

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

Meriélem Saldanha Martins

**Desenvolvimento embriológico em *Dyckia polyclada* L.B. Sm.
(Pitcairnioideae - Bromeliaceae).**

**Santa Maria, RS, Brasil.
2016**

Meriélem Saldanha Martins

Desenvolvimento embriológico em *Dyckia polyclada* L.B. Sm.

(Pitcairnioideae - Bromeliaceae).

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo Santos de Oliveira

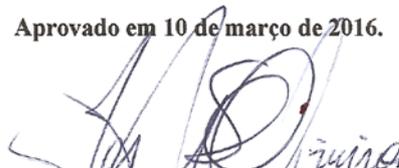
**Santa Maria, RS, Brasil.
2016**

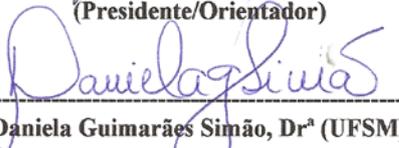
Meriélem Saldanha Martins

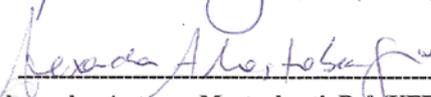
**DESENVOLVIMENTO EMBRIOLÓGICO EM *Dyckia polyclada* L.B. Sm.
(PITCAIRNIOIDEAE - BROMELIACEAE).**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia.**

Aprovado em 10 de março de 2016.


João Marcelo Santos de Oliveira, Dr (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Daniela Guimarães Simão, Dr^a (UFSM)


Alexandra Antunes Mastroberti, Dr^a (UFRGS)

Santa Maria, RS.
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Saldanha Martins, Merielem
Desenvolvimento embriológico em *Dyckia polyclada* L.B.
Sm. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae) / Merielem
Saldanha Martins.-2016.
98 p.; 30cm

Orientador: João Marcelo Santos de Oliveira
Coorientadora: Liliانا Essi
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2016

1. Bromeliaceae 2. *Dyckia* 3. Esporogênese 4.
Gametogênese 5. Gineceu I. Santos de Oliveira, João
Marcelo II. Essi, Liliانا III. Título.

Dedico ao meu pai Marino Martins e minha mãe Cleuza T.S. Martins que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas. A minha cadelinha Cléo que esteve sempre comigo nesta jornada. E a todos os familiares e amigos que me ajudaram nesta jornada.

In Memoriam Marino Martins e Cléozinha

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre acreditaram e apoiaram todos meus sonhos, aceitando as ausências e comemorando as minhas conquistas.

Ao meu orientador, Professor Dr. João Marcelo Santos de Oliveira pelos ensinamentos ao longo de tantos anos, a paciência e as contribuições valiosas para a minha formação.

Aos professores e colegas, pelo aprendizado durante as disciplinas cursadas.

À Mariza, pela amizade e pela gentileza em auxiliar prontamente às demandas do laboratório.

Aos meus amigos do Laboratório de Botânica Estrutural: César Carvalho de Freitas, Mariane P. Dorneles, Marisa B. Abbad, Patrícia Kurtz da Costa, Bruna Thies Palese, Jaqueline S. Sartori e Jordano Tavares pelo apoio, auxílio técnico, ajuda nas coletas do material botânico, pela paciência, companheirismo. Sentirei Saudades do convívio diário!

Aos amigos que fiz na UFSM.

A Professora Dr. Lílíana Essi, pela identificação da espécie e ao meu colega de laboratório Jordano Tavares pela ajuda na inclusão da espécie no herbário.

Aos amigos que fiz ao longo desses dois anos de mestrado Aline Pereira, Athos Odin, Marcelo Vielmo Alfonso, Maria Medianeira, Camila Elicker e Gabriel Bortolin pelo companheirismo e apoio durante as aulas e incentivo e discussões acadêmicas.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que passaram pela minha vida e colaboraram de alguma maneira para a construção deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Aos outros, dou o direito de ser como são.
A mim, o dever de ser cada dia melhor”.*
Chico Xavier

RESUMO

DESENVOLVIMENTO EMBRIOLÓGICO EM *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (PITCAIRNIOIDEAE - BROMELIACEAE).

Autora: Meriélem Saldanha Martins

Orientador: João Marcelo Santos de Oliveira

Bromeliaceae é umas das importantes famílias neotropicais. Possui aproximadamente 3501 espécies. Pitcairnioideae apresenta cerca de 170 espécies. O presente trabalho tem por objetivo analisar e caracterizar a esporogênese e a gametogênese em anteras e em rudimentos seminiais em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae). *Dyckia polyclada* L.B. Sm. é nativa e endêmica do Rio Grande do Sul, sendo encontrada na região central do estado. A espécie apresenta flores perfeitas, trímeras e heteroclamídeas. O androceu é composto por seis estames, anteras tetraesporângiadas e dorsifixas. Quanto a investigação sobre os contíuintes químicos da antera foram definidos nove estádios distintos de desenvolvimento. Apenas amido foi detectado no conectivo. Amido e lipídios de reserva foram observados nos esporângios, micrósporos e grãos de pólen. O *pollenkitt* apresenta lipídios neutros, óleos essenciais e oleorresinas em sua composição química. O ovário de *D. polyclada* é súpero, tricarpelar, trilocular e plurispérmico. A placentação é do tipo axial. O estigma é trífido do tipo espiral conduplicado. Os rudimentos seminiais são anátropos, bitegmentados e crassinucelados. Os tegumentos são de origem dérmica. O canal micropilar é formado pelo tegumento interno. O gametófito é de origem monospórica e do tipo *Polygonum*. O aparelho fibrilar é de natureza péctica. Nectários septais infraloculares, labirínticos e não estruturados estão presentes. O apêndice calazal é curto e curvo em direção a rafe e apresenta células alongadas e com espaços intracelulares. O obturador em *D. polyclada* apresenta células alongadas em forma de domo e citoplasma denso e vacuolado, revestindo toda a região placentária. Os dados apresentados são inéditos para a espécie e contribuem para a compreensão das relações filogenéticas dentro da família e para melhor entendimento do funcionamento do processo reprodutivo de *Dyckia polyclada*, tendo em vista que a espécie, por falta de estudos, encontra-se na categoria de dados insuficientes e não se pode diagnosticar o grau de risco de extinção.

Palavras-chave: *Dyckia*. Esporogênese. Gametogênese. Amido. Lipídios.

ABSTRACT**EMBRYOLOGICAL DEVELOPMENT OF *Dyckia polyclada* L.B. Sm.
(PITCAIRNIOIDEAE - BROMELIACEAE).**

Author: Meriélem Saldanha Martins
Advisor: João Marcelo Santos de Oliveira

Bromeliaceae is one of the important neotropical families. It has approximately 3501 species. Pitcairnioideae has about 170 species. The present study aims to analyze and characterize the sporogenesis and gametogenesis in anthers and seminal rudiments of *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae). *Dyckia polyclada* L.B.Sm. is native and endemic to Rio Grande do Sul and it is found in the central area of the state. The species presents perfect trimerous and heterochlamydous flowers. The androecium consists of six stamens, tetrasporangiate and dorsifixed anthers. Nine different phases of development were defined when it comes to the chemical constituents of the anthers. Only starch was detected in the connective. Starch and reserve lipids were observed in sporangia, microspores and pollen grains. The *pollenkitt* presents neutral lipids, essential oils and oleoresins in its chemical composition. The ovary in *D. polyclada* is superior, tricarpellate, trilocular and polyspermic. Placentation is axial. The stigma is trifid of the conduplicate spiral. The ovules are anatropous, bitegmic and crassinucellate. The teguments are from dermic origin. The micropyle is formed by the inner tegument. The gametophyte is monosporic of the *Polygonum* type. The fibrillar apparatus is from pectic nature. Infralocular, labyrinthine and unstructured septal nectaries are present. The chalazal appendix is short and curved toward the raphe and features elongated cells with intracellular spaces. The obturator in *D. polyclada* has elongated dome-shaped cells and dense, vacuolated cytoplasm, coating the entire placental region. The presented data are unprecedented to the species and contribute to the understanding of the phylogenetic relationships within the family and for better understanding of the functioning of the reproductive process of *Dyckia polyclada*, given that, for lack of studies, the species is in the category of insufficient data and one cannot diagnose the degree of extinction.

Keywords: *Dyckia*. Sporogenesis. Gametogenesis. Starch. Lipids.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	12
Objetivos.....	19
Objetivos específicos.....	19
ARTIGO I - Análise dos constituintes químicos de anteras e grãos de pólen em <i>Dyckia polyclada</i> L.B. Sm. (Bromeliaceae)	25
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	29
Resultados.....	30
Discussão.....	33
Conclusão.....	38
Referências Bibliográficas	38
ARTIGO II - Caracterização morfológica do gineceu e rudimento seminal em <i>Dyckia polyclada</i> L.B. Sm. (Bromeliaceae)	54
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	58
Resultados e discussão	60
Conclusão.....	70
Referências Bibliográficas.....	71
CONCLUSÃO.....	96

INTRODUÇÃO GERAL

Introdução geral

As Monocotiledôneas são consideradas um grupo monofilético com base em caracteres morfológicos e dados moleculares bem definidos (REMIZOWA; SOKOLOFF; RUDALL, 2010). Devido à sua grande diversidade são reconhecidas 12 ordens, dentre elas Poales, a maior ordem entre o clado das Commelinídeas, o qual faz parte à família Bromeliaceae (APG III, 2009).

Atualmente, a família ocupa uma posição basal dentro de Poales, como grupo irmão de Typhaceae e Rapateaceae (GIVNISH et al., 2007; APG III 2009; REMIZOWA; SOKOLOFF; RUDALL, 2010). Segundo Judd et al. (2009), a monofilia de Poales é bem sustentada por caracteres moleculares e possíveis sinapomorfias como a presença de corpos silicosos na epiderme, estiletos livres ou conatos, perda de raídeos, sendo que alguns destes caracteres estão presentes em Bromeliaceae (SMITH; TILL, 1998).

Em Bromeliaceae existem aproximadamente 3501 espécies e 59 gêneros (GOUDA et al., 2015). Estudos filogenéticos propõem uma nova classificação para a Bromeliaceae, com novas subfamílias sendo propostas a partir dos diferentes clados referentes às antigas Pitcairnioideae. Assim, são propostas oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae (GIVNISH et al., 2007, 2011) (Fig. 1).

A família é predominantemente tropical (BENZING, 2000), exceto por *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr, que possivelmente chegou ao continente Africano por dispersão a longa distância, em um período relativamente recente (JAQUES-FÉLIX, 2000; GIVNISH et al., 2007). No Brasil são encontradas 40% das espécies de bromeliáceas e muitas destas são endêmicas do ecossistema atlântico (LEME, 1997).

Bromeliaceae é considerada monofilética, o que foi comprovado por análises filogenéticas a partir de caracteres morfológicos e moleculares (GIVNISH et al., 2007, 2011). Ao longo das últimas décadas as relações infrafamiliares em Bromeliaceae tem sido modificada, porém, dentre as três tradicionais subfamílias, Tillandsioideae e Bromelioideae são consideradas monofiléticas e Pitcairnioideae é considerada parafilética (SMITH; DOWNS 1974, 1977, 1979).

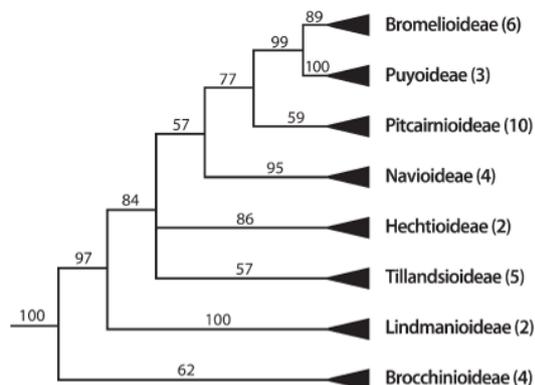


Fig.1: Cladograma com a divisão das subfamílias proposta por Givnish et al. (2011) para Bromeliaceae.

A família ocupa uma variedade de habitats, desde ambientes montanhosos até a mata atlântica, incluindo ervas epífitas, rupícolas ou terrícolas. Suas folhas são dispostas em espiral, formando uma roseta. O limbo é recoberto por tricomas peltados conspícuos. A inflorescência é simples ou composta, apresentando, em geral, brácteas coloridas. O perianto é heteroclamídeo, trímero, e as peças florais apresentam segmentos livres entre si, ou fusionados. Estames apresentam filamentos livres ou conatos ou adnatos às pétalas. O ovário pode ser súpero ou ínfero, trilocular, com rudimentos seminais anátropos, as vezes campilótropos. Os frutos são cápsulas ou bagas. As sementes podem ser nuas, aladas ou plumosas. Com relação aos embriões, os mesmos são relativamente pequenos, na base do endosperma (REITZ, 1983; JUDD et al., 2009).

Devido à sua grande riqueza e adaptabilidade aos mais variados nichos, Bromeliaceae é considerada umas das famílias neotropicais de monocotiledôneas mais importantes (MARTINELLI, 2006). O grupo apresenta características morfológicas que o permite oferecer abrigo, água, nutrientes e sítio de reprodução para diversos organismos (ROCHA et al., 2004). Os representantes da família são extremamente sensíveis a qualquer mudança ou perturbação das condições ambientais, que podem alterar sua composição e populações (BENZING, 1998).

O grupo é conhecido pelo seu potencial ornamental (BENZING, 2000), além de muitas espécies serem utilizadas como fonte alimentícia, medicinal (VIEIRA-DE-ABREU, 2005), e fonte de fibras (BENETT, 2000). O potencial comercial das espécies e a expansão das atividades agrosilvipastoris, permitem que as populações naturais das

espécies de Bromeliaceae, entre outras em associação, entrem em declínio, devido à fragmentação do habitat (MARTINELLI, 2006). Segundo Benzing (2000) as bromeliáceas possuem uma enorme quantidade de néctar e grão de pólen que fornecem como recompensas aos seus polinizadores, assim como as bromélias epífitas são de grande importância para a ciclagem de nutrientes, contribuindo na formação de serrapilheira (OLIVEIRA, 2004).

Morfologia e anatomia dos órgãos reprodutivos da família

As flores das bromeliáceas geralmente são completas, podendo ser também dióicas (BENZING, 2000) e andromonóicas (RAMÍRES, 2001).

O androceu apresenta seis estames, filetes livres ou fusionados entre si ou adnatos as pétalas (SMITH; DOWNS, 1974, 1977, 1979; REITZ, 1983). As anteras de Bromeliaceae são tetrasporângiadas, bitecadas e com deiscência longitudinal (BENZING 2000). Possuem quatro estratos parietais: epiderme, endotécio do tipo fibroso, camada média e tapete do tipo secretor (JOHRI et al., 1992). Os grãos de pólen são monocolpados, inaperturados ou porados (BENZING, 2000) e são liberados na forma bicelular. A androsporogênese foi descrita como sucessiva (DORNELES, 2013, FURNESS; RUDALL, 1999; LAKSHMANAN, 1967; RAO; WEE, 1979), tipo mais comum encontrado nas monocotiledôneas (SAJO et al., 2005).

O gineceu é tricarpelar, trilocular e plurispérmico, com ovário súpero ou ínfero. Os frutos são do tipo baga ou cápsula e as sementes podem ser nuas, aladas ou plumosas (RAO; WEE, 1979; REITZ, 1983; SAJO; PRYCHID; RUDALL, 2004a; SMITH; DOWNS, 1974, 1977, 1979). A placentação é do tipo axial (REITZ, 1983). Nectários septais estão presentes no ovário (JUDD et al., 2009). Os rudimentos seminiais são anátropos, bitegmentados e crassinucelados (JOHRI et al., 1992). O número de camadas nucelares é variável (RAO; WEE, 1979; SAJO; PRYCHID; RUDALL, 2004a). O canal micropilar pode ser formado por um ou ambos os tegumentos (SAJO; PRYCHID; RUDALL, 2004a; SARTORI, 2008; PAPINI et al., 2011; SPAT, 2012 WEE; RAO, 1974). Algumas espécies apresentam apêndices calazais, mas pouco se sabe sobre esta estrutura (FAGUNDES; MARIATH, 2014; SAJO; PRYCHID; RUDALL, 2004a). A família apresenta desenvolvimento de origem monospórica e megagametófito do tipo *Polygonum* (JOHRI et al., 1992).

Galetto e Bernadello (1991) realizaram estudo relacionado aos nectários extraflorais e composição do néctar na família. Alguns trabalhos a cerca da estrutura estigmática foram estudados mais detalhadamente por Brown e Gilmartin (1984, 1989), Vandarjam e Brown (1988). Brown e Gilmartin (1989) caracterizaram a superfície estigmática em cinco tipos: simples-ereto, espiral conduplicado, lamina-convoluta, cupulado e coraliforme.

No trabalho de Sajo et al. (2004a) foi descrito para várias espécies da família a presença do obturador na região placentária, porém não houve nenhum tipo de detalhamento do mesmo. Fagundes e Mariath (2010) descreveram anatomia do ovário, obturador juntamente com o desenvolvimento do fruto para seis espécies da família e em 2013, Fagundes descreveu para *Billbergia nutans* estrutura anatômica do tecido estigmático e estilar, este tipo de estudo ainda são desconhecidos para Bromeliaceae. Mendes et al. (2010) descreveram o desenvolvimento do embrião em *Dyckia pseudococcinea*. Magalhães e Mariath, (2012) estudaram a morfoanatomia da semente em espécies de Tillandsioideae. Santos-Silva et al. (2015) descreveram a estrutura dos frutos de espécies de *Dyckia*.

Estudos sobre a anatomia dos órgãos reprodutivos são escassos na família, considerando o número de representante da mesma, principalmente no que diz respeito à anatomia e desenvolvimento do grão de pólen e rudimentos seminiais, podendo ser citado os trabalhos de Lakshmanan (1967), Wee e Rao (1974) e Rao e Wee (1979), Sajo et al. (2004a, 2005), Conceição et al. (2005), Sartori (2008), Spat (2012) Dorneles (2013), Dorneles et al. (2014), Mendes et al. (2014). Trabalhos anatômicos com enfoque filogenético e taxonômicos com ênfase em órgãos reprodutivos em Bromeliaceae temos os estudos de Sajo et al. (2004b), Fagundes e Mariath (2010, 2014), Albert et al. (2014). Estudos cromossômico na família foi abordado por Gitaí et al. (2005). Oliveira et al. (2015) descreveram para *Aechmea recurvata*, *Dyckia racinae* e *Tillandsia aeranthus* a distribuição do amido nas anteras e grão de pólen.

Gênero *Dyckia*

Dyckia, pertencente à subfamília Pitcairnioideae, possui cerca de 170 espécies (GOUDA et al., 2015), sendo que 148 ocorrem no Brasil (GOUDA et al., 2015). Suas

espécies são geralmente terrestres ou rupestres, de natureza xerofítica, crescem em locais de altitude elevada (GIVNISH et al., 2011). São encontradas no Escudo Brasileiro, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (GIVNISH et al., 2011). No Brasil o gênero tem o seu centro diversidade nas regiões montanhosas do Cerrado brasileiro e entre os biomas adjacentes Mata Atlântica e Caatinga (SMITH; DOWNS, 1974) (Fig. 2). Dentro de sua área de distribuição geográfica, as espécies de *Dyckia* são um componente importante da vegetação sazonal (KRAPP et al., 2014).

