificado conforme Raduski et al. (2012): xenógamo- $ISI \geq 0,8$; parcialmente xenógamo- $0,2 < ISI < 0,8$; autógamo- $ISI \leq 0,2$. Para o cálculo do ISI foi utilizada a fórmula proposta por Lloyd (1965):

$$ISI = \frac{n^{\circ} \text{ de frutos formados por autopolinização manual}}{n^{\circ} \text{ de frutos formados por polinização cruzada manual}}$$

O déficit de polinização (DP) foi avaliado conforme Vaissière et al. (2011) através do cálculo da diferença entre a porcentagem de frutos formados por PCM e PC. Valores negativos significam que a espécie não apresenta déficit de polinização no local de estudo.

O crescimento do tubo polínico foi verificado em flores com tratamento de polinização cruzada manual e autopolinização manual. Passados intervalos de 12 horas, até completar 72 horas após as polinizações, pistilos (N= 10/hora) foram fixados em FAA 70% e, posteriormente, observados em microscópio com fluorescência (MARTIN et al. 1959).

3.1.2.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e teste de homocedasticidade (Samiuddin), com significância de 5%. Os dados que não mostraram normalidade dos resíduos ou homogeneidade da variância foram transformados pela equação $y(\lambda) = \sqrt[2]{y} + c$ (PINO, 2014). As médias e o erro padrão (\pm) para o número médio de flores abertas/hora, volume e concentração do néctar disponível de *P. interior* durante o período de estudo foram calculados usando o software Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft®). Devido ao elevado número de horários amostrados as médias para o número de flores abertas/hora foram comparadas entre si pelo método de agrupamento divisivo hierárquico de Skott-Knott com um nível de confiança de 95%, utilizando o pacote ExpDes.pt (FERREIRA et al. 2018). As taxas de fecundação nos tratamentos de polinização cruzada e autopolinização foram comparadas pelo Teste t de Student com um nível de confiança de 95%. As demais médias, quando significativas, foram comparadas pelo Teste de Tukey da Diferença Honestamente Significativa com um nível de confiança de 95%, utilizando o pacote ExpDes.pt (FERREIRA et al. 2018). Os tratamentos de polinização não apresentaram normalidade dos resíduos e foram avaliados pela análise de variância unidirecional de Kruskal-Wallis (ANOVA) e comparados pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni ($\alpha = 5\%$), pelo pacote Agricolae (MENDIBURU, 2019) e pela plotagem gráfica no pacote ggplot2 (WICKHAM, 2016). Todas os testes estatísticos de comparações de média foram realizados em ambiente estatístico R (R CORE TEAM, 2019).

3.1.3 RESULTADOS

3.1.3.1 MORFOLOGIA FLORAL

Petunia interior possui flores hermafroditas e heteroclamídeas. O cálice é pentâmero, dialissépalo e de coloração esverdeada (Fig. 2A). A corola é infundibuliforme, pentâmera, gamopétala, zigomorfa, de coloração púrpura (Fig. 2A, B), com diâmetro do limbo entre 18 e 25 mm ($22,0 \pm 2,13$; N= 20) e comprimento do

tubo floral entre 12 e 19 mm ($15,9 \pm 1,59$; N= 20). O androceu isostêmone, inserto e epipétalo é formado por cinco estames dialistêmones e heterodínamos (dois grandes, dois médios e um pequeno) com anteras dorsifixas e rimosas contendo pólen violáceo (Fig. 2C). A conação dos filetes na corola delimita uma câmara nectarífera com comprimento entre 4 e 5 mm ($4,2 \pm 0,51$; N=20). O gineceu apresenta ovário súpero, pluriovulado, com uma glândula nectarífera bilobada na base e estilete terminal. O estigma é truncado e está localizado entre as anteras dos estames médios e grandes (Fig. 2C). O número médio de óvulos por ovário foi 156,7 ($\pm 26,7$). O número médio de grãos de pólen por antera foi de 15.906,7 ($\pm 4.592,9$) e por flor 79.533,3 ($\pm 2.2964,3$). Externamente aos grãos de pólen foi verificada a presença de compostos lipídicos (Fig. 2D, seta), constituintes do fluido locular da antera.

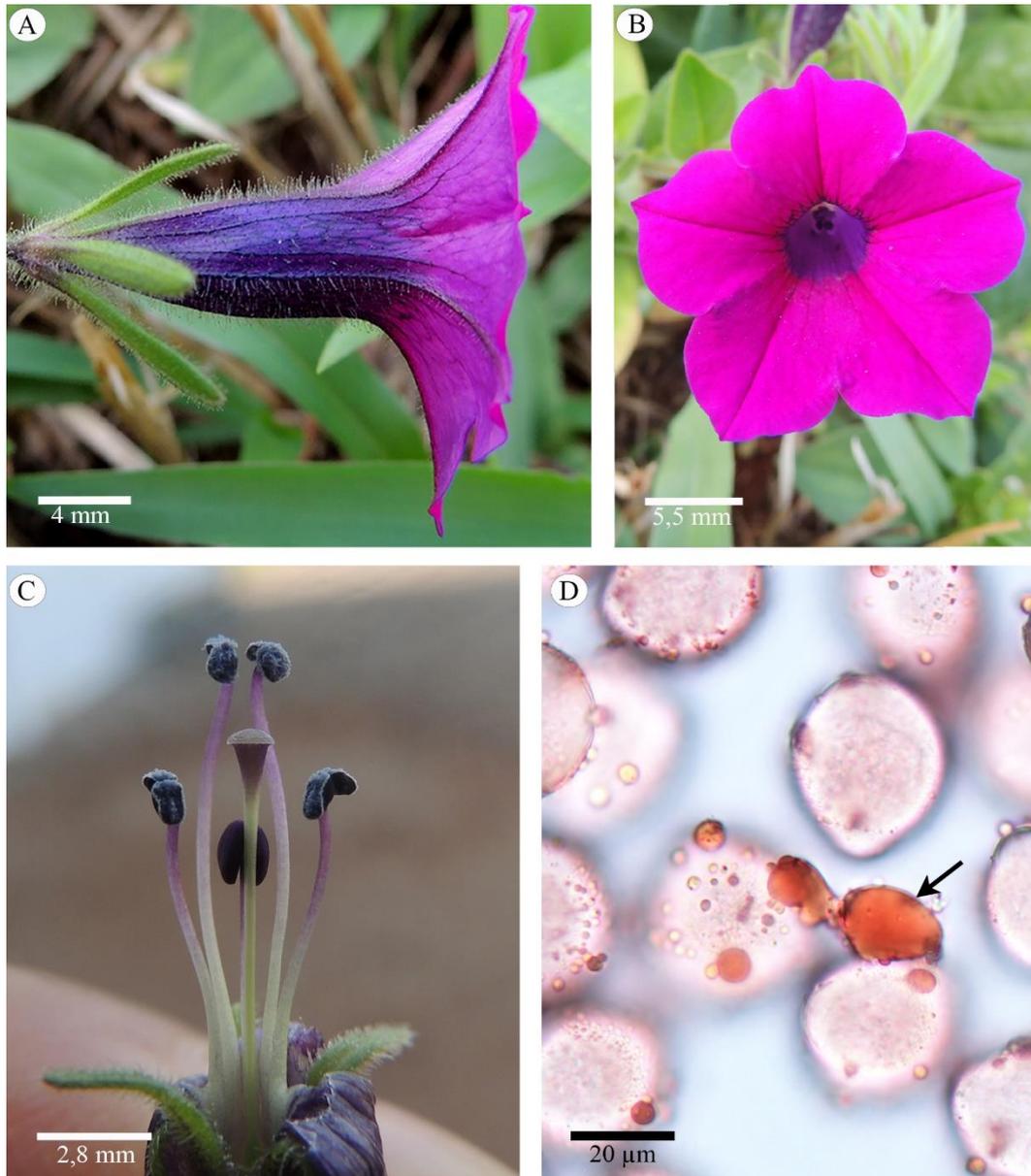


Figura 2- Morfologia floral de *Petunia interior*. A) Flor em posição lateral. B) Flor em posição frontal. C) Estruturas reprodutivas. D) Reação positiva para lipídios no fluido locular da antera (seta).

