

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

Cesar Carvalho de Freitas

**CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA FLORAL E DA
EMBRIOLOGIA DE ESPÉCIES DE *DYCKIA* SHULT. F.
(PITCAIRNIOIDEAE – BROMELIACEAE).**

**Santa Maria, RS.
2017**

Cesar Carvalho de Freitas

**CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA FLORAL E DA EMBRIOLOGIA
DE ESPÉCIES DE *DYCKIA* SHULT. F.
(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.
2017

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

Freitas, Cesar Carvalho de
CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA FLORAL E DA EMBRIOLOGIA
DE ESPÉCIES DE DYCKIA SHULT. F. (PITCAIRNIOIDEAE -
BROMELIACEAE). / Cesar Carvalho de Freitas.- 2017.
69 f. ; 30 cm

Orientador: João Marcelo Santos de Oliveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2017

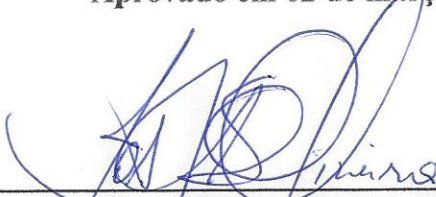
1. Antera 2. Dyckia 3. Morfologia 4. Poales 5.
Rudimento Seminal I. Santos de Oliveira, João Marcelo
II. Título.

Cesar Carvalho de Freitas

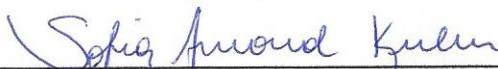
**CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA FLORAL E DA EMBRIOLOGIA
DE ESPÉCIES DE *DYCKIA* SHULT. F.
(PITCAIRNIOIDEAE – BROMELIACEAE).**

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**

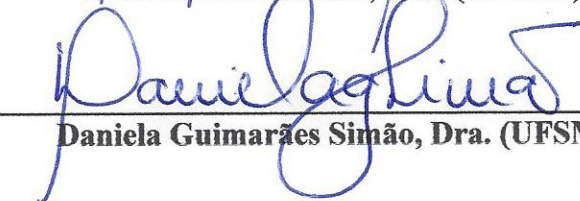
Aprovado em 02 de março de 2017:



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



Sofia Amund Kuhn, Dra. (UFRGS)



Daniela Guimarães Simão, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS.
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Leonel Fagundes de Freitas e Ana Luiza Carvalho, que sempre estiveram me incentivando e colaborando com meu crescimento pessoal/profissional.

Ao Professor/Orientador João Marcelo Santos de Oliveira, pela dedicação, comprometimento, questionamentos e aprendizado proporcionado ao longo dos anos.

À Universidade Federal de Santa Maria, à Pró Reitoria de Pós Graduação, ao Centro de Ciências Naturais e Exatas, ao Programa de Pós Graduação em Agrobiologia e funcionários desses, pela recepção, acolhida e ensinamento durante o Curso.

Aos colegas e amigos que fiz durante ao longo dos anos no Laboratório de Botânica Estrutural: Bruna Thies Palese, Cristiele Spat, Jordano Tavares, Mariane P. Dorneles, Marisa B. Abbad, Meriélen Saldanha Martins, Patrícia Kurtz da Costa e a todos os demais membros do LABOTE, pelo apoio, auxílio técnico, ajuda nas coletas do material botânico, pela paciência, companheirismo, discussões e estudos partilhados.

À minha namorada Marilei Almeida de Oliveira pela amizade, dedicação, companheirismo, compreensão e apoio de sempre.

Aos amigos(as) que estiveram contribuindo antes e durante o processo árduo da pesquisa Ana Paula Correa, Cleiton Froelich, Gean Batista, Luiz Felipe da Rocha, Suelen Trindade. Vocês fizeram toda a diferença nessa caminhada, e foram essenciais para que essa conquista fosse alcançada.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, meu muito obrigado a cada um de vocês.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA FLORAL E DA EMBRIOLOGIA DE ESPÉCIES DE *Dyckia* Schult. F. (PITCAIRNIOIDEAE - BROMELIACEAE).

AUTOR: Cesar Carvalho de Freitas

ORIENTADOR: Prof. DR. João Marcelo Santos de Oliveira

Data e local: 02/03/2017, Santa Maria

Bromeliaceae é uma família neotropical que apresenta enorme riqueza e adaptabilidade em diversos ambientes; atualmente possui cerca de 3539 espécies agrupadas em oito subfamílias, entre elas Pitcairnioideae, a qual inclui o gênero *Dyckia* com mais de 170 espécies. A presente pesquisa teve como principais objetivos apresentar uma análise morfoanatômica dos estames em *Dyckia ibicuiensis*, *D. polyclada* L.B. Sm. e *D. racinae* L.B. Sm. e descrever e analisar aspectos da ginospogênese e da ginogametogênese de *D. ibicuiensis* Strehl, incluindo-se detalhes citológicos e histológicos do ginospogônio. Considerando que *D. ibicuiensis* está criticamente ameaçada de extinção e *D. polyclada* e *D. racinae* encontram-se na categoria de dados insuficientes, pois não apresentam informações suficientes para avaliar o risco de extinção, o presente trabalho torna-se fundamental tanto para melhor descrição dos táxons quanto para conservação da espécie. O material botânico foi analisado e processado no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais de Exatas da Universidade Federal de Santa Maria CCNE/UFSM. As coletas de flores e os botões foram realizadas nos municípios de Santa Maria e São Pedro do Sul, RS, Brasil. Foram realizadas análises morfométricas de estames em indivíduos aleatórios, para a análise de espessamentos fibrosos, foi feita a maceração das anteras utilizando uma solução 3:1 de peróxido de hidrogênio e ácido acético glacial. Para análise em microscopia óptica o material botânico foi processado de acordo com as técnicas usuais para a mesma, também foi feita análise em microscopia de fluorescência e contraste diferencial e interferencial. Para a realização dos testes histoquímicos foram utilizados: Vermelho de Rutênio para mucopolissacarídeos ácidos e ácidos pécnicos, Azul de Anilina, para calose, sob fluorescência e Calcofluor White, em solução aquosa 0,01% para celulose. Morfológicamente, o androceu dessas espécies é diferenciado pela disposição dos estames ao redor do gineceu e pelas características gerais da antera. Estames inclusos, com filetes antessépalos diferentes dos antepétalos, anteras com disposição radial ao redor do gineceu com esporângios curvos sempre voltados para o mesmo caracterizam *D. ibicuiensis* e *D. racinae*. Esta configuração resulta da conação do filete, bem como características anatômicas especiais das anteras, tais como os espessamentos do conectivo. Além disso, estas espécies são diferenciadas por espessamento em forma de U no endotécio. *Dyckia polyclada* é caracterizada por seus estames pequenos, livres e exsertos, com um tubo comum muito curto, suas anteras, que não são curvadas ou organizadas em torno do gineceu. Com os resultados dos estudos do gineceu, observou-se que *D. ibicuiensis* possui ovário súpero, tricarpelar, trilocular, plurispérmico com placentação axial; o estigma é trífido do tipo espiral conduplicado; os rudimentos seminiais são anátropos, bitegumentados e crassinucelados; os tegumentos são de origem dérmica; tegumento externo é vascularizado; o canal micropilar é formado pelo tegumento interno; o gametófito é de origem monospórica e do tipo *Polygonum*; o aparelho fibrilar é de composição péctica; os nectários septais são infraloculares, labirínticos; o apêndice calazal apresenta células alongadas e com espaços intracelulares e o obturador apresenta células alongadas em forma de domo e citoplasma denso e vacuolado, revestindo toda a região placentária. A presença de metabolitos secundários nas células do nucelo foi observada durante a meiose, persistindo no decorrer do desenvolvimento do ginófito outra característica marcante na meiose foi a ausência de calose ao redor dos esporos durante a meiose, característica essa nunca observada em espécies da família. Os dados apresentados são inéditos para as espécies e contribuem para a compreensão das relações taxonômicas e filogenéticas dentro da família, e para melhor entendimento do funcionamento do processo reprodutivo das mesmas bem como na delimitação de *Dyckia*, sendo assim, o aumento do uso desses dados deve ser igualmente importante para outras espécies e agrupamentos infragenéricos.

Palavras-chave: Antera. *Dyckia*. Morfologia. Poales. Rudimento Seminal.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF FLORAL MORPHOLOGY AND EMBRYOLOGY OF SPECIES OF *Dyckia* Schult. F. (PITCAIRNIOIDEAE - BROMELIACEAE).

AUTOR: Cesar Carvalho de Freitas

ORIENTADOR: Prof. DR. João Marcelo Santos de Oliveira

Data e local: 02/03/2017, Santa Maria

Bromeliaceae is a Neotropical family that presents enormous richness and adaptability in diverse environments; currently has about 3539 species grouped in eight subfamilies, among them Pitcairnioideae, which includes the genus *Dyckia* with more than 170 species. The present study had as main objectives to present a morphological analysis of the stamens in *Dyckia ibicuiensis*, *D. polyclada* LB Sm. and *D. racinae* LB Sm., and to describe and analyze aspects of the ginosporogenesis and the ginogametogenesis of *D. ibicuiensis* Strehl, including details cytological and histological findings of the ginosporângio. Considering that *D. ibicuiensis* is critically endangered and *D. polyclada* and *D. racinae* are in the category of insufficient data, since they do not present sufficient information to evaluate the extinction risk, the present work becomes fundamental both for better description conservation of the species. The botanical material was analyzed and processed in the Laboratório de Botânica Estrutural (LABOTE) of the Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas at the universidade federal de Santa Maria CCNE / UFSM. Flower collections and buds were carried out in the municipalities of Santa Maria and São Pedro do Sul, RS, Brazil. Morphometric analyzes of stamens were performed in random individuals, for the analysis of fibrous thickenings, the maceration of the anthers was made using a 3: 1 solution of hydrogen peroxide and glacial acetic acid. For analysis in optical microscopy the botanical material was processed according to the usual techniques for the same, it was also made analysis in fluorescence microscopy and differential and interferential contrast. To perform the histochemical tests were used: Ruthenium Red for acidic and acidic mucopolysaccharides, Aniline Blue, for cucumber, under fluorescence and Calcofluor White, in aqueous solution 0.01% for cellulose. Morphologically, the androecium of these species is differentiated by the arrangement of the stamens around the gynoecium and by the general characteristics of the anther. Stamens included, with anastomosis filaments different from the forefoot, anthers with a radial disposition around the gynoecium with curved sporangia always facing the same characterize *D. ibicuiensis* and *D. racinae*. This configuration results from fillet coning as well as special anatomical features of the anthers, such as the connective thickenings. In addition, these species are differentiated by U-shaped thickening in endothecium. *Dyckia polyclada* is characterized by its small, free and exerted stamens, with a very short common tube, its anthers, which are not curved or organized around the gynoecium. With the results of the gynoecium studies, it was observed that *D. ibicuiensis* has a superior ovary, tricarpetate, trilocular, plurispermic with axial placentation; the stigma is triplicate of the conduplicated type spiral; the ovules are anatropous, bitegmic and crassinucellate; the integuments are of dermal origin; outer tegument is vascularized; the micropillar canal is formed by the inner integument; the gametophyte is of monosporic origin and *Polygonum*-type; the fibrillar apparatus is from pectic composition; septal nectaries are infralocular, labyrinthic; the chalazal appendix presents elongated cells with intracellular spaces and the obturator presents dome-shaped elongate cells and dense and vacuolated cytoplasm, covering the entire placental region. The presence of secondary metabolites in the nucelo cells was observed during meiosis, persisting during development of the gynophyte. Another striking feature in meiosis was the absence of callose around the spores during meiosis, a characteristic that has never been observed in family species. The data presented are unpublished for the species and contribute to the understanding of the taxonomic and phylogenetic relationships within the family, and for a better understanding of the reproductive process of the species as well as the delimitation of *Dyckia* be equally important for other species and infrageneric groupings.

Keywords: Anther. *Dyckia*. Morphology. ovule. Poales.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1	INTRODUÇÃO.....	8
1.2	ASPECTOS MORFOANATÔMICOS	9
1.3	ASPECTOS EMBRIOLÓGICOS	11
1.4	O GÊNERO <i>DYCKIA</i>	12
1.5	ASPECTOS AMBIENTAIS E BASES DA CONSERVAÇÃO.....	13
1.6	OBJETIVO.....	13
1.6.1	Objetivos Gerais	14
1.6.2	Objetivos Específicos	14
	REFERÊNCIAS	15
2	DESENVOLVIMENTO	20
2.1	STAMEN MORPHOANATOMY OF <i>DYCKIA</i> SCHULT.F. (BROMELIACEAE, PITCAIRNIOIDEAE) SPECIES: NEW DATA FOR TAXONOMIC USE	20
2.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO GINECEU E RUDIMENTO SEMINAL EM <i>DYCKIA</i> IBICUIENSIS STREHL. (BROMELIACEAE).	34
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

As Monocotiledôneas são consideradas um grupo monofilético com base em caracteres morfológicos e dados moleculares bem definidos (REMIZOWA et al., 2010), englobando 12 ordens, dentre elas Poales, a qual Bromeliaceae faz parte (APG III, 2009).

Poales é a maior ordem dentro do grupo das Commelinídeas (APG III, 2009), onde Bromeliaceae ocupa uma posição basal junto com Rapateaceae e Typhaceae (REMIZOWA et al., 2010). Caracteres moleculares e possíveis sinapomorfias como a presença de corpos silicosos na epiderme, estiletos livres ou conatos, perda de rafídeos, sustentam a monofilia de Poales (JUDD et al. 2009), sendo que alguns destes caracteres estão presentes em Bromeliaceae (SMITH; TILL, 1998).

Existem aproximadamente 3539 espécies de bromeliáceas distribuídas em 70 gêneros (GOUDA et al., 2017). Uma revisão recente na família propõe oito subfamílias: Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Puyoideae, Tillandsioideae, Pitcairnioideae e Bromelioideae (GIVNISH et al., 2011). A família é predominantemente tropical (BENZING, 2000), exceto por *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr encontrada no continente africano, (JACQUES-FÉLIX, 2000). No Brasil são encontradas 40% das espécies de bromeliáceas muitas destas endêmicas do ecossistema atlântico (LEME, 1997).

Recentemente análises filogenéticas comprovaram, a partir de caracteres morfológicos e moleculares, que Bromeliaceae é monofilética (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 parafilética (SMITH; DOWNS 1974, 1977, 1979).

O grupo é conhecido pelo seu potencial ornamental (BENZING, 2000) e muitas espécies são utilizadas como fonte medicinal, alimentícia e de fibras. O potencial comercial das espécies e as ações antrópicas levam ao declínio das populações naturais das espécies de Bromeliaceae, entre outras em associação, devido à fragmentação e destruição do habitat (MARTINELLI, 2006).

O gênero *Dyckia* pertence a Pitcairnioideae, e possui mais de 160 espécies (GOUDA et al., 2017), sendo que 144 ocorrem no Brasil (FORZZA et al., 2015). Suas espécies são terrestres ou rupestres, de natureza xerofítica, crescem em locais de altitude elevada (GIVNISH et al.,

2011). Atualmente, Pitcairnioideae, compreende os gêneros *Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Encholirium*, *Fosterella* e *Pitcairnia* (FORZZA et al., 2013, GIVNISH et al., 2007, 2011, LUTHER, 2008, PETERS et al., 2008). As relações filogenéticas dentro de Pitcairnioideae mostram o surgimento de um grupo formado por *Deuterocohnia*, *Dyckia* e *Encholirium*, denominado 'clado xérico' (GIVNISH et al., 2007). Essas espécies são adaptadas a ambientes de estresse, habitam áreas abertas rochosas e apresentam uma morfologia externa característica, com folhas suculentas e fortemente aculeadas (SANTOS-SILVA et al., 2013).