O gênero apresenta inflorescência amplamente paniculada a simples, com brácteas primárias inconspícuas e brácteas florais mais curtas que os pedicelos a maiores que as flores. O escapo floral é geralmente lateral. As flores são perfeitas e uniformes ou raramente dimorfas, apresentam tamanho relativamente pequeno e sua coloração pode variar de amarela a vermelha. As bases dos filamentos são separadas uns dos outros, mas às vezes individualmente adnatos às pétalas e sépalas. Os frutos são cápsulas septicidas e algumas vezes loculicidas com sementes largas e aladas. As folhas apresentam as margens espinescentes ou serreadas. (REITZ, 1983; SMITH; DOWNS 1974; SMITH; TILL, 1998).

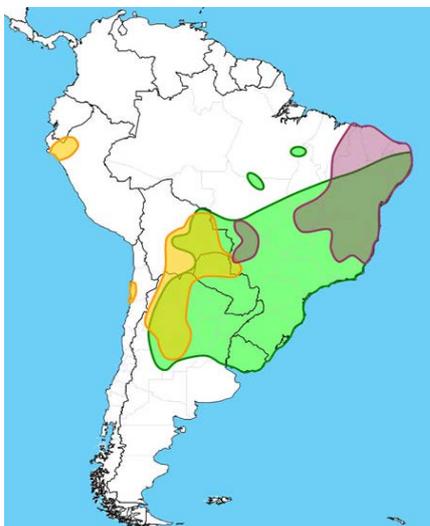


Fig. 2: Modificado de: Krapp et al., 2014: Distribuição de *Dyckia* na América do Sul. Legenda de cores: Violeta: *Encholirium*, Verde: *Dyckia*, Laranja: *Deuterocohnia*.

Recentemente, Krapp et al. (2014) apresentaram a primeira análise filogenética molecular de *Dyckia* utilizando dados de sequências de DNA e uma porção do gene Phyc nuclear. A variação da sequência de DNA entre as espécies foi extremamente baixa, mas sustentou o monofiletismo de *Dyckia*. Segundo os autores citados *Dyckia* e

Encholirium divergiram no nordeste do Brasil, ao passo que uma linhagem de *Dyckia* se dispersou para o sul do Brasil, onde colonizaram habitats adequados para o seu desenvolvimento. Por isso, acredita-se que o ancestral do grupo *Dyckia* tenha chegado ao sul do Brasil em torno de 3,4-2,9 Ma.

Em 2008 Martinelli et al. publicaram para o Rio Grande do Sul, com ênfase na Mata Atlântica, 69 espécies e nove gêneros, dessas nove espécies são endêmicas para o Estado. Salienta-se que são comuns estudos que tratam de Bromeliaceae na Mata Atlântica, ao contrário das demais formações vegetais no Rio Grande do Sul ou suas regiões.

A taxonomia e a má delimitação das espécies de *Dyckia* tem sido um grande problema, a falta de estudos taxonômicos e boas coletas em campo dificultam a identificação das espécies (KRAPP et al., 2014).

A espécie

Dyckia polyclada L.B. Sm. (Figs. 3-7) é nativa e endêmica do Rio Grande do Sul (FORZZA et al., 2016), sendo encontrada na região central do estado. É uma espécie encontrada em ambiente rochoso, com escassez de água e com muita exposição solar. Sua floração tem início, geralmente, entre a primeira e segunda quinzena de dezembro, tendo duração de aproximadamente de 30 dias.

Sua inflorescência possui aproximadamente dois metros de altura. É laxa, bi a tripartida, multiflora e paniculada. Os ramos são patentes a suberetos, novamente ramificados, de 0,20 a 0,40 centímetros de comprimento. O pedúnculo é terminal, ereto, com dez milímetros de espessura no ápice; possui brácteas pedunculares subfoliaceas, superando os entrenós, mas expondo mais do pedúnculo. É uma roseta com folhas numerosas, serreadas, com espinhos aduncos e pungentes. Suas folhas são rosuladas, com 40 centímetros de comprimento, as lâminas foliares apresentam dois centímetros de largura. As brácteas florais são ovais, agudas e possuem quatro milímetros de comprimento na antese, o pedicelo é muito curto na antese. As flores são perfeitas, e pequenas, de 0,80 a 1,00 cm de comprimento. As sépalas são suborbiculares, possuindo quatro milímetros de comprimento. As pétalas são espatuladas, amarelas, e ápices

arredondados, na base um pouco concrecidas entre si e com os filamentos, de 0,80 cm de comprimento a 0,30 cm de largura. Os estames são ligeiramente maiores que as pétalas. As anteras são basifixas. Os estames e o estigma são ligeiramente exsertos (SMITH, 1989; STRELL, 1998).

Na “Lista Vermelha” (IUCN, 2011) e a na “Lista Final das Espécies da Flora Ameaçadas do Rio Grande do Sul” (FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA, 2014) há várias Bromeliaceae, incluindo espécies de *Dyckia* em risco de extinção. Segundo a “Lista Final das Espécies da Flora Ameaçadas do Rio Grande do Sul” (FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA, 2003) *Dyckia polyclada*, encontrava-se na categoria vulnerável (VU). Atualmente, informações sobre a espécie são insuficientes para avaliação de seu risco de extinção (FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA, 2014), devido a falta de estudos e registro de localização da espécie.



Figs. 3-7: *Dyckia polyclada*: Fig. 3: Local de coleta de *D. polyclada*, Morro do Santo Antão, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. - Fig. 4: Aspecto geral da inflorescência em habitat natural. Fig. 5: Detalhe da inflorescência. Fig. 6: Flor de *D. polyclada* em pré antese Fig. 7: Flor de *D. polyclada*, evidenciando os órgãos reprodutivos, (Fotos: Merielem Saldanha Martins).

Sendo assim, este trabalho busca conhecer a embriologia com ênfase estrutural de *Dyckia polyclada*, caracterizando o desenvolvimento das estruturas reprodutivas de *D. polyclada*, contribuindo para caracterização de processo reprodutivo da espécie, sua aplicação em análises filogenéticas e também reunir informações que possam auxiliar

no processo de conservação da espécie e da família.

Objetivo geral

- Analisar e caracterizar a esporogênese e a gametogênese em anteras e em rudimentos seminiais em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae).

Objetivos específicos

- Caracterização dos androsporângios;
- Descrever o padrão de formação dos andrósporos e andrófitos;
- Descrever a dinâmica dos metabolitos primários na antera.
- Descrever a origem do nucelo e dos tegumentos;
- Analisar a meiose e o padrão de organização dos megásporos;
- Caracterizar a diferenciação do megagametófito;
- Caracterizar o megagametófito maduro.

Referências bibliográficas

ALBERT, B. TOGHRANEGAR.Z; NADOT, S. Diversity and evolution of microsporogenesis in Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, p.36-45, 2014.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161(2), p. 105-121, 2009.

BENNETT, B. Ethnobotany of Bromeliaceae. *In*: BENZING, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 587-608, 2000.

BENZING, D.H. Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes. **Climatic Change**, v.39, p.519-540, 1998.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.

BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma structure and variation in Bromeliaceae – neglected taxonomic characters. **Brittonia**, v. 36, n. 4, p. 364-374, 1984.

BROWN G. K.; GILMARTIN A. J. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **American Journal of Botany**, v. 76, p. 657– 665, 1989.

CONCEIÇÃO, S. P. **Ontogênia das anteras de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae)**. Monografia de conclusão de curso. Universidade Santa Úrsula, Rio de Janeiro, RJ, 2005.

DORNELES, M. P. **Desenvolvimento inicial, caracterização estrutural da flor, androsporogênese e androgametogênese em *Dyckia racinae* L.B. Sm. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae)**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia UFSM. Santa Maria, RS, 2013.

DORNELES, M.P; OLIVEIRA, J.M.S; DOROW, T.S. DO CANTO. *Dyckia racinae* L. B. Sm. (Bromeliaceae): morphological description emphasizing the reproductive structures. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 69, n. 2, p. 397-404, 2014

FAGUNDES, N. F.; MARIATH, J. E. A. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 765-779, 2010.

FAGUNDES, N. F.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny in *Billbergia nutans* in the evolutionary context of Bromeliaceae (Poales). **Plant Systematic and Evolution**, v.300 (6), p. 1323-1336, 2014.

FORZZA, R.C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J.A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R.F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B. *Bromeliaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016 <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6061>> Acesso em 23 de janeiro. 2016.

FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA. **Lista Vermelha da Flora Ameaçada do Rio Grande do Sul**. Disponível em: <http://www.fzb.rs.gov.br/> Acessado em 23 de janeiro de 2016, 2003.

FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA. **Lista Vermelha da Flora Ameaçada do Rio Grande do Sul**. Disponível em: <http://www.fzb.rs.gov.br/> Acessado em 23 de janeiro de 2016, 2014.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Microsporogenesis in monocotyledons. **Annals of Botany**, v.84, p. 475-499, 1999.

GALETTO, L.; BERNARDELLO, L. M. Extrafloral nectaries that attract ants. *In*: Bromeliaceae: structure and nectar composition. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 1101 – 1106, 1991.

GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E.; SYSTMA, K. J. Phylogeny, adaptative radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. **Aliso**, v. 23, p. 3-26, 2007.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; EE, B. V.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY; R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, J. A. C.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptative radiation, and historical biogeography. *In*: Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98 (5), p. 872-895, 2011.

GITAÍ, J.; HORRES, R.; BENKO-ISEPPON, A.M. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. **Plant Systematic Evolution**. v 253, p.65-80, 2005.

GOUDA, E.J., BUTCHER, D., GOUDA, C.S. (cont. updated) **Encyclopaedia of Bromeliads**, *Version 3*. <http://encyclopedia.florapix.nl/>. University Botanic Gardens, Utrecht. Acessado em: 23 de janeiro de 2016.

IUCN. **The IUCN Red list of threatened Species**. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org>>. Version 2011.1. Acessado em: 23 de janeiro de 2016.

JACQUES-FÉLIX, H. The Discovery of a Bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. **Selbyana**, v. 21(2), p. 118-124, 2000.

JOHRI, M. B.; AMBEGAOKAR, K. B.; SRIVASTAVA, P. S. Comparative embryology of angiosperms. Berlin, Springer-Verlag, v. 2, 615-1221, 1992.

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F., DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3a ed. Artmed, Porto Alegre. 2009.

KRAPP, F.; PINANGÉ, D.S.B.; BENKO-ISEPPON, A.M.; LEME, E.M.C.; WEISING, K. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Systematic Evolution**, v.300, p.1591-1614, 2014.

LAKSHMANAN, K. K. Embryological studies in the Bromeliaceae. I. *Lindmania penduliflora* (C. H. Wright) Stapf. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**, v. 65, p. 49-55, 1967.

LEME, E.M.C. **Canistrum: Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro, Salamandra, 107 pg., 1997.

MAGALHÃES, R. I; MARIATH, J.E.A. Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae) **Plant Systematic Evolution**, v. 298, p. 881-1895, 2012.

MARTINELLI, G. Manejo de populações e comunidades vegetais: um estudo de caso na conservação de Bromeliaceae. **Biologia da Conservação**, Essências. 1 ed. São Carlos: Rima, v. 1, p. 479-503, 2006.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, n.1, p. 209-258, 2008.

MENDES, S. P.; COSTA, C. G.; DE TONI, K. L. G. Embryo development of *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae - Bromeliaceae), an endangered Brazilian species. **Australian Journal of Botany**, v. 58, p. 485-492, 2010.

MENDES, S. P, MASTROBET, A. A., MARIATH, J. E. A., VIEIRA, R. C, DE TONI, K. L. G. Ovule and female gametophyte development in the Bromeliaceae: an embryological study of *Pitcairnia encholirioides*. **Botany**, v.92, p. 883-894, 2014.

OLIVEIRA, R. R. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18(4), p. 793-799, 2004.

OLIVEIRA, J.M.S; MARTINS, M.S; DORNELES M.P; FREITAS C.C. Starch distribution in anthers, microspores and pollen grains in *Aechmea recurvata* (Klotzsch.)

L.B.Sm., *Dyckia racinae* L.B.Sm. and *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.29, p.103-121,2015.

PAPINI A, MOSTI S, MILOCANI E, TANI G, DI FALCO P, BRIGHIGNA L. Megasporogenesis and programmed cell death in *Tillandsia* (Bromeliaceae). **Protoplasma**, v. 248(4), p. 651-662, 2011.

RAMÍRES, I. M. Pollinator in *Cryptanthus*: a hypothesis. **Journal of the Bromeliads society**, v. 51, p. 65-70, 2001

RAO, A. N.; WEE, Y. C. Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. **New Phytologist**, v. 83(2), p. 485-497, 1979.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica. Flora ilustrada catarinense (BROM)**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1983.

REMIZOWA, M.V; SOKOLOFF; D.D; RUDALL, P.J. Evolutionary History of the Monocot Flower. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.97, p.617-645, 2010.

ROCHA, C. F. D.; COGLIATTI-CARVALHO, L.; NUNES-FREITAS, A. F.; ROCHA-PESSOA, T. C.; DIAS, A. S.; ARIANI, C. V.; MORGADO, L. N. Conservando uma larga proporção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, v. 2, p. 52-68, 2004.

SAJO, M.G.; PRYCHID, C.J.; RUDALL, P.J. Structure and development of the ovule in Bromeliaceae. **Kew Bulletin**, v. 59, p. 261-267, 2004a.

SAJO, M. G., RUDALL, P. J.; PRYCHID, C. J. Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectarines in commelinid monocots. **Plant Systematics and Evolution**, v. 247, p. 215-231, 2004b.

SAJO, M. G.; FURNESS, C. A.; PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Microsporogenesis and anther development in Bromeliaceae. **Grana**, v. 44, p. 65-74, 2005.

SANTOS-SILVA, F.; MASTROBERT, A.A.; MARIATH, J.E.A. Capsule structure in three species of *Dyckia* (Bromeliaceae): Ontogenetic and taxonomic issues. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 142(3), p. 249-257, 2015.

SARTORI, J. S. **Desenvolvimento Floral em *Vriesea carinata* Wawra (Tillandsioideae – Bromeliaceae)**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica UFRGS. Porto Alegre, RS, 2008.

SMITH, L.B. Another Giant *Dyckia* Mystery. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 39, n. 5, p.206, 1989.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Bromelioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotrópica Monographs**, v. 14, p. 1604-1724, 1979.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotrópica Monographs**, v. 4, p. 663-1492, 1977.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotrópica Monographs**, v. 4, p. 1-658, 1974.

SMITH, L. B.; W. TILL. Bromeliaceae: *in* The families and genera of vascular plants. K. Kubitzki. Berlin: Springer, v. 4, p. 74–99, 1998.

SPAT, C. **Caracterização estrutural da embriologia em *Tillandsia aeranthos* (Lois.) L.B. Sm (Tillandsioideae - Bromeliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2012.

STREHL, T. Flórua fanerogâmica da Reserva Biológica do Ibicuí Mirim, Rio Grande do Sul, Brasil: Bromeliaceae. **Iheringia**, série botânica, Porto Alegre, I (51): 17-37. 1998

VARADARAJAN, G. S.; BROWN, G. K. Morphological variation of some floral features of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and their significance in pollination biology. **Botanical Gazette**, v. 149, n. 1, p. 82-91, 1988.

VIEIRA-DE-ABREU, A. *et al.* Anti-allergic properties of the Bromeliaceae *Nidularium procerum*: Inhibition of eosinophil activation and influx. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 1966 – 1974, 2005.

WEE, Y. C.; RAO, A. N. Gametophytes and seed development in pineapple. **Current Science**, v. 43, p. 171-173, 1974.

CAPÍTULO I

Análise dos constituintes químicos de anteras e grãos de pólen em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Bromeliaceae)

Artigo foi redigido de acordo com as normas para autores do periódico

‘Acta Botanica Brasilica’

Mariane Paludette Dorneles, Meriélem Saldanha Martins, Cesar Carvalho de Freitas,
João Marcelo Santos de Oliveira

Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

mmartins077@gmail.com

Artigo Original

Análise dos constituintes químicos de anteras e grãos de pólen em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Bromeliaceae)

Artigo foi redigido de acordo com as normas para autores do periódico

‘Acta Botanica Brasilica’

Mariane Paludette Dorneles, Meriélem Saldanha Martins, Cesar Carvalho de Freitas,
João Marcelo Santos de Oliveira

Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

mmartins077@gmail.com

Durante o desenvolvimento da antera substâncias com finalidade nutritivas e estruturais, como amido, lipídios e proteínas são sintetizadas e transformadas nos esporângios. A dinâmica desses constituintes químicos está envolvida na diferenciação da antera, na divisão celular, na quebra da calose e na síntese de materiais que ocorrem durante o desenvolvimento do pólen (Konyar *et al.* 2013). Poucos são os trabalhos que trazem informações sobre a dinâmica dos metabólitos de seus grãos de pólen. O trabalho objetiva investigar as alterações nos componentes químicos dos esporângios e durante a formação do grão de pólen com especial atenção na distribuição e na quantidade dos lipídios em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. Para isso, foram definidos nove estádios distintos de desenvolvimento e realizados testes para a presença de lipídios, proteínas, polissacarídeos totais e amido. No conectivo, apenas amido foi detectado. Nos esporângios, micrósporos e grãos de pólen estão presentes amido e lipídios de reserva. O *pollenkitt* apresenta lipídios neutros, óleos essenciais e oleorresinas em sua composição química. A acumulação desses metabólitos está associada a formação de grãos de pólen viáveis além de garantir sua propagação e germinação.

Palavras-chave: Bromeliaceae, *D. polyclada*, grão de pólen, lipídios, *pollenkitt*

Analysis of the chemical constituents of anthers and pollen grains in *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Bromeliaceae)

The article was written according to the standards for journal authors
'Acta Botanica Brasilica'

Mariane Paludette Dorneles, Meriélem Saldanha Martins, Cesar Carvalho de
Freitas, João Marcelo Santos de Oliveira
Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

mmartins077@gmail.com

During the development of the anther, substances with nutritional and structural purpose such as starch, lipids and proteins are synthesized and processed in the sporangia. The dynamics of these chemical constituents are involved in the differentiation of the anther, cell division, break of callose and synthesis of materials that occur during pollen development. There are only a few studies that provide information about the dynamics of metabolites of their pollen grains. The study aims to investigate the alterations in chemical components of sporangia and during the formation of pollen grains with special attention to the distribution and quantity of lipids in *Dyckia polyclada* L.B. Sm. To do this, nine different stages of development and tests for the presence of lipids, proteins, total polysaccharides and starch were defined. Only starch was detected in the connective. Starch and reserve lipids are present in the sporangia, microspores and pollen grains. The *pollenkitt* features neutral lipids, essential oils and oleoresins in its chemical composition. The accumulation of these metabolites is associated with the formation of viable pollen grains and ensures its propagation and germination.

Key words: Bromeliaceae, *Dyckia polyclada*, pollen grain, lipids, *pollenkitt*.