3.1.3.2 BIOLOGIA FLORAL

A abertura das flores de *P. interior* iniciou por volta das 8:00 (flores abertas registradas às 7:00 são decorrentes dia anterior). A expansão completa da corola ocorreu em aproximadamente uma hora após o início da antese. A longevidade floral média foi de $61,7 \pm 13,3$ horas para flores protegidas e $17,3 \pm 9,44$ horas para flores visitadas.

A abertura e senescência das flores em cada indivíduo ocorreu de forma assincrônica ao longo do dia, com maior número de flores abertas entre o período das 9:00 até às 12:00 (Fig. 3). No nível populacional, foi registrado aumento gradual no número de flores abertas durante o dia, com média máxima de 16,8 flores abertas por indivíduo no período das 12:00 às 12:30 (Fig. 4). O aumento no número de flores abertas do início da manhã (7:00) até o início da tarde (12:30), e o decréscimo a partir das 13:00 até às 18:30 foi significativo, em ambos os períodos (Fig. 4).

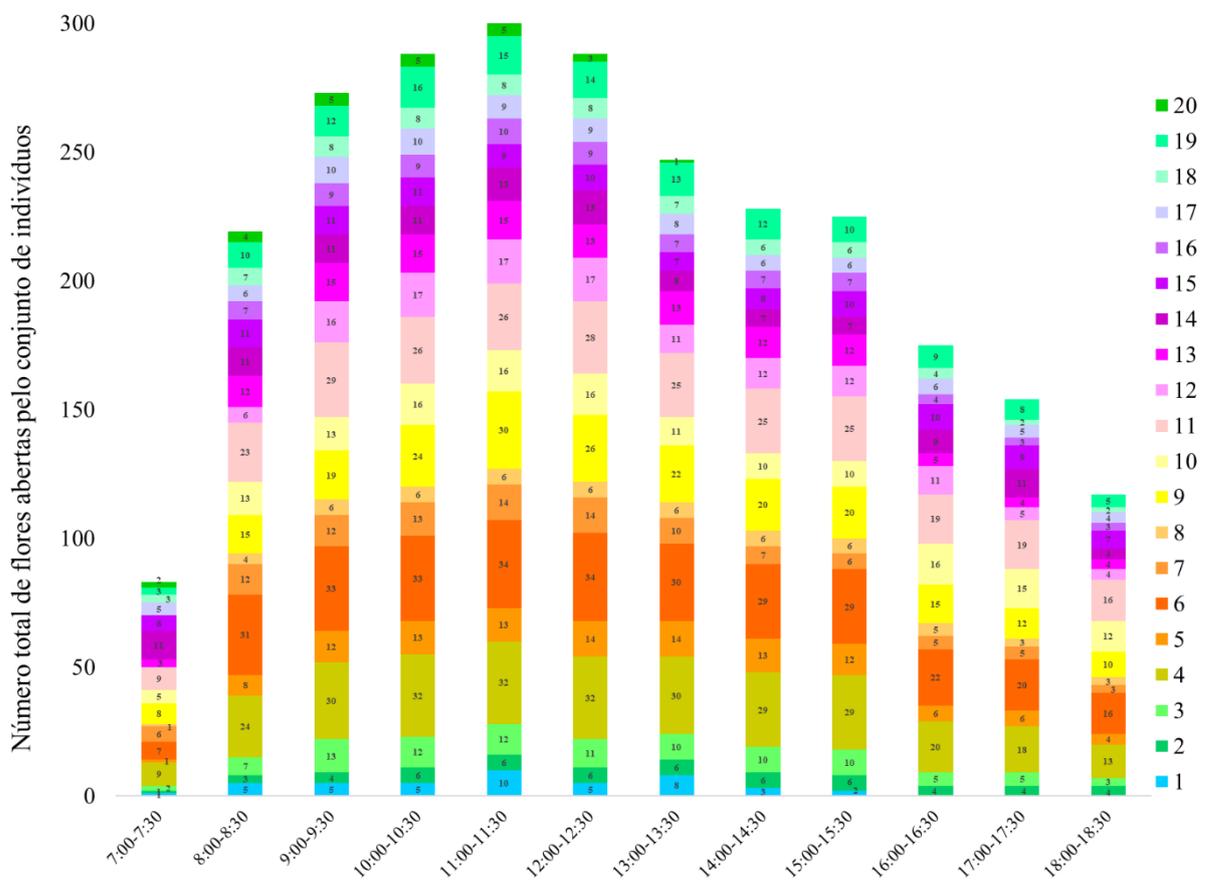


Figura 3- Número de flores abertas por hora em plantas individuais de *Petunia interior* (N=20).

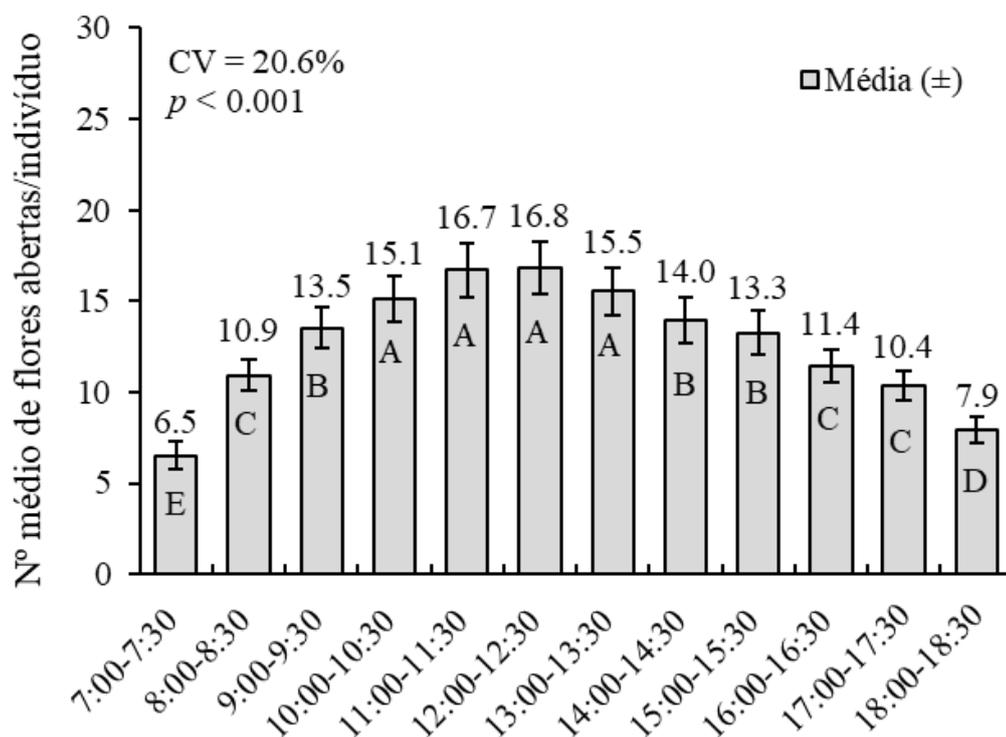


Figura 4- Média do número de flores de *Petunia interior* abertas por hora, durante o período de estudo (N= 20 indivíduos x duas repetições). Letras maiúsculas diferentes denotam diferença significativa entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knnot com 5% de probabilidade de erro.