Segundo Krapp et al. (2014) dentro da sua área de distribuição as espécies de *Dyckia* são um componente importante da vegetação azonal. Sua área de ocorrência abrange o Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (GIVNISH et al., 2011). No Brasil o seu centro diversidade se dá nas regiões montanhosas do Cerrado brasileiro avançando para biomas os adjacentes Mata Atlântica e Caatinga (SMITH; DOWNS, 1974).

1.2 ASPECTOS MORFOANATÔMICOS

Bromeliaceae compreende ervas terrícolas, rupícolas ou epífitas. As folhas geralmente se dispõem em forma de roseta e podem conter bainhas em sua base. O limbo se encontra recoberto por tricomas peltados conspícuos. As inflorescências podem ser simples ou compostas, apresentando, em geral, brácteas coloridas. O perianto é heteroclamídeo, trímero, cujos antófilos podem ser livres ou conatos. Os estames apresentam filetes livres ou conatos ou adnatos às pétalas. O ovário pode ser súpero ou ínfero, sempre trilocular, com rudimentos seminiais anátropos às vezes campilótropos, as curvaturas anátropa e ortótropa foram relatadas em *Ananas comosus* (WEE; RAO, 1974, RAO; WEE, 1979). Os frutos são cápsulas ou bagas. As sementes podem apresentar-se aladas ou plumosas ou sem tais especializações, com embriões relativamente pequenos (REITZ, 1983; JUDD et al., 2009). Nectários ocorrem usualmente no septo do ovário (JUDD et al., 2009). O néctar é composto principalmente por glicose, frutose e sacarose, suas concentrações e composições podem variar, e possivelmente estão relacionadas às preferências dos polinizadores e não às relações filogenéticas (KRÖMER et al., 2008).

As espécies do gênero *Dyckia* possuem inflorescências que variam de amplamente paniculada a simples, brácteas primárias inconspícuas e brácteas florais mais curtas que os pedicelos a maiores que as flores. As flores são perfeitas e uniformes, ou raramente dimorfas, sendo de tamanho relativamente pequeno; sua coloração pode variar de amarelo a vermelho. O

fruto é do tipo cápsula septicida, algumas vezes loculicida, com sementes largas e aladas. As folhas podem apresentar margens espinescentes ou serreadas (SMITH; DOWNS, 1974; REITZ, 1983; SMITH; TILL, 1998). Em *Dyckia* as folhas são usualmente coriáceas com borda espinescente, apresentam diferentes níveis de suculência e são geralmente densamente lepidotas. As inflorescências podem ser simples ou ramificadas com inserção lateral (KRAPP, et al., 2014), característica que diferencia marcadamente *Dyckia* de *Encholirium* (FORZZA, 2005). As flores variam de quase sésseis, por apresentarem um pedicelo muito curto, a pediceladas. As pétalas, sépalas e tipicamente o escapo floral mostram cores vibrantes em tons de vermelho, amarelo e laranja. Os filetes são concrecidos na base e formam um tubo comum. Os frutos são capsulas que liberam sementes aladas e anemocóricas na deiscência (KRAPP et al., 2014).

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 permitem oferecer alimento, abrigo, água, nutrientes e sítio de reprodução para diversos organismos, ampliando a riqueza e diversidade de espécies nos ecossistemas que se encontram (ROCHA et al., 2004). São extremamente sensíveis a qualquer mudança ou perturbação das condições ambientais, que podem causar alteração na sua composição e populações (BENZING, 1998).

Existem muitos estudos em Bromeliaceae, com relação à anatomia de órgãos vegetativos, cuja ênfase tem sido dada principalmente à folha (TOMLINSON, 1969; AOYAMA; SAJO, 2003; PROENÇA; SAJO, 2004, 2008), além de estudos sobre a morfologia das escamas peltadas (VARADARAJAN; GILMARTIN, 1987), morfoanatomia e ontogenia de frutos (FAGUNDES; MARIATH, 2010), morfoanatomia de semente (MAGALHÃES; MARIATH, 2012). Estudos sobre a anatomia dos órgãos reprodutivos são relativamente escassos frente ao número de espécies, contudo na última década estão havendo incrementos importantes, incluindo espécies da flora brasileira, Billings (1904), Lakshmanan (1967), Wee; Rao (1974), Rao; Wee (1979), Sajo et al. (2004a,b), Sajo et al. (2005), Sartori (2008); Mendes et al. (2010), Papini et al. (2011), Mendes (2012), Mendes et al. (2012), Spat (2012); Dorneles (2013), Fagundes; Mariath (2014), Nogueira et al. (2015), Martins (2016), Kuhn et al. (2016), Carvalho et al. (2016). No que diz respeito à anatomia e desenvolvimento dos rudimentos seminiais, cabendo destacar os estudos de Billings (1904); Rao; Wee (1979), Sajo et al. (2004a, b), Conceição et al. (2007), Sartori (2008), Spat (2012), Papini et al. (2011), Dorneles (2013); Fagundes; Mariath (2014); Martins (2016); Kuhn et al., (2016).

1.3 ASPECTOS EMBRIOLÓGICOS

A parede da antera em Bromeliaceae é formada pela epiderme, endotécio do tipo fibroso e tapete do tipo secretor (JOHRI et al. 1992; DAVIS, 1966). Na androsporangêese durante a meiose a citocinese foi descrita como sucessiva (PALM, 1920; SARTORI, 2008; FURNESS; RUDALL, 1999; LAKSHMANAN, 1967; RAO; WEE 1979, DORNELES, 2013) e é o tipo mais frequente em monocotiledôneas (SAJO et al., 2005). As tétrades podem ser isobilaterais ou decussadas. Os grãos de pólen são descritos como bicelulares quando liberados das anteras, com uma ou duas aberturas (colpado-distal) como descrito por Lakshmanan (1967) e Conceição (2005). Oliveira et al. (2015) descreveram para *Aechmea recurvata*, *Dyckia racinae* e *Tillandsia aeranthis* a distribuição e a dinâmica do amido nas anteras e grão de pólen, demonstrando que eventos de amilogênese e amilólise são variáveis na família.

Em se tratando de estudos que tratam da embriologia e do desenvolvimento inicial do rudimento seminal podendo ser citados os trabalhos de Sajo et al. (2004a), Spat (2012), Dorneles et al. (2014), Carvalho et al. (2015) e Martins (2016) que em sua pesquisa descreveu também a esporo e gametogênese de *Dyckia polyclada*, bem como as alterações observadas em relação ao desenvolvimento do nucelo de *Dyckia pseudococcinea* por Conceição et al. (2005). Pesquisa sobre o desenvolvimento do fruto com espécies representantes das três tradicionais subfamílias, foi realizada no intuito de subsidiar novos estudos a partir de caracteres importantes do desenvolvimento do fruto e incluindo processo de deiscência (FAGUNDES; MARIATH, 2010). Com relação aos dados embriológicos do rudimento seminal tem-se, para Bromeliaceae que os rudimentos seminais são anátropos, bitegumentados e crassinucelados (JOHRI et al., 1992). O número de camadas nucelares é variável (SAJO et al., 2004 a; RAO; WEE, 1979). O canal micropilar pode ser formado por um ou ambos os tegumentos (WEE; RAO 1974; SAJO et al., 2004 a; SARTORI, 2008; PAPINI et al., 2011; SPAT, 2012, FAGUNDES; MARIATH, 2014). O desenvolvimento do ginósporo caracteriza-se por dois ciclos meióticos que resultam em uma tétrade linear a partir da qual somente o esporo calazal progride no desenvolvimento, caracterizando assim, um padrão monospórico de desenvolvimento, a seguir o esporo funcional passa por três ciclos mitóticos, sendo ao final do processo observadas duas sinérgides, uma oosfera, uma célula média e três antípodas, o que corresponde ao padrão tipo *Polygonum* de desenvolvimento do ginófito.

Outros estudos, com enfoque filogenético, taxonômico e ontogenético, destacam nectários septais (SAJO et al., 2004b), os tipos de estigmas (BROWN; GILMARTIN, 1984, 1989) e apêndices petalares (BROWN; TERRY, 1992). Muitos foram os trabalhos que

contribuíram para a sistemática das subfamílias, como os de Terry et al. (1997a, b), Horres et al. (2000), Barfuss et al. (2004), Nogueira et al. (2015), além dos que abordam aspectos anatômicos e a filogenia de Bromeliaceae e suas relações com as monocotiledôneas (GILMARTIN & BROWN, 1987) e com as Poales (LINDER & RUDALL, 2005, GIVNISH et al., 2010).

1.4 O GÊNERO *DYCKIA*

Dyckia se caracteriza por apresentar inflorescência amplamente paniculada a simples, as brácteas primárias inconspícuas e as brácteas florais de mais curtas que os pedicelos a maiores que as flores. As flores são perfeitas e uniformes ou raramente dimorfas, apresentam tamanho relativamente pequeno, sua coloração pode variar de amarelo a vermelho. As bases dos filetes são separadas uns dos outros, mas às vezes individualmente adnatos às pétalas e sépalas. Os frutos são uma cápsula pequena a grande, septicida e algumas vezes loculicida com sementes largas e aladas. As folhas apresentam as margens espinescentes ou serradas. O escapo floral é geralmente lateral (SMITH; DOWNS 1974; REITZ, 1983; SMITH; TILL, 1998).

Dyckia ibicuiensis Strehl. é nativa e endêmica do Estado do Rio Grande do Sul, seu habitó é terrícola, encontrada em encostas de morro ou campo limpo (FORZZA et al., 2016). Sua floração tem início, geralmente, no mês de outubro, tendo duração de aproximadamente de 30 dias. Sua inflorescência possui aproximadamente um metro e meio de altura. É laxa, multiflora e simples. O pedúnculo é lateral, ereto, com brácteas pedunculares subfoliáceas, superando os entrenós, mas expondo mais do pedúnculo. É uma roseta com folhas numerosas, serradas, com espinhos aduncos e pungentes. Suas folhas são rosuladas, levemente curvas. As flores são perfeitas, com uma bráctea floral.

Dyckia polyclada L.B. Sm. é nativa e endêmica do Rio Grande do Sul (FORZZA et al., 2016). É encontrada em ambiente rochoso, com escassez de água e com muita exposição solar. Sua floração ocorre predominantemente no mês 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. O pedúnculo é lateral, ereto; possui brácteas pedunculares subfoliáceas, superando os entrenós, mas expondo mais do pedúnculo. É uma roseta com folhas numerosas, serradas, com espinhos aduncos e pungentes. Suas folhas são rosuladas, 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. (SMITH, 1989; STRELL, 1998; MARTINS, 2016).

Dyckia racinae L.B. Sm. é nativa e endêmica do Rio Grande do Sul (FORZZA et al., 2016). A espécie é terrestre, oriunda de local nunca sombreado, exposto a intensidade maior de ventos e radiação solar, onde o solo é raso e pedregoso. Sua floração ocorre entre os meses de outubro e novembro, 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. O pedúnculo é lateral, ereto e possui brácteas pedunculares subfoliaceas, A porção vegetativa é uma roseta com folhas numerosas, serreadas, com borda espinosa. As flores são perfeitas. (SMITH, 1989; DORNELES, 2013).

1.5 ASPECTOS AMBIENTAIS E BASES DA CONSERVAÇÃO

A “Lista Vermelha”, publicada pela IUCN (2011) e “Lista Final das Espécies da Flora Ameaçadas do Rio Grande do Sul” (2014) inclui várias Bromeliaceae, e também espécies de *Dyckia*. Nesta última lista, *D. ibicuiensis*, encontra-se na categoria criticamente em perigo (CR), já *D. polyclada* e *D. racinae*, encontram-se na categoria de dados insuficientes (DD), aumentando ainda mais a importância de estudos botânicos sobre o táxon.

Estudos morfológicos e anatômicos contribuem tanto para taxonomia, filogenia e biologia reprodutiva da espécie e da família em geral, além de programas de conservação, como demonstrado por Oriani; Scatena (2013), Oriani et al. (2012) e Sajo et al. (2004).

A grande importância de se reunir informações morfológicas e taxonômicas, e o panorama de conservação da biodiversidade para Bromeliaceae, são as principais considerações para a realização deste estudo. Este trabalho aborda aspectos anatômicos e estruturais do androceu de forma comparada em espécies de *Dyckia*, e também busca conhecer a embriologia com ênfase estrutural de *D. ibicuiensis*, caracterizando o desenvolvimento das estruturas reprodutivas, a ginosporogênese e ginogametogênese. Fornecendo assim, bases morfológicas acerca dos caracteres do rudimento seminal e do estame para o gênero contribuindo, para a caracterização de processos reprodutivos dos táxons estudados, e para aplicação em análises taxonômicas e filogenéticas, de grande valor em programas de conservação.

1.6 OBJETIVO

1.6.1 Objetivos Gerais

Caracterizar aspectos da estrutura do androceu de *Dyckia* Strehl.

Caracterizar aspectos estruturais das flores de *Dyckia ibicuiensis*

Caracterizar a ginosporogênese e ginogametogênese de *Dyckia ibicuiensis*.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar morfo-anatomicamente os estames em *Dyckia*;
- Analisar o espessamento do endotécio em *Dyckia*;
- Caracterizar a vascularização dos estames em *Dyckia*;
- Caracterizar a estrutura da flor madura;
- Caracterizar estilete e estigma;
- Analisar a meiose e o padrão de organização dos ginósporos;
- Descrever a origem do nucelo e dos tegumentos;
- Caracterizar a diferenciação do ginófito bem como caracterização do ginófito maduro.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AOYAMA, E. M.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de *Aechmea* Ruiz & Pav. Subgênero *Lamprococcus* (Beer) Baker e espécies relacionadas (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26 (4), p. 461-473, 2003.
- BARFUSS, M.; SAMUEL, M. R.; TILL, W. Molecular phylogeny in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on six cpDNA markers: an update. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 54(1), p. 9-17, 2004.
- 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 adaptative radiation**. Cambridge University Press, Cambridge. 2000.
- BILLINGS, F. H. A Study of *Tillandsia usneoides*. **Botanical Gazette**, v. 38(2) p. 99-121, 1904.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma structure and variation in Bromeliaceae – neglected taxonomic characters. **Brittonia**, v. 36(4), p. 364-374, 1984.
- _____; _____. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **American Journal of Botany**, v. 76, p. 657– 665, 1989.
- _____; TERRY, R. G. Petal appendages in Bromeliaceae. **American Journal of Botany**, v. 79(9): p. 1051-1071,1992.
- CARVALHO J. D. T.; OLIVEIRA J. M. S.; FREITAS C. C.; MARTINS M. S. Stamen morphoanatomy of *Dyckia* Schult.f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) species: new data for taxonomic use. **Acta Botanica Brasilica**, v. 30(3), p 389-400. 2016
- CONCEIÇÃO, S. P.; DE TONI, K. L. G.; COSTA, C. G. Particularidades do nucelo de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5 (1), p. 846-848, 2007.
- _____. **Ontogenia das anteras de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae)**. Monografia de conclusão de curso. Universidade Santa Úrsula, Rio de Janeiro, RJ, 2005.
- DAVIS, G.L. **Systematic embryology of the angiosperms**. John Wiley & Sons, New York, 1966.
- DORNELES, M. P.; **Desenvolvimento inicial, caracterização estrutural da flor, androsporogênese e androgametogênese em *Dyckia racinae* L.B.Sm. (Pitcairnioideae -**

Bromeliaceae). 2013. 135 páginas. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

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

_____. A. Ovule ontogeny in *Bilbergia nuttans* in the evolutionary context of Bromeliaceae (Poales). **Plant Systematic Evolution**, v. 300, p.1323-1336, 2014.