Introdução

Durante o desenvolvimento da antera substâncias com finalidade nutritivas e estruturais, como amido, lipídios e proteínas são sintetizadas e transformadas nos esporângios (Konyar *et al.* 2013). Os esporângios e grãos de pólen funcionam como drenos dos metabólitos durante o desenvolvimento das anteras (Oliveira *et al.* 2015).

A dinâmica desses constituintes químicos está envolvida na diferenciação da antera, na divisão celular, na quebra da calose e na síntese de materiais que ocorrem durante o desenvolvimento do pólen (Konyar *et al.* 2013).

As proteínas e os lipídios podem ser componentes importantes da estrutura interna e externa dos grãos de pólen, podendo representar mais de dois terços do conteúdo dos mesmos (Evans *et al.* 1991). Os lipídios internos do grão de pólen são sintetizados pela célula vegetativa, mas é o tapete que é o responsável pelo fornecimento dos nutrientes que mantêm a rápida síntese dos mesmos observados no desenvolvimento do pólen (Evans *et al.* 1992).

Além disso, as proteínas e os lipídios encontrados entre as ondulações da exina podem estar relacionados às mais variadas funções, como a adesão do pólen a polinizadores, manutenção da hidratação durante sua dispersão, protegendo o grão de pólen dos efeitos da radiação solar e do ataque de possíveis patógenos. Além disso, participam dos processos de reconhecimento do grão de pólen ao estigma receptivo, interferindo diretamente nos processos de germinação (Pacini & Franchi 1993; Piffanelli *et al.* 1998; Edlund *et al.* 2004).

O *pollenkitt*, formado no final do processo degenerativo do tapete (Pacini 1997), é produzido independentemente do tipo de tapete, plasmodial ou secretor (Pacini &

Hesse 2005). É constituído, principalmente, por lipídios e carotenóides, como descrito para espécie de *Lilium* L. (Liliaceae) por Heslop-Harrison (1968).

Em Bromeliaceae, trabalhos sobre o grão de pólen são relativos aos processos e aspectos embriológicos ou palinológicos, podendo haver aplicações taxonômicas (Benzing 2000). São poucas as informações sobre a dinâmica dos metabólitos primários e secundários nos grãos de pólen na família (Baker & Baker 1979; Hess 1991; Eva *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2015).

No presente estudo as alterações nos componentes químicos que ocorrem no esporângio e durante a formação do grão de pólen nos diferentes estádios de desenvolvimento da antera foram investigadas, dando especial atenção a distribuição e quantidade de lipídios. Mesmo havendo uma íntima relação entre a formação do pólen viável e a distribuição de substâncias de reservas durante seu desenvolvimento, o conhecimento ainda é muito reduzido para Bromeliaceae. Portanto esperamos contribuir para os estudos sobre biologia reprodutiva da família, do gênero *Dyckia* e da espécie *Dyckia polyclada*.

Materiais e métodos

Foram coletadas inflorescências com botões florais em diferentes estádios do desenvolvimento de *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Fig. 1A-C), no município de Santa Maria, RS (S 29° 42' 911" e W 53° 43' 093".), com número de registro SMDB 15923.

Os botões florais e flores foram fixados em 1% glutaraldeído e 4% formaldeído (McDowell & Trump 1976) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 (Gabriel 1982), seguido de lavagem em água destilada. As anteras foram desidratadas em (2-hidroxietil) - metacrilato (HEMA) diluído em água destilada nas seguintes proporções 10%, 20%,

30%, 40% e 50%. O material botânico foi submetido a desidratação e inclusão simultâneas em HEMA durante 48 horas (Oliveira 2015). Foram realizadas secções de 2 µm a 3µm de espessura em micrótomo de rotação Leica RM2245. As anteras maduras foram maceradas mecânicamente, em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 (Gabriel 1982), para a exposição dos grãos de pólen, nos quais foram realizados os testes para a observação do *pollenkitt*. Para a identificação de polissacarídeos totais e de amido foi utilizado Ácido Periódico/Reagente de Schiff (PAS) (O'Brien & McCully 1981), combinado com Azul de Toluidina O em tampão benzoato de sódio, pH 4,4 (Sidman et al 1961). Para observação de lipídios neutros utilizou-se Sudan Red 7B (Brundrett *et al.* 1991), para identificação lipídios neutros (coram de rosa) e lipídios ácidos (coram de azul) usou-se o Sulfato Azul do Nilo (Cain 1947). Para identificação dos lipídios totais Sudan Black B (Pearse 1972), para a observação de óleos essenciais (coram de azul), oleorresinas (coram de vermelho), e para da mistura de óleos essenciais e oleorresinas (coram de púrpura) foi utilizado o reagente de NADI (David & Carde 1964). Para a observação de proteínas utilizou-se o Azul de Coomassie (Fisher 1968). A análise e as fotomicrografias foram realizadas em microscópio Leica DM2000.

No presente estudo, nove fases do desenvolvimento embriológico, conforme Oliveira *et al.* (2015), foram usadas como referência para a análise da espécie.

Resultados

O androceu, é levemente heterodínamo, formado por seis estames, a anteras são exsertas, rimosas e triangulares, com ápice agudo e curvo (Fig 1B, C), formada por quatro esporângios. O padrão de formação dos estratos parietais nas anteras é do tipo básico. Na antera madura restam apenas epiderme e endotécio fibroso (Fig. 2A).

Na espécie estudada foram definidos nove estádios de desenvolvimento (1. Prófase da meiose, 2. Tétrade de micrósporos, 3. Dissolução da calose, 4. Micrósporos livres, 5. Vacuolação, 6. 1ª mitose haplóide, 7. Gametogênese inicial (célula generativa parietal), 8. Gametogênese média (unidade germinativa masculina já formada), 9. Gametogênese final (célula generativa fusiforme) para observação e análise comparada da presença de amido (Fig. 2A-F) e lipídios (Figs. 2G-K, 3A-I, 4 A-E) de reserva no conectivo, esporângios, micrósporos e grãos de pólen (Tabela 1). Proteínas foram detectadas no citoplasma junto à região da abertura, aparentemente não como proteínas de reserva (Fig. 3J).

Amido

Nos esporângios e no conectivo (Fig 2B, D) a reação foi positiva para a presença de amido para os estádios 1 a 5, havendo um pico da amilogênese no estádio 2 (Fig. 2B), com tétrades de micrósporos formadas, embora livres em fluido locular. A amilogênese nos esporângios inicia durante o estádio 1, com células-mãe de micrósporo (Fig. 4C), enquanto no conectivo inicia pouco depois, antes da formação das tétrades. Nos meiócitos, a amilogênese inicia na fase de formação das tétrades. As fases seguintes são marcadas pela amilólise que leva ao consumo total dos grãos de amido nos esporângios (Fig. 2E) e conectivo até o estádio 5. Nos micrósporos o pico de amilogênese ocorre durante o estádio 2 e a amilólise total se observa ao final da dissolução da calose.

No estádio 4, inicia-se novo processo de amilogênese, onde pequenos grãos de amido são visualizados nos micrósporos (Fig. 2D). Após a primeira mitose, no estádio 7, se observa o pico de amilogênese, sendo exclusivo na célula vegetativa (Fig. 2E). A partir deste estádio ocorre amilólise progressiva, culminando em grãos de pólen sem amido, tipo *starchless*, na fase de dispersão (Fig. 2F).

Lipídios

Com relação aos lipídios de reserva, para o conectivo a reação foi negativa para todos em todos os testes e estádios analisados (Tabela 1). No esporângio observa-se acúmulo de lipídios neutros, na forma de gotas, a partir do estádio 5, e seu pico de acumulação ocorre no estádio 7 (Tabela 1). Há redução gradual dessa reserva a partir do final do estádio 7 (Fig. 2I), sendo que no estádio 9 não são mais observadas. A outra categoria lipídica, de óleos essenciais e oleorresinas e lipídios ácidos, foram observados apenas no tapete, a partir do estádio 2 (Fig. 3F), com acumulação gradual até o estádio 7, seguido de decréscimo gradual (Figs. 3F-G).

Durante o estádio de célula mãe é possível perceber a presença de lipídios neutros na cutícula da epiderme e na de célula-mãe de micrósporo (Fig. 4A) em pequena quantidade. A presença dos lipídios neutros é mais representativa nos micrósporos e fluido locular no estádio 2 (Figs. 2I, 3A); sendo que as gotículas lipídicas no lóculo ficam dispersas e envolvendo os micrósporos (Figs. 2H, J). No estádio 5 o padrão de reação da exina é idêntico àquele apresentado anteriormente pelas gotas lipídicas e, também, pelas gotículas ainda remanescentes no fluido locular (Fig. 3B). Sem haver total consumo dos lipídios descritos, se percebe novo processo de acúmulo, este gradual nos estádios 6 e 7 (Figs. 2I, 3C), culminando com o pico de acumulação no início do estádio 8 (Fig. 3D-E). Ainda, no estádio 8 há um decréscimo brusco da quantidade de lipídios neutros até quase total desaparecimento no estádio 9, ficando concentrados junto a região de abertura (Fig. 2K). Lipídios neutros também compõem o *pollenkitt* em grãos de pólen maduros (Fig. 3C, E).

Quanto aos lipídios ácidos sua dinâmica é muito similar a descrita para os lipídios neutros, embora tenham diferido em suas quantidades aparentes. Além disso, no grão de pólen maduro a presença de lipídios ácidos é positiva apenas na estrutura da exina e da intina (Fig. 3C-E), não sendo observados no *pollenkitt* ou como lipídios de

reserva. A análise comparada das fases permite identificar maior quantidade de gotas de lipídios neutros em relação aos ácidos (Fig. 3A-E). Apenas no estágio 1 é que a presença de lipídios ácidos é superior aos neutros (Fig. 4B).

É bem marcada a presença de óleos essenciais na célula-mãe de micrósporo no estágio 1 (Fig. 4 D), nos micrósporos, no estágio 2 (Fig. 3F) e nos grãos de pólen jovens, no estágio 6, quanto no lóculo (Fig. 3G). É a partir do estágio 7 que gotículas que indicam a presença de misturas de óleos essenciais e oleorresinas começam a aparecer, em quantidades menores em relação as que possuem apenas óleos essenciais. O pico desse metabólito também foi verificado no estágio 8, cujo o decréscimo também é brusco e culmina com a redução quase total no estágio 9 (Fig. 3H). O padrão de coloração do *pollenkitt*, ao reagente NADI, indicou nesse a mistura de óleos essenciais e oleorresinas, tanto no material incluído quanto no material macerado (Fig. 3 H, I).

Discussão

Como é possível observar na tabela 1, no conectivo foi detectada a presença apenas de amido, sem acúmulo, portanto, de lipídios ou proteínas. Nos esporângios o amido aparece com maior intensidade nos estádios iniciais, não sendo mais detectado a partir do estágio 5. Em *Campsis radicans* (Konyar *et al.* 2013) a acumulação dos corpos lipídicos nas células tapetais ocorre no estágio de tétrade, e coincide com o decréscimo dos grãos de amido armazenados no conectivo e no esporângio, também observado em *D. polyclada*. Konyar *et al.* (2013) sugerem que o amido armazenado é utilizado para originar produtos lipídicos nos tecidos esporofíticos. Em *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino (Xie *et al.* 2005), foi observada dinâmica similar para amido e lipídios em comparação à *C. radicans* e *D. polyclada*, contudo ao analisar o processo em

macho estéreis, foi observado que não há consumo total dos grãos de amido e que não há formação e acumulação de lipídios no tapete. Em outro estudo com espécies macho estéreis de *Oenothera*, o tapete se degenera rapidamente, lipídios não são sintetizados e a formação da esporoderme não acontece integralmente (Halac 1990). Assim, os estudos com macho estéreis mostram a importância da dinâmica dos nutrientes de reserva principalmente amido e lipídios, para o desenvolvimento das anteras e grãos de pólen.

Em *D. polyclada*, no estágio 4, o tapete já se apresenta colapsado, nos micrósporos os grãos de amido são reduzidos em número e tamanho, sugerindo ocorrência de amilólise. No estágio 5, de vacuolação, o amido é quase totalmente consumido, enquanto espessamento da intina na região da abertura aumenta. Em *Dyckia racinae* também foram observadas, na mesma fase embriológica, amilólise e diferenciação da intina nas aberturas do pólen (Oliveira *et al.* 2015). A relação entre amilólise e o aumento da espessura da intina é sugerida por Santos & Mariath (1999).

Algumas características estruturais como crescimento de células epidérmicas, células do endotécio, bem como formação de seus espessamentos secundários, são concomitantes ao consumo dos grãos de amido acumulados nas camadas parietais em *D. polyclada* (Tab. 1). Oliveira e colaboradores (2015) colocam que a mobilização do açúcar está relacionada diretamente ao processo de formação e diferenciação de esporângios, esporos e gametófitos, bem como das estruturas que auxiliam na deiscência da antera, as quais em conjunto funcionariam como um dreno desse metabólito.

Terpenos e lipídios ácidos foram mais representativos no tapete em relação aos lipídios neutros, o que pode ser observado mesmo depois da liberação dos corpos lipídicos no lóculo. Em *Brassica napus* a maioria dos lipídios foram caracterizados

como lipídios neutros (Hernández-Pinzón *et al.* 1999). Ácidos graxos podem ser os principais constituintes dos lipídios neutros (Andrikopoulos *et al.* 1985), sua síntese ocorre nos plastídios, e como fazem parte da constituição da membrana plasmática podem estar sendo utilizados no desenvolvimento celular dos gametas (Heldt & Piechulla 2011).

As células do tapete possuem função secretora (Pacini 1997) estando envolvidas na síntese e liberação de materiais importantes para o desenvolvimento dos micrósporos como a formação da esporopolenina, tryphine e *pollenkitt* (Bhandari 1984). Em estudo com plantas mutantes para o gene NEF1, houve observação da produção e liberação de corpos lipídicos no lóculo das anteras, porém com constituição química diferente em relação ao tipo silvestre, tendo como consequência a não formação da esporoderme (Ariizumi *et al.* 2004).

A acumulação adequada de lipídios nos plastos e corpos lipídicos está de alguma forma associada à formação normal da parede do pólen. Em plantas estéreis em que a expressão do gene mutante age na formação do esporófito, gerando uma degeneração precoce do tapete e impedindo o correto metabolismo lipídico, é possível identificar que a falta dos produtos metabólicos liberados pelo tapete durante a formação do grão, compromete a formação da exina (Halac *et al.* 1990).

Componentes lipídicos como ésteres de esterol e triacilglicerídeos são acumulados nos plastos e corpos lipídicos (Hernández-Pinzón *et al.* 1999). Os triacilglicerídeos no pericarpo podem atrair dispersores, embora quando presentes na semente contribuem com o carbono necessário para os processos de germinação (Heldt & Piechulla 2011).

No estágio 2, os testes foram positivos para a presença de lipídios no citoplasma dos micrósporos, mas esses reduzem nos estádios 3 e 4 no citoplasma e aparecem na

primexina, sugerindo sua participação na formação da esporoderme. No estágio 5, uma grande quantidade de corpos lipídicos é liberada no lóculo. Esses lipídios podem estar contribuindo com a primeira mitose que ocorre no estágio 6, fornecendo energia como sugerem Sanger & Jackson (1971), assim como o tamanho e a distribuição dos corpos lipídicos no citoplasma podem estar contribuindo para o sucesso da divisão assimétrica (Park & Twell 2001).

Durante o estágio bicelular, do grão de pólen, ocorre o pico dos metabólitos lipídicos, sendo os mais representativos os lipídios neutros e terpenos, mas também foi verificada a presença de lipídios ácidos, além da mistura de óleos essenciais e oleorresinas. A maioria dos corpos lipídicos é armazenada durante o estágio de desenvolvimento inicial do grão de pólen. Junto com a deposição da esporoderme ocorre seu consumo de lipídios (Evans *et al.* 1992), indicando que a esporoderme é um dreno importante dos lipídios nas anteras.

Os corpos lipídicos acumulados nos grãos de pólen maduros podem atuar como reservas de energia para a sua germinação, enquanto a polarização desses corpos junto a exina e da abertura também podem evitar a perda de água (Garcia *et al.* 2003). Quanto a polarização dos corpos lipídicos não é possível confirmar se ela ocorre, mas, no presente estudo, após seu decréscimo os corpos lipídicos tendem a ocorrer entorno da célula generativa. Segundo Bianchi *et al.* (1990), grãos de pólen com lipídios de reserva estariam mais aptos a suportar o ambiente.

Grãos de amido também podem apresentar distribuição similar em volta da célula generativa, tendo sido descrito para *Arabidopsis*, no estágio tricelular antes da antese, onde é possível identificar vacúolos, grãos de amido e corpos lipídicos associados aos gametas, mas na antese eles são redistribuídos no citoplasma (Park & Twell 2001).

Foram identificados como constituintes da intina polissacarídeos e lipídios. Antes da primeira mitose na região da abertura já é observada a porção externa da intina com grande espessura, composta por polissacarídeos, embora lipídios neutros e ácidos tenham sido detectados na abertura dos grãos maduros. A intina é estruturalmente mais simples do que a exina e é composta principalmente de polissacarídeos (pectinas, hemiceluloses e celulose) (Southworth 1973; Rudall 2007). A exina é composta por lipídios neutros e ácidos e terpenos. Quando presentes na exina os lipídios podem evitar a perda de água ao mesmo tempo em que permitem a troca de gases através de suas aberturas (Southworth 1973).

Enquanto a exina funciona como um local de depósito das proteínas esporofíticas, derivadas do tapete, a intina nos locais da abertura possui proteínas de origem gametofíticas (Howlett *et al.* 1973). Algumas das camadas que formam a intina possuem enzimas e alérgenos potentes, outras parecem estar relacionadas com a emergência do tubo polínico (Howlett *et al.* 1973).

As aberturas representam regiões especializadas em que a exina é reduzida ou ausente e a intina é espessada (Rudall 2007). A abertura não possui apenas a função de fornecer um caminho para a emergência do tubo polínico, é também importante como local para o armazenamento e liberação de proteínas do gametófito, incluindo enzimas e substâncias de reconhecimento (Howlett *et al.* 1973; Edlund *et al.* 2004). Essas enzimas são incorporadas a parede do tubo polínico durante a germinação, e podem estar desempenhando um importante papel para o crescimento desse tubo pelos tecidos do estigma, ou ainda auxiliando no processo de reconhecimento (Southworth 1973).

Em *D. polyclada* o *pollenkitt* apresenta reação positiva para lipídios neutros, óleos essenciais e oleorresinas. Os lipídios neutros foram encontrados em maior quantidade na superfície dos grãos de pólen. Ácidos graxos livres e triacilglicerídeos

são os principais constituintes dos lipídios neutros dos grãos de pólen de *Pinus halepensis* Mill. (Andrikopoulos *et al.* 1985). Os ácidos graxos presentes no *pollenkitt* são extremamente atraentes às abelhas (Lepage & Boch 1968), embora possam em algumas espécies inibir a gustação (Singh *et al.* 2015). Os triacilglicerídeos insaturados são necessários para que haja a reidratação do grão de pólen e do estigma (Wolters-Arts *et al.* 1998). Já os óleos essenciais e oleorresinas são encontrados principalmente no interior das cavidades da exina. As oleorresinas e óleos essenciais possuem odor característico, atraindo os insetos polinizadores e repelindo outros (Heldt & Piechulla 2011). O *pollenkitt* deixa o pólen brilhante, colorido e pegajoso o que facilita a polinização por insetos (Southworth 1973).