A deiscência das anteras iniciou em torno de 30 minutos após a abertura total da flor. Primeiramente abriram as anteras dos estames grandes, em seguida as anteras dos estames médios e por último a antera do estame pequeno. A abertura de todas as anteras ocorreu em aproximadamente uma hora e trinta minutos. Os estigmas foram receptivos desde a fase de botão. No primeiro dia da antese, 100% (N= 108) das flores analisadas estavam com estigmas receptivos. A receptividade diminuiu em flores de segundo dia (88%, N= 108) e terceiro dia (26%, N= 108) de antese. Não foi registrada autodeposição de pólen sobre o estigma das flores no primeiro dia de antese, apenas no segundo (10%, N= 144) e no terceiro dia (12%, N= 144).

As flores de *P. interior* acumularam néctar durante os três dias de antese e aumentaram o volume gradualmente do período da manhã até a tarde, com diferença significativa entre os três turnos do primeiro dia, e entre a manhã e demais turnos do segundo dia (Fig. 5A). O maior volume médio diário (2,2 μ L) de néctar

registrado no segundo dia de antese diferiu significativamente dos volumes registrados no primeiro (1,6 μL) e terceiro (1,2 μL) dia de antese (Fig. 5B). A concentração média do néctar acumulado apresentou diferença significativa entre os turnos apenas no segundo dia de antese (Fig. 5C). No entanto, a concentração diária aumentou significativamente do primeiro ao terceiro dia de antese (Fig. 5D). Não foi registrada diferença significativa nos valores médios do volume e concentração do néctar disponível entre os turnos da antese (Fig. 6).

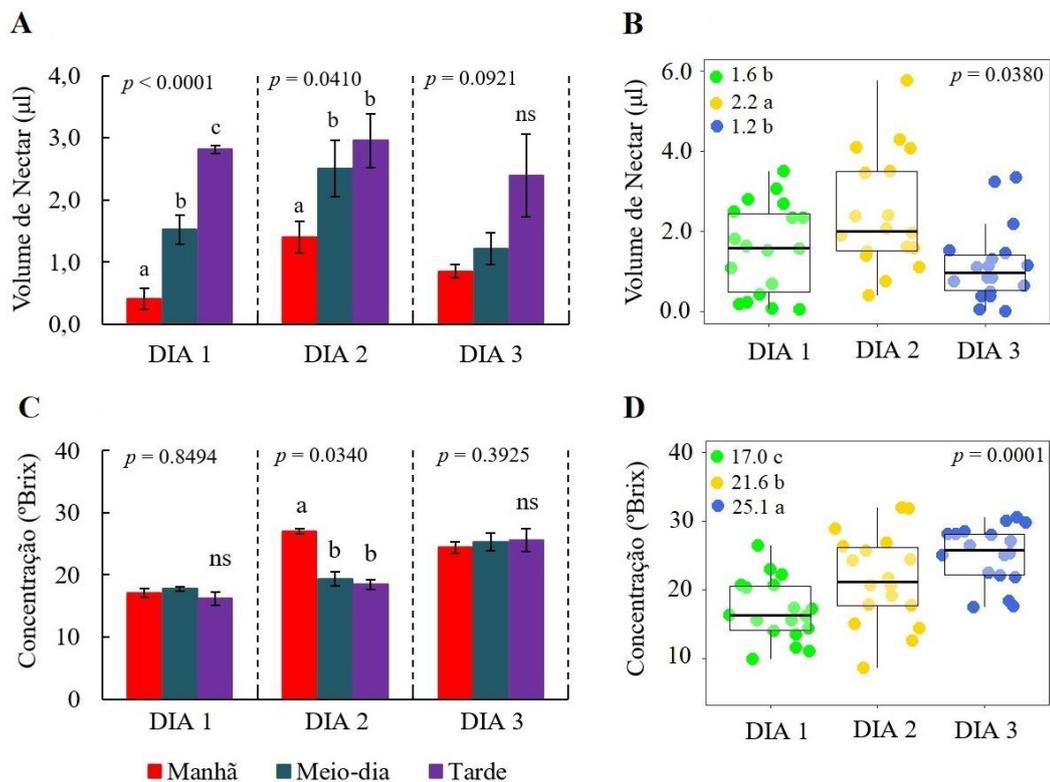


Figura 5- Volume e concentração do néctar acumulado de *Petunia interior* durante os três dias de antese. (A) Média do volume por turno nos três dias de antese; (B) Média do volume por dia; (C) Média da concentração por turno nos três dias de antese. (D) Média da concentração por dia. (N= 432 flores; 8 flores/hora/dia x duas repetições). Letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Turnos: Manhã- 8:00 às 10:00; Meio-dia- 11:00 às 13:00; Tarde- 14:00 às 16:00.

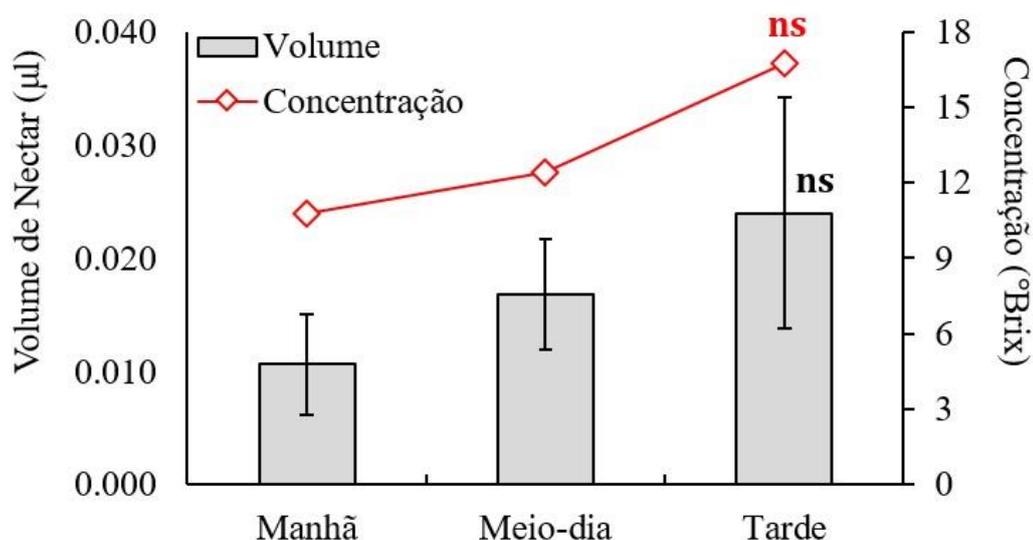


Figura 6- Volume e concentração do néctar disponível de *Petunia interior* nos turnos manhã, meio-dia e tarde. As médias não resultaram em diferenças significativas pela análise de variância (ANOVA) com $\alpha = 5\%$ (N= 360 flores; 20 flores/hora x duas repetições). ns (não significativo). Turnos: Manhã- 8:00 às 10:00; Meio-dia- 11:00 às 13:00; Tarde- 14:00 às 16:00.

3.1.3.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA

Petunia interior apresentou alto percentual de formação de frutos por polinização cruzada e baixo percentual de formação de frutos por autopolinização (Tab. 1). O valor do ISI registrado foi de 0,9, o que classifica a espécie como xenogâmica obrigatória. Além disso, o maior número de frutos formados em polinização controle demonstra que não houve déficit de polinização no local de estudo (DP = -7).

Tabela 1- Sucesso reprodutivo de *Petunia interior* por tratamento de polinização durante o período de estudo no município de Cerro Largo, RS, Brasil.

Tratamento	Flores (n)	Frutos formados (%)
Autopolinização espontânea	30	0
Autopolinização manual	30	10
Polinização cruzada manual	30	90
Polinização controle	30	97

Fonte. Elaborada pelo autor.