FORZZA, R.C. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. ex. Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 23(1), p. 1 - 49, 2005

_____. et al. *Bromeliaceae In Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2013. Disponível em <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB34333>. Acesso em: janeiro 2016.

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

GILMARTIN, A. J.; BROWN, G. K. Bromeliales, Related Monocots, and Resolution of Relationships among Bromeliaceae Subfamilies. **Systematic Botany**. v. 12, (4), p. 493-500, 1987.

GIVNISH, T.J. et al. **Phylogeny, adaptive radiations, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data**. In: Columbus, J.T., Friar, E.A., Porter, J.M., Prince, L.M. & Simpson, M.G. (eds.) *Monocots: Comparative Biology and Evolution – Poales*. Rancho Santa Ana Botanic garden, Claremont, CA, p. 3-26, 2007.

_____. et al. Assembling the Tree of the Monocotyledons: Plastome Sequence Phylogeny and Evolution of Poales. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 97(4), p. 584-616, 2010.

_____. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical Biogeography in Bromeliaceae: insights from an Eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98 (5), p. 872-895, 2011.

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: janeiro, 2017.

HORRES, R.; ZIZKA, G.; KAHL, G.; WEISING, K. Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from *trnL*(UAA) intron sequences of the chloroplast genome. **Plant Biology**, v. 2(3): p. 306-315, 2000.

IUCN. **The IUCN Red list of threatened Species**. Disponível em <http://www.iucnredlist.org> (acessado em 04/06/2014), Version, 2011.

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, p. 615-1221, 1992.

JUDD, W.S.; et al. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre. 2009.

KRAPP, F.; et al. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Systematic Evolution**, v.300, p.1591-1614, 2014.

KRÖMER, T.; KESSLER, M.; LOHAUS, G.; SCHMIDT-LEBUHN, A. N. Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. **Plant Biology**. v. 10 (4), p. 502-511, 2008.

KUHN S. A.; NOGUEIRA F. M.; FAGUNDES N. F.; MARIATH J. E. A. Morphoanatomy of the ovary and ovule in Bromeliaceae subfamily Tillandsioideae and its systematic relevance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p. 343–361, 2016.

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, p.107, 1997.

LINDER, H. P.; RUDALL, P. J. 1993. The megagametophyte in *Anarthria* (Anarthriaceae, Poales) and its implications for the phylogeny of the Poales. **American Journal of Botany** v. 80(12), p. 1455-1464.

LISTA FINAL DAS ESPÉCIES DA FLORA AMEAÇADAS-RS. **Fundação Zoobotânica**, 2014. Disponível em:
http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20141208161010anexo_i_taxons_da_flora_nativa_do_estado_rio_grande_do_sul_ameacadas_de_extincao_1_.pdf. Acesso em: 04/01/2017

MAGALHÃES, R. L.; MARIATH, J. E. A. Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Plant Systematic and 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.

MARTINS, M. S.; **Desenvolvimento embriológico em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae)**. 98 páginas. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

MENDES, S. P. **Estudos embriológicos em *Pitcairnia encholirioides* L.B.Sm. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae)**. 2012. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

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.

NOGUEIRA, F. M; FAGUNDES, N. F; KUHN, S. A; FREGONESI, J. N; MARIATH, J. A. E. 2015. Ovary and ovule anatomy in the nidularioid complex and its taxonomic utility (Bromelioideae: Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 66–77.

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.

ORIANI, A.; STTÜZEL, T.; SCATENA V.L. Contributions to the floral anatomy of Juncaceae (Poales - Monocotyledons). **Flora**, v. 207, p. 334–340, 2012.

_____; SCATENA, V.L. The taxonomic value of floral characters in Rapateaceae (Poales - Monocotyledons). **Plant Systematics and Evolution**, v. 299(2), p. 291-303, 2013.

PALM, B. J. Preliminary notes on pollen development in tropical monocotyledons. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v.14, p. 261- 266, 1920.

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

PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.18 (2), p. 319-331, 2004.

_____; _____. Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. **Rodriguésia**, v.59 (1), p.113-128, 2008.

RAO, A. N.; WEE, Y. C. Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. **New Phytologist**, v. 83, 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(4), p. 617-645, 2010.

ROCHA, C. F. D.; et al. Conservando uma larga proporção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, Viçosa, M.G., 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.

_____ ; 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.

_____ ; 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.; SARAIVA, D. P.; MONTEIRO, R. F.; PITA, P.; MANTOVANI, A.; FORZZA, R. C.; Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it? **Flora** xxx (2013) xxx–xxx, available online.

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

_____ ; _____. Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica Monographs** v.4, p. 663-1492, 1977.

_____ ; _____. Bromelioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica Monographs** v.14, p. 1604-1724, 1979.

_____ ; W. TILL. Bromeliaceae. In K. Kubitzki [ed.]. **The families and genera of vascular plants**, Springer, Berlin, Germany, v.4, p. 74–99, 1998.

SPAT, C. Embriologia de *Tillandsia aeranthos* (LOIS.) L. B. SM. (Tillandsioideae – Bromeliaceae). 112 páginas. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

TERRY, R. G.; BROWN, G. K.; OLMSTEAD, R. G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus ndhF. **American Journal of Botany**, v. 84 (5), p. 664-670, 1997a.

_____ ; _____ ; _____. Phylogenetic Relationships in Subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) Using ndhF Sequences. **Systematic Botany**, v. 22 (2), p. 333-345, 1997b.

TOMLINSON, P.B. **Anatomy of the Monocotyledons – Commelinales - Zingiberales**. Oxford University Press, New York, 1969.

VARADARAJAN, G.S.; GILMARTIN, A.J. Foliar scales of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematic Botany**, v.12 (4), p. 562-57, 1987.

WEE, Y. C; RAO, A. N. Gametophytes and seeds development in pineapple. **Current Science**, v 43 (6), p. 171-173, 1974.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 STAMEN MORPHOANATOMY OF DYCKIA SCHULT.F. (BROMELIACEAE, PITCAIRNIOIDEAE) SPECIES: NEW DATA FOR TAXONOMIC USE

(Artigo foi publicado no periódico Acta Botânica Brasilica)

Stamen morphoanatomy of *Dyckia* Schult.f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) species: new data for taxonomic use

Jordano Dorval Tavares de Carvalho¹, João Marcelo Santos de Oliveira^{1*}, Cesar Carvalho de Freitas¹ and Meriélem Saldanha Martins¹

RESUMO

Este estudo apresenta uma análise morfoanatômica dos estames de *Dyckia ibicuiensis*, *D. polyclada* e *D. racinae*. Flores em antese foram dessecadas e seus estames foram processados seguindo microtécnicas usuais para a análise em microscopia de luz. Morfologicamente, o androceu dessas espécies é diferenciado pela disposição dos estames ao redor do gineceu e pelas características gerais da antera. Estames inclusos, com filetes antessépalos diferentes dos antepétalos, anteras em disposição radial, sempre curvas com os esporângios voltados para o gineceu caracterizam *D. ibicuiensis* e *D. racinae*. Essa configuração resulta da conação do filete, bem como de características anatômicas especiais das anteras, tais como o conectivo com espessamentos. Além disso, as espécies diferenciam-se pelo espessamento em forma de U no endotécio. *Dyckia polyclada* é caracterizada por seus estames pequenos, livres e exsertos, com um tubo comum muito curto, suas anteras não são curvadas ou organizadas em torno do gineceu e seus esporângios são divergentes. As características anatômicas e morfológicas aqui identificadas são importantes para a caracterização dessas espécies. Considerando que o androceu é importante na delimitação de *Dyckia*, o aumento do uso desses dados deve ser igualmente importante para outras espécies e agrupamentos infragenéricos.

Stamen morphoanatomy of *Dyckia* Schult.f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) species: new data for taxonomic use

Jordano Dorval Tavares de Carvalho¹, João Marcelo Santos de Oliveira^{*}, Cesar Carvalho de Freitas¹ and Meriélem Saldanha Martins¹

Received: April 4, 2016

Accepted: June 13, 2016

ABSTRACT

This study presents a morphoanatomical analysis of *Dyckia ibicuiensis*, *D. polyclada* and *D. racinae* stamens. Flowers at anthesis were desiccated and their stamens were processed using common microtechniques for light microscopic analysis. Morphologically, the androecium in these species is differentiated by the disposition of the stamens around the gynoecium and by general anther characteristics. Included stamens, with antesealous filaments different from those of the antepetalous, anthers in a radial disposition, always curved, and sporangia facing the gynoecium characterize *D. ibicuiensis* and *D. racinae*. This configuration results from the filament connation, as well as special anatomical characteristics of the anthers, such as the connective with thickenings. In addition, these species are differentiated by the U-shaped thickening in the endothecium. *D. polyclada* is characterized by its small, free and exerted stamens, with a very short common tube, its anthers, that are not curved or organized around the gynoecium, and its divergent sporangia. The anatomical and morphological characteristics identified here are important for characterization of these species. Considering that the androecium is important in the delimitation of *Dyckia*, the increased use of these data should be equally important for other species and infrageneric groupings.

Keywords. anatomy, androecium, anther, common tube, connective, *Dyckia*, endothelial thickening, stamen vasculature

Introduction

Dyckia is a very diverse genus of Pitcairnioideae (Bromeliaceae), with over 160 terricolous or saxicolous species, with adaptations to xerophytism, distributed across South America, especially in Brazil (Smith & Downs 1974; Leme *et al.* 2012; Forzza *et al.* 2015; Gouda *et al.* 2015). Phylogenetic hypotheses based on morphological (Forzza 2001) and molecular (Krapp *et al.* 2014) traits have confirmed the monophyly of the genus. However, there are still difficulties regarding both the circumscription of some species and the proposition of infrageneric groupings

(Krapp *et al.* 2014). This genus has a large number of endemic or rare species (Martinelli *et al.* 2008), and is considered problematic from a taxonomic point of view, either because of insufficient records of specimens, or due to overlaps in key analytical characteristics (Smith 1967; Versieux & Wendt 2007). For this reason, *Dyckia* has been of interest in morphoanatomical studies of reproductive organs in order to define the species more consistently (Fagundes & Mariath 2010; Dorneles *et al.* 2014; Martins *et al.* 2015; Oliveira *et al.* 2015; Santos-Silva *et al.* 2015) and to serve as a basis for understanding infrageneric relations and making phylogenetic inferences, which are rare and hampered by

¹ Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

* Corresponding author: linneau@yahoo.com.br

the homogeneity of traits in this group, due to its recent radiation (Krapp *et al.* 2014).

Characteristics of floral morphology, such as the presence of extranuptial nectaries and, mainly, fusion of the stamens, are important in the definition of the genus, which is phylogenetically and morphologically quite similar to *Encholirium*. However, the androecium is usually little pronounced in the original descriptions of *Dyckia* species, with emphasis in some species on the connation and relative size. Nevertheless, the importance of the stamens is not restricted to the delimitation of the genus, having been referred to in epithets, such as in *Dyckia choristaminea* (“dyckia of separated stamens”), *D. tubifilamentosa* (“dyckia of filaments in tube”), *D. exserta* (“dyckia of exserted stamens”), demonstrating the plasticity of this organ in the group, whose floral characteristics are considered quite homogeneous.

Anatomical analysis of reproductive organs has been used for taxonomic and phylogenetic purposes in Bromeliaceae and *Dyckia* (Sajo *et al.* 2005; Fagundes & Mariath 2010; Nogueira *et al.* 2015; Santos-Silva *et al.* 2015), due to not only the descriptive and diagnostic potential but also to the value of this kind of analysis in evolutionary considerations or the relative homogeneity of some often used morphological traits. In *Dyckia*, in addition to general anatomical traits of the flower (Dorneles *et al.* 2014; Martins *et al.* 2015), stamen anatomy, especially of the anther, has been investigated in some works from ontogenetic (Sajo *et al.* 2005; Mendes *et al.* 2012), taxonomic (Dorneles *et al.* 2014; Martins *et al.* 2015) and histochemical (Oliveira *et al.* 2015) points of view, especially in endemic or rare species. This type of analysis has contributed to a more precise characterization and delimitation of the respective species of *Dyckia*. The original descriptions of the species analyzed in the present study, *Dyckia racinae*, *D. ibicuiensis* and *D. polyclada*, presented only general aspects of flowers (Smith 1988; 1989; Strehl 1997) and few specific elements. The difficulties in identification not only exacerbate the condition of ‘critically endangered’ of *D. ibicuiensis*, but also hamper the classification of *D. racinae* and *D. polyclada* into the accurate category of endangerment, due to insufficient data and a lack of knowledge about the distribution and/or their respective population states (DOE RS 2014).

Considering the lack of information about the stamen in *Dyckia*, more detailed analyses of this organ are important in research on traits with potential phylogenetic and taxonomic use. Thus, the present study aims to characterize morphoanatomically the androecium of *D. racinae*, *D. ibicuiensis* and *D. polyclada*, highlight relevant characteristics of the stamens and anthers for each species and compare them using these characteristics.

Materials and methods

The processing and analysis of floral samples was carried out at the Laboratório de Botânica Estrutural (LABOTE) of

the Departamento de Biologia at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Inflorescences of six specimens of *D. ibicuiensis* Strehl, ten specimens of *D. racinae* L.B. Sm. and ten specimens of *D. polyclada* L.B. Sm. were collected from natural populations in: Morro Itaquiá, São Pedro do Sul, RS, Brazil (29°42.941’S/ 53°43.087’ W), São Pedro do Sul, RS, Brazil (29°35’22.2’’S/ 54°49’49.4’’W) and Distrito de Santo Antão, Santa Maria, RS, Brazil (29°42.911’S/ 53°43.093’W), respectively. The plant material was deposited at the herbarium of UFSM, under the registration numbers SMDB 13840, SMDB 15923 and SMDB 15924.

Morphometric data were obtained from random individuals, using stamens of 10 to 20 flowers at anthesis for each species, at different heights of inflorescence. The total size of the stamen, the length of the anther and the filament, the ratio between filament length and total length of the stamen, the height of connation, the height of connation relative to the total size of the stamen and the width of the filament were measured. The terminology used is in accordance with Smith & Downs (1974).

For the light microscopy, the botanical material was fixed in a solution containing 1% glutaraldehyde and 4% formaldehyde (McDowell & Trump 1976) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 (Gabriel 1982), followed by washing in the same buffer, washing in distilled water and finally dehydration in an ethyl alcohol series (O’Brien & McCully 1981). The material was pre-infiltrated in a 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and pure ethanol solution (1:1) during 12h, followed by infiltration in HEMA for approximately 4h and embedding in a Teflon holder until polymerization was completed (Gerrits & Smid 1983). The anthers and filaments were sectioned to 3µm in thickness using a Leica RM2245 rotary microtome. Toluidine blue O in 0.05% sodium benzoate buffer, pH 4.4 was used to stain the histological slides (Sidman *et al.* 1961).

For analysis of fibrous thickening, portions of anthers were macerated using a 3:1 solution of hydrogen peroxide and glacial acetic acid, with subsequent temporary preparation in alcoholic glycerine (Johansen 1940) and analyzed using Differential Interference Contrast (DIC).