A presença de compostos altamente energéticos nos grãos de pólen no estágio 9, sugere que estes possam ter um papel importante nas estratégias de polinização de *D. polyclada*, contribuindo assim para o sucesso do processo reprodutivo. Grãos de pólen do tipo *starchless* foram descritos para Bromeliaceae por Baker & Baker (1979), similar ao que foi encontrado nesse trabalho. Esse tipo de grão costuma ser produzido em número elevado e tamanho reduzido, ricos em lipídios servindo como parte da recompensa recebida pelos polinizadores (Baker & Baker 1979).

Conclusão

A partir dos resultados obtidos verifica-se que a dinâmica dos metabólitos analisados está diretamente relacionada ao desenvolvimento do esporângio e do grão de pólen. A diferenciação do esporângio, desenvolvimento de estruturas relacionadas ao processo de deiscência da antera, formação dos grãos de pólen envolvendo as divisões celulares, formação da esporoderme e *pollenkitt* bem como processo relacionados a

proteção dos gametas durante a dispersão e a germinação em conjunto funcionam, como dreno dos metabolitos analisados.

As diferenças encontradas na composição dos lipídios mostraram-se importantes na modificação de diferentes papéis desempenhados por esse metabólito durante os processos de desenvolvimento da antera.

Referências Bibliográficas

- Andrikopoulos NK, Siafaka-Kapadai A, Demopoulos CA, Yanovits-Argyriadis N. 1985. Lipids of *Pinus halepensis* pollen. *Phytochemistry* 24: 2953-2957.
- Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, Inatsugi R, Nishida I, Sato S, Kato T, Tabata S, Toriyama K. 2004. Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39: 170-181.
- Baker HG, Baker I. 1979. Starch in Angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *American Journal of Botany* 66: 591-600.
- Benzing DH. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge, Cambridge University Press.
- Bhandari NN. 1984. The Microsporangium. In: Johri BM. (Ed.). *Embryology of Angiosperms*. Berlin, Springer-Verlag: 53-121.
- Bianchi G, Murelli C, Ottaviano E. 1990. Maize pollen lipids. *Phytochemistry* 29: 739-744.
- Brundrett MC; Kendrick B; Peterson CA. 1991. Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol glycerol. *Biotechnic & Histochemistry* 66: 111-116.

- Cain AJ. 1947. The use of Nile blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88: 383-392.
- Conceição SP. 2005. Ontogenia das anteras de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae). Monografia de conclusão de curso. Universidade Santa Úrsula, Rio de Janeiro.
- David R; Carde JP. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris Série D* 258: 338-1340.
- Davis GL. 1966. Systematic embryology of the angiosperms. John Wiley & Sons, New York.
- Edlund AF, Swanson R, Preuss D. 2004. Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. *The Plant Cell* 16: 84-97.
- Eva M; Papini A, Brighigna L. 2006. Ultrastructural studies on bicellular pollen grains of *Tillandsia seleriana* Mez (Bromeliaceae), a neotropical epiphyte. *Caryologia* 59: 88-97.
- Evans DE, Taylor PE, Singh MB, Knox RB. 1991. Quantitative analysis of lipids and protein from the pollen of *Brassica napus* L. *Plant Science* 73: 117-126.
- Evans DE, Taylor PE, Singh MB, Knox RB. 1992. The interrelationship between the accumulation of lipids, protein and the level of acyl carrier protein during the development of *Brassica napus* L. pollen. *Planta* 186: 343-354.
- Fisher DB, Jensen WA, Ashton ME. 1968. Histochemical studies of pollen: storage pockets in the endoplasmic reticulum (ER). *Histochemie* 13: 169-182.
- Gabriel BL. 1982. Biological Electron Microscopy. New York, Van Nostrand Reinhold Company.
- Halac IN, Cismondi IA, Harte C. 1990. Pollen ontogenesis in *Oenothera*: a comparison of genotypically normal anthers with the male-sterile mutant *sterilis*. *Sexual Plant Reproduction* 3: 41-53.

- Hernandez-Pinzon I, Ross JHE, Barnes KA, Damant AP, Murphy DJ. 1999. Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus*. *Planta* 208: 588-598.
- Heslop-Harrison J. 1968. Tapetal Origin of Pollen-Coat Substances in *Lilium*. *New Phytologist* 67: 779-786.
- Hess MW. 1991. Ultrastructure of organelles during microsporogenesis in *Tillandsia pallidoflavens* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* 176: 63-74.
- Howlett BJ, Knox RB, Heslop-Harrison J. 1973. Pollen-Wall Proteins: Release of the Allergen Antigen E from intine and Exine Sites in Pollen Grains of Ragweed and Cosmos. *Journal of Cell Science* 13: 603-619.
- Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS. 1992. *Comparative Embryology of Angiosperms*. Berlin, Springer-Verlag.
- Konyar ST, Dane F, Tütüncü S. 2013. Distribution of insoluble polysaccharides, neutral lipids, and proteins in the developing anthers of *Campsis radicans* (L.) Seem. (Bignoniaceae). *Plant Systematics and Evolution* 299: 743-760.
- Lakshmanan KK. 1967. Embryological studies in Bromeliaceae. I. *Lindmania penduliflora* (Ch Wright) Stapf. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B* 65: 49-55.
- Lepage M, Boch R. 1968. Pollen lipids attractive to honeybees. *Lipids* 3:530-534.
- McDowell EM, Trump BR. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100:405-414.
- O'Brien TP, McCully ME. 1981. *The study of plant structure principles and selected methods*. Melbourne, Termarcarphi Pty Ltd.

- Oliveira JMS. 2015. Simultaneous dehydration and infiltration with (2-hydroxyethyl)-methacrylate (HEMA) for lipid preservation in plant tissues. *Acta Botanica Brasilica* 29: 207-212.
- Oliveira JMS, Martins MS, Dorneles MP, Freitas CC. 2015. Starch distribution in anthers, microspores and pollen grains in *Aechmea recurvata* (Klotzsch.) L.B.Sm., *Dyckia racinae* L.B.Sm. and *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica* 29: 103-121.
- Pacini E. 1997. Tapetum character states: Analytical keys for tapetum types and activities. *Canadian Journal of Botany* 75: 1448–1459.
- Pacini E, Franchi GG. 1993. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. *Plant Systematics and Evolution* 7: 1-11.
- Pacini E, Hesse M. 2005. Pollenkitt - its composition, forms and functions. *Flora* 200: 399-415.
- Park SK, Twell D. 2001. Novel *gemini pollen1* Patterns of Ectopic Cell Plate Growth and Lipid Body Distribution in the *Arabidopsis* Mutant¹. *Plant Physiology* 126: 899–909.
- Pearse AGE. 1972. *Histochemistry: theoretical and applied*, Vol. II, 3rd ed., Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Piffanelli P, Ross JHE, Murphy DJ. 1998. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sexual. Plant Reproduction* 11: 65–80.
- Rodríguez - García MI, M'rani-Alaoui M, Fernández MC. 2003. Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen *Protoplasma*, 221: 237–244.
- Rudall P. 2007. *Anatomy of Flowering Plants – An Introduction to Structure and Development*. 3^a ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Singh S, Saini K, Jain KL. 1999. Quantitative comparison of lipids in some pollens and their phagostimulatory effects in honeybees, *Journal of Apicultural Research* 38: 87-92.

- Sanger JM, Jackson WT. 1971. Fine structure study of pollen development in *Hemanthus katherinae* Baker. *Journal of Cell Science* 8: 289–301.
- Santos RP, Mariath JEA. 1999. Storage substances in the androgametogenesis and mature pollen grain of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 22: 125-131.
- Sidman RL, Mottla PA, Feder N. 1961. Improved polyester wax embedding for histology. *Stain Technol* 36: 279-284.
- Southworth D. 1973. Cytochemical Reactivity of Pollen Walls *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 21: 73-80.
- Xie CT, Yang YH, Qiu YL, Zhu XY, Tian HQ. Cytochemical investigation of genic male-sterility in Chinese cabbage. *Sexual Plant Reproduction* 18: 75-80.
- Wolters-Arts M, Lush WM, Mariani C. 1998. Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* 392, 818-821.

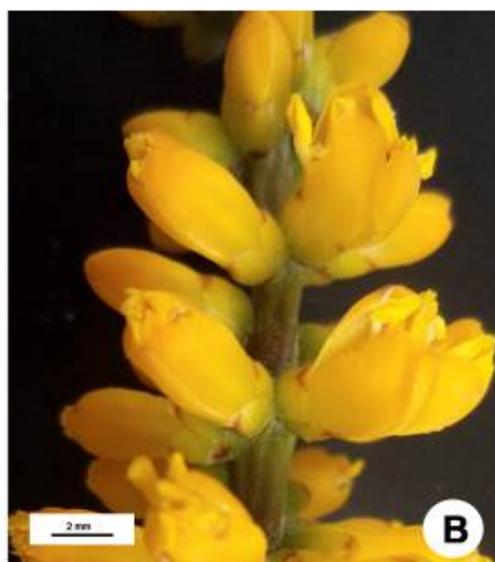


Figura 1. *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Bromeliaceae). A. Aspecto geral da planta com inflorescência. B. Detalhe da inflorescência multiflora, com várias flores por nó. C. Detalhe da flor em antese, evidenciando os verticilos, e apenas quatro dos seis estames.

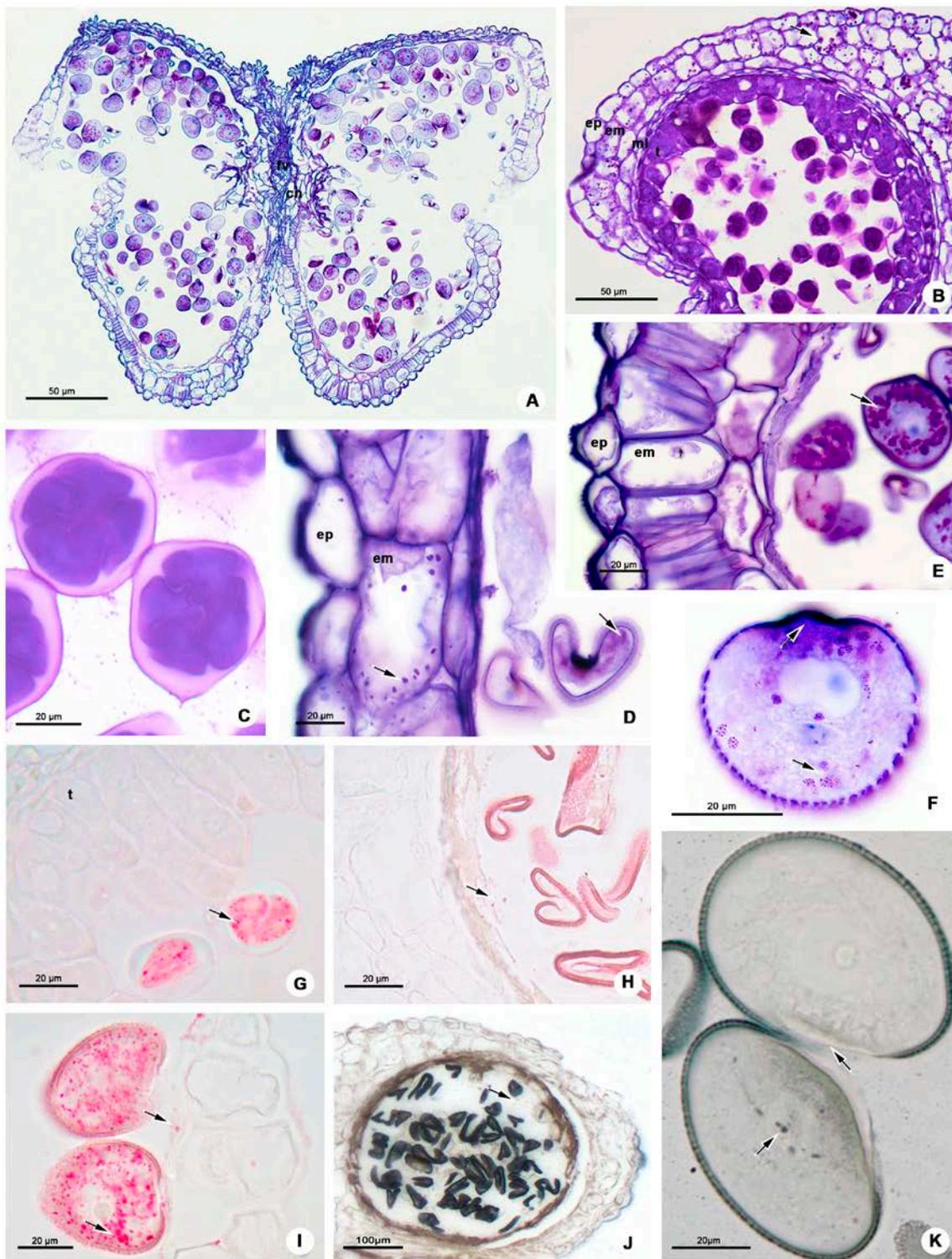


Figura 2. *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Bromeliaceae). A. Seção transversal da antera, mostrando os quatro esporângios. Grão de pólen em gametogênese inicial. B. Detalhe dos estratos parietais e micrósporo em estágio de tetrade; presença de amido indicada pela seta. C. Tetrade isobilateral. D. Detalhe dos estratos parietais e micrósporos livres no lóculo; amido (setas). E. Detalhe dos estratos parietais e grãos de pólen bicelulares; amido (seta). F. Grão de pólen bicelular, presença de amido indicada pelas setas. G. Estádio: tetrade; lipídios neutros (seta). H. Micrósporos livres no lóculo; lipídios neutros (seta). I. Detalhe dos estratos parietais e grãos de pólen bicelulares; lipídios neutros (setas). J. Detalhe dos estratos parietais e micrósporos livres no lóculo; lipídios totais (seta). K. Grão de pólen maduro durante antese; lipídios totais (setas). ep = epiderme, em = endotécio, ml = camada média, t = tapete, cn = conectivo, fv = feixes vasculares.

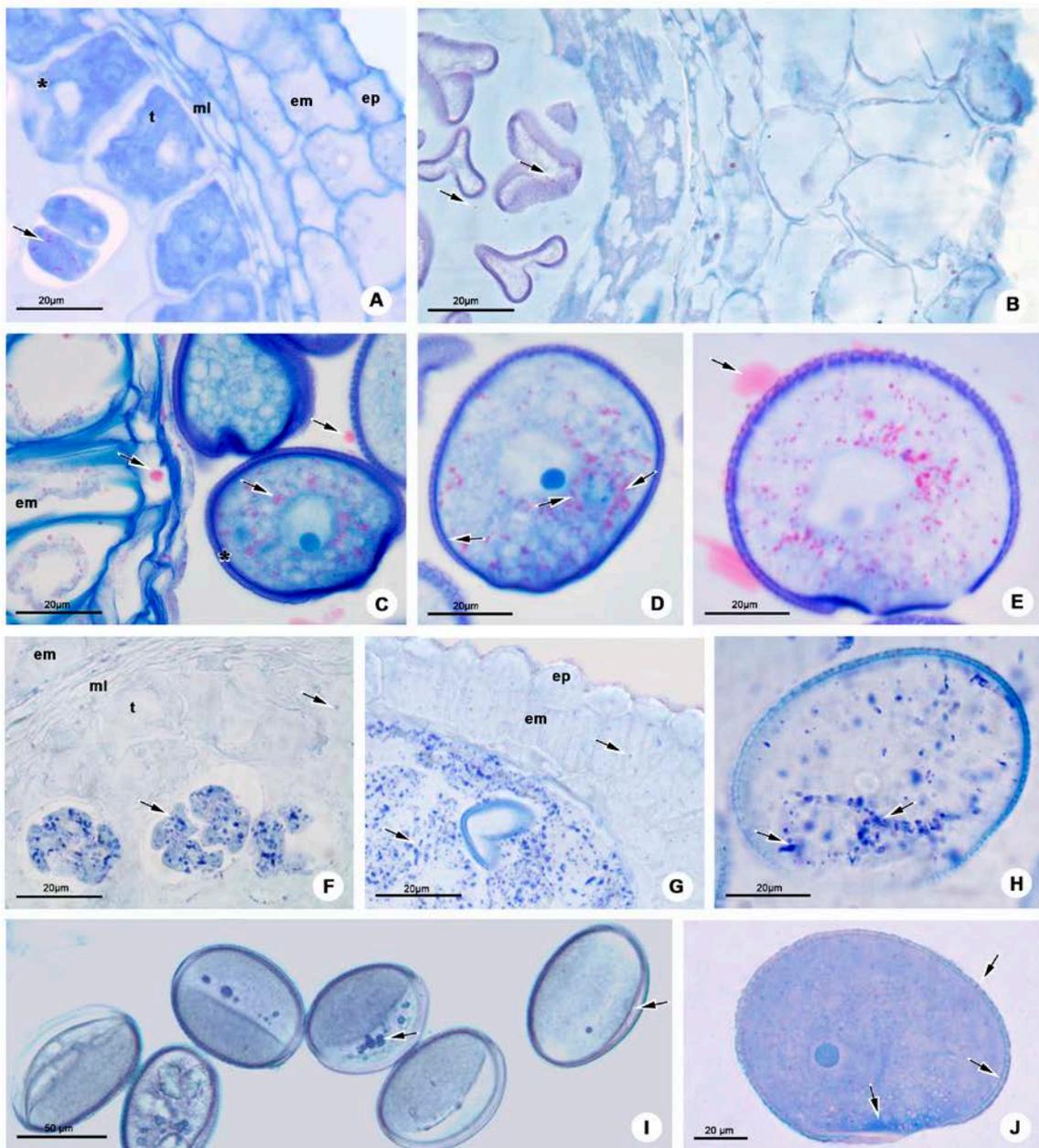


Figura 3. *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Bromeliaceae). A. Detalhe dos estratos parietais e micrósporo em estágio de tétrade, presença de lipídios neutros (seta) nos esporos e lipídios ácidos (asterisco) no tapete. B. Detalhe dos estratos parietais e micrósporos livres, presença de lipídios neutros indicada pelas setas. C. Detalhe dos estratos parietais e grãos de pólen bicelulares, presença de lipídios neutros indicada pelas setas e lipídios ácidos indicada pelo asterisco na esporoderme. D. Grão de pólen bicelular, maior concentração de lipídios neutros em volta da célula generativa. E. Grão de pólen bicelular, presença de lipídios neutros no *pollenkitt* (seta). F. Detalhe dos estratos parietais e tétrades: óleos essenciais (setas). G. Estratos parietais e micrósporo livre; óleos essenciais (setas). Grande quantidade de gotas de óleo no lóculo e região tapetal. H. Grão de pólen bicelular; óleos essenciais (setas). Óleos essenciais em volta da célula generativa. I. Antera macerada. Grão de pólen; óleos essenciais e oleorresinas no *pollenkitt* e região de abertura (setas). J. Grão de pólen bicelular; proteínas (setas). ep = epiderme, en = endotécio, ml = camada média, t = tapete, cn = conectivo.