Foi registrada fecundação dos óvulos nas primeiras 12 horas após as polinizações manuais (Fig. 7A), porém a taxa média de fecundação foi de 96,7 % para polinização cruzada manual e de apenas 16,7 % na autopolinização manual (Fig. 7B).

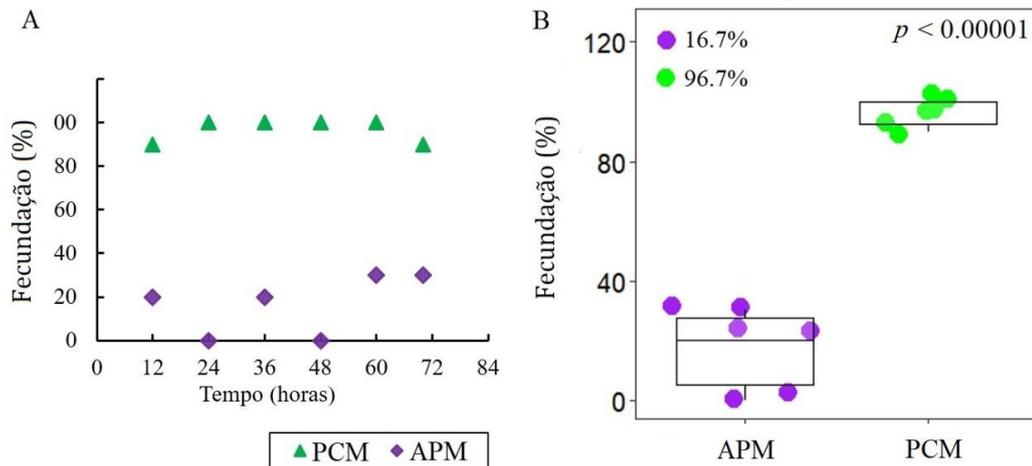


Figura 7- Taxa de fecundação nos tratamentos de polinização cruzada manual e autopolinização manual em flores de *Petunia interior*. (A) valores coletados em diferentes intervalos de tempo após a polinização (N= 10 flores/hora para cada tratamento); (B) taxa média de fecundação em cada tratamento. PCM (polinização cruzada manual); APM (autopolinização manual).

Não houve déficit de polinização (-7) no local de estudo.

Os valores de todas as variáveis testadas nos frutos formados foram significativamente inferiores naqueles provenientes de autopolinizações, quando comparados com os frutos formados no teste de polinização cruzada e polinização controle (Fig. 8). Os valores da massa (Fig. 8A) e do número de sementes dos frutos (Fig. 8B) formados nos tratamentos de polinização cruzada manual e polinização controle não diferiram entre si, enquanto os valores de diâmetro (transversal e longitudinal) foram significativamente superiores no tratamento de polinização cruzada manual (Fig. 8C e D).

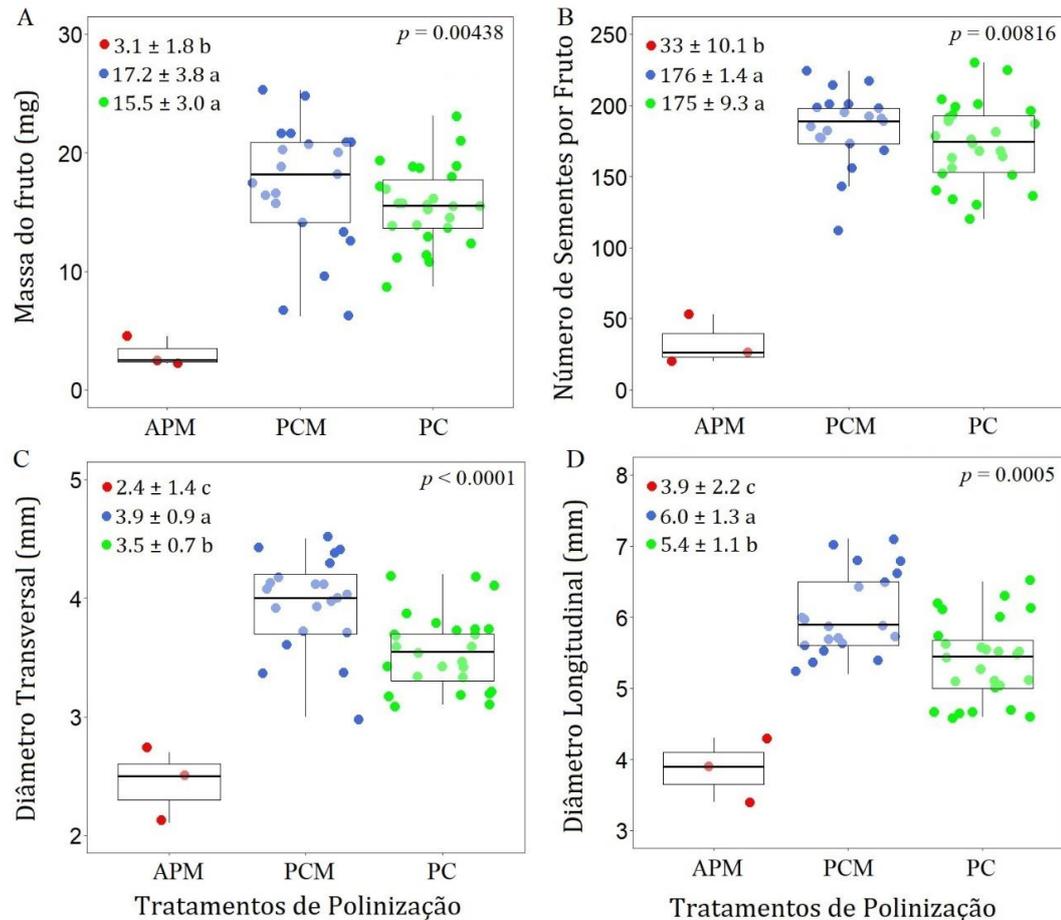


Figura 8- Variáveis dos frutos de *Petunia interior* nos tratamentos de polinização e controle, durante o período de estudo, (Média \pm sd). Letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. APM (autopolinização manual); PCM (polinização cruzada manual); PC (polinização controle).

3.1.4 DISCUSSÃO

3.1.4.1 MORFOLOGIA FLORAL

Petunia interior possui morfologia floral semelhante as demais espécies melitófilas do gênero, que possuem flores púrpuras, pólen violáceo e corola infundibuliforme, zigomorfa, com tubo largo e curto (STEHMANN et al. 2009). Além da função de atrair os polinizadores, a morfologia floral também é responsável pela interação física entre polinizadores e órgãos reprodutivos (HODGINS; BARRET, 2008). Nas flores de *P. interior*, o arranjo dos estames em diferentes alturas aumenta a extensão da deposição de pólen sobre o corpo do polinizador. Além

disso, a largura do tubo da corola e a condição inclusa e próxima dos órgãos reprodutivos facilita tanto o contato com as anteras quanto com o estigma da flor durante a visita de abelhas, de tal modo, que todas as visitas podem resultar em polinização.

Em flores hermafroditas, a proximidade dos órgãos reprodutivos (ausência de hercogamia) e sobreposição das fases masculina e feminina (ausência de dicogamia ou dicogamia incompleta) comumente resultam em interferência sexual e, conseqüentemente, em autopolinização (LLOYD; WEBB, 1986). Entretanto, apesar da ausência de hercogamia e dicogamia nas flores de *P. interior*, eventos de autopolinização raramente foram registrados (10% e 12% em flores de segundo e terceiro dia de antese, respectivamente). Nesse caso, a autodeposição de pólen possivelmente foi evitada pela presença do composto lipídico (descrito como *pollenkitt* para o gênero *Petunia*) presente no fluido locular das anteras, uma vez que esse composto é responsável por manter os grãos de pólen unidos e presos à antera até que um visitante os retire (PACINI; HESSE, 2005). Além de evitar a autopolinização, o *pollenkitt* possui as funções de manter o pólen aderido ao corpo dos polinizadores durante o transporte, bem como de facilitar o depósito e adesão de grupos de pólen ao estigma (PACINI; HESSE, 2005). Com isso, esses compostos auxiliam na promoção da polinização cruzada, juntamente com as demais características florais da espécie.