For analysis of vascularization, fixed anthers and filaments were clarified using 3% sodium hypochlorite (Johansen 1940).

Photographic documentation and analysis were performed using a Leica DM2000 microscope® and Stereomicroscope Leica M80 with DFC295 image capture system and Zeiss AxioImager A2 with a Zeiss AxioCam RMC digital photographic system.

Photoshop™ was used to process the images.

Results and discussion

The species analyzed present an androecium with six stamens, three antepetalous and three antepetalous (Fig. 1A-E), which are adnate to the corolla forming a typical



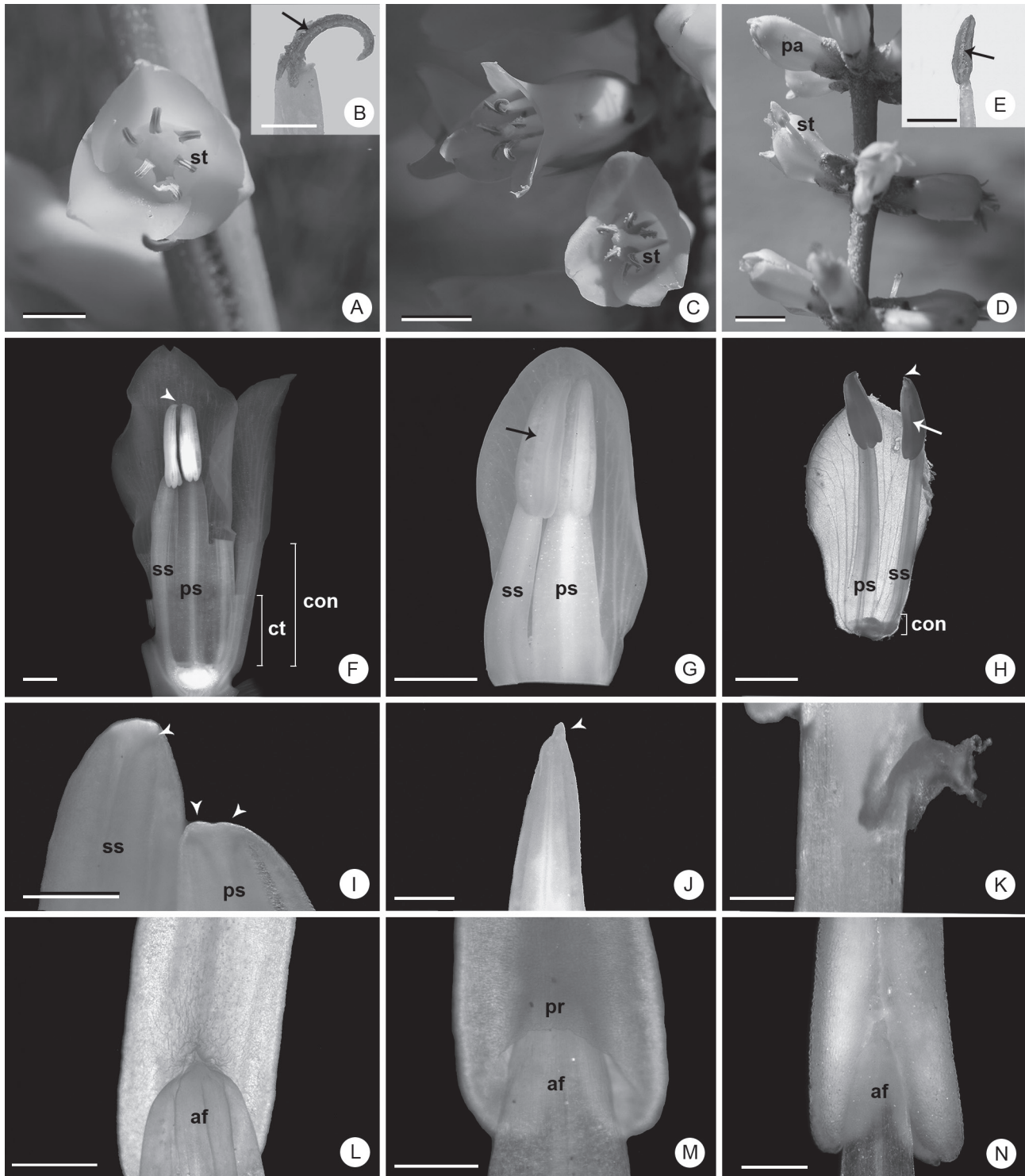


Figure 1. General aspects of the stamens of *Dyckia* species. A, B, F, I, L: *D. ibicuiensis*. C, G, J, M: *D. racinae*. D, E, H, K, N: *D. polyclada*. A, C, D: General appearance of the flower *in vivo*. B, E: detail of dehiscent anther. F, G, H: general appearance of antepetalous and antesepalous stamens after chemical fixation. G: cross section of filaments occurred near the distal region of the common tube. I, J, K: rostra. K: projection of tissue at the base of the anther of *D. polyclada*. L, M, N: detail of the region of filament insertion. Arrows: region of dehiscence; arrow heads: rostra; **af**: apex of the filament; **con**: connation; **ct**: common tube with the petals; **pa**: flower at pre-anthesis; **pr**: projection around the apex of the filament; **ps**: antepetalous stamen; **ss**: antesepalous stamen; **st**: stamen. Bars: A, C, D: 5 mm; B, E, F-H: 2 mm; I-N: 500 μ m.

common tube with the petals (Smith & Downs 1974). Thus, there are two stamen whorls, which can be connate

only at the base or above the common tube (Fig. 1F-H). The stamens are included in *D. racinae* and *D. ibicuiensis*



and exerted in *D. polyclada* (Fig. 1A-H). *D. racinae* and *D. ibicuiensis* present an evident common tube with the petals (Fig. 1F); in *D. polyclada* this tube is short or imperceptible (Fig. 1H). The anthers are triangular, dorsifixed, introrse and bitheous, with longitudinal dehiscence (Fig. 1F-H), and present a pointed rostrum (Fig. 1 H-J), which is bilobed in the antepetalous stamens of *D. ibicuiensis* (Fig. 1I). The general characteristics of the androecium, in the three species analyzed, corroborate previous data for *Dyckia* (Smith & Downs 1974; Reitz 1983) in large taxonomic studies of the genus. However, the original descriptions of the species analyzed here (Smith 1988; 1989; Strehl 1997), merely reported the height relative to the corolla and the occurrence of connation.

Morphometrically, the stamens differ by total size, size relative to the corolla, extent of connation and length and width of the filaments (Tab. 1). *D. ibicuiensis* and *D. racinae* present the largest stamens, with antepetalous filaments wider than the antesepalous filaments and with a greater extent of connation (Tab. 1). The filament in these two species represent 74% and 55%, respectively, of the total size of the stamen (Tab. 1). *D. polyclada* presents the smallest stamens and smallest extent of connation. In addition, the filaments are thin and the antepetalous and antesepalous filaments are similar (Tab. 1). The filament comprise more than 60% of the total size of the stamen (Tab. 1). Based on interpretation of the data, it is possible to infer that despite these ratios being unique for each species, there is no direct relationship between relative size of the filament and length relative to the corolla, which may be related to the length and curvature of the petals. Nevertheless, it is observed that the filaments continue to lengthen after anthesis in *D. polyclada*, while the petals cease to grow in this period (Fig. 1D), a common phenomenon in several angiosperms according to Greyson (1994). This characteristic could be investigated in future studies, associated to temporal development patterns of flower organs, during anthesis. Similarly, it is not possible to evaluate the relationship between the longer common tube and stamens, with greater extent of connation, and the relative sizes observed which differentiate *D. racinae* and *D. ibicuiensis* from *D. polyclada*, since the common tube with petals may also lengthen late, without leading to exposition of the stamens. It is important to note that relative measurements are rarely used in descriptions of species, despite generally being

robust, as they do not present overlaps and they provide good comparisons.

At anthesis, the stamens of *D. ibicuiensis* and *D. racinae* are regularly positioned around the carpels, giving the anthers a radial organization, with zones of dehiscence facing toward the gynoecium (Fig. 1A-C). This radial disposition is made possible by the greater extension of connation of the stamens, and by the greater opening of the corolla in these species, due to the dorsal curvature of the petals in *D. racinae* and *D. ibicuiensis* (Fig. 1A, C). In contrast, *D. polyclada* presents an irregular stamen distribution (Fig. 1D), mainly due to the smaller opening of the corolla and by the short connation. In addition, *D. ibicuiensis* and *D. racinae*, *in vivo*, show a marked dorsal curvature of the anthers (Fig. 1A-C), while in *D. polyclada*, there is only a slight curvature (Fig. 1D-E). After fixation, or when the anthers are rehydrated, there is a return to the rectilinear shape observed prior to dehiscence (Fig. 1F-G). This curvature does not appear to be a result of differential growth processes, but rather a result of typical dehydration of the anther during dehiscence, in association with its mature tissues. This consideration is supported by the fact that after rehydration, the anthers resume the typical pre-anthesis form. Changes in morphology, as well as position of the anther during anthesis have been observed in other plant groups (Dettke & Santos 2011), including *Dyckia* (Rogalski *et al.* 2009) and are related mainly to strategies of pollen grain dispersal and reproductive systems adopted by the species. As indicated by Rogalski *et al.* (2009), in addition to the radial arrangement of the anthers, which turn the sporangia toward the gynoecium, this curvature also characterizes a self-pollination system commonly observed in other Bromeliaceae genera, including *Dyckia* (Smith & Downs 1974; Benzing 2000).

Irregular projections of tissue were observed from the base of the theca of some stamens in *D. polyclada* (Fig. 1K). This structure possesses variable and asymmetric forms. Since the presence of these projections is not constant, its taxonomic utilization is not viable, but nevertheless is a new record for the species and genus.

The insertion point of the filament is different in each species (Fig. 1L-N). In *D. ibicuiensis* and *D. polyclada* the apical region of the filament is exposed (Fig. 1L, N), unlike *D. racinae*, where this region is covered by the projection of the connective and sporangia around the apex of the

Table 1. Morphometry of the stamens of *Dyckia ibicuiensis*, *D. racinae* and *D. polyclada*. SL: stamen length. AL: anther length. FL: filament length (including the common tube with the petals). FL/SL: approximate mean ratio of filament length relative to total stamen length CON: connation height (including the common tube with petals). CON/SL: mean ratio between connation height and total stamen length. FW: filament width immediately above the connation point. FW (AS): filament width of antesepalous stamens. FW (AP): filament width of antepetalous stamens. SL, AL, FL, CON and FW measurements in cm; CON/SL and FL/SL: percentage values.

	SL	AL	FL	FL/SL	CON	CON/SL	FW (AS)	FW (AP)
<i>D. ibicuiensis</i>	1.4-1.8	0.4-0.5	1.0-1.5	74.0	0.7-1.0	56.5	0.1	0.25
<i>D. racinae</i>	0.9-1.1	0.4-0.45	0.6-0.7	55.0	0.21-0.3	25.5	0.09	0.17
<i>D. polyclada</i>	0.8-1.0	0.25-0.3	0.5-0.7	65.0	0.03-0.06	5.0	0.05	0.05-0.06



filament, similar to a groove (Fig. 1M). These species also differ by the shape of the filament apex, both antepetalous and antepetalous, which are obtuse in *D. ibicuiensis* and *D. racinae* (Fig. 1L-M) and acute in *D. polyclada* (Fig. 1N). In all the species, there is a gradual narrowing of the filament towards the apex (Fig. 1L-N). The insertion point of the filament is often associated with the movement of the anther in the reproductive period (D'Arcy 1996; Dettke & Santos 2011). The morphology of this region suggests constraint of lateral and dorso-ventral movements of the anther in *D. ibicuiensis* and *D. racinae*, regardless of its curvature. In *D. polyclada*, on the other hand, there seems to be articulation of the anthers, which, combined with the free exerted stamens, the rectilinearity of the anthers and the divergent sporangia, may be evidence of variations in the pollination process.

Another important feature is the differential morphology between the antepetalous and the antepetalous stamens of *D. ibicuiensis* and *D. racinae* (Fig. 1F-G) (Tab. 1). Differences between stamen whorls, as indicated by Greyson (1994), are related to initiation time and differential spacing between the antepetalous and antepetalous stamens during the early stages of floral development. These different widths of filaments in each whorl may demonstrate different patterns of floral development between these species and *D. polyclada*, whose filaments presented only a slight dimorphism, making their use in future taxonomic analyses relevant for both revisions of species of genus and for new descriptions. In the anthers, it is noteworthy that there is a forked rostrum only in the antepetalous stamens in *D. ibicuiensis*, which may be used as a diagnostic trait.

The anatomy and histology of the mature anthers in a cross-section of the species analyzed here was in line with typical expectations for *Dyckia* and other Bromeliaceae (Johri *et al.* 1992; Sajo *et al.* 2005; Mendes *et al.* 2012), with regard to the presence of a connective with central vascular bundle and four sporangia with parietal layers consisting of epidermis, endothecium and middle layer (Fig. 2A-F). Details of the distribution and constitution of these tissues, however, showed important anatomical and histological differences among the species.

In the cross section, the middle portion of the anthers presents typical histological sites, the connective and the sporangial site (Fig. 2A-F). The connective in *D. ibicuiensis* and *D. racinae* (Fig. 2A-D) presents a relatively more developed mid-dorsal region of the anther, unlike that in *D. polyclada* (Fig. 2E-F). The sporangial site comprises four sporangia facing the gynoecium in *D. ibicuiensis* and *D. racinae* (Fig. 2A, C), where in *D. polyclada* the sporangia assume a divergent position (Fig. 2E).

The connective, in a broad sense, is a tissue that comprises the entire area inside the anther, except for the sporangial tissue (D'Arcy 1996). In addition, it is the site of vascular bundle differentiation and, thus, sporangial nutrition. It also provides support for the anther and assists

in its dehiscence, in addition to being a site for storage and mobilization of metabolites (Clément *et al.* 1994; Oliveira *et al.* 2015).

In the present study, the presence of fibrous thickenings allowed for differentiation between two regions in the connective (Fig. 2A-F). The region without fibrous thickenings is central and made up of a collateral vascular bundle, with two parallel xylem poles, surrounded by parenchymatous tissue, similar to a sheath, with four to six cell layers extending to the septal region (Fig. 2A-F). The sheath, and its extensions to the septal sporangia are probably associated with the transfer of nutrients to the sporangia. In addition, they possibly aid in anther support, especially in *D. polyclada*, where this tissue forms almost the entirety of the connective (Fig. 2E-F). The connective dorsal and ventral regions in *D. ibicuiensis* and *D. racinae* are bulky and have cells with fibrous thickenings (Fig. 2B, D), unlike in *D. polyclada* (Fig. 2E), where this region is limited to a few thick cell layers (Fig. 2E-F). Considering the anthers in cross-section, the dorsal region in *D. ibicuiensis* and *D. racinae* is protruding (Fig. 2A, D), and in *D. polyclada* it is always concave (Fig. 2E), due to the connective bulk. Apparently, the greater accumulation of mechanical tissue in the dorsal and ventral region of the connective is important for the conformation of the anther in the anthesis period. Hufford & Endress (1989) and Dettke & Santos (2011) described the dehiscence of the anthers in different species as a result of the association between mechanical tissues of the connective and the endothecium, which likely occurs in the present study. The mechanical function is associated with the forces generated by differential dehydration of cell walls of mechanical tissues, as described by D'Arcy (1996). Thus, the dorsal curvature observed in the anthers after dehydration was interpreted as a result of deformation of the connective in *D. racinae* and *D. ibicuiensis*. In *D. polyclada*, the presence of few cells in the connective region and a more limited distribution of thickenings allow for this interpretation. Another result of the volume of the connective in the species analyzed in this work is related to the convergent position of the sporangia, facing the ventral region, especially in *D. ibicuiensis* and *D. racinae*, where this tissue orientates the growth and direction of the sporangia. In *D. polyclada*, whose connective is basically limited to the parenchymal region surrounding the vascular bundle, there is no mechanical restriction on sporangial development, which takes a lateralized position. From a taxonomic point of view, it is important to check this anatomical trait in future descriptions or infrageneric considerations, given its importance in the final structuring of anthers and its constancy in different flowers and different individuals.