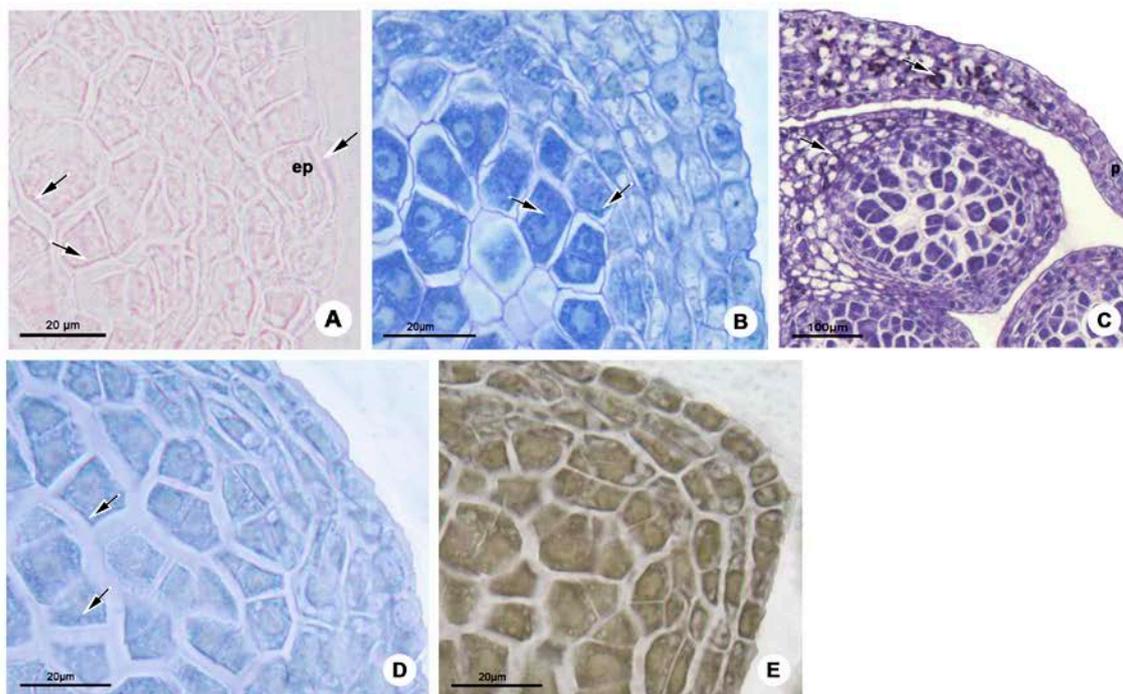


Figura 4. *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Bromeliaceae). Estádio de célula-mãe de micrósporo. A. Lipídios neutros (setas). B. Lipídios ácidos (setas). C. Amido (setas). D. Mistura de óleos essenciais e oleorresinas (setas). E. Lipídios totais (setas). ep = epiderme; p = sépalas.

Tabela 1. Prófase da meiose, 2. Tétrade de micrósporos, 3. Dissolução da calose, 4. Micrósporos

Tabela 1. Apresentação da dinâmica dos lipídios e amido em *Dyckia polyclada* L.B.Sm. (Bromeliaceae) ao longo do desenvolvimento da antera. Para melhor demonstração dos processos foram discriminados os esporângios, o conectivo e os meiócitos-micrósporos-grão de pólen.

ANTERA	COMPOSTOS QUÍMICOS	ESTÁDIOS DO DESENVOLVIMENTO									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<u>ESPORÂNGIO</u>	Amido										
	Lipídios	Neutros									
		Ácidos									
<u>CONECTIVO</u>	Amido										
	Lipídios	Neutros									
		Ácidos									
<u>MEIÓCITOS/ MICRÓSPOROS/ GRÃO DE PÓLEN</u>	Amido										
	Lipídios	Neutros									
		Ácidos									
<u>GRÃO DE PÓLEN</u>	Lipídios	Neutros									
		Ácidos									

livres, 5. Vacuolação, 6. 1ª mitose haplóide, 7. Gametogênese inicial (célula generativa parietal), 8. Gametogênese média (unidade germinativa masculina já formada), 9. Gametogênese final (célula generativa fusiforme). Triângulo invertido: início de crescimento das células da epiderme e do endotécio. Triângulo cheio: indica formação dos espessamentos do endotécio. Triângulo: indica pico do metabólito no andrófito. Traço cheio: indica acúmulo. Traço pontilhado: indica o consumo

CAPITULO II

Caracterização morfológica do gineceu e rudimento seminal em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Bromeliaceae).

**Artigo foi redigido de acordo com as normas para autores do periódico
'Acta Botanica Brasilica'**

Meriélem Saldanha Martins, João Marcelo Santos de Oliveira
Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil
mmartins077@gmail.com

Artigo original

Caracterização morfológica do gineceu e rudimento seminal em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Bromeliaceae).

Meriélem Saldanha Martins, João Marcelo Santos de Oliveira
Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil
mmartins077@gmail.com

Dyckia é um dos maiores gêneros em número de espécies, aproximadamente 170 espécies. O gênero apresenta problemas taxonômicos devido à má delimitação das suas espécies. *Dyckia polyclada* L.B. Sm. é nativa e endêmica do Rio Grande do Sul, Brasil. Estudo embriológicos para *D. polyclada* são inexistentes. Este trabalho objetiva descrever a flor madura, caracterizar o gineceu e a esporogênese e gametogênese em rudimentos seminais em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae). As flores de *Dyckia polyclada* são perfeitas, trímeras e heteroclamídeas. O ovário de *D. polyclada* é súpero, sincárpico, tricarpelar, trilocular, e plurispérmico e placentação axial. O estigma é trífidio do tipo espiral conduplicado. O estilete é terminal e mais longo que o comprimento do ovário. Os rudimentos seminais são anátropos, bitegmentados e crassinucelados. Os tegumentos são de origem dérmica. O canal micropilar é formado pelo tegumento interno. O gametófito é de origem monospórica e do tipo *Polygonum*. Os dados apresentados são inéditos para a espécie.

Palavras Chave: Bromeliaceae, *Dyckia polyclada*, rudimento seminal, nectários septais, estigma, estilete.

**Morphological characterization of the gynoecium and ovule in
Dyckia polyclada L.B. Sm. (Bromeliaceae).**

Meriélem Saldanha Martins, João Marcelo Santos de Oliveira
Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil
mmartins077@gmail.com

Dyckia is one of the largest genera in number of species, approximately 170 species. The genus presents taxonomic problems due to poor demarcation of its species. *Dyckia polyclada* L.B. Sm. is native and endemic to Rio Grande do Sul, Brasil. Embryological studies for *D. polyclada* are inexistent. This paper aims to describe the mature flower, characterize the gynoecium, sporogenesis and gametogenesis in ovules in *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae). The flowers of *Dyckia polyclada* are perfect, trimerous and heterochlamydous. The ovary in *D. polyclada* is superior, syncarpous, tricarpellate, trilobulate and plurispermic, with axial placentation. The stigma is trifid of the conduplicate spiral. The style is terminal and longer than the length of the ovary. The ovules are anatropous, bitegmic and crassinucellate. The teguments are from dermic origin. The micropyle is formed by the inner tegument. The gametophyte is monosporic of the *Polygonum* type. The presented data is unprecedented to the species.

Key words: Bromeliaceae, *Dyckia polyclada*, ovule, septal nectaries, stigma, style.

Introdução

Bromeliaceae apresenta rudimentos seminais anátropos, bítegmentados e crassinucelados, com primórdios trizonados, desenvolvimento monospórico, tétrade do tipo linear, paredes celulares calósicas durante a meiose, megásporo funcional calazal, gametófito do tipo *Polygonum*, presença de hipóstase e origem dérmica dos tegumentos (Johri *et al.* 1992).

Dyckia é um dos maiores gêneros em número de espécies, aproximadamente 170 espécies, (Gouda *et al.* 2015) dentro de Pitcairnioideae e ocorre no Sudeste da América do Sul (Smith & Downs 1974). No Brasil apresenta 1347 espécies, (Forzza *et al.* 2016). O gênero apresenta problemas taxonômicos devido à má delimitação das suas espécies de (Krapp *et al.* 2014), além disto a falta de estudos e coletas pouco representativas dificultem a identificação e a classificação das espécies (Krapp *et al.* 2014).

Dyckia polyclada L.B. Sm. (Fig. 1A - C) é nativa e endêmica do Rio Grande do Sul (Forzza *et al.* 2016), tendo sido observada na reserva do Ibicui Mirim (Strell, 1998) e na região central do estado, local do presente estudo. A espécie, atualmente encontra-se na categoria DD (dados insuficientes), pois não apresenta informações suficientes para avaliação de seu risco de extinção (Fundação ZooBotânica 2014).

Sobre a embriologia da família podem ser citados os estudos Lakshmanan (1967), Wee & Rao (1974), Rao & Wee (1979), Sartori (2008), Spat (2012), Fagundes & Mariath (2014), Nogueira *et al.* (2015). Em relação ao gênero, poucos são os trabalhos encontrados na literatura, podendo citar: Sajo *et al.* (2004a), Conceição *et al.* (2007), Mendes *et al.* (2010), Dorneles *et al.* (2014), Mendes *et al.* (2015). Considerando que estudos embriológicos para *Dyckia polyclada* são inexistentes, e que os estudos embriológicos existentes, sejam relevantes, não podem ser generalizados para o gênero, devido a poucas espécies terem sido estudadas.

Com base nas informações apresentadas acima este trabalho busca caracterizar o gineceu, a esporogênese e gametogênese em rudimentos seminais em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Bromeliaceae).

Material e Métodos

O material botânico foi analisado e processado no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Biologia, CCNE/ UFSM. As flores e os botões de *Dyckia polyclada* L.B. Sm. foram coletados no Distrito de Santo Antão no município de Santa Maria, RS, Brasil, nas coordenadas geográficas S 29° 42' 911" e W 53° 43' 093". O material testemunho de *Dyckia polyclada* encontra-se depositado no Herbário do CCNE da Universidade Federal de Santa Maria - SMDB, sob o número de 15923. Uma coleção líquida dos materiais coletados para as análises histológicas, com registro de coleta será mantida no Laboratório de Botânica Estrutural da UFSM. Para a análise em Microscopia óptica, o material botânico foi fixado em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 (Gabriel 1982; McDowell & Trump 1976), no qual foi adicionado Tween20 2ml/L (Freudenstein *et al.* 2002).

Após a fixação o material foi submetido ao vácuo, seguido de lavagem em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 (Gabriel 1982) por quinze minutos e a seguir submetido a uma lavagem em água destilada por mais quinze minutos. Após estas etapas o material foi mantido no Tween20 2ml/L e submetido novamente no vácuo pelo período de sete a 10 dias, sendo este Tween20 sendo trocado a cada dois dias. Em função de problemas com infiltração e adesão da resina plástica às superfícies epidérmicas, principalmente locular e no rudimento seminal, foi feita lavagem das amostras em solução com Tween20 2ml/L sob aquecimento, à aproximadamente 50°C, com agitação constante. O processo visou aumentar a infiltração da resina em superfícies cutinizadas.

A seguir o material botânico foi desidratado em série etílica ascendente por quinze minutos cada etapa. Os ovários foram pré-infiltrados em uma solução de hidroxietilmetacrilato (HEMA) (Gerrits & Smid 1983) e etanol absoluto durante o período de 12h, seguido de infiltração em hidroxietilmetacrilato por cerca de 4h e emblocado com esta resina em suporte Histomold (Leica) até sua polimerização (Gerrits & Smid 1983). O gineceu também foi submetido a desidratação e inclusão simultâneas em HEMA durante 48 horas (Oliveira 2015). As seções, de 3 µm de espessura, foram feitas em micrótomo de rotação Leica RM2245, e coradas com Azul de Toluidina O 0,05% pH 4.4 em tampão de benzoato de sódio (Sidman et al 1961).

A análise das lâminas histológicas foi realizada em microscópio Leica DM2000 com sistema de captura digital de imagem DFC 295. Para microscopia de fluorescência e contraste interferencial (DIC) as análises foram realizadas em microscópio Axio Imager. A2. Para a realização dos testes histoquímicos, Vermelho de Rutênio para mucopolissacarídeos ácidos e ácidos pécticos (Johansen 1940), Calcofluor White, em solução aquosa 0,01% para celulose, sob fluorescência (Hughes & McCully 1975), Azul de Anilina, para calose, sob fluorescência (Martin 1959).

Resultados e discussão:

Gineceu

Dyckia polyclada apresenta um gineceu composto por estigma, estilete e ovário (Fig. 2A). O ovário é súpero, sincárpico, tricarpelar, trilocular e plurispérmico (Fig. 2B). A placentação em *D. polyclada* é do tipo axial (Fig. 2B), comumente encontrada nas

demais Bromeliaceae (Johri *et al.* 1992; Smith & Downs 1974; Sajo *et al.* 2004a-b; Fagundes & Mariath 2014).

As folhas carpelares possuem epiderme ventral e dorsal uniestratificadas (Figs. 2B, C). A epiderme dorsal é estomatífera, cujas câmaras subestomáticas se mostram descontínuas em função da presença da hipoderme (Fig. 2C). As células da epiderme dorsal, em corte transversal, mostram-se alongadas radialmente e as células da epiderme ventral, são tangencialmente alongadas (Fig. 2C). O mesofilo é pluriestratificado e parenquimatoso, com hipoderme diferenciada (Figs. 2C). Idioblastos contendo ráfides foram observados no mesofilo (Fig. 2C).

Nectários

Os nectários septais são infraloculares, labirínticos e não estruturados (Figs. 2D, E). Estão localizados predominantemente no receptáculo, atingindo a região nodal do gineceu e tornando-se contínuos com as folhas carpelares entre a região basal do ovário e o receptáculo (Fig. 2D). A epiderme é secretora, não estomatífera, com duas camadas celulares e suas células apresentam núcleo proeminente, citoplasma denso e pequenos vacúolos (Fig. 2E).

Nectários septais infraloculares e labirínticos foram observados por Galetto & Bernadello (1991), Bernadello (2007), Vesprini *et al.* (2003), Sajo *et al.* (2004b), Fagundes & Mariath (2010), Dorneles *et al.* (2014). Segundo Sajo *et al.* (2004b) a presença de nectários septais é uma condição plesiomórfica dentro de Bromeliaceae, embora tenham sido perdidos várias vezes ao longo da evolução das monocotiledoneas, onde sua presença é comum (Rudall 2002; Sajo *et al.* 2004b). Em Poales, apenas em espécies de Bromeliaceae e Rapateaceae foram relatados a presença dos nectários

septais (Sajo *et al.* 2004b), observações que suportam a posição basal dessas famílias na ordem (Linder & Rudall 2005).

Estigma e Estilete

O estigma é trífido (Fig. 3A, B, C, D) do tipo espiral conduplicado, com os três carpelos não fusionados em suas margens (Fig. 3C). O mesofilo apresenta-se pluriestratificado, com células isodiamétricas na parte apical, embora gradualmente alonguem-se em direção ao estilete (Fig. 3A). Em secção transversal observam-se os três lobos estigmáticos e um feixe vascular para cada lóbulo estigmático (Fig. 3D). A epiderme externa apresenta células papiladas e vacuoladas, enquanto as células da epiderme interna são mais arredondadas, vacuoladas e com citoplasma denso (Fig. 3E). Estigma do tipo espiral conduplicado é o mais comum em Bromeliaceae (Brown & Gilmatin 1984, 1989; Vosgueritchian & Buzato 2006; Dorneles *et al.* 2014; Fagundes & Mariath 2014). Brown & Gilmatin (1988) sugerem que este tipo de estigma seria um caractere plesiomórfico para a família, enquanto estigmas do tipo laminar-convoluto seriam mais especializados, por terem sua área de superfície aumentada pela presença de papilas.

Cada carpelo apresenta um estilete, com canal estilar oco, terminal e mais longo que o comprimento do ovário (Fig. 3A). Dorneles *et al.* (2014) observou em *Dyckia racinae* foi observado que o estilete é sólido com comprimento, aproximadamente, duas vezes a do ovário, diferindo de *D. polyclada*. A epiderme possui uma camada celular (Fig. 3A). Em secção transversal observa-se que as células da epiderme externa do estilete são regulares e vacuoladas, e as células da epiderme interna são mais alongadas e com citoplasma denso (Figs. 3F-H). O mesofilo é pluriestratificado e as células são alongadas longitudinalmente (Figs. 3G, H). As células da epiderme do canal estilar apresentam células muito pequenas e com citoplasma denso (Fig. 3A). Idioblastos

contendo ráfides foram observados no estigma e estilete, e ocorrem em grande quantidade (Figs. 3A, D, F). Ráfides também foram observadas por Fagundes (2012) e Dorneles *et al.* (2014).

Apêndice Calazal

Na maturidade, o apêndice calazal é curto e curvado em direção a rafe e possui células alongadas com espaços intracelulares (Fig. 4A). Em relação a sua origem e diferenciação, foi observado um grupo de células importantes à morfogênese em função de aspectos particulares de crescimento, primeiramente gerando a curvatura e, posteriormente, gerando o apêndice calazal. No estágio de célula arqueosporial observa-se que as células subdérmicas da região calazal e as células do funículo começam a aumentar de volume, ambas apresentam núcleo proeminente e pequenos vacúolos (Fig. 4B). No estágio de célula mãe-de-megásporo, as células subdérmicas calazais se dividem e alongam-se, perpendicularmente a epiderme, por meio de vacuolação (Figs. 4C, D).

Fagundes & Mariath (2014) observaram em *Billbergia nutans* que o apêndice calazal é de origem subdérmica e possui variedade de formas e tamanhos, podendo até ser vestigial, curto ou longo e curvado em direção a anti-rafe. Palací *et al.* (2004) observou em *Catopsis paniculata* que o apêndice calazal é de origem dérmica e composto por tricomas multicelulares. Sajo *et al.* (2004a) relatam em todas as espécies estudadas que a origem do apêndice é dérmica e subdérmica, porém o que varia entre as espécies é o seu formato, como por exemplo em *Piticairnia paniculata*, que é longo e curvo em direção a rafe ou, como em *Dyckia hedbingii*, achatado lateralmente, ou ainda *Aechmea conglomerata*, muito longo. Segundo Fagundes (2013) o apêndice calazal em Bromeliaceae não pode ser considerado uma ferramenta útil para taxonomia, devido a

grande variação sobre a sua origem e a vasta diversidade de formatos encontrados na família.

Obturador

O obturador na maturidade apresenta células alongadas em forma de domo e citoplasma denso e vacuolado, revestindo toda a região placentária e as células do tecido fundamental são ovaladas e vacuoladas (Fig. 4E).