3.1.4.2 BIOLOGIA FLORAL

Os indivíduos de *P. interior* medem em média 20 a 40 cm de altura (ANDO; HASHIMOTO, 1996), e considerando o fato de serem plantas herbáceas relativamente pequenas, produzem um alto número de flores abertas diariamente (média de até 16,8 flores/indivíduo). A magnitude do *display* floral é estreitamente relacionada a longevidade das flores (HARDER; JOHNSON, 2005), e plantas com maior *display* são mais atraentes aos polinizadores do que plantas com poucas flores (MITCHELL et al. 2004).

A redução da longevidade floral é comum em flores polinizadas de *Petunia*, e já foi registrada em *P. inflata* (SINGH et al. 2002), *P. hybrida* (JONES, 2008), *P. secreta* (RODRIGUES et al. 2018a) e *P. mantiqueirensis* (ARAÚJO et al. 2019). Apesar disso, com uma longevidade média variando de 17h (flores visitadas) até 62

horas (flores não visitadas), *P. interior* permanece com flores abertas por um grande período do dia, e assim deve manter alta atratividade aos polinizadores. Além disso, as flores que permanecem abertas até o dia seguinte devem auxiliar na atração dos primeiros polinizadores da manhã. No entanto, em alguns casos, à medida que o *display* floral aumenta, os polinizadores podem visitar mais flores de uma mesma planta e favorecer a autopolinização geitonogâmica (MITCHELL et al. 2004; KARRON; MITCHELL, 2012). Contudo, em *P. interior*, a abertura assíncrona das flores e deiscência gradual das anteras reduz a oferta simultânea de pólen entre as flores de um indivíduo, o que pode diminuir as chances de geitonogamia.

A deiscência gradual das anteras em flores individuais, como ocorre em *P. interior*, é reconhecida como uma estratégia responsável por limitar a quantidade de pólen que pode ser removida durante a visita do polinizador (LLHOYD; YATES, 1982). Com isso, os animais forrageiros são induzidos a frequentar um alto número de flores para conseguir a quantidade necessária desse recurso (SIRIANI-OLIVIERA et al. 2018) e, conseqüentemente, devem intensificar a deposição de pólen coespecífico sobre os estigmas (LLHOYD; YATES, 1982). Além disso, tanto a intensidade de visitas entre as flores, quanto a eficiência na coleta de pólen, aumentam com a presença de polinizadores especializados (SIRIANI-OLIVIERA et al. 2018). Desse modo, considerando que as flores de *P. interior* são frequentadas, além de outras abelhas, por abelhas oligoléticas (SOUZA, S. et al. 2020, dados não publicados), as polinizações cruzadas tendem a ser altamente eficazes para essa espécie. Embora, a oferta de pólen das flores de *P. interior* seja esgotada logo nas primeiras visitas (SOUZA, S. et al. 2020, dados não publicados), a produção de néctar durante a antese é contínua e, por isso, mantém a atratividade da flor.

Conforme GÜBITZ et al. (2009), nas espécies do gênero *Petunia*, o volume de néctar varia com as síndromes florais existentes. Em *P. interior*, o menor volume de néctar acumulado (1,6, 2,2 e 1,2 μ L do primeiro ao terceiro dia de antese, respectivamente) quando comparado aos volumes registrados em *P. axillaris* (34,7 μ L) (BRANDERBURG et al. 2012) e *P. secreta* (8 μ L) (RODRIGUES et al. 2018a), corresponde ao proposto para espécies melitófilas do gênero, que devem produzir volumes consideravelmente inferiores às espécies esfingófilas e, também, às ornitófilas (GÜBITZ et al. 2009). Os valores da concentração média de açúcar registrados do primeiro ao terceiro dia de antese em flores não visitadas (17,0, 21,6 e 25,1%, respectivamente) foram inferiores aos valores atribuídos para plantas

melitófilas, que devem apresentar concentrações entre 35 e 65% (KIM et al. 2011; ROUBIK et al. 1995). Além disso, em comparação com concentrações conhecidas dentro do gênero, esses valores diferiram de *P. integrifolia* (espécie melitófila com morfologia semelhante a *P. interior*), cuja concentração registrada foi de 37,5% (BRANDERBURG et al. 2012), mas foram semelhantes aos valores da espécie esfingófila *P. axillaris* (16,5%) (BRANDERBURG et al. 2012) e da espécie com traços de ornitofilia *P. secreta* (21,5%) (RODRIGUES et al. 2018a). Contudo, mesmo diante de uma concentração incomum de néctar para uma espécie melitófila, o ínfimo volume de néctar registrado nas flores disponíveis de *P. interior* indica que esse recurso foi constantemente retirado pelas abelhas. Nesse sentido, a produção e disponibilidade contínua de baixos volumes de néctar durante a antese, são características que favorecem o número de visitas recebidas pelas flores de *P. interior*. Somado a isso, a abertura assincrônica das flores, liberação gradual do pólen e polinização por abelhas oligoléticas, formam um conjunto de características capazes de intensificar o sucesso reprodutivo dessa espécie.

3.1.4.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA

Dentre os estudos reprodutivos realizados em espécies do gênero *Petunia*, a autogamia foi registrada em *P. exserta* (STEHMANN, 1999), *P. axillaris* (KOKUBUN et al. 2006) e *P. secreta* (RODRIGUES et al. 2018b), enquanto a xenogamia obrigatória foi verificada em algumas populações de *P. axillaris* subespécie *axillaris* (KOKUBUN et al. 2006) e nas espécies púrpuras: *P. bonjardinensis*, *P. altiplana* (STEHMANN, 1999), *P. littoralis* (atualmente *P. integrifolia*) (CASTELLANI; LOPES, 2002) e *P. mantiqueirensis* (ARAÚJO et al. 2019). Além dessas, a xenogamia obrigatória também é característica de *P. inflata* (LEE et al. 1994; ZHI-HUA et al. 2008). Em *P. interior*, a taxa de frutos formados por autopolinização (10%) indica a presença de autogamia, entretanto, este valor foi consideravelmente baixo quando comparado às taxas registradas no tratamento de polinização cruzada manual e nas flores controle (90% e 97%, respectivamente). Além disso, os frutos de *P. interior* provenientes de polinização cruzada e controle apresentaram variáveis com valores significativamente superiores aos frutos formados por autopolinização. Ainda, o índice de autoincompatibilidade de 0,9 corrobora a condição de xenogamia obrigatória proposta para as espécies melitófilas de coloração púrpura e pólen

violáceo do gênero (STEHMANN et al. 2009), bem como uma alta dependência de abelhas para a reprodução.

Em espécies xenógamas obrigatórias do gênero *Petunia*, a autoincompatibilidade é do tipo gametofítica, controlada por proteínas contidas no locus S do pólen (proteínas S-locus F-box ou SLF) (KUBO et al. 2010) e do pistilo (proteínas S-RNases) (LEE et al. 1994). Nesse caso, após a polinização, se as SLF do pólen são reconhecidas como próprias pelas S-RNases, estas exercem citotoxicidade dentro do tubo de autopólen para inibir o crescimento do mesmo (ZHI-HUA et al. 2008). Com isso, considerando a função essencial das S-RNases no reconhecimento do pólen, falhas na produção dessas proteínas resultaram na formação de frutos por autogamia em *P. inflata* (LEE et al. 1994) e em *P. axillaris* subsp. *axillaris* (população autoincompatível) (TZUKAMOTO et al. 1999) e, talvez, também tenha ocorrido em *P. interior*, o que poderia explicar a proporção de frutos formados por autogamia nessa espécie.