As for fibrous thickenings, although Manning (1996) suggested that only those originating in the endothecium are taxonomically useful, in this study, thickenings found in the connective are similar to those of the endothecium. Some authors such as Hufford & Endress (1989) and D'Arcy



(1996) have interpreted these portions of the connective as an endothelial-type of hypodermis or as a tabular configuration of the endothecium, due to the fact that the presence of fibrous thickenings is also associated with the opening of the anthers.

As for the sporangial region (Fig. 3), in the mature

anther, there only remains cells from the epidermis, fibrous endothecium and some cells from the middle layer, despite there being an increase of cell layers in regions of transition from the sporangia to the connective (Fig. 3A, C, D).

When comparing the three species, the epidermis is striated, with thickened and cutinized external periclinal

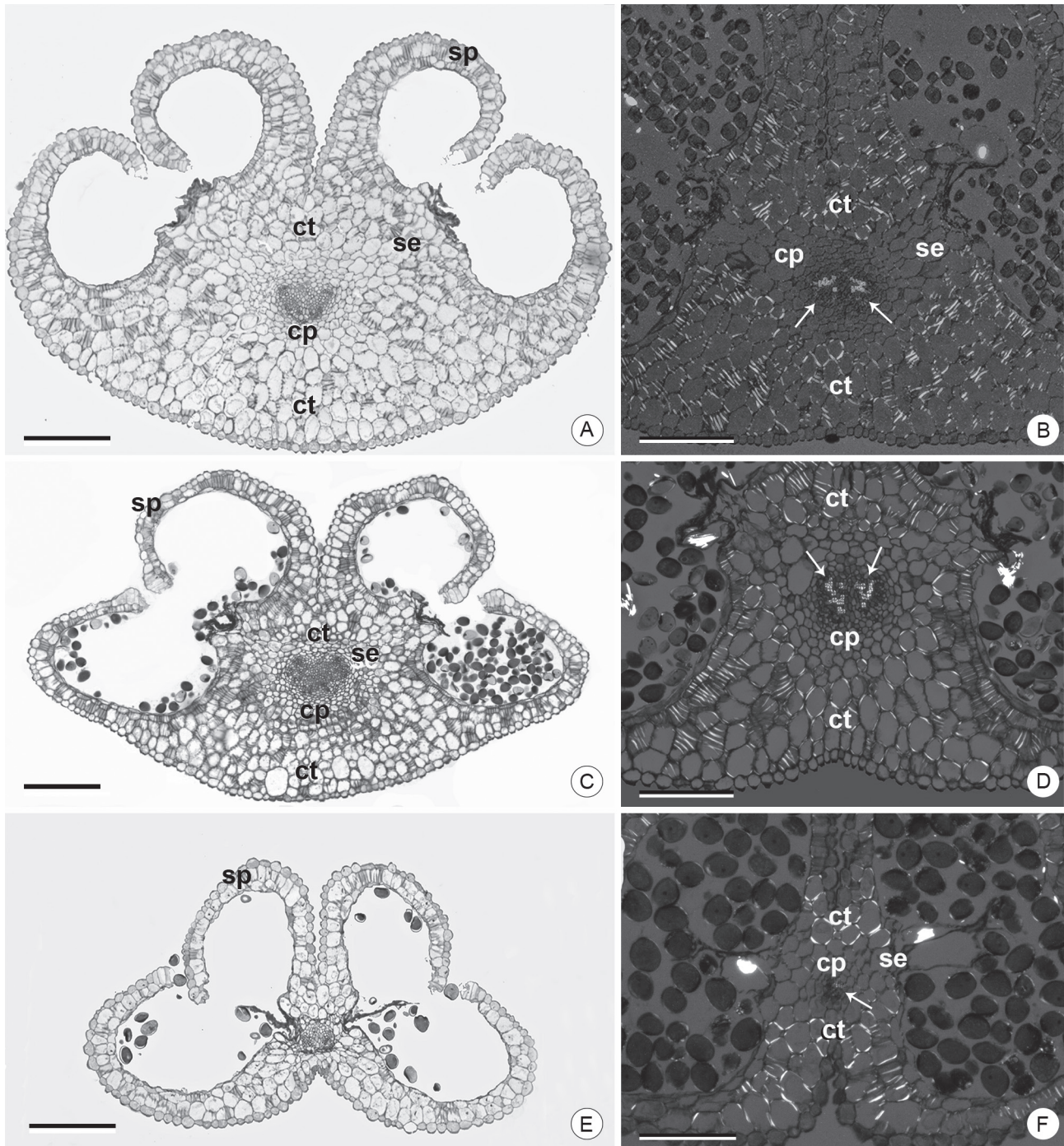


Figure 2. Anthers of *Dyckia* species in median cross section. A, B: *D. ibicuiensis*. C, D: *D. racinae*. E, F: *D. polyclada*. A, C, E: bright field microscopy (images on the same scale). B, D, F: polarized light microscopy. Arrows: vascular bundle xylem poles; **cp**: connective region with parenchymatous cells; **ct**: connective region with thickened cells; **se**: bundle sheath extension; **sp**: sporangium. Bars: A, C, E: 200 μ m; B, D, F: 100 μ m.



walls, making the organ surface irregular (Fig. 3B). In addition, it presents cells with anticlinal elongation in the region adjacent to the stomium (Fig. 3A, C, D). Lobo *et al.* (2013) consider these characteristics of *Dyckia* epidermis to reflect a xeromorphic condition common to the genus,

being that the taxonomic use of this layer is limited due to its structural simplification in the stamens.

The endothecium is the thickened subepidermal layer of the anthers, responsible, mainly, for aiding in its dehiscence (D'Arcy 1996). This function is associated directly with the

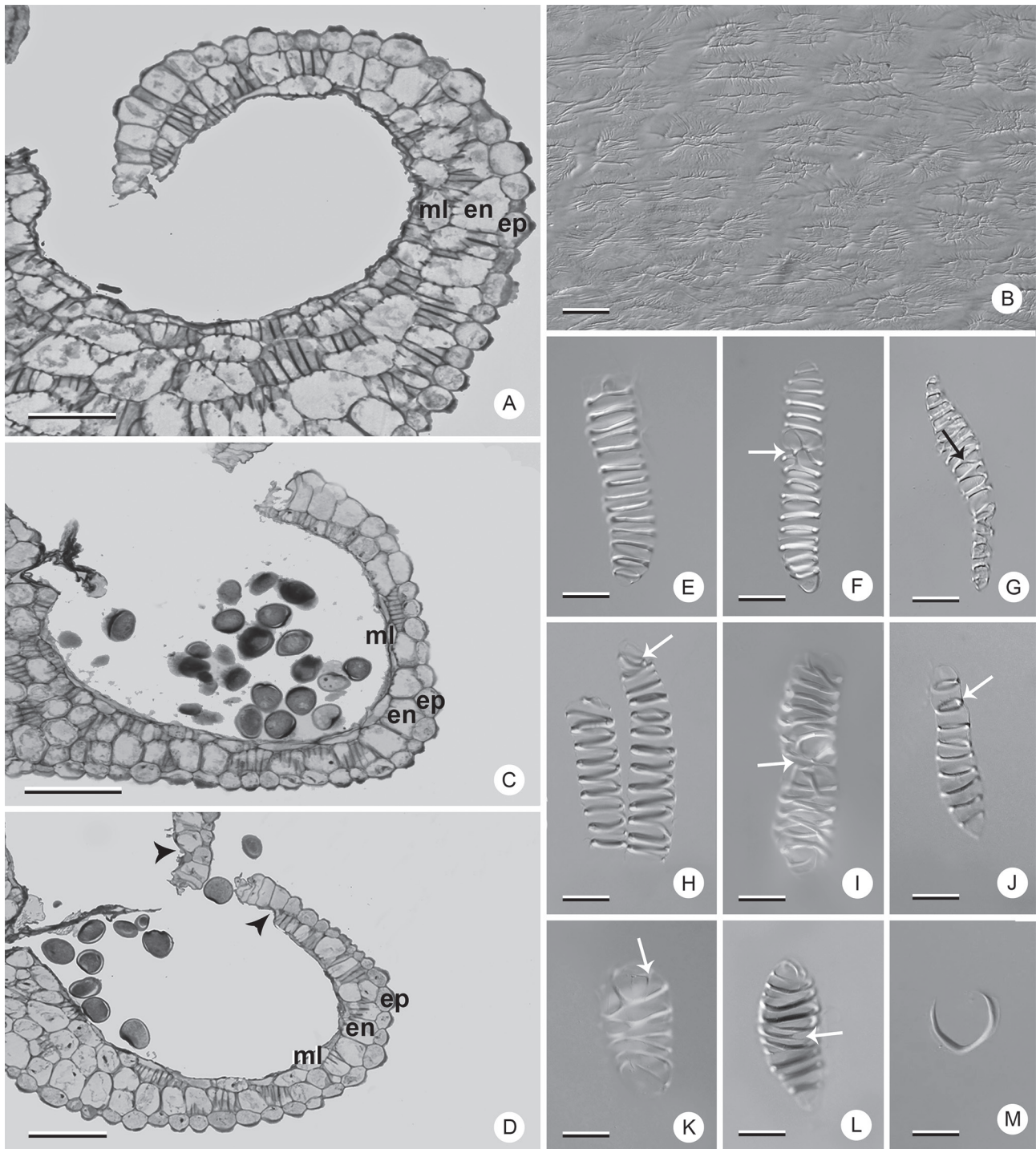


Figure 3. Sporangia and fibrous thickenings in *Dyckia* species. A, B, E-G, M: *D. ibicuiensis*. C, H-J: *D. racinae*. D, K, L: *D. polyclada*. A, C, D: sporangia in median cross section under bright field microscopy. B, E-M: Differential Interference Contrast microscopy (DIC). B: sporangial surface detail. E-M: endothecium cells showing different patterns of fibrous thickening. Arrows: bifurcations or rings; arrow heads: region with absent endothecium; **en**: endothecium; **ep**: epidermis; **ml**: middle layer. Bars: A, C, D: 100 μ m; B, E-M: 10 μ m.



thickenings present in this layer, which generate differential tensions with typical dehydration during anthesis, aiding to open the sporangia (Keijzer 1987), by means of hygroscopic mechanisms. The greater structural diversity of the endothecium cells and the conservation of these types in different groups of plants (Manning 1996) justify its utilization in phylogenetic and taxonomic analyses. In the present study, in the same anther, different types of fibrous thickenings in endothelial cells were observed, in addition to types exclusive to the species (Fig. 3E-M).

In the species analyzed here, the endothecium consists of a layer of cells that is continuous until the stomial region, with the exception of *D. polyclada*, in which the endothecium cells do not occur in that region (Fig. 3D). In all the species, there is a predominance of helical thickening, combined or not with rings at the extremities or with bifurcations (Fig. 3E-I, K-L). In addition, cells with annular thickenings may also be observed (Fig. 3J). *D. ibicuiensis* and *D. racinae* also present U-shaped thickenings (Fig. 3M), not observed in *D. polyclada*. The predominant types in the three species are variations of the helical type described by Manning (1996), which, according to the author, is one of the most important types from a phylogenetic point of view, in addition to the U-shapes. Manning & Linder (1990) consider U-shaped thickenings as a derived type in Poales families. According to them, this type emerged from the helical type in this group, a hypothesis that may justify future studies in *Dyckia*, due to the variability in fibrous thickenings found in the three species analyzed. Besides the absence of U-shaped thickenings, *D. polyclada* is also characterized by the absence of the endothecium near the stomial region.

The middle layer, in the three species, consists of a non-uniform layer of cells that also presents fibrous thickenings (Fig. 3A, C-D). This parietal layer is conspicuous only in *D. ibicuiensis* (Fig. 3A). The structure of the middle layer in the mature anther proved to be of interest in the comparison among the species since, by remaining in the anthers, its cells also developed fibrous thickenings. The permanence of the middle layer with thickenings in the mature anther is common and has been reported in other monocot families, such as Rapateaceae (Oriani & Scatena 2013) and Commelinaceae (Hardy *et al.* 2000), despite being unidentified in *Dyckia* and other Bromeliaceae. It probably aids in anther dehiscence together with the endothecium, due to the presence of fibrous thickening.

Some studies investigating the anther anatomy in *Dyckia* have shown the location and types of vascular bundles (Sajo *et al.* 2005; Mendes *et al.* 2012; Dorneles *et al.* 2014). Likewise, a number of studies have recognized the phylogenetic and taxonomic importance of anther vasculature in other taxonomic groups (Hufford 1980; French 1986; Dettke & Santos 2011). In this study, *D. ibicuiensis* and *D. racinae* present a bifurcation of the vascular bundle in the anther, extending from the insertion point of the filament to the basal region of both theca (Fig. 4A-B), unlike *D. polyclada*, which presents vascular bundles

without ramifications (Fig. 4C). *D. ibicuiensis* presents a small bifurcation at the apex of the antepetalous stamens, corresponding to the rostral lobes (Fig. 4A), which does not occur in the other two species. The vascularization patterns described are easily observed anatomically along the anther (Fig. 4 D-I), due to the occurrence not only of conducting elements, but also the vascular sheaths. In *D. polyclada* this tissue is also present along the entire length of the anther, although in the basal region only the vascular sheaths occur (Fig. 4F-G). In the basal region of the theca of some anthers of this species there are projections of non-vascular tissue (Fig. 1K), with epidermis and parenchymatous content (Fig. 4J). Relationships between anther volume and vascular branching in the connective have been proposed previously (Dettke & Santos 2011) and in the present study, it is possible to observe a simplification of the vascular tissues in *D. polyclada*, possibly associated with the smaller size of the anther. In the other species, the vascular branching possibly occurs due to the larger size of the anthers and to the distance from the site of entry of vascularization in the connective.