Até o estágio de célula arquesporial, as células placentárias apresentam aspecto meristemático, enquanto as células do tecido fundamental apresentam-se com muitos vacúolos e núcleo evidente (Fig. 4F). A partir do estágio de célula mãe de megásporo, as células placentárias iniciam seu alongamento e tornando-se prismáticas, e a porção distal das mesmas convexa, neste estágio nas células do tecido fundamental do obturador observa-se que há um alongamento das mesmas em direção a epiderme, algumas divisões e pequenos vacuolos e núcleo evidente (Fig. 4G).

Segundo Tilton & Horner (1980) o obturador é um tipo de tecido de transmissão diferenciado, originado da região placentária, funicular ou uma combinação destes, e que está presente nas margens carpelares associado a micrópila dos rudimentos seminiais. Apesar de sua descrição e a presença em inúmeras espécies não relacionadas (Tilton & Horner 1980), pouco se sabe sobre a sua função (Herrero 2000). Para alguns autores (Maheshwari 1950; Tilton & Horner 1980; Tilton *et al.* 1984 e Erbar 2003) o obturador teria a função de controlar física e quimicamente a direção do crescimento do tubo polínico até a micrópila. A estrutura do obturador em representantes da família foi abordada por Dornelles *et al.* (2014), Fagundes & Mariath (2014) e Fagundes & Mariath (2010), sendo que os últimos autores relataram que em espécies de Tillandsioideae o obturador é uni a biestratificado e com células muito alongadas e que

em espécies de Bromelioideae e Pitcairnioideae, o obturador é uniestratificado e com células alongadas, como observado em *D. polyclada*.

Desenvolvimento do rudimento seminal

Os rudimentos seminais são anátropos, bitegmentados e crassinucelados (Fig. 5A). Nas angiospermas e monocotiledôneas, os rudimentos seminais bitegmentados são os que ocorrem em maior predominância (Davis 1966; Bouman 1984; Johri *et al.* 1992; Endress 2011). Segundo Sajo *et al.* (2004a) os rudimentos seminais com placentação do tipo axial e com curvatura anátropa configuram uma característica plesiomórfica dentro de Poales, ordem na qual está inserida Bromeliaceae. *Dyckia polyclada* apresenta apenas rudimentos com curvatura anátropa, diferindo do que foi encontrado por Wee & Rao (1974) e Rao & Wee (1979) em *Ananas comosus* que além da curvatura anátropa, foram observados rudimentos ortótropos.

O tegumento externo (TE) possui quatro a cinco estratos de células, relativamente compactas, na porção basal, enquanto, em direção ao ápice ocorre aumento de espaços intercelulares e redução do número de camadas celulares (Figs. 5A, B). O TE é assimétrico, tendo um dos lados fusionados ao funículo (Figs. 5A, B). O tegumento interno (TI) é simétrico e possui duas camadas celulares na porção média e de três a quatro na porção terminal. As células do tegumento interno são mais alongadas na porção apical e ficam imbricadas na região do canal micropilar. (Figs. 5A, B). O canal micropilar é formado pelo tegumento interno (Figs. 5A, B). Nas monocotiledôneas, ambos os tegumentos apresentam duas camadas celulares (Endress 2011). Em espécies de Bromeliaceae já estudadas (Sajo *et al.* 2004a; Sartori 2008; Fagundes & Mariath 2014) o TE mostrasse variável e diferindo do número de camadas observadas em *D. polyclada*, sugerindo que o TE não pode ser considerado com potencial taxonômico na família.

Rudimentos seminiais bitementados e crassinucelados foram observados em *Lindmania penduliflora* (Lakshmanan 1967), *Ananas comosus* (Wee & Rao 1974, Rao & Wee 1979), *Dyckia pseudococcineae* (Conceição *et al.* 2007) e *Billbergia nutans* (Fagundes & Mariath 2014). Segundo Endress (2005) rudimentos seminiais crassinucelados são comuns em famílias de Angiospermas basais. Venturelli & Bouman (1988) e Asplund (1972) observaram rudimentos crassinucelados em Rapateaceae e Typhaceae, respectivamente, famílias que juntamente com Bromeliaceae formam o grado basal dentro de Poales (Givnish *et al.*, 2010).

Na maturidade o gametófito, apresenta nucelo com uma a duas camadas de células na região próxima a micrópila, três a quatro camadas celulares entre epiderme e gametófito, na região média, e duas camadas celulares na região basal. As células do nucelo apresentam citoplasma denso e núcleo central e, usualmente, um ou dois vacúolos (Fig. 6A, B). O número de camadas nucelares próximo a região micropilar em outras espécies da família é variável (Sajo *et al.* 2004 a; Rao & Wee 1979) e é semelhante ao encontrado neste estudo por Fagundes (2012) para *B. nutans*. O feixe vascular no rudimento seminal de *D. polyclada* estende-se da calaza, passando pelo funículo, até a região placentária (Figs. 6A, E). Segundo Endress (2011) este tipo de feixe vascular é o mais comum encontrado nas angiospermas.

Ao longo da região placentária os rudimentos seminiais de uma mesma margem carpelar formam uma linha reta e se tocam lateralmente. Quando consideradas as duas margens da folha carpelar, se observa que os rudimentos emergem alternadamente e tendo a face dorsal voltada ao espaço comum àquelas margens carpelares. A presença do apêndice calazal permite o contato e encaixe, à semelhança de zig-zag, ao longo de toda a região ventral (Figs. 5A, B). Os rudimentos seminiais de *D. polyclada* possuem orientação perpendicular ao eixo do ovário (Fig. 5C), diferindo do encontrado por Sajo

et al. (2004a) para algumas espécies da família que apresentaram orientação paralela ao eixo do ovário.

Esporogênese

Os primórdios dos rudimentos seminais de *D. polyclada* apresentam uma organização trizonada (Figs. 6A, B). Nas espécies de angiospermas o caráter trizonado é comum (Bouman 1984), assim como em espécies de Bromeliaceae (Conceição *et al.* 2007; Sartori 2008; Fagundes & Mariath 2014. Algumas espécies de Poales apresentam organização bizonada do primórdio do rudimento seminal (Nakamura *et al.* 2009), sendo esta condição considerada derivada nas Angiospermas (Bouman 1984). Para Sartori (2008) estudos sobre o desenvolvimento inicial do rudimento seminal são importantes pois são uma fonte relevante de informações quando estabelecidas relações entre os taxons.

No primórdio do rudimento seminal, a célula inicial ocupa posição apical e subdérmica, e se diferencia das demais células. Ao longo do desenvolvimento esta célula alonga-se e divide-se em uma célula parietal (CP) e uma célula arquesporial (CA) (Fig. 6C), o que caracteriza o rudimento seminal como crassinucelado. Concomitante a divisão da célula inicial, ocorre o surgimento do tegumento interno, seguido do tegumento externo, ambos de origem dérmica (Fig. 6D). Sajo *et al.* (2004a), Conceição *et al.* (2007), Sortori (2008) e Papini *et al.* (2011) também observaram, em seus estudos, origem dérmica dos tegumentos. Juntamente ao surgimento dos tegumentos, observa-se que as células da região placentária apresentam características meristemáticas (Fig. 5F). E as células da região calazal e funicular tornam -se vacuoladas e seu volume começa a expandir (Fig. 5B).

A célula arquesporial se diferencia em célula mãe de megásporo (CMM), com citoplasma denso e núcleo volumoso (Fig. 6E). A CMM alonga-se acompanhando o

alongamento do esporângio. Uma deposição de parede de calose foi observada em torno da CMM, exceto na região calazal (Fig. 6F). Observou-se o início da deposição de calose em *D. polyclada* durante a prófase meiótica. Nas angiospermas a deposição de calose tem início na prófase meiótica na porção calazal (Bouman 1984). Neste estudo foi observado um rudimento seminal com duas células arquesporias (Fig. 6G) e um rudimento seminal com duas CMM (Fig. 6H), dentre os diversos rudimentos seminais observados, mas apenas uma das células completa o seu desenvolvimento.

Em *D. polyclada* não foi observado a formação de uma díade e nem as fases da meiose, exceto a prófase, sendo comum a observação de tríades. Observou-se parede de calose na parede entre os esporos (Figs. 6I, J).

A meiose II tem início com a divisão do megásporo calazal. Há a formação de uma tríade linear de megásporos envolta por calose (Fig. 7A-H). Contudo, não foi observada tetrade, ou observados indícios de sua formação, como parede de calose no ápice do megásporo calazal, três células em degeneração ou seus restos. A calose é observada entre as paredes transversais e laterais dos esporos, embora não foi observada parede de calose terminal no megásporo calazal. Observa-se que há um aumento da espessura da calose nas paredes laterais dos esporos (Figs. 7D, F, H). Indícios importantes reforçam a ideia da ocorrência de apenas tríades lineares como a formação de apenas dois septos ou paredes transversais de calose. Segundo Rodkiewicz (1970) e Bhandari (1984) a calose provavelmente atua como uma barreira entre os ginósporos e as células do rudimento seminal, proporcionando maior autonomia no desenvolvimento das células haploides. A parede de calose foi observada em espécies que apresentam padrão de desenvolvimento o monospórico (Rodkiewicz 1970) e em angiospermas (Rodkiewicz 1967), mesmo padrão encontrado em *D. polyclada*. Observou-se no estágio de tríade, que o megásporo calazal apresenta pequenos vacúolos contendo

polissacarídeos (Figs. 6I, 7B, C). O megásporo calazal é o funcional, os demais megásporos degeneram (Figs. 7F, H) culminando em um gametófito de origem monospórica, padrão comum entre as Angiospermas (Davis 1966). O megásporo funcional tem o seu volume expandido, o núcleo é central e os vacúolos posicionam-se nos pólos micropilar e calazal (Figs. 7F, H). A calose foi observada na parede transversal entre o ginósporo funcional e os degenerados e em torno dos mesmos. Em *D. polyclada* não foi observado parede de calose na porção micropilar do megásporo funcional, como foi observado por Mendes *et al.* (2014) em *Pitcairnia encholirioides*. Segundo Ünal *et al.* (2013) a calose desaparece a partir do megásporo funcional, enquanto que freqüentemente permanecem presente nas paredes dos megásporos que degeneram.

Segundo Papini *et al.* (2011) a parede de calose está relacionada com a degeneração dos megásporos micropilares do rudimento seminal. Ünal *et al.* (2013) sugere que a formação de parede de calose desempenha um papel significativo no desenvolvimento do tipo de megagametófito, pois a parede de calose forma um filtro molecular, que diminui a permeabilidade da parede celular. Assim, isolando temporariamente a CMM. Segundo os autores, este isolamento permite que as células sigam a um curso independente de diferenciação, acompanhado pela mudança da fase esporofítica até a expressão do gene para a fase gametofítica.

Na esporogênese observa-se que a epiderme do rudimento seminal se apresenta uniseriada, com células vacuoladas e núcleo evidente. O tegumento interno apresenta duas camadas celulares e o tegumento externo possui três a quatro camadas celulares. As células nucelares possuem duas camadas celulares e encontram-se íntegras (Fig. 7B).

Gametogênese

Um megagametófito uninucleado é formado, observa-se que seu único núcleo se encontra na região calazal e há um vacúolo menor no polo calazal, e um vacuolo maior no polo micropilar e o megagametófito torna-se mais alongado no sentido calaza-micropila (Fig. 8A). Ocorrem três ciclos mitóticos, originando gametófitos binucleados (Fig. 8B), tetranucleados e octanucleados, todos estes estádios após a primeira divisão para a formação do gametófito binucleado possuem um vacúolo central. Na gametogênese observa-se que algumas células nucelares, em torno do megagametófito, degeneram-se (Figs. 8A-K). A degeneração destas células foi observada por Brighina *et al.* 2006, Spat 2012 e Fagundes & Mariath 2014.

Ao final da gametogênese, o megagametófito é composto por oito núcleos e sete células, sendo três antípodas (Figs. 8C, D e F), uma célula-média (Fig. 8F), com dois núcleos, duas sinérgides (Figs. 8G-K) e uma oosfera (Figs. 8I, J), configurando um gametófito do tipo *Polygonum*, tipo de megagametófito mais comumente encontrado em Bromeliaceae e nas Angiospermas (Johri 1992; Endress 2011).

As antípodas são uninucleadas e estão dispostas em um arranjo piramidal e permaneceram viáveis até a maturidade do megagametófito (Figs. 8C, D e F). Antípodas em arranjo triangular foram observadas por Fagundes (2013) e Spat (2012).

Os núcleos polares fusionam-se, quando próximos a região micropilar, formando a célula média diplóide (Fig. 8E). A célula média encontra-se geralmente na região mediana ou próximo a região micropilar do megagametófito (Fig. 8F). Em *Ananas comosus* (Wee & Rao 1974; Rao & Wee 1979) e em *Vriesea carinata* (Sartori 2008) foi observada que a fusão dos núcleos polares é similar ao encontrado em *D. polyclada*.

O aparelho oosférico é formado pela oosfera e as duas sinérgides. As sinérgides estão dispostas lado a lado, estas possuem aparelho fibrilar na porção micropilar de natureza péctica (Fig. 8G, H, J, K). Em *P. encholirioides* (Mendes *et al.* 2014), o

aparelho fibrilar tem um grande volume e parece atingir cerca de metade das sinérgides, assim como em *D. polyclada*. Willense & Went (1984) e Ünal *et al.* (2013) sugerem o tubo polínico penetra na sinérgide através do aparelho fibrilar.

A oosfera é observada lateralizada (Figs. 8I, J), em contato com a parede do megagametófito. A oosfera possui núcleo voltado para a região calazal do megagametófito e um vacúolo voltado para região micropilar do megagametófito. Segundo Batygina (2002) nas angiospermas após o aparelho oosférico estar totalmente organizado, as células alongam-se e ocupam praticamente boa parte do polo micropilar no megagametófito. Esta observação está de acordo com o observado em *D. polyclada*. O megagametófito tem um formato piriforme, sendo a região calazal, onde ficam as antípodas, relativamente estreita e afunilada e a região micropilar mais ovalada (Fig. 8F). Essa constrição na região calazal é uma característica estável na família, pois foi observado em espécies de *Ananas*, *Tillandsia* e *Bilbergia*, gêneros em que o formato do megagametófito foi abordado (Fagundes 2013).

Uma hipóstase foi observada durante toda a gametogênese (Fig. 8A, B e C). As paredes celulares da hipóstase possuem composição fenólica. Segundo Paoli (2006) a hipóstase pode apresentar células com citoplasma denso com compostos fenólicos, paredes compostas por cutina, suberina, lignina ou calose. A hipóstase tem uma estrutura variável e multifuncional exercendo funções, tais como, barreira de tecido para parar a invasão do megagametófito, pode conectar o fornecimento vascular com o megagametófito, assim facilitando o transporte do material nutritivo, pode ser responsável pela produção de enzimas ou hormônios, desempenhar papel no balanço hídrico em sementes dormentes (Bouman 1984). A presença de hipóstase é comum em monocotiledôneas (Rudall 1997).

Conclusões

As presentes análises realizadas comprovam características já descritas para o gênero e família. O padrão de formação do rudimento seminal, bem como a formação dos tegumentos e seu desenvolvimento, padrão de desenvolvimento do megagametófito, descrição do apêndice calazal, obturador, estigma, estilete e nectários florais foram descritos pela primeira vez para espécie.

Os resultados obtidos para *Dyckia polyclada* são uma eficiente ferramenta a serem utilizados nas determinações taxonômicas, na compreensão das relações filogenéticas dentro da família e são importantes para melhor compreensão do funcionamento do processo reprodutivo da espécie, auxiliando na conservação da mesma, já que atualmente não existem dados suficientes para diagnosticar o grau de risco de extinção e também não há registros de sua localização no estado.

Referências Bibliográficas

- Asplund I. 1972. Embryological studies in the genus *Typha*. Svensk Botanisk Tidskrift 66: 1-17.
- Batygina TB. 2002. Embryology of flowering plants, terminology and concepts I: Generative organs of flowers Science Publishers Enfield, N.H.
- Bhandari NN. 1984. The microsporangium. In: Johri BM (Ed.). Embryology of angiosperms. Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag: 53-121.
- Bernadello G. 2007. A Systematic survey of floral nectaries. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E (eds) Nectaries and nectar. Springer, Heidelberg: 19-128.
- Bouman F. 1984. The ovule. In: Johri BM. (Ed.). Embryology of the Angiosperms. Berlin: Springer-Verlag: 123-157.

- Brighigna L, Papini A, Milocani E, Vesprini JL. 2006. Programmed cell death in the nucellus of *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Caryology* 59 (4): 334-339.
- Brown GK, Gilmartin AJ. 1984. Stigma structure and variation in Bromeliaceae – neglected taxonomic characters. *Brittonia* 36(4): 364-374.
- Brown GK, Gilmartin AJ. 1989. Chromosome numbers in Bromeliaceae. *American Journal of Botany* 76: 657– 665.
- Conceição SP, De Toni KLG, Costa CG. 2007. Particularidades do nucelo de *Dyckia pseudococcinea* L.B. Smith (Bromeliaceae) *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre 5 supl. 1:846-848.
- Davis GL. 1966. *Systematic embryology of the angiosperms*. John Wiley & Sons, New York.
- Dorneles MP, Oliveira JMS, Dorow TS do Canto. 2014. *Dyckia racinae* L. B. Sm. (Bromeliaceae): morphological description emphasizing the reproductive structures. *Iheringia, Série Botânica*, Porto Alegre 69 (2): 397-404.
- Endress PK. 2005. Links between embryology and evolutionary floral morphology. *Current Science*, Bangalore 89:749-754.
- Endress PK. 2011. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms. *American Journal of Botany* 98(3): 370–396.
- Erbar C. 2003. Pollen tube transmitting tissue: place of competition of male gametophytes. *International Journal Plant Science* 164 (5 Suppl.):265-277.
- Fagundes NF, Mariath JEA. 2010. A. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. *Acta Botanica Brasilica* 24 (3): 765-779.

- Fafundes NF. 2012. Desenvolvimento do gineceu e do gametófito feminino em *Billbergia nutans* H. Wendl. Ex Regel (Bromelioideae - Bromeliaceae): primeiros registros para o gênero. Defesa de Qualificação de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS
- Fagundes NF. 2013. Desenvolvimento estrutural e dinâmica de constituintes químicos no gineceu de *Billbergia nutans* H. Wendl. Ex Regel (Bromelioideae-Bromeliaceae) Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS
- Fagundes NF, Mariath JEA. 2014. Ovule ontogeny in *Billbergia nutans* in the evolutionary context of Bromeliaceae (Poales). *Plant Systematic Evolution* 300 (6): 1323-1336.
- Forzza RC, Costa A, Siqueira Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva, F, Saraiva P, Paixão-Souza B. 2013. *Bromeliaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016 <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6061>> Acesso em 23 de janeiro. 2016.
- Freudenstein JV, Harris EM, Rasmussen FN. 2000. The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the vandoid complex. *American Journal of Botany* 89(11): 1747-1755.
- Fundação Zoobotânica. 2014. Lista Vermelha da Flora Ameaçada do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.fzb.rs.gov.br/> Acessado em 23 de janeiro de 2016.
- Gabriel BL. 1982. *Biological Electron Microscopy*. New York, Van Nostrand Reinhold Company.