Em plantas xenógamas é comum registrar maior número de sementes nos frutos formados por polinização manual, pois o pólen utilizado é 100% cruzado, enquanto polinizadores reais carregam uma mistura de pólen autogâmico, geitonogâmico e de cruzamento (THOMSON, 2001). Entretanto, os valores registrados para o número de sementes e massa dos frutos formados nos tratamentos de polinização cruzada e controle não apresentaram diferenças significativas. Esse resultado, provavelmente, reflete o comportamento de fidelidade dos polinizadores de *P. interior*, o que é esperado em plantas cujas flores são polinizadas por abelhas oligoléticas.

3.1.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, concluímos que o conjunto de características florais de *P. interior* favorecem o sucesso reprodutivo da espécie por evitar a autopolinização e promover a polinização cruzada. Observamos que o sistema reprodutivo de *P. interior* é xenógamo obrigatório, mas que a autogamia pode ocorrer para uma baixa porcentagem de flores. Diante desta possibilidade, *P. interior* dispõe de características como a presença de compostos lipídicos ao redor dos grãos de pólen para impedir a autopolinização espontânea, bem como de abertura assíncrona das flores e das anteras para reduzir as chances de

geitonogamia. Por outro lado, a polinização cruzada é intensificada através de mecanismos como a liberação gradual do pólen e disponibilidade contínua de baixos volumes de néctar, uma vez que isso deve obrigar os polinizadores a visitar um alto número de flores para conseguir a quantia ideal desses recursos. Por fim, a ausência de déficit na polinização, bem como a ausência de diferença significativa entre as variáveis dos frutos formados no tratamento de polinização cruzada e controle, evidenciam o sucesso reprodutivo de *P. interior* em condições naturais.

REFERÊNCIAS

- ALVES-DOS-SANTOS¹, I. SILVA, C. I.; PINHEIRO, M.; KLEINERT, A. M. P. Quando um visitante floral é um polinizador? **Rodriguésia**, v. 67, n. 2, p. 295-307. 2016.
- ANDO, T.; SOTO, S.; SUÁREZ, E. New records of *petunia* (solanaceae) for the argentinean flora. **Darwiniana**, v. 43, n. 1-4, p. 64-68, 2005.
- ANDO, T.; HASHIMOTO, G. A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from interior Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. **Brittonia**, v. 48, n. 2, p. 217-223, 1996.
- ARAÚJO, F. F.; OLIVEIRA, R.; MOTA, T.; STEHMANN, J. R.; SCHLINDWEIN, C. Solitary bee pollinators adjust pollen foraging to the unpredictable flower opening of a species of *Petunia* (Solanaceae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. XX, p. 1-15, 2019.
- BRANDENBURG, A. et al. Hawkmoth Pollinators Decrease Seed Set of a Low-Nectar *Petunia axillaris* Line through Reduced Probing Time. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. 1635-1639, 2012.
- CASTELLANI, T. T.; LOPES, C. L. Abundância e biologia reprodutiva de *Petunia littoralis* Smith & Downs nas dunas da Praia da Joaquina, Ilha de Santa Catarina. **Biotemas**, v. 15, n. 2, p. 7-22, 2002.
- DAFNI, A. **Pollination ecology** - A practical approach. Oxford University Press. 1992.
- FAEGRI, K; VAN DER PJIL, L. **The Principles of Pollination Ecology**. Pergamon Press. 1971.
- FERREIRA, E. B; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese)**. R package version 1.2.0. 2018. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>>. Acesso em: 15 jun. 2020.
- GIBBS, P. E. Late-acting self-incompatibility – the pariah breeding system in flowering plants. **New Phytologist**, v. 203, p. 717–734, 2014.
- GÜBITZ, T.; HOBALLAH, M. H.; DELL’OLIVO, A.; KUHLEMEIER, C. *Petunia* as a Model System for the Genetics and Evolution o Pollination Syndromes. In: GERATS, T.; STROMMER, J. (eds.). **Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics**. Springer, p. 29-49, 2009.
- HARDER, L. D.; JOHNSON, S. D. Adaptive plasticity of floral display size in animal pollinated plants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, p. 2651–2657, 2005.

HODGINS, K. A.; BARRETT, S. C. H. Geographic variation in floral morphology and style morph ratios in a sexually polymorphic daffodil. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 2, p. 185-195, 2008.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico da vegetação brasileira**. 2ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. Disponível em: <ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/manuais_tecnicos/manual_tecnico_vegetacao_brasileira.pdf>.

JONES, M. L. Ethylene signaling is required for pollination-accelerated corolla senescence in petúnias. **Plant Science**, v. 175, p. 190-196, 2008.

KARRON, D.; MITCHEL, R. J. Effects of floral display size on male and female reproductive success in *Mimulus ringens* Jeffrey. **Annals of Botany**, v. 109, p. 563-570, 2012.

KIM, W.; GILET, T.; BUSH, J. W. M. Optimal concentrations in nectar feeding. **Proceedings of the National Academy of Sciences. Natl. Acad. Sci. USA**, v.108, p. 16618–16621, 2011.

KOKUBUN, H.; NAKANO, M.; TSUKAMOTO, M.; WATANABE, H.; HASHIMOTO, G.; MARCHESI, E.; BULLRICH, L.; BASUALDO, I. L.; KAO, T.; ANDO, T. Distribution of self-compatible and self-incompatible populations of *Petunia axillaris* (Solanaceae) outside Uruguay. **Journal of Plant Research**, v. 119, p. 419-430, 2006.

KUBO, K.; ENTANI, T.; TAKARA, A.; WANG, N.; FIELDS, A. M.; HUA, Z.; TOYODA, M.; KAWASHIMA, S.; ANDO, T.; ISOGAI, A.; KAO, T.; TAKAYAMA, S. Collaborative Non-Self Recognition System in S-RNase–Based Self-Incompatibility. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 796-799, 2010.

LEE, H.; SHIHSIEH, H.; KAO, T. S-proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. **Nature**, v. 367, 1994.

LLOYD, D. G. Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). **Contributions from Gray Herbarium of Harvard University**, v. 195, p. 3-134, 1965.

LLOYD, D. G.; WEBB, C. J. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. **New Zealand Journal of Botany**, v. 24, p. 135-162, 1986.

LLOYD, D. G.; YATES, J. M. A. Intrasexual selection and the segregation of pollen and stigmas in hermaphrodite plants, exemplified by *Wahlenbergia albomarginata* (campanulaceae). **Evolution**, v. 36. n. 5, p. 903-913, 1982.

MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology**, v. 37, n. 125, 1959.

MENDIBURU F. **Agricolae**: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-1. 2019. Disponível em <<https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>>.

MITCHELL, R. J.; KARRON, J. D.; HOLMQUIST, K. G.; BELL, J. M. The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. **Functional Ecology**, v. 18, p. 116–124, 2004.

MOURA, R. A.; PURCHIO, A.; WADA, C. S.; ALMEIDA, T. V. **Técnicas de laboratório**. 3.ed. Livraria Atheneu, São Paulo, 1987.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p. 321–326, 2011.

PACINI, E.; HESSE, M. Pollenkitt – its composition, forms and functions. **Flora**, v. 200 p. 399–415, 2005.

PINHEIRO, M.; GAGLIANONE, M. C.; NUNES, C. E. P.; SIGRIST, M. R.; ALVES DOS SANTOS, I. Polinização por abelhas. In: RECH, A. R. et al (Orgs.). **Biologia da polinização**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014, p. 205-233.