The antesealous and antepetalous filaments (Fig. 5), in a same flower, are distinct in *D. ibicuiensis* and *D. racinae* (Fig. 5A-B, D, G-H). In these species, the filaments of the antesealous stamens are narrow and possess a concave-convex section, while those of the antepetalous stamens are broader and flattened dorsio-ventrally. In *D. polyclada*, the antesealous and antepetalous filaments are similar and may show a small dimorphism (Fig. 5C, E-F). In the middle cross-section, the filaments present a single-layered epidermis and hypodermis followed by typical parenchymatous tissue and one or more collateral vascular bundles (Fig. 5D-H). In this region, it is possible to note a tissue continuity in *D. ibicuiensis* (Fig. 5D). All the species present a vascular bundle in the central portion of the filament, which generally possesses two parallel xylem poles (Fig. 5A-C). In *D. racinae*, in most of the flowers, there are filaments with one or two vascular bundles of smaller size (Fig. 5B, G-H), occurring in a lateralized position, between the central vascular tissue and the epidermis. These bundles remain separate from the central vascular bundle from the base of the stamens, uniting into a single bundle in the area of narrowing and insertion of the anther. The filament anatomy of the species examined is quite similar to that documented for other Bromeliaceae (Sajo *et al.* 2004; Mendes *et al.* 2012). However, the vasculature of this organ is unusual, both in terms of the common configuration of the bundles or the variants found. The conformation of vascular bundles with two parallel xylem poles in *D. ibicuiensis* and *D. racinae* can be interpreted as a consequence of the increased volume of this organ in these species, when compared to *D. polyclada*, a species with relatively narrow filaments. The patterns found in *D. racinae* are rare in most angiosperms, which present a single unbranched vascular bundle in the filament, despite ramification in the connective being common (Greyson 1994). As Puri (1951) points out, the vascular tissue in the



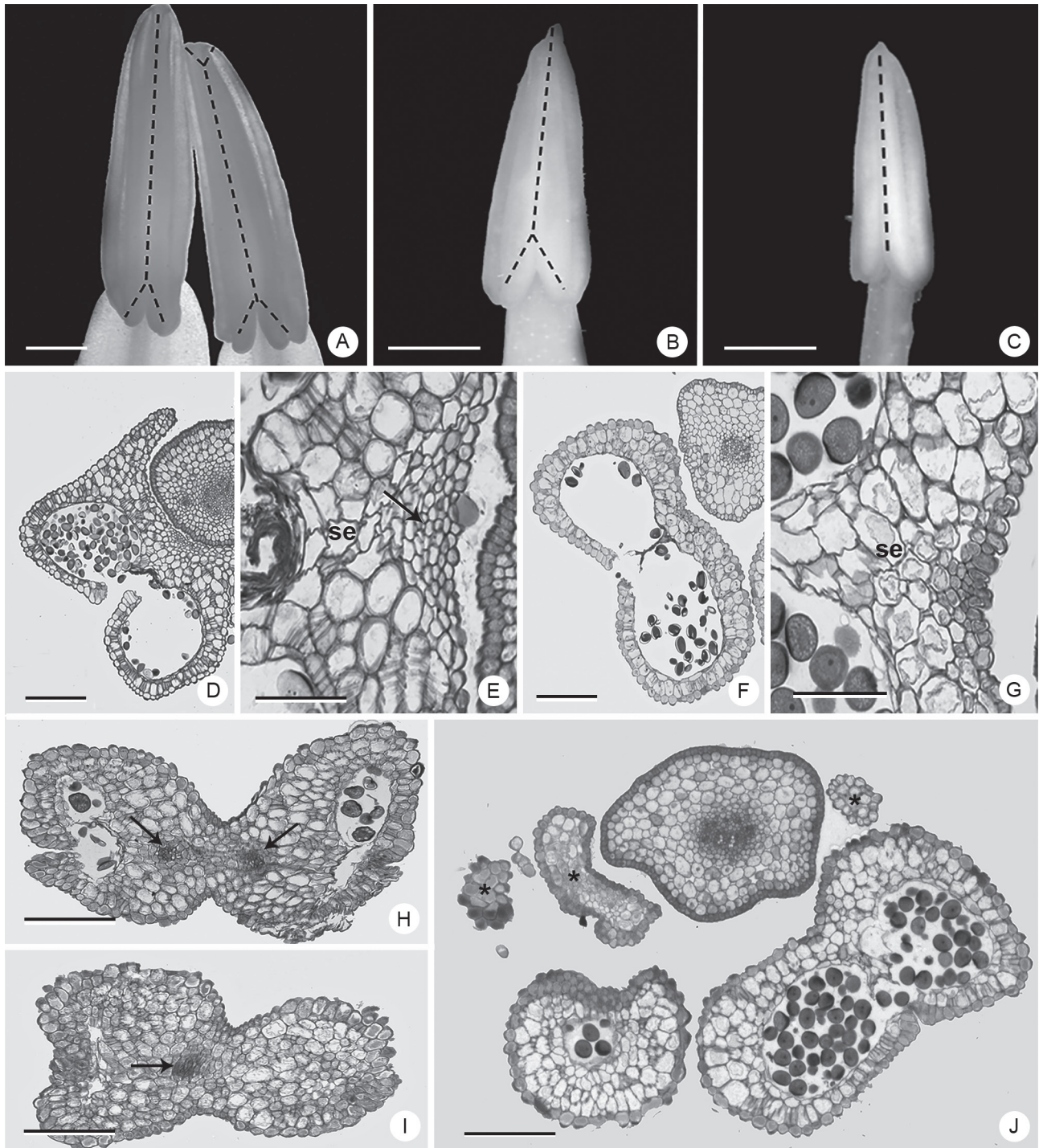


Figure 4. Vascularization of the anthers in *Dyckia* species. A, H, I: *D. ibicuiensis*. B, D, E: *D. racinae*. C, F, G, J: *D. polyclada*. A-C: images of stereomicroscopy. D-J: bright field microscopy. A-C: dashed line indicates vascularization of the anthers. D-G, J: basal portion of the anther. H, I: apices of anthers of antepetalous and antesepalous stamens, respectively; Arrows: vascular bundles; asterisk: projections of non-vascular parenchymatous tissue; **se**: bundle sheath extension. Bars: A-C: 1 mm; D, E, F, J: 200 μ m. E, G, H, I: 50 μ m.

flowers remains relatively well-conserved, being important for evolutionary inferences, especially related to fusions and structural losses. Therefore, the variations found in *D. racinae* are an important record of the variability in stamen vasculature, demonstrating the need for studies

of flower development in order to verify the origin of these configurations and their possible utilization in species characterization.

Finally, when *D. polyclada* is compared with other species of the genus, it presents similarities with species of the



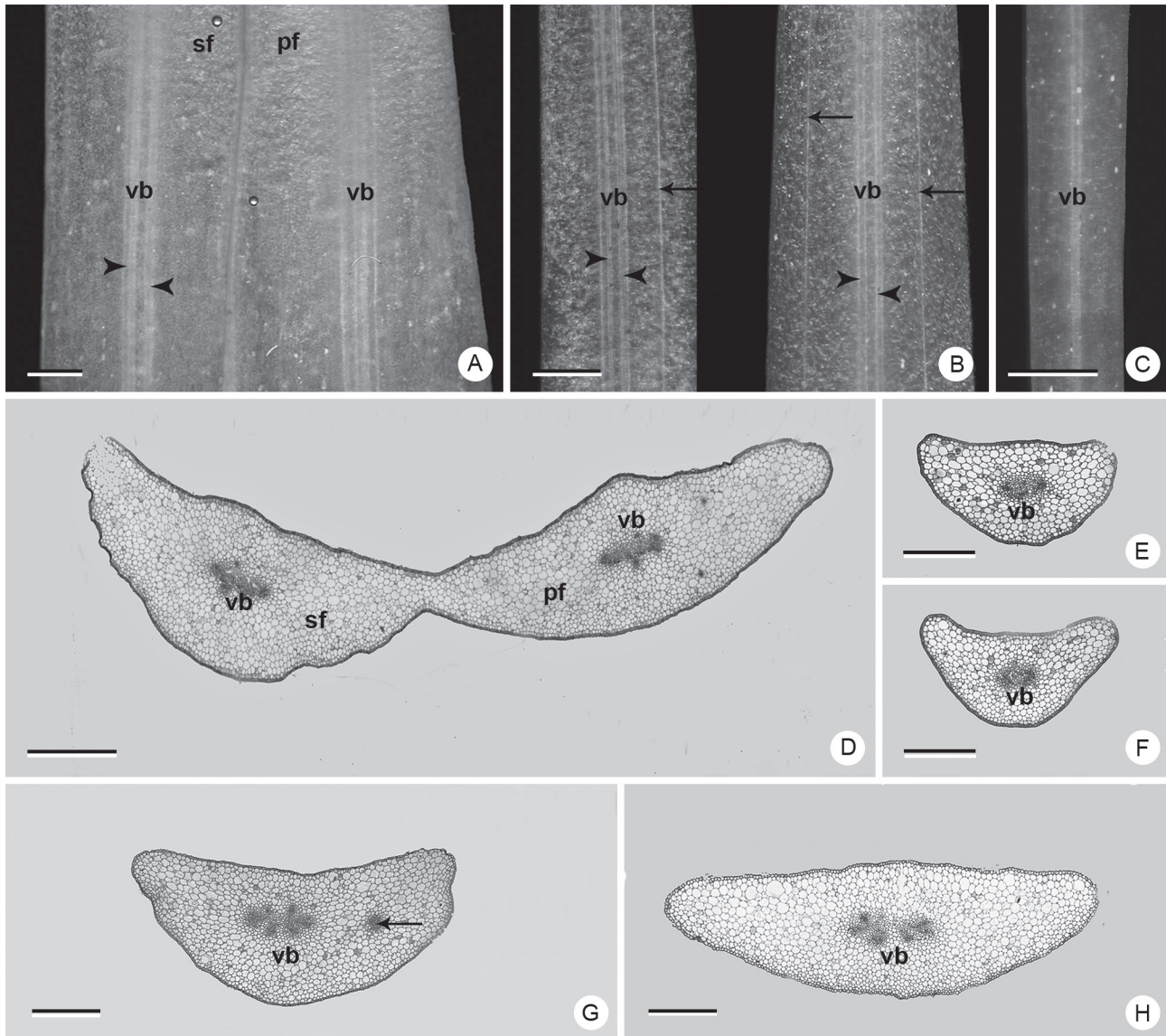


Figure 5. Vascularization and histology of filaments in *Dyckia* species. A, D: *D. ibicuiensis*. B, G-H: *D. racinae*. C, E-F: *D. polyclada*. A-C: filaments clarified under stereomicroscopy. D-H: median cross-section of filaments under bright field microscopy. C, E, G: filaments of antesepalous stamens. F, H: filaments of antepetalous stamens. Arrow: eccentric vascular bundle; arrow heads: xylem poles; **pf**: antepetalous filament; **sf**: antesepalous filament; **vb**: vascular bundle. Bars: A-C: 500 μ m; D-H: 200 μ m.

“maritima complex” (Strehl & Beheregaray 2006), a group that has been neglected, but which shares various floral characteristics, including the morphology of the androecium observed in this study. According to HM Büneker *et al.* (unpubl. res.) several species of *Dyckia* from southern Brazil are part of this group, including *D. myriostachya*, *D. retroflexa*, *D. rigida*, *D. maritima*, *D. selloa*, *D. alba*, *D. agudensis*, *D. nigrospinulata*, *D. tomentosa*, *D. domfelicianensis*, *D. hebdingii*, *D. delicata*, as well as *D. polyclada*. Apparently, the androecium in all these species is quite similar, with slightly connate or free stamens, often exerted, with a short common tube with the petals, similar and narrow antesepalous and antepetalous filaments and small anthers not distributed radially around the gynoecium, in contrast

to *D. racinae* and *D. ibicuiensis*, which are likely related to other dyckias of a second group (Strehl & Beheregaray 2006), apparently heterogeneous. It is important to note that there are significant overlaps in taxonomic descriptions, especially in floral characterization of the “maritima complex” species, for example, the demarcation between *D. polyclada* and *D. maritima* (Smith & Downs 1974; Reitz 1983), whose few diagnostic characteristics overlap markedly. This points to the need for an analysis that includes a greater number of floral features, especially those related to the androecium, which, according to the data of this study, may be relevant.

This study aims to expand the characterization of the androecium in *Dyckia* because of its reproductive and taxonomic importance. In addition, it contains promising



unpublished data for future studies of the genus. For comparative purposes, a number of characteristics can be highlighted, including the connective with thickened cells, the curvature of the anthers, the types of fibrous thickenings found in the endothecium, the particularities of each stamen whorl and stamen vasculature. Finally, the stamen morphoanatomy in *Dyckia* was found to be important in the characterization of three rare and endangered species of this diverse genus. We emphasize that the stamen features present taxonomic potential both for revisions of already described species and for characterization of new *Dyckia* species.

Acknowledgements

We thank Henrique Mallmann Büneker for the correct identification of the species and collection of biological material.

References

- Benzing DH. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge, Cambridge University Press.
- Clément C, Chavant L, Burrus M, Audran JC. 1994. Anther starch variations in *Lilium* during pollen development. Sexual Plant Reproduction 7: 347-356.
- D'Arcy WG. 1996. Anthers and stamens and what they do. In: D'Arcy WG, Keating RC. (eds.) The anther: form, function and phylogeny. Cambridge, Cambridge University Press. p. 1-24.
- Dettke GA, Santos RP. 2011. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Biociências 9: 48-74.
- DOE RS. 2014. Decreto 51.109 de 19 de dezembro de 2014. <http://www.fzb.rs.gov.br/conteudo/4809/?Homologada_a_nova_Lista_da_Flora_Ga_C3%B4cha_Amea%3%A7ada_de_Extin%3%A7%C3%A3o.> 29 May 2016.
- Dorneles MP, Oliveira JMS, Canto-Dorow TS. 2014. *Dyckia racinae* L.B. Sm. (Bromeliaceae): morphological description emphasizing the reproductive structures. Iheringia Serie Botânica 69: 397-404.
- Fagundes NE, Mariath JEA. 2010. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. Acta Botanica Brasílica 24: 765-779.
- Forzza RC. 2001. Filogenia da tribo Puyeeae Wittm. e revisão taxonômica do gênero *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae). PhD Thesis, Universidade de São Paulo, Brazil.
- Forzza RC, Costa A, Siqueira Filho JA, et al. 2015. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB34334>>. 10 Oct. 2015.
- French JC. 1986. Patterns of stamen vasculature in the Araceae. American Journal of Botany 73: 434-449.
- Gabriel BL. 1982. Biological Electron Microscopy. New York, Van Nostrand Reinhold Company.
- Gerrits 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.
- Gouda EJ, Butcher D, Gouda K. 2015. [continuously updated]. Encyclopaedia of Bromeliads Version 3.1. <<http://botu07.bio.uu.nl/bcg/encyclopedia/brome/>>. 10 Oct. 2015.
- Greyson RI. 1994. The Development of Flowers. Oxford, Oxford University Press.
- Hardy CR, Stevenson DW, Kiss HG. 2000. Development of the gametophytes, flower, and floral vasculature in *Dichorisandra thyrsiflora* (Commelinaceae). American Journal of Botany 87: 1228-1239.
- Hufford LD. 1980. Staminal vascular architecture in five dicotyledonous angiosperms. Proceedings of the Iowa Academy of Science 87: 96-102.
- Hufford LD, Endress PK. 1989. The diversity of anther structures and dehiscence patterns among Hamamelididae. Botanical Journal of the Linnean Society 99: 301-346.
- Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. New York, MacGraw-Hill.
- Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava OS. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms. Berlin, Springer.
- Keijzer CJ. 1987. The processes of anther dehiscence and pollen dispersal. New Phytologist 105: 487-498.
- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Leme EM, Weising K. 2014. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. Plant Systematics and Evolution 300: 1591-1614.
- Leme EMC, Ribeiro OBDC, Miranda ZDJG. 2012. New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. Phytotaxa 67: 9-37.
- Lobo GM, Souza TV, Voltolini CH, Reis A, Santos M. 2013. Leaf Epidermis of the Rheophyte *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae). The Scientific World Journal 2013: 1-7.
- Manning JC. 1996. Diversity of endothelial patterns in the angiosperms. In: D'Arcy WG, Keating RC. (eds.) The anther: form, function and phylogeny. Cambridge, Cambridge University Press. p. 136-158.
- Manning JC, Linder HP. 1990. Cladistic analysis of patterns of endothelial thickenings in the Poales/Restionales. American Journal of Botany 77: 196-210.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, da Costa AF, Forzza, RC. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. Rodriguésia 59: 209-258.
- Martins MS, Dorneles MP, Oliveira JMS, Nicoloso FT. 2015. Morphological characterization of the ovarian wall, stigma, stylus and ovules in two species of *Dyckia* (Bromeliaceae). Rodriguésia 66: A32.
- McDowell EM, Trump BF. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 100: 405-414.
- Mendes SP, Costa CG, Toni KLG. 2012. Androecium development in the bromeliad *Dyckia pseudococcinea* L.B.Sm. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae), an endangered species endemic to Brazil: implications for conservation. Flora 207: 622-627.
- Nogueira FM, Fagundes NE, Kuhn SA, Fregonezi JN, Mariath, JEA. 2015. Ovary and ovule anatomy in the nidularioid complex and its taxonomic utility (Bromelioideae: Bromeliaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 177: 66-77.
- O'Brien TP, McCully ME. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne, Termarcaphi Pty Ltd.
- 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 Brasílica 29: 103-112.
- Oriani A, Scatena VL. 2013. The taxonomic value of floral characters in Rapateaceae (Poales-Monocotyledons). Plant Systematics and Evolution 299: 291-303.
- Puri V. 1951. The role of floral anatomy in the solution of morphological problems. The Botanical Review 17: 471-553.
- Reitz R. 1983. Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica. In: Reitz R. (ed.). Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues p. 1-808.
- Rogalski JM, Reis A, Reis MSD, Hmeljevski KV. 2009. Reproductive biology of the rheophyte *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), on the Itajaí-Açu River, Santa Catarina, Brazil. Brazilian Journal of Botany 32: 691-702.
- Sajo MG, Rudall PJ, Prychid CJ. 2004. Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectaries in commelinid monocots. Plant Systematics and Evolution 247: 215-231.
- Sajo MG, Furness CA, Prychid CJ, Rudall PJ. 2005. Microsporogenesis and anther development in Bromeliaceae. Grana 44: 65-74.
- Santos-Silva F, Mastroberti AA, Mariath JEA. 2015. Capsule structure in three species of *Dyckia* (Bromeliaceae): Ontogenetic and taxonomic issues. Journal of the Torrey Botanical Society 142: 249-257.