- Galetto L, Bernadello LM. 1991. Extrafloral nectaries that attract ants. *In Bromeliaceae: structure and nectar composition*. Canadian Journal of Botany 70:101-1106.
- Geritz PO, Smid L. 1983. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* 132: 81-85.
- Gilmartin AJ, Brown GK. 1987. Bromeliales, Related Monocots, and Resolution of Relationships among Bromeliaceae Subfamilies. *Systematic Botany* 12(4): 493-500.
- Givnish TJ, Ames M, McNeal RJ, McKain MR, Steele PR, Pamphilis CW, Sean W. Graham SW, Pires JC, Dennis W. Stevenson DW, Zomlefer WB, Briggs BG, Duvall MR, Moore MJ, Heaney JM, Soltis DE, Soltis PS, Kevin Thiele K & James H. Leebens-Mack JH. 2010. Assembling the tree of the Monocotyledons: Plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97: 584-616.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R., Schulte K, Horres R., Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98 (5): 872-895.
- Gouda EJ, Butcher D, Gouda CS. *Encyclopaedia of Bromeliads, Version 3*. <http://encyclopedia.florapix.nl/>. University Botanic Gardens, Utrecht. Acessado em: 23 de janeiro de 2016.
- Herrero M. 2000. Changes in the Ovary Related to Pollen Tube Guidance. *Annals of Botany* 85 (Supplement A): 79-85.

- Hughes J, McCully M. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology* 50(5): 319-329.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York, MacGraw-Hill.
- Johri BM, Ambegaokar, KB, Srivastava PS. 1992. *Comparative Embryology of Angiosperms*. Springer, Berlin.
- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Isepon AM, Leme EMC, Weising K. 2014. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Systematic Evolution* 300: 1591-1614.
- Lakshmanan KK. 1967. Embryological studies in Bromeliaceae. I. *Lindmania penduliflora* (Ch Wright) Stapf. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B* 65: 49-55.
- Linder, Rudall P. 2005. Evolutionary history of Poales. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36:107-124.
- Maheshwari P. 1950. *An introduction to the embryology of angiosperms*. McGraw-Hill Publishing Company Ltd., New Delhi.
- Martin FV. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125-128.
- Mendes SP, Costa CG, De Toni KLG. 2010. Embryo development of *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered Brazilian species. *Australian Journal of Botany* 58: 485-492.

- Mendes SP *et al* 2014. Ovule and female gametophyte development in the Bromeliaceae: an embryological study of *Pitcairnia encholirioides*. *Botany* 92: 883–894.
- McDowell EM, Trump BR. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100: 405-414.
- Nakamura AT, Longui-Wagner HM, Scatena VL. 2009 Desenvolvimento de óvulo, fruto e semente de espécies de Poaceae (Poales). *Revista Brasileira de Botânica* 32 (1): 165-176.
- Nogueira FM, Fagundes NF, Kuhn SA, Fregonesi JN, Mariath JAE. 2015. Ovary and ovule anatomy in the nidularioid complex and its taxonomic utility (Bromelioideae: Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 66–77.
- Oliveira JMS. 2015. Simultaneous dehydration and infiltration with (2-hydroxyethyl)-methacrylate (HEMA) for lipid preservation in plant tissues. *Acta Botânica Brasilica* 29: 207-212.
- Paoli AAS. 2006. Semente. In *Anatomia do fruto e da semente* (LA Souza, org). UEPG, Ponta Grossa: 127-163
- Palací CA, Brown GK, Tuthill DE. 2004. The seeds of *Catopsis* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). *Systematic Botany* 29: 518-527.
- Papini A, Mosti S, Milocani E, Tani G, Di Falco P, Brighina L. 2011. Megasporogenesis and programmed cell death in *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Protoplasma* 248 (4): 651-662.

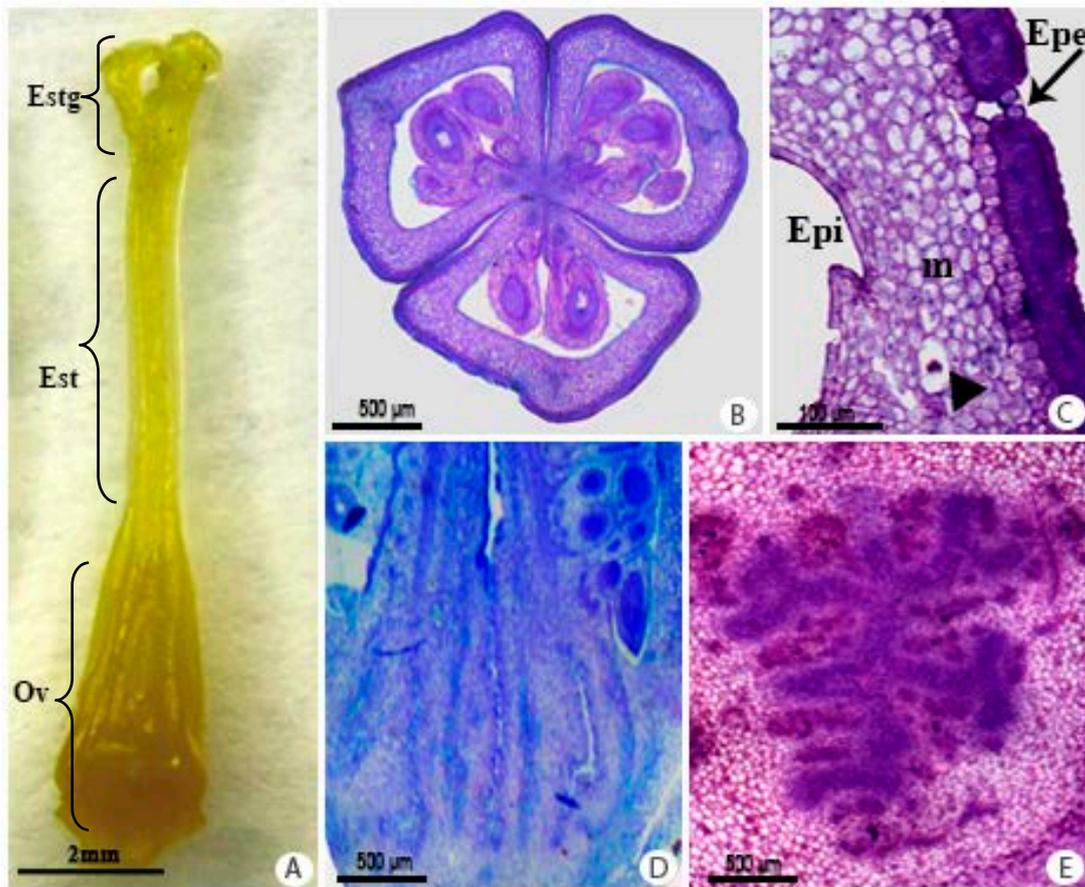
- Rao AN, Wee YC. 1979. Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. *New Phytologist* 83:485-497.
- Reitz R 1983. Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica. Flora ilustrada catarinense (BROM). Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues
- Rodkiewicz B. 1967. Walls with callose in megaspore and hypostase of ovules of *Antirrhinum majus* observed in a fluorescence microscope. *Bulletin Academic Pol* 15: 493-495.
- Rodkiewicz B. 1970. Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. *Planta* 93: 39-47.
- Rudall P. 2002. Homologies of inferior ovaries and septal nectaries in monocotyledons. *International Journal Plant Science* 163(2):261–276.
- Rudall P. 2007. *Anatomy of Flowering Plants – An Introduction to Structure and Development*. 3^a ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sajo MG, Prychid CJ, Rudall PJ. 2004a. Structure and development of the ovule in Bromeliaceae. *Kew bulletin* 59: 261-267.
- Sajo MG, Rudall PJ, Prychid CJ. 2004b. Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectarines in commelinid monocots. *Plant Systematics and Evolution* 247: 215-231.
- Spat C. 2012. Caracterização estrutural da embriologia em *Tillandsia aeranthos* (Lois.) L.B. Sm. (Tillandsioideae - Bromeliaceae). Dissertação (Mestrado em Agrobiologia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

- Sartori JS. 2008 Desenvolvimento Floral em *Vriesea carinata* Wawra (Tillandsioideae – Bromeliaceae). Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, UFRGS. Porto Alegre, RS.
- Sidman RL, Mottla PA, Feder N. 1961. Improved polyester wax embedding for histology. *Stain Technol* 36: 279-284.
- Smith LB 1989. Another Giant *Dyckia* Mystery. *Journal of The Bromeliad Society* 39 (5):206
- Smith LB, Downs RJ. 1974 Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monographs* 4: 1-658.
- Strehl, T. Flórua fanerogâmica da Reserva Biológica do Ibicuí Mirim, Rio Grande do Sul, Brasil: Bromeliaceae. *Iheringia, série botânica, Porto Alegre, I* (51): 17-37. 1998.
- Tilton V R., Horner Jr HT. 1980. Stigma, style and obturator of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in the reproductive process. *American Journal of Botany* 67: 1113-1131.
- Tilton VR, Wilcox LW, Palmer RG, and Marc C. Albertsen MC. 1984. Stigma, Style, and Obturator of Soybean, *Glycine max* (L.) Merr. (Leguminosae) and Their Function in the Reproductive Process 71(5): 676-686.
- Ünal M, Vardar F & Aytürk Ö. 2013. Callose in plant sexual reproduction. In M. Silva-Opps (Ed.) *Current progress in biological research*. Croatia: In Tech: 319-343.
- Venturelli M, Bouman F. 1988. Development of ovule and seed in Rapateaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 97: 267-294.

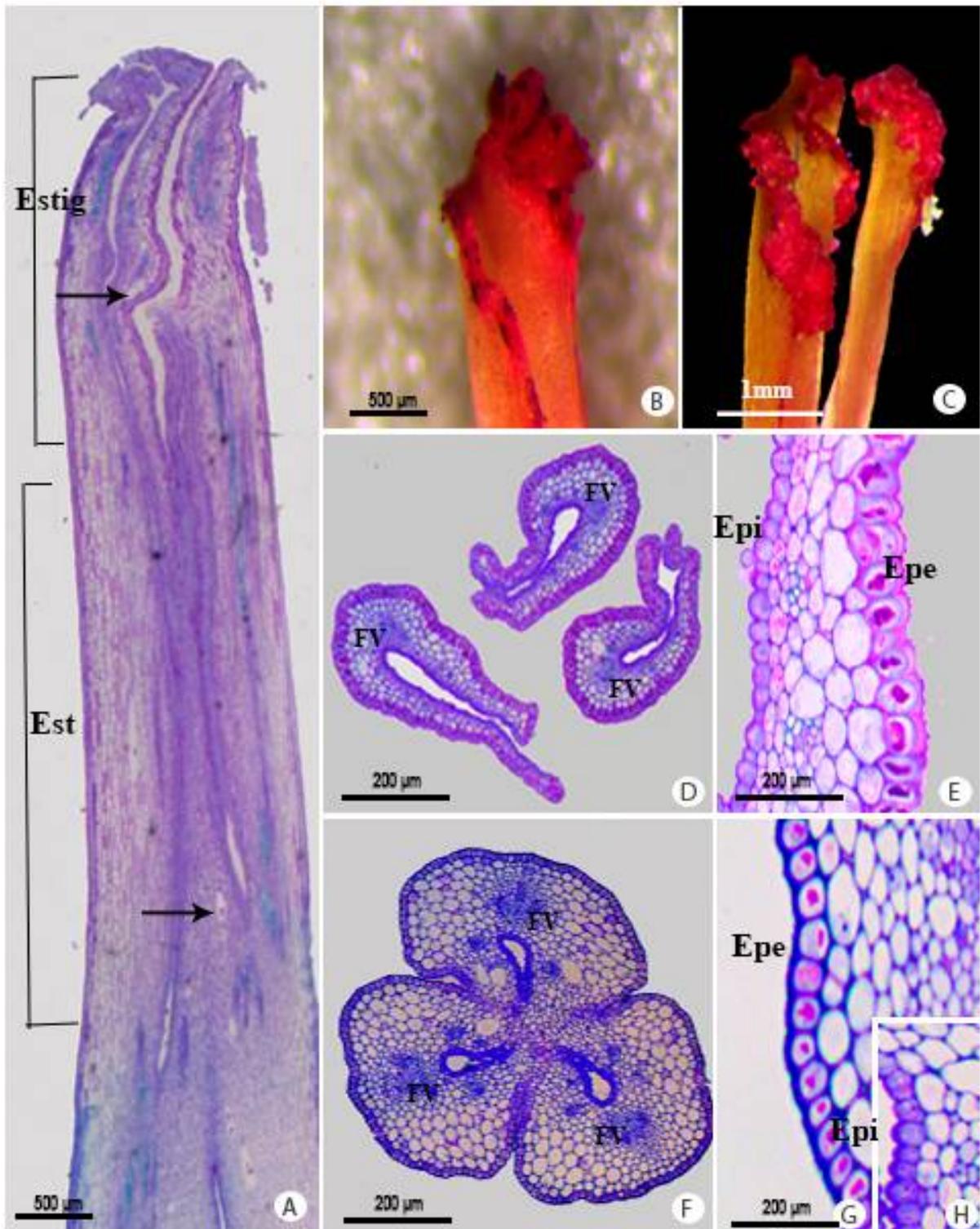
- Vesprini JL, Galetto L, Bernadello G. 2003. The beneficial effect of ants on the reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant. *Canadian Journal of Botany* 81: 24–27.
- Vosgueritchian SB, Buzato S. 2006. Reprodução Sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e Interação Planta Animal. *Revista Brasileira de Botânica* 29 (3): 433-442.
- Wee YC, Rao AN. 1974. Gametophytes and seed development in pineapple. *Current Science* 43: 171-173.
- Willense MTM, Van Went JL. 1984. The female gametophyte. In: Johri BM (Ed.). *Embryology of the Angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag 159-196.



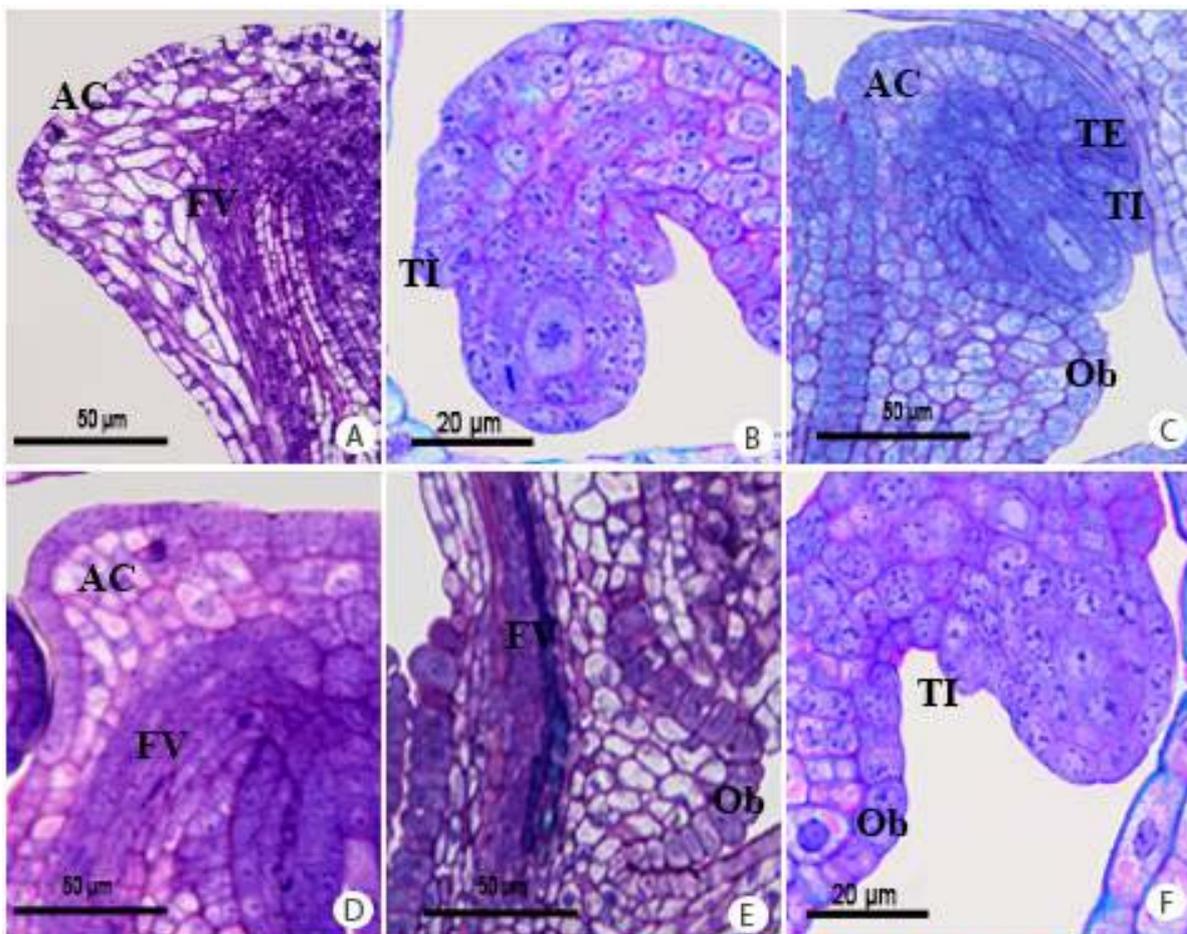
Fig. 1A-C: *Dyckia polyclada*. L.B. Sm. Fig.1A: Inflorescência de *D. polyclada* em habitat natural. Fig. 1B: Detalhe da inflorescência de *D. polyclada* com várias flores por nó. Fig.1C: Flor de *D. polyclada* evidenciando os verticilos. B: bráctea. S: sépala. P: pétala. A: androceu e G: gineceu. Seta branca indica a posição lateral do escapo floral.



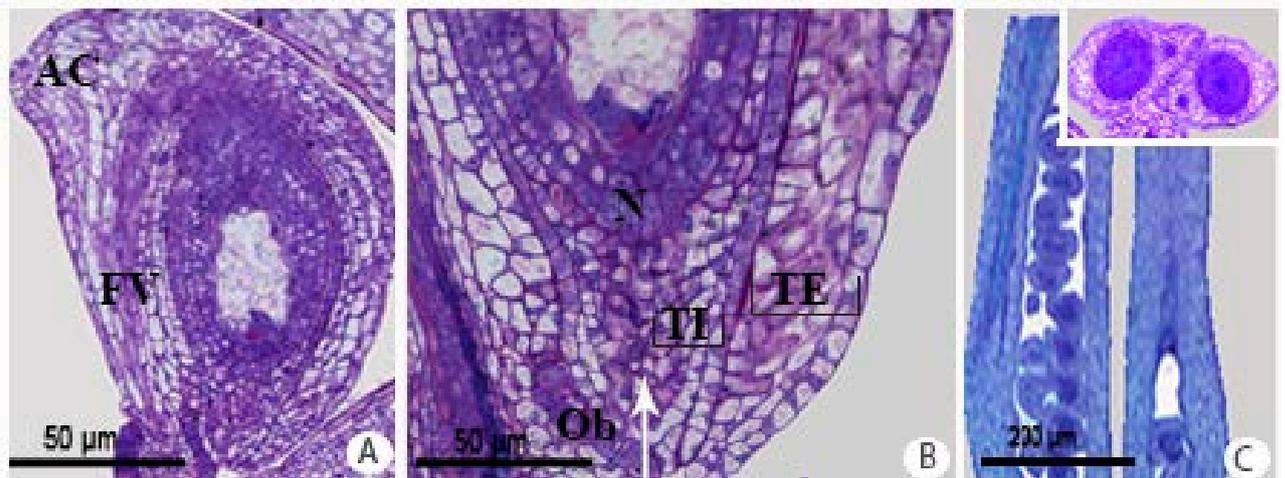
Figs.2A – E: Fig.2A: Gineceu de *D. polyclada*. Fig. 2B: Ovário de *D. polyclada* é sincárpico, tricarpelar, trilocular e plurispérmico. Fig. 2C: Detalhe da parede ovariana, evidenciando a epiderme dorsal, epiderme ventral e mesofilo. Figs. 2D- E: Nectário. Fig. 2D: Nectário septal infralocular e labiríntico Fig. 2E: Detalhe das células do nectário com varias camadas celulares. Estg: estigma. Est: estilete. Ov: ovário. Epd: epiderme dorsal. Epv: epiderme ventral. m: mesofilo. Seta Preta: indica estômato. Cabeça de seta preta: indica idioblasto de oxalato de cálcio.