PINO, F. A. A questão da não normalidade: uma revisão. **Revista de Economia Agrícola**, v. 61, n. 2, p. 17-33, 2014.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2019. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

RADFORD, A. E.; DICKISON, W. C.; MASSEY, J. R.; BELL, C. R. **Vascular plant systematics**. New York, Harper & Row Publishers. 1974.

RADUSKI, A. R.; HANEY, E. B.; IGIC, B. the expression of self-incompatibility in angiosperms is bimodal. **Evolution**, v. 66, n. 4, p. 1275–1283, 2012.

RIBEIRO, A. A.; ZANDONADI, L.; ZAVATTINI, J. A.; ROHDE, M. D. S. Chuvas e estiagens na região das Missões, Rio Grande do Sul: a percepção dos moradores urbanos de Santo Antônio das Missões. **Revista Geonorte**, v.2, n. 4, p. 804 – 817, 2012.

RODRIGUES, D. M.; CABALLERO-VILLALOBOS, L.; TURCHETTO, C. T.; JACQUES, A.; KUHLEMEIER, C.; FREITAS, L. B. Do we truly understand pollination syndromes in *Petunia* as much as we suppose? **AoB PLANTS**, v. 10, n. 1-14, 2018a.

RODRIGUES, D. M.; TURCHETTO, C. T.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; FREITAS, L. B. Can the reproductive system of a rare and narrowly endemic plant species explain its high genetic diversity? **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, n. 2, p. 180-187, 2018b.

- ROUBIK, D.; YANEGA, D.; ALUJA, M.; BUCHMANN, S.; INOUE, D. On optimal nectar foraging by some tropical bees (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie**, v. 26, p. 197-211, 1995.
- SANTOS, H. G. et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3ed. Brasília: Embrapa, 2013. 353 p.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. Iowa, State University Press, 1951.
- SINGH, A; EVENSEN, K. B.; KAO, T. Ethylene Synthesis and Floral Senescence following Compatible and Incompatible Pollinations in *Petunia inflata*. **Plant Physiology**, v. 99, n. 1, p. 38-45, 1992.
- SIRIANI-OLIVEIRA, S. OLIVEIRA, R.; SCHLINDWEIN. Pollination of *Blumenbachia amana* (Loasaceae): flower morphology and partitioned pollen presentation guarantee a private reward to a specialist pollinator. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. XX, p. 1–13, 2018.
- STEHMANN, J. R. **Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae)**: revisão de *Petunia* Jussieu das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave e *Lexarza* eo estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir. 1999. 242p. Tese (doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.
- STEHMANN, J. R.; LORENZ-LEMKE, A. P.; FREITAS, L. B.; SEMIR, J. The Genus *Petunia*. In: GERATS, T.; STROMMER, J. (eds.). **Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics**. Springer, p. 1-28, 2009.
- STRECK, E.V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2ed. Porto Alegre, EMATER/RS. 2018.
- THOMSON, J. D. Using Pollination Deficits to Infer Pollinator Declines Can Theory Guide Us? **Conservation Ecology**, v. 5, n. 1, 2001.
- TSUKAMOTO T.; ANDO, T.; KOKUBUN, H.; WATANABE, H.; MASADA, M.; ZHU, X.; MARCHESI, E.; KAO, T. Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. **Sexual Plant Reproduction**. v. 12, n. 6–13, 1999.
- VAISSIÈRE, B. E.; FREITAS, B. M.; GEMMILL-HERREN, B. **Protocol to detect and assess pollination deficits in crops**: a handbook for its use. Rome, ITA: FAO, 81 p.
- WEBB, C. J; LLOYD, D. G. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. **New Zealand Journal of Botany**, v. 24, p. 163-178, 1986.
- WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag, New York, 2016.

WITTMANN, D.; RADTKE, R.; CURE, JR; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Coevolved reproductive strategies in the oligolectic bee *Callonychium petuniae* (Apoidea, Andrenidae) and three purple flowered *Petunia* species (Solanaceae) in southern Brazil. **Zool. syst. Evo1ut.forsch.** v. 28, p. 157-165, 1990.

ZHI-HUA, H, FIELDS, A.; KAO, T. Biochemical Models for S-RNase-Based Self-Incompatibility. **Molecular Plant**, v. 1, n. 4, p. 575–585, 2008.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação de mestrado propiciou contribuições relevantes sobre os mecanismos florais e reprodutivos de *P. interior*, contribuindo para o conhecimento desses aspectos nas espécies do gênero. Nossos resultados revelaram que o sistema reprodutivo de *P. interior* é xenogâmico obrigatório e, portanto, a alta taxa de formação de frutos em condições naturais mostra que as características florais dessa espécie foram suficientes para atrair e garantir a eficiência de seus polinizadores. Sabe-se que a polinização de *P. interior* é realizada por abelhas e, dentre elas, duas espécies oligoléticas. Por este motivo, a presença dessa planta implica diretamente na conservação dessas abelhas.

Na região onde este estudo foi desenvolvido (Noroeste do Rio Grande do Sul), *P. interior* ocorre naturalmente em áreas abertas, tais como pátios de casas, beiras de estradas e rodovias e, principalmente, em áreas adjacentes de cultivos agrícolas. Apesar de sua beleza e potencial para ornamentação, nessa região, *P. interior* é conhecida apenas como uma planta espontânea. Considerando que a região noroeste do Rio Grande do Sul é predominantemente agrícola, *P. interior* sofre com a ação do uso de agrotóxicos, fato que deve acarretar na drástica redução das populações naturais dessa espécie e, conseqüentemente, interferir na sobrevivência de abelhas que dependem exclusivamente do seu pólen como fonte proteica.

Um modo de contribuir para minimizar esse dano seria a promoção de ações de extensão através de projetos de educação ambiental voltados a sensibilizar a população para preservação dos polinizadores e diversidade de plantas nativas. Através desses projetos é possível levar ao público, de maneira clara e direta, informações como: biologia das espécies, interação entre plantas e polinizadores, importância da polinização para a conservação da biodiversidade e equilíbrio dos ecossistemas, bem como para a manutenção dos serviços ecossistêmicos essenciais para o bem-estar humano.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, K.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. Recursos florais. In: RECH, A. R. et al (Orgs.). **Biologia da polinização**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014, p. 129-150.
- ANDO, T.; HASHIMOTO, G. A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from interior Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. **Brittonia**, v. 48, n. 2, p. 217-223, 1996.
- ANDO, T.; NOMURA, M.; TSUKAHARA, J.; WATANABE, H.; KOKUBUN, H.; TSUKAMOTO, T.; HASHIMOTO, G.; MARCHESI, E.; IAN J. KITCHING, I. J. Reproductive Isolation in a Native Population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). **Annals of Botany**, v. 88, p. 403-413, 2001.
- APG IV. STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Group**. Version 14, 2017. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: abr. 2020.
- ARAÚJO, F. F.; OLIVEIRA, R.; MOTA, T.; STEHMANN, J. R.; SCHLINDWEIN, C. Solitary bee pollinators adjust pollen foraging to the unpredictable flower opening of a species of *Petunia* (Solanaceae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. XX, p. 1-15, 2019.
- CASTELLANI, T. T.; LOPES, C. L. Abundância e biologia reprodutiva de *Petunia littoralis* Smith & Downs nas dunas da Praia da Joaquina, Ilha de Santa Catarina. **Biotemas**, v. 15, n. 2, p. 7-22, 2002.
- CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201–217, 2016.
- FAEGRI, K.; VAN DER PJIL, L. **The Principles of Pollination Ecology**. Pergamon Press. 1971.
- FENSTER, C. B.; AMBRUSTER, W. S.; WILSON, P.; DUDASH, M. R.; THOMSON, J. D. Pollination syndromes and floral specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 35. p. 375-403, 2004.
- FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL E DE SANTA CATARINA**. Giehl, E. L. H. (coordenador), 2020. Disponível em: <<http://floradigital.ufsc.br>>. Acesso em: ago. 2020.
- FLORA DO BRASIL 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: abr. 2020.
- FOREST, F.; GOLDBLATT, P.; MANNING, J. C.; BAKER, D.; COLVILLE, D. S.; JOSE, S.; KAYEL, M.; BUERKI, S. Pollinator shifts as triggers of speciation in painted petal irises (Lapeirousia: Iridaceae). **Annals of Botany**, v. 113, p. 357–371, 2014.