- Sidman RL, Mottla PA, Feder N. 1961. Improved polyester wax embedding for histology. *Stain Technology* 36: 279-284.
- Smith LB. 1967. Notes on Bromeliaceae. *Phytologia* 14: 457-491.
- Smith LB. 1988. A giant *Dyckia* mystery. *Journal of the Bromeliad Society* 38: 248-249.
- Smith LB. 1989. Another giant *Dyckia* mystery. *Journal of the Bromeliad Society* 39: 206.
- Smith LB, Downs RJ. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). In: *Flora Neotropica Monograph* 14, part. 1. New York, The New York Botanical Garden.
- Strehl T. 1997. Novas bromélias da flora gaúcha - I, *Dyckia ibicuiensis* Strehl sp. nov. *Bromélia - Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias* 4: 14-16.
- Strehl T, Beheregaray RCP. 2006. Morfologia de sementes do gênero *Dyckia*, subfamília Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Pesquisas Botânicas* 57: 103-120.
- Versieux LM, Wendt T. 2007. Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 16: 2989-3009.



2.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO GINECEU E RUDIMENTO SEMINAL EM
DYCKIA IBICUIENSIS STREHL. (BROMELIACEAE).

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

Cesar Carvalho de Freitas, João Marcelo Santos de Oliveira
Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil
cesarcarvalho_07@hotmail.com

Artigo original

Caracterização morfológica do gineceu e rudimento seminal em *Dyckia ibicuiensis* Strehl. (Bromeliaceae).

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

Cesar Carvalho de Freitas, João Marcelo Santos de Oliveira
Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil
cesarcavvalho_07@hotmail.com

Resumo

O gênero *Dyckia* é um grupo que apresenta problemas na delimitação e de espécies e também sofre com a crescente perda de habitats coloca as populações em risco fazendo assim necessário o aumento de conhecimento acerca da mesma para futura aplicação em programas de conservação, bem como na taxonomia e filogenia do grupo. O presente trabalho objetiva, forma inédita, descrever a flor madura, caracterizar o gineceu e a esporogênese e gametogênese em rudimentos seminais em *Dyckia ibicuiensis*. As flores de *D. ibicuiensis* são perfeitas, trímeras e heteroclamídeas. O ovário de *D. ibicuiensis* é súpero, sincárpico, tricarpelar, trilocular, e plurispérmico e placentação axial. Os rudimentos seminais são anátropos, bitegumentados e crassinucelados. O tegumento é externo é vascularizado a partir da calaza. O canal micropilar é formado pelo tegumento interno. O desenvolvimento do ginófito é do tipo monospórico e *Polygonum*, onde o ginófito apresenta sete células e oito núcleos, com a presença de duas sinérgides, uma oosfera, formando o aparelho oosférico e três antípodas. Os núcleos polares de fusionam antes da fecundação. Há presença do aparelho fibrilar no aparelho oosférico. O presente trabalho traz dados inéditos para a família, como a deposição de metabólitos secundários no tecido nucelar em torno do ginófito e também a ausência de calose durante o desenvolvimento dos esporos, que lançam novas perspectivas no entendimento dos reprodutivos da família.

Palavras-chave: *Dyckia*. esporogênese. gineceu. rudimento seminal.

Abstract:

The genus *Dyckia* is a group that presents problems in the delimitation and species and also suffers from the increasing loss of habitats places the populations at risk thus making necessary the increase of knowledge about the same for future application in conservation programs as well as in the taxonomy And phylogeny of the group. The present work aims, in an unprecedented way, to describe the mature flower, to characterize gynoecium and sporogenesis and gametogenesis in ovules of *Dyckia ibicuiensis*. The flowers of *D. ibicuiensis* are perfect, trimeric and heteroclamid. The ovary of *D. ibicuiensis* is superior, syncarpic, tricarpelate, trilocular, and plurispermic with axial placentation. The seminal rudiments are anthropic, bitegumentate, and crassinucelated. The outer integument is vascularized from the shoe. The micropillar canal is formed by the inner integument. The development of the gynophyte is of the monosporic type and *Polygonum*, where the gynophyte presents seven cells and eight nuclei, with the presence of two synergids, one egg cell, forming the egg apparatus and three antipodals. The polar nuclei fuse before fertilization. There is presence of the filiform apparatus in the egg apparatus. The present work brings unpublished data to the family, such as the deposition of secondary metabolites in the nucellar tissue around the gynophyte and also the absence of callose during spore development, which throw new perspectives on the understanding of the reproductive family.

Keywords: *Dyckia*. sporogenesis. gynoecium. ovule.

Introdução

Bromeliaceae é formada por cerca de 70 gêneros com atualmente, cerca de 3539 espécies (Gouda et al. 2017), com distribuição geográfica neotropical (Smith & Downs 1974), exceto por *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr, nativa do oeste da África (Jacques-Félix 2000). No Brasil a família apresenta 1343 espécies, dentre essas 1174 são endêmicas (Forzza et al. 2015), ocorrendo em todos os domínios fitogeográficos existentes com os mais variados tipos de vegetação (Forzza et al. 2015). Uma revisão recente na família propôs oito subfamílias: Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Puyoideae, Tillandsioideae, Pitcairnioideae e Bromelioideae (Givnish et al. 2011). *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).

Devido à má delimitação das suas espécies o gênero apresenta problemas taxonômicos (Krapp et al. 2014), além disto a falta de estudos e coletas pouco representativas geram um grande problema na identificação e a classificação das espécies (Krapp et al. 2014). *Dyckia ibicuiensis* Strehl. é nativa e endêmica do Rio Grande do Sul, atualmente encontra-se na categoria CR (criticamente ameaçada) (Forzza et al. 2015).

O número de estudos embriológicos utilizando espécies pertencentes a Bromeliaceae vem crescendo de forma significativa nos últimos anos, Sajo et al. (2004b); Sajo et al. (2005); Sartori (2008); Mendes et al. (2010); Mendes (2012); Mendes et al. (2012); Spat (2012), Fagundes & Mariath (2014), Nogueira et al. (2015), Martins (2016), Kuhn et al. (2016). Outros autores que podem ser citados são os de Palací et al. (2004) e Papini et al. (2011) que em seus trabalhos também apresentam dados embriológicos para a família. Trabalhos contemplando a embriologia do rudimento seminal em *Dyckia*, são escassos, podendo ser citados Sajo et al. (2004a), Conceição et al. (2007), Mendes (2008), Mendes et al. (2010), Mendes et al. (2012),

Dorneles et al. (2014) e Martins (2016). Estudos morfológicos sobre rendimento seminal e ovário (Nogueira et al. 2015, Kuhn et al. 2016), sementes (Fagundes & Mariath 2010), tipos de estigmas (Brown & Gilmartin 1989), apêndices petalares (Brown & Terry 1992) foram realizados com enfoque filogenético dentro de Bromeliaceae.

A utilização de estudos embriológicos para resolver problemas taxonômicos e filogenéticos dentro da família, são escassos. Considerando relevância de estudos morfológicos e embriológicos, o presente trabalho busca prover, de forma inédita para a espécie, dados embriológicos do rudimento além aspectos morfológicos e anatômicos das estruturas que compõe o esporângio, tais como o funículo, apêndice calazal, tegumentos e nucelo, acerca de *Dyckia ibicuiensis*, contribuindo para o conhecimento da espécie e podendo auxiliar na taxonomia e filogenia da família.

Materiais e Métodos

O material botânico foi analisado e processado no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Biologia-LABOTE, Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria CCNE/ UFSM. As coletas de flores e botões de *Dyckia ibicuiensis* L.B. Sm. foram realizadas no Morro Itaqui localizado no município de São Pedro do Sul, RS, Brasil (Fig. 1A), nas coordenadas geográficas S 29° 42' 941" e W 053° 43' 087". O material testemunho de *Dyckia ibicuiensis* encontra-se depositado no Herbário do CCNE/ UFSM – com o número de registro SMDB 13840. Uma coleção líquida dos materiais coletados para as análises histológicas, com registro de coleta está mantida no LABOTE.

Para a análise em microscopia óptica, o material botânico foi fixado em 1% glutaraldeído e 4% formaldeído 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 por 72 horas e, posteriormente, foi desidratado em série etílica. O material foi pré-infiltrado em 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). Foram realizadas seções de 3-5 µm de espessura, 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 diferencial e interferencial (DIC) as análises e o registro fotomicrográfico foram realizados em microscópio Zeiss Axio Imager A2. Para a realização dos testes histoquímicos foram utilizados: Vermelho de Rutênio para mucopolissacarídeos ácidos e ácidos pécticos (Johansen 1940), Azul de Anilina, para calose, sob fluorescência (Martin 1959) e Calcofluor White, em solução aquosa 0,01% para celulose (Hughes & McCully, 1975). Controle positivo para calose foi realizado em tétrades de micrósoros em calose na mesma espécie.

Resultados e discussão

Aspectos gerais da flor

As flores em *Dyckia ibicuiensis* são perfeitas, trímeras, heteroclamídeas e cada flor possui uma bráctea (Fig. 1B-C). O tamanho das flores em antese varia de 2,25 a 2,75 cm de comprimento. As brácteas florais são ovado-triangulares com margens inteiras, e podem chegar

a 3 cm de comprimento de coloração castanha, consistência coriácea e com pilosidade branca (Fig. 1B-C). As sépalas são suborbiculares, com 1,6 cm de comprimento com coloração amarelada e apresentam tricomas em sua superfície (Fig. 1C-D). As pétalas são glabras, espatuladas, amarelas, e ápices obtusos, na base um pouco concrecidas entre si (Fig. 1B-D). O androceu é formado por seis estames inclusos, dispostos ao redor do gineceu, as anteras são dorsifixas e apresentam duas tecas, e deiscência é longitudinal (Fig. 1B-D). O gineceu apresenta região ovariana, estilete e estigma como regiões de fácil distinção (Fig. 1D). O gineceu apresenta três carpelos fundidos entre si que formam três lóculos, local de surgimento dos rudimentos seminiais (Fig. 2A). As características aqui descritas para a bráctea, cálice, corola, androceu e gineceu estão de acordo com estudos já feitos sobre o gênero (Smith & Downs 1974; Reitz 1983), bem como para a descrição original da espécie (Strehl 1997).

Nectários

Os nectários encontram-se localizados logo abaixo dos lóculos, predominantemente no receptáculo, atingindo a região nodal do gineceu (Fig. 1D). Tais nectários são labirínticos e estruturados (Fig. 1E), sua epiderme é secretora e apresenta células com núcleo proeminente, citoplasma denso e pequenos vacúolos (Fig. 1F). Idioblastos contendo ráfides (Fig. 1E) ocorrem no parênquima receptacular adjacente ao nectário. Nectários septais labirínticos também foram descritos em estudos recentes para outras *Dyckia* tais como *D. racinae* (Dorneles et al. 2014), *D. polyclada* (Martins 2016) e *D. hebdingii* (Sajo et al. 2004b). Os últimos autores demonstraram que diferenças estruturais do nectário entre tribos de *Pitcairnioideae* corroboram com evidências da análise de dados moleculares (Horres et al., 2000, Givnish et al., 2003b) de que esta subfamília é polifilética, evidenciando a relevância dessa estrutura para novos estudos comparativos dentro do grupo.

A presença de nectários septais em flores de Bromeliaceae é considerada anômala em Poales, onde os nectários septais mostram-se raros ou ausentes (Sajo et al. 2004b). Em contrapartida, nectários septais são muito comuns em outras monocotiledôneas, mas aparentemente foram perdidos várias vezes durante o período evolutivo das mesmas (Smets et al. 2000, Rudall 2002, Rudall et al. 2003). Nesse contexto, os nectários fazem parte dos caracteres morfológicos que suportam a posição basal dessas famílias na ordem (Linder & Rudall 2005).

Segundo Schmid (1985) nectários septais labirínticos são mecanismos morfológicos, anatômicos e fisiológicos que provavelmente aumentam a produção de néctar através do aumento da área de superfície nectarífera por ondulações, e especialmente por convoluções (crescimento localizado) O autor ainda propõe que nectários infraloculares encontrados em Bromeliaceae hipóginas são aparentemente mais especializados do que os nectários interloculares de espécies epíginas.

Gineceu

O gineceu de *D. ibicuiensis* é diferenciado em três porções, estigma, estilete e ovário, as peças florais são inseridas abaixo do ovário, caracterizando-o como súpero (Fig. 1D). Os três carpelos encontram-se concrecidos entre si, formando três lóculos os quais abrigam os rudimentos seminiais inseridos no tecido placentário axial (Fig. 3A), compatível com o descrito para Bromeliáceas (Smith & Downs 1974; Sajo et al. 2004 a, b; Conceição et al. 2007; Fagundes & Mariath 2014). Segundo Igersheim et al. (2001), o número de rudimentos seminiais por lóculo pode variar de um a vários, sendo que em Bromeliaceae, mostra constante rudimentos por lóculo, e podem variar de 15-20, como descrito para *Ananas comosus* (Wee & Rao 1974).