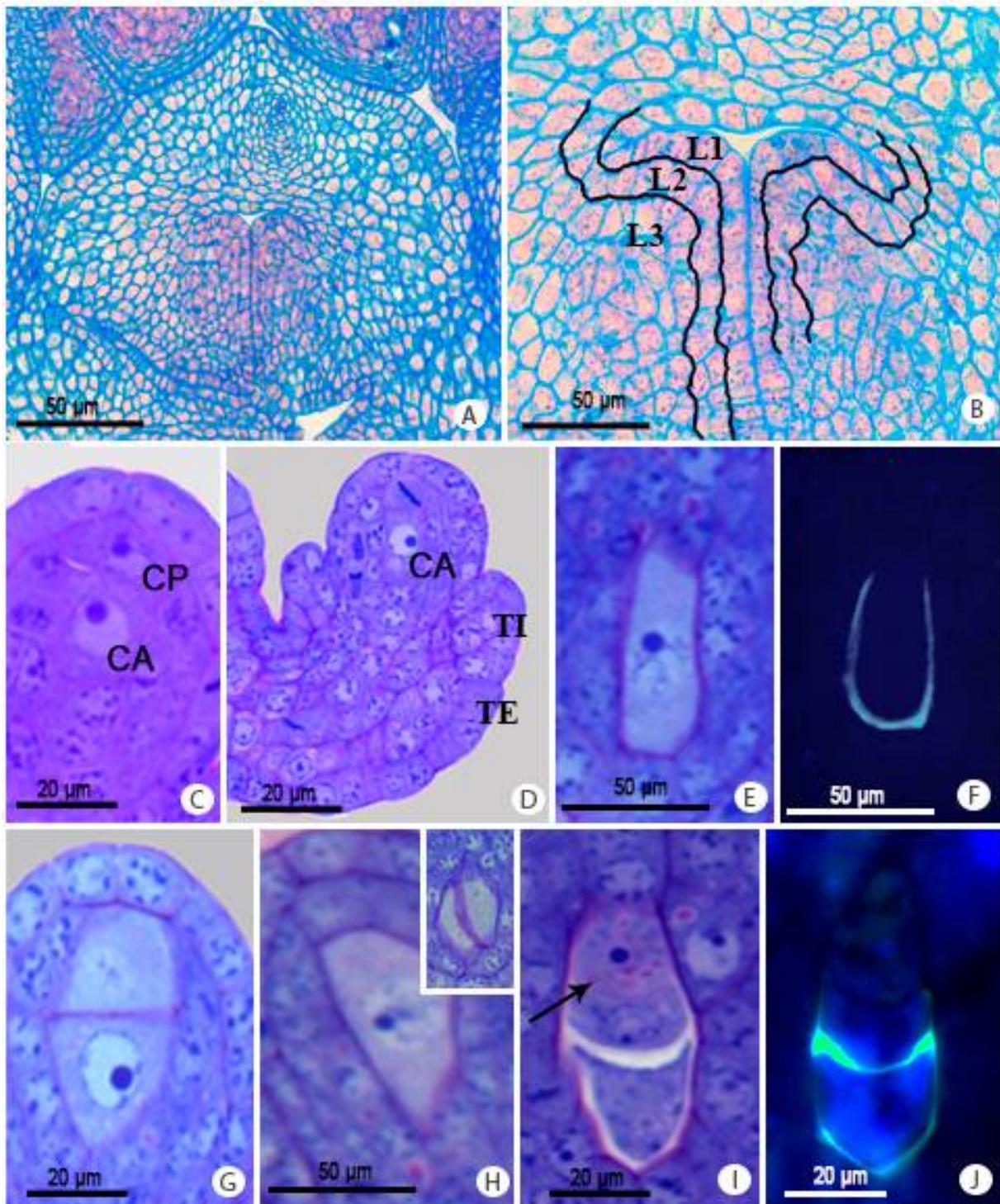
Figs. 3A - G: Estigma e Estilete: Fig. 3A: Corte longitudinal do estigma e estilete de *D. polyclada*. Fig.4A: estilete terminal e mais longo que o comprimento do ovário. Fig. 3B e C: Estigma trifido, do tipo espiral conduplicado. Fig. 3C: detalhe do estigma mostrando os três carpelos não fusionados em suas margens. Fig. 3D: Secção transversal do estigma evidenciando os três lobos estigmáticos e os três feixes vasculares. Fig.3E: Secção transversal da epiderme externa e interna do estigma. Fig. 3F: Secção transversal do estilete. Fig.3G: Secção transversal – detalhe das células da epiderme externa do estilete. Fig. 4H: Secção transversal – detalhe das células das células da epiderme interna. Fig. 3A, F e G: Idioblastos contendo ráfides no estigma e estilete. Estg: estigma. Est: estilete. F.V: feixe vascular. Epe: epiderme externa. Epi: epiderme interna. Seta preta indica idioblastos no estigma e estilete



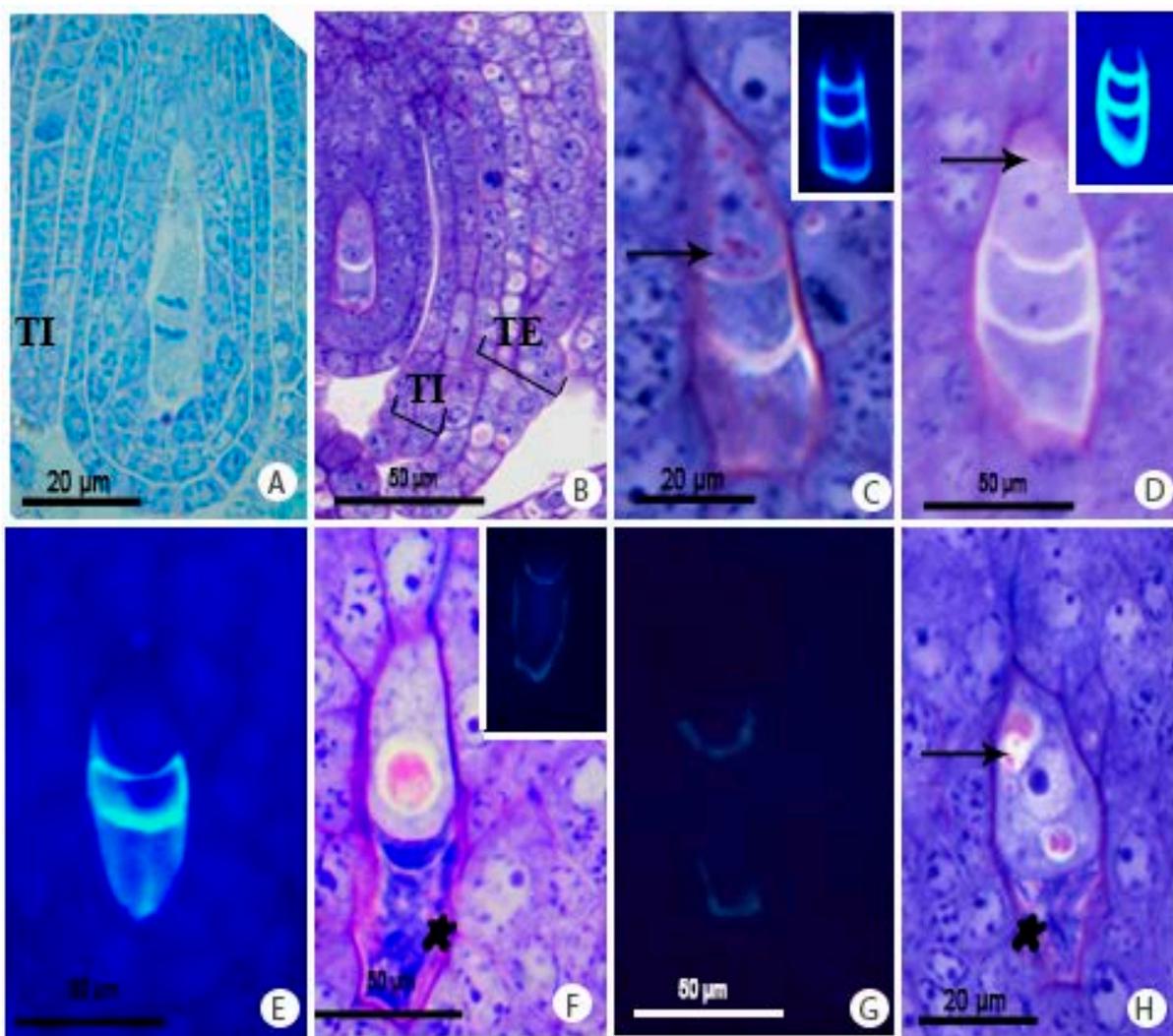
Figs. 4A – J: Apêndice calazal e obturador de *D. polyclada*. Fig. 4A: Secção transversal - apêndice calazal curto e curvo em direção a rafe. Fig. 4B: Estádio estádio de célula arqueosporial: detalhes das células subdémicas da região calazal e as células funiculares evidenciando o aumento do volume das células e pequenos vacúolos. Fig.4C, D: Estádio de célula mãe-de-ginósporo: evidenciando a divisão e o alongamento perpendicular das células, por meio de vacuolação. Fig. 4E: Obturador de *D. polyclada* revestindo toda a região placentária. Fig 4F: Células placentárias com aspecto meristemático, e as células do tecido fundamental com muitos vacúolos e núcleo evidente. Fig. 4G: Observa-se início do alongamento das células placentárias. AC: apêndice calazal. FV: feixe vascular. Ob: obturador. TI: tegumento interno. TE: tegumento externo. Seta preta indica amido no obturador. Seta branca indica lipídios neutros na cutícula da epiderme externa do obturador.



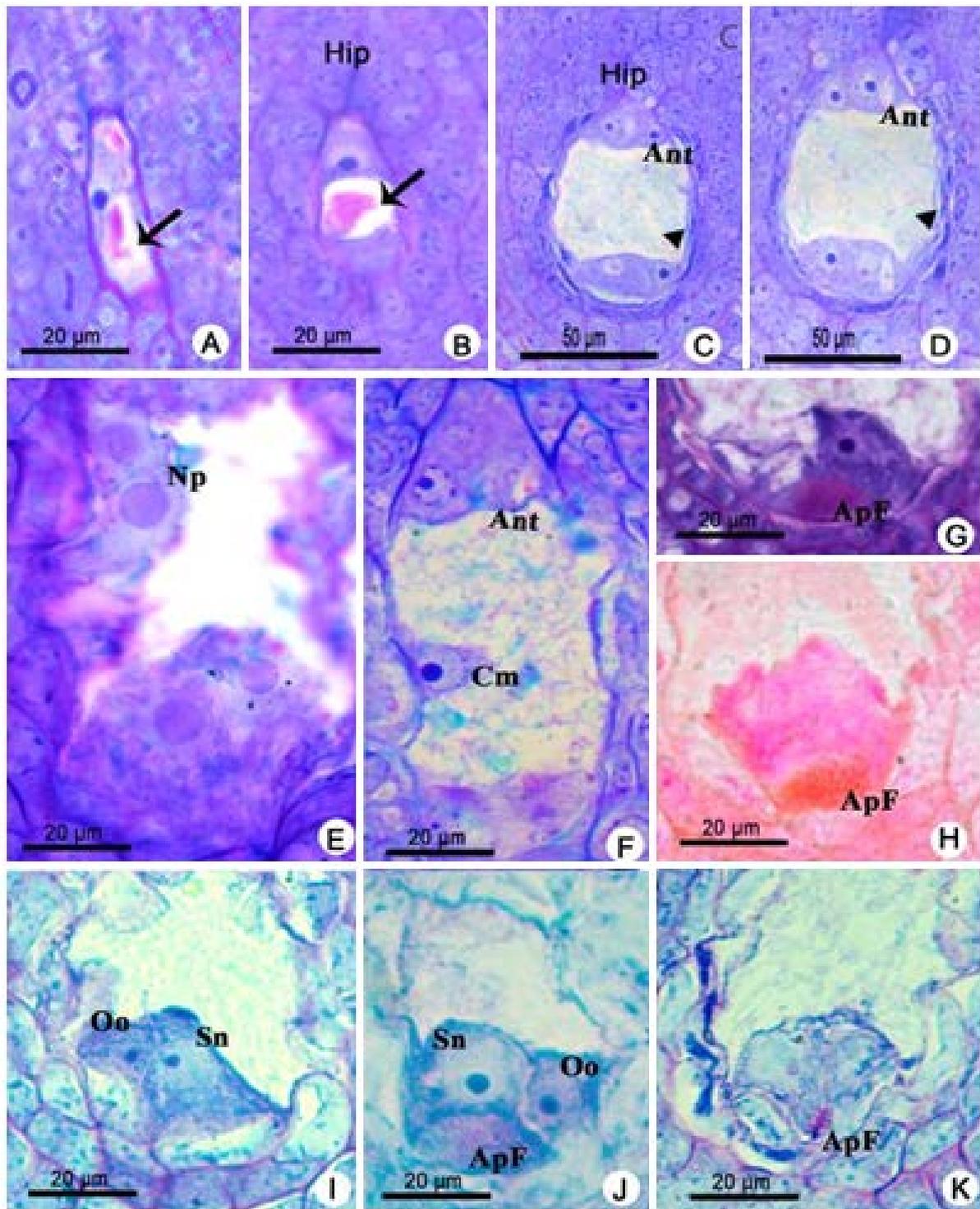
Figs. 5A – C: Rudimento Seminal de *D. polyclada*. Fig. 5A: Rudimentos seminiais anátropos, bitegmentados e crassinucelados. Figs. 5A, B: TE assimétrico, observa-se células relativamente compactas, na porção basal. Figs. 5A, B: TI simétrico, células da porção apical são mais alongadas e imbricadas na região do canal micropilar. Figs. 5A: Feixe vascular no rudimento seminal de *D. polyclada*. Fig. 5C: Orientação perpendicular ao eixo do ovário dos rudimentos seminiais. AC: apêndice calazal. FV: feixe vascular. Ob: obturador. TI: tegumento interno. TE: tegumento externo. n: nucelo. Seta preta indica amido. Seta branca indica canal micropilar.



Figs. 6A – J: Esporogênese em *D. polyclada*. Fig.6A - B: Primórdios trizonados dos rudimentos seminais de *D. polyclada*. Fig. 6C: Célula parietal (CP) e uma célula arquesporial (CA). Fig. 6D: Origem dérmica dos tegumentos. Fig. 6E: Célula mãe de ginósporo (CMG), com citoplasma denso e núcleo volumoso. Fig. 6F: Deposição de parede de calose em torno da CMG, exceto na região calazal. Fig. 6G: rudimento seminal com duas células arquesporias Fig. 6H: rudimento seminal com duas CMG. Fig. 6I: Tríades de ginósporos. Fig. 6J: Tríades de ginósporos com parede de calose entre os esporos. CA: célula arquesporial. CP: célula parietal. TI: tegumento interno. TE: tegumento externo. L1, L2, L3: camadas meristemáticas.



Figs. 7A – H: Esporogênese: Fig. A: Figs. 7B - E: tríade de ginósporos com presença de pequenos vacúolos contendo polissacarídeos. Fig. 7B: Rudimento seminal evidenciando a epiderme unisseriada, tegumento interno com duas camadas celulares, tegumento externo possui três a quatro camadas celulares. As células nucleares possuem duas camadas celulares e encontram-se íntegras. Fig. 7C, D: tríde de ginósporos com presença de parede calose entre as paredes transversais e laterais dos esporos Figs. 7F, H: ginósporo calazal é o funcional evidenciando os vacúolos posicionados nos pólos micropilar e calazal e ginósporos micropilares degenerados. TE: tegumento externo. TI: tegumento interno. Seta preta indica: vacúolos com polissacarídeos. Estrela preta: indica ginósporos micropilares degenerados.



Figs 8A – K: Gametogênese: Fig. 8A: Ginófito uninucleado. Fig. 8B: gametófitos binucleados. Figs. 8C, D e F: megagametófito é composto por oito núcleos e sete células, sendo três antípodas. Fig. 8E: núcleos polares fusionando-se, próximos a região micropilar. Fig. 8F: uma célula-média. Figs. 8G-K: duas sinérgides Figs. 8I, J: uma oosfera. Figs. 8A-K: células nucleares, entorno do megagametófito, degeneradas. Fig. 8G, H, J, K: aparelho fibrilar na porção micropilar de natureza péctica. Fig. 8F: megagametófito em formato piriforme. Fig. 8B e C: hipóstase. Sn: sinérgide. Oo: oosfera. ApF: aparelho fibrilar. Ant: antípodas. Np: núcleo polar. Cm: célula média. Hip: hipostase. Seta preta indica vacúolos com polissacarídeos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo vários aspectos merecem ser destacados:

- As análises realizadas sobre a esporogênese e gametogênese permitiram observação de características já descritas para o gênero e a família; porém a descrição detalhada dos processos é inédita para *Dyckia polyclada*. Ressalta-se a importância de mais estudos e da utilização das mais variadas técnicas para uma melhor compreensão dos processos.
- A dinâmica dos metabólitos analisados na antera está diretamente relacionada ao desenvolvimento do esporângio e do grão de pólen;
- A composição lipídica na antera mostra-se importante durante os processos de desenvolvimento da antera,
- A formação dos rudimentos seminiais, formação dos tegumentos e seu desenvolvimento, a descrição do apêndice calazal e obturador, descrição do estigma, estilete e nectários florais foram descritos pela primeira vez para espécie.

Salienta-se que este estudo abrange vários aspectos de desenvolvimento para uma mesma espécie e que juntamente com dados obtidos na literatura e o estudo morfológico dos caracteres do androceu e gineceu de *D. polyclada* contribuem para o entendimento do processo reprodutivo da espécie, e podem ser utilizados como parâmetros em análises taxonômicas, assim como, em análises filogenéticas, auxiliando no processo de conservação da espécie e da biodiversidade de Bromeliaceae.