GALLIOT, C.; STUURMAN, J.; KUHLEMEIER, C. The genetic dissection of floral pollination syndromes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 78-82, 2006.

GÜBITZ, T.; HOBALLAH, M. H.; DELL'OLIVO, A.; KUHLEMEIER, C. *Petunia* as a Model System for the Genetics and Evolution of Pollination Syndromes. In: GERATS, T.; STROMMER, J. (eds.). **Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics**. Springer, p. 29-49, 2009.

HOBALLAH, M. E.; GÜBITZ, T.; STUURMAN, J.; BROGER, L.; BARONE, M.; MANDEL, T.; DELL'OLIVO, A.; ARNOLD, M.; KUHLEMEIER, C. Single Gene-Mediated Shift in Pollinator Attraction in *Petunia*. **The Plant Cell**, v. 19, p. 779–790, 2007.

KOKUBUN, H.; NAKANO, M.; TSUKAMOTO, M.; WATANABE, H.; HASHIMOTO, G.; MARCHESI, E.; BULLRICH, L.; BASUALDO, I. L.; KAO, T.; ANDO, T. Distribution of self-compatible and self-incompatible populations of *Petunia axillaris* (Solanaceae) outside Uruguay. **Journal of Plant Research**, v. 119, p. 419-430, 2006.

LEE, H.; SHIHSHIEH, H.; KAO, T. S-proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. **Nature**, v. 367, 1994.

LINSLEY, E. G. The ecology of solitary bees. **Hilgardia**, v. 27, n. 19, p. 543-599, 1958.

LORENZ-LEMKE, A. P.; MADER, G.; MUSCHNER, V. C.; STEHMANN, J. R.; BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. Blackwell Publishing Ltd Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 4487–4497, 2006.

MILET-PINHEIRO, P.; SCHLINDWEIN, C. Mutual reproductive dependence of distyllic *Cordia leucocephala* (Cordiaceae) and oligolectic *Cebalurgus longipalpis* (Halictidae, Rophitinae) in the Caatinga. **Annals of Botany**, v.106, p. 17–27, 2010.

OLIVEIRA, P. E.; MARUYAMA, P. K. Sistemas reprodutivos. In: RECH, A. R. et al (Orgs.). **Biologia da polinização**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014, p. 71-92.

OLLERTON, J.; ALARCO'N, R.; WASER, N. M.; PRICE, M. V.; WATTS, S.; CRANMER, L.; HINGSTON, A.; PETER, C. I.; ROTENBERRY, J. A global test of the pollination syndrome hypothesis. **Annals of Botany**, v. 103, p. 1471–1480, 2009.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p. 321–326, 2011.

PINHEIRO, M.; GAGLIANONE, M. C.; NUNES, C. E. P.; SIGRIST, M. R.; ALVES DOS SANTOS, I. Polinização por abelhas. In: RECH, A. R. et al (Orgs.). **Biologia da polinização**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014, p. 205-233.

RECH, A. R.; AVILA JÚNOR, R. S.; SCHLINDWEIN, C. Síndromes de polinização: especialização e generalização. In: RECH, A. R. et al (Orgs.). **Biologia da polinização**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014, p. 171-182.

RECK-KORTMANN, M.; SILVA-ARIAS, G. A.; SEGATTO, A. L. A.; MÄDER, G.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. Multilocus phylogeny reconstruction: New insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2014.

RODRIGUES, D. M.; CABALLERO-VILLALOBOS, L.; TURCHETTO, C. T.; JACQUES, A.; KUHLEMEIER, C.; FREITAS, L. B. Do we truly understand pollination syndromes in *Petunia* as much as we suppose? **AoB PLANTS**, v. 10, n. 1-14, 2018a.

RODRIGUES, D. M.; TURCHETTO, C. T.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; FREITAS, L. B. Can the reproductive system of a rare and narrowly endemic plant species explain its high genetic diversity? **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, n. 2, p. 180-187, 2018b.

ROSAS-GUERRERO, V.; AGUILAR, R.; MARTÉN-RODRÍGUEZ, S.; ASHWORTH, L.; LOPEZARAIZA-MIKEL, M.; BASTIDA, J. M., QUESADA, M. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? **Ecology Letters**, v. 17, p. 388–400, 2014.

SAUQUET, H.; MAGALLON, S. Key questions and challenges in angiosperm macroevolution. **New Phytologist**, v. 219, p.1170–1187, 2018.

SEGATTO, A. L. A.; CAZÉ, A. L. R.; TURCHETTO, C.; KLAHRE, U.; KUHLEMEIER, C., BONATTO, S. L., FREITAS, L. B. Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.70, p. 504–512, 2014.

SEGATTO, A. L. A.; RAMOS-FREGONEZI, A. M. C.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petunias. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 1, p. 119–127, 2014.

SHIVANNA, K. R.; SHARMA, N. Self-incompatibility recognition in *petunia hybrida*. **Micron and Microscopica Acta**, v. 16, n. 4, p. 233-245, 1985.

SIMS, T. L.; ROBBINS, T. P. Gametophytic Self-Incompatibility in *Petunia*. In: GERATS, T.; STROMMER, J. (eds.). **Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics**. Springer, 2009, p. 85-106.

SOUZA, S. MUCHA, P., PINHEIRO, M. *Petunia interior*: uma espécie chave para a conservação da abelha *Hexanthera missionica*. **I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis - PPGATS: Biodiversidade e sustentabilidade**. Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2020. Disponível em: <<https://ppgatsuffs.wixsite.com/simposio/anais>>.

STEHMANN, J. R. **Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae):** revisão de *Petunia* Jussieu das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave e Lexarza eo estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir. 1999. 242p. Tese (doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.

STEHMANN, J. R.; LORENZ-LEMKE, A. P.; FREITAS, L. B.; SEMIR, J. The Genus *Petunia*. In: GERATS, T.; STROMMER, J. (eds.). **Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics**. Springer, p. 1-28, 2009.

TSUKAMOTO T.; ANDO, T.; KOKUBUN, H.; WATANABE, H.; MASADA, M.; ZHU, X.; MARCHESI, E.; KAO, T. Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. **Sexual Plant Reproduction**. v. 12, n. 6–13, 1999.

VAMOSI, J. C.; MAGALLON, S.; MAYROSE, I.; OTTO, S. P.; SAUQUET, H. Macroevolutionary Patterns of Flowering Plant Speciation and Extinction. **Annual Review of Plant Biology**. v. 69, p. 9.1–9.22, 2018.

VAMOSI, J. C.; VAMOSI, S. M. Factors influencing diversification in angiosperms: at the crossroads of intrinsic and extrinsic traits. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 460–471. 2011.

VANDENBUSSCHE, M.; CHAMBRIER, P.; BENTO, S. R.; MOREL, P. *Petunia*, your next supermodel? **Front. Plant Sci**. v. 7, n. 72, 2016.

WITTMANN, D.; RADTKE, R.; CURE, JR; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Coevolved reproductive strategies in the oligolectic bee *Callonychium petuniae* (Apoidea, Andrenidae) and three purple flowered *Petunia* species (Solanaceae) in southern Brazil. **Zool. syst. Evo1ut.forsch**. v. 28, p. 157-165, 1990.