As folhas carpelares apresentam epidermes uniestratificadas (Fig. 2B). A epiderme dorsal apresenta câmaras subestomáticas e suas células da epiderme dorsal, em corte transversal,

mostram-se alongadas radialmente, enquanto as células da epiderme ventral, são tangencialmente alongadas (Fig 2B). O mesofilo é pluriestratificado e parenquimatoso, apresentando grande quantidade de espaços intercelulares e idioblastos contendo ráfides (Fig. 1B). Essas características se mostram de acordo com *D. racinae* (Dorneles 2013) e *D. polyclada* (Martins 2016), outras espécies do gênero estudadas, o que gera a necessidade de mais dados acerca de outras espécies de *Dyckia*, afim de verificar a estabilidade e ou não dessas características no gênero.

Estigma e Estilete

O estigma é trifido do tipo espiral conduplicado, com os três carpelos não fusionados em suas margens (Fig. 3A-B). O mesofilo apresenta-se pluriestratificado, com células isodiamétricas na parte apical, embora gradualmente alonguem-se em direção ao estilete. As células da face epidérmica externa são vacuoladas e apresentam estrias em sua face periclinal externa, enquanto as células da epiderme interna são menores mais, vacuoladas e com citoplasma denso (Fig. 3B-C). As células da superfície estigmática são papiladas, vacuoladas e apresentam citoplasma denso (Fig. 3A-D). A morfologia das células epidérmicas e a presença de ráfides no estilete se mostra semelhante ao encontrado em *D. polyclada* (Martins 2016) e *D. racinae* Dorneles et al. (2014). A estrutura estigmática foi estudada extensivamente na família porém os estudos se detiveram apenas em aspectos morfológicos (Brown & Gilmartin, 1984, 1988; Varadarajan & Brown 1988; Heslop-Harrison & Shivana 1977; Tardivo & Rodrigues 1998; Vermeake et al. 2003), sendo proposta a classificação em cinco categorias conforme Brown & Gilmartin (1988).

Estigma do tipo espiral conduplicado é o mais comum em Bromeliaceae (Brown & Gilmartin 1984; Brown & Gilmartin 1988; Vosgueritchian & Buzato 2006; Dorneles et al. 2014; Fagundes & Mariath 2014). Brown & Gilmartin (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, de modo que, mesmo grãos de pólen atingindo o estigma em momentos diferentes, germinariam em sincronia quando esse se torna receptivo (Heslop-Harrison & Shivanna 1977).

Fagundes (2013) sugere que as características anatômicas do estigma também possam ser úteis na taxonomia da família, do mesmo modo que a morfologia do estigma, por mostrar ampla variação morfológica no grupo (Brown & Gilmartin, 1984; Brown & Gilmartin, 1989), sendo assim o estigma e seus tricomas se mostram estruturas menos variáveis na história evolutiva do grupo tendo grande valor em estudos comparativos para a família (Fagundes 2013).

Obturador funicular

O início da diferenciação do obturador é observado logo após a formação da célula arquesporrial do rudimento seminal, as células da placenta possuem características meristemáticas, enquanto as células de tecido fundamental apresentam vacúolos e núcleo conspícuo (Fig. 4B). A partir do estágio de célula mãe de ginósporo (CMG), as células placentárias tornam-se prismáticas, a parte distal das células torna-se convexas, observa-se o alongamento, algumas divisões e vacúolos e núcleo evidente (Fig. 4C). O obturador na maturidade apresenta células papilosas e citoplasma denso e vacuolado, revestindo toda a região placentária e as células do tecido fundamental são ovaladas e vacuoladas (Fig. 2E). O obturador funicular estaria diretamente ligado ao crescimento do tubo polínico na sua rota até o ginófito, podendo significar uma adaptação adicional de uma placenta secretora (Herrero 2000). Dos poucos estudos realizados sobre papel do obturador cabe ressaltar Tilton & Horner (1980), que classificam essa estrutura como um tipo de tecido de transmissão diferenciado, originado da região placentária, funicular ou por ambos, e que está presente nas margens carpelares

associado a micrópila dos rudimentos seminais. Como apontado por alguns autores (Maheshwari 1950; Tilton & Horner 1980; Tilton et al. 1984; Erbar 2003) o obturador atua no controle físico e químico da direção do crescimento do tubo polínico até a micrópila. Fagundes (2013) relatou a produção de secreção polissacarídica pelas células do obturador em *Billbergia nutans*, e também evidenciou a presença de parede celular labiríntica, caracterizando-as como células de transferência de composição pecto-celulósica, característica compartilhada com o tecido transmissor.

Em outros representantes de Bromeliaceae, Dorneles et al. (2014), Martins (2016), Fagundes & Mariath (2014) e Fagundes & Mariath (2010) abordaram, em seus estudos, a estrutura do obturador, sendo que os últimos autores relataram como em *Tillandsia aeranthos* e em *Vriesea carinata* que, ao longo do desenvolvimento de fruto, o obturador pode apresentar-se uni ou biestratificado com células muito alongadas. Ainda de acordo em espécies de Bromelioideae e Pitcairnioideae, o obturador é uniestratificado e com células alongadas com a face periclinal externa em forma de domo.

Ginosporogênese

O primórdio de rudimento seminal surge a partir do tecido placentário na região axial do ovário, onde são observáveis três camadas de células meristemáticas LI, LII, LIII (Fig. 4A). O primórdio do rudimento seminal é trizonado, a projeção do primórdio provem da expansão seguida de divisões da LIII (Fig. 4A). Esse padrão se mostra comum entre as angiospermas (Bouman 1984), e também para Bromeliaceae já estudadas incluindo (Conceição et al. 2007; Sartori 2008; Fagundes & Mariath 2014, Martins 2016). O padrão de desenvolvimento bizonado do primórdio de rudimento seminal também foi encontrado em espécies de Poales (Nakamura et al. 2009). Para Bouman (1984) essa é uma condição derivada dentro das angiospermas e dados sobre o desenvolvimento inicial do rudimento seminal são importantes,

pois a maioria dos estudos não abordam tais aspectos. Sartori (2008) considera que estudos acerca da fase inicial do desenvolvimento do rudimento seminal são importantes, pois geram uma fonte relevante de informações quando estabelecidas relações entre os táxons.

O processo de iniciação dos rudimentos seminais em *D. ibicuiensis* se dá pelo aumento de densidade citoplasmática na região placentária, seguido de crescimento radial, principalmente das células da camada subdérmica nos locais de origem (Fig. 4A). No primórdio, uma célula subdérmica apical destaca-se dentre as outras por apresentar citoplasma mais denso e um núcleo conspícuo (Fig. 4A). No decorrer do desenvolvimento, ocorre o alongamento do rudimento seminal e da inicial arquesporial, com o início da formação do tegumento interno, a partir da epiderme (Fig. 4B). Nesse estágio, o primórdio do rudimento seminal já iniciou o processo de curvatura. Outros estudos também descrevem a origem dérmica dos tegumentos no rudimento seminal em Bromeliaceae (Sajo et al. 2004a; Conceição et al. 2007; Sartori 2008; Spat 2012, Papini et al. 2011; Fagundes e Mariath 2014; Martins 2016).

A divisão periclinal de uma célula inicial subdérmica apical dá origem a célula parietal primária localizada logo abaixo da epiderme e a inicial arquesporial, caracterizando um rudimento crassinucelado (Fig. 4B). Ainda nessa fase observa-se a progressão da curvatura do rudimento. No decorrer do desenvolvimento, enquanto a CMG se alonga, na epiderme da face dorsal do rudimento, surge o tegumento externo, que se diferencia apenas esta face, resultando em um tegumento assimétrico. O rudimento seminal nesse estágio do desenvolvimento já apresenta curvatura anátropa (Fig. 4C). O apêndice calazal tem origem subdérmica, com início após a formação dos tegumentos, principalmente pelo alongamento das células subdérmicas (Fig. 4C).

Na fase de CMG, as células da região placentária apresentam características meristemáticas e observa-se a vacuolação e a expansão em células do apêndice calazal e funiculares (Fig. 4C). Nesta fase as células do apêndice calazal alongam-se perpendicularmente

à epiderme, por meio de vacuolação; no decorrer do desenvolvimento estas células se dividem e surgem espaços intercelulares formando o apêndice calazal, que na maturidade apresenta-se curto e curvado em direção a rafe (Fig. 2C). A origem subdérmica do apêndice calazal também foi observada em outras Bromeliaceae como *Pitcairnia encholirioides* (Mendes 2014), *Billbergia nutans* (Fagundes & Mariath 2014) e *D. polyclada* (Martins 2016), entretanto esses dados divergem dos obtidos por Sajo et al. (2004), que consideram o apêndice calazal originário das camadas dérmica e subdérmica para espécies de Bromeliaceae de diversas subfamílias, incluindo Bromelioideae e Pitcairnioideae. De acordo com Smith & Downs (1974), o apêndice calazal é um caráter que varia muito entre as espécies e dificilmente pode ser considerado um caráter distintivo de gênero corroborando, Fagundes & Mariath (2014) observaram em *B. nutans* uma variedade de formas e tamanhos do apêndice calazal, podendo até ser vestigial, curto ou curto e curvado em direção a anti-rafe, em *D. ibicuiensis* o apêndice calazal encontra-se sempre presente. Portanto, a origem e a construção do apêndice calazal merece investigação mais aprofundada na família, embora sua utilização na taxonomia do grupo deva ser tratada com cautela.

No decorrer do desenvolvimento, a CMG passa por uma primeira divisão meiótica gerando uma díade (Fig. D-E) e, posteriormente observa-se a formação de uma tríade como um padrão mais frequente para *D. ibicuiensis*, pois o esporo calazal divide-se anteriormente ao esporo micropilar. O ginósporo micropilar degenera antes de concluir a segunda divisão meiótica, formando uma tríade (Fig. 4G). Martins (2016) relatou a formação de tríades em *D. polyclada* com formação de apenas dois septos ou paredes transversais de calose, além de tétrede linear de ginósporo, com o esporo funcional localizado no pólo calazal. Em *D. ibicuiensis* não detecta-se, a calose em torno dos esporos, porém foi observada a presença de metabólito secundário nas paredes das células nucelares durante toda a meiose (Fig. 4I). Em Bromeliaceae não existem relatos da ausência de calose durante esporogênese. Rodkiewicz

(1970) descreveu a deposição de calose em várias espécies através dos testes de azul de anilina e Azul de resorcina, a ausência da mesma foi evidenciada somente em espécies de Liliaceae com desenvolvimento tetraspórico. Segundo Rodkiewicz (1970) e Bhandari (1984) a calose atuaria como uma barreira entre os ginósporos e as células do rudimento seminal, proporcionando maior autonomia no desenvolvimento das células haploides.

Espécies com padrão de desenvolvimento monospórico exibem paredes de calose em torno dos esporos (Rodkiewicz 1970). Para Papini et al. (2011) a parede de calose está fortemente relacionada com o mecanismo de morte celular programada dos ginósporos micropilares. Ünal et al. (2013) sugere que a formação de parede de calose desempenha um papel significativo no desenvolvimento do tipo de ginófito, onde a calose formaria um filtro molecular, diminuindo a permeabilidade da parede celular. Segundo os autores, o isolamento da CMG permite que as células sigam a um curso independente de diferenciação, acompanhado pela mudança da fase esporofítica até a expressão gênica para a fase gametofítica. A ausência de calose em *D. ibicuiensis* pode indicar a existência de outro processo ligado a determinação do esporo funcional visto que o padrão desenvolvimento segue monospórico (Fig. 4D-H), assim como nas demais Bromeliaceae (Papini et al. 2011; Spat 2012; Dorneles 2013; Fagundes & Mariath 2014; Martins 2016) sempre associado a presença de calose ou de outra substância, que desempenha papel similar ao da calose. Aparentemente a predominância da ocorrência de tríades à tétrades não estaria a presença de calose visto que em *D. polyclada* (Martins 2016) foi constatada calose circundando os esporos nas tríades.

O ginósporo funcional inicia o processo de diferenciação por meio de expansão celular e da presença de vacúolos contendo polissacarídeos, enquanto os demais ginósporo degeneram, gerando um gametófito uninucleado e de origem monospórica (Fig. 5A). O ginósporo funcional tem o seu volume expandido, o núcleo é central e os vacúolos formam-se nos polos micropilar e calazal (Fig. 4H). Ao final da esporogênese, a epiderme do rudimento seminal se apresenta

unisseriada, com células vacuoladas e núcleo evidente. O tegumento interno apresenta padrão de crescimento diferente entre suas faces (Fig. 4D-I), chegando ao final da esporogênese, com a face dorsal diferenciando-se para formar o canal micropilar enquanto a face ventral exibe o mesmo crescimento do tegumento externo alcançando a porção micropilar do nucelo (Fig. 4H).

Segundo Endress (2011), em muitos casos o feixe vascular chega na calaza e estendem-se para o tegumento externo, tegumento interno ou ambos. Em alguns casos, a ramificação começa na rafe, e tais ramos vasculares atingem o tegumento externo, passando pela calaza (Endress 2011). Rudimentos seminiais que apresentam tegumentos vascularizados são geralmente volumosos e desenvolvem grandes sementes (Corner 1976; Bouman 1984). Para Bromeliaceae não se tem dados acerca da vascularização dos tegumentos, a presença de tecido pró-vascular no tegumento externo de *D. ibicuiensis* (Fig. 2D,F) é muito relevante visto que seu rudimento seminal é de volume muito inferior ao das espécies que comumente exibem essa característica. Os dados aqui apresentados acerca da vascularização do tegumento externo são inéditos para o gênero.

Ao final da esporogênese as células nucelares estão dispostas em quatro camadas celulares na região lateral ao ginósporo e encontram-se íntegras (Fig. 4H). Uma característica peculiar nesse tecido é a presença de metabolitos secundários indicada pelo Azul de toluidina (Fig. 4D-H), durante toda a meiose e gametogênese. Não foi possível diferenciar a hipóstase durante o desenvolvimento, uma vez que algumas características celulares próprias, à hipóstase, também ocorriam nas demais células do esporângio, como o acúmulo, de metabólitos secundários (Fig. 4D-H; 5A-H). Segundo Paoli (2006) a hipóstase pode apresentar células com citoplasma denso com compostos fenólicos, paredes compostas por cutina, suberina, lignina ou calose. Bouman (1984) infere à hipóstase série de funções, tais como, atuar como uma barreira de tecido na contenção da expansão do gametófito, pode conectar o fornecimento vascular com o gametófito, assim facilitando o transporte do material nutritivo, podendo também ser

responsável pela produção de enzimas ou hormônios, desempenhar papel no balanço hídrico em sementes dormentes. A deposição de metabólitos secundário nas paredes das células nucleares em *D. ibicuiensis* pode indicar que funções atribuídas a hipóstase estejam compartilhadas pelas mesmas, evidenciando uma variabilidade na dinâmica de metabólicos do esporângio dessa espécie.

Ginogametogênese

A formação de vacúolos e a expansão celular, bem como o início do estabelecimento do canal micropilar pelo tegumento interno com células papilosas marcam a diferenciação do ginósporo funcional em ginófito uninucleado dando início a gametogênese (Fig. 5A). Com o avançar do desenvolvimento a mitose neste gametófito resulta em um ginófito binucleado, onde os dois núcleos se posicionam em regiões opostas da célula, com a presença de um vacúolo que ocupa a região central (Fig. 5B). Um segundo ciclo mitótico ocorre, originando um ginófito tetranucleado com dois núcleos em cada pólo da célula, nesta fase, também há um vacúolo central, com acúmulo de substâncias pécticas (Fig. 5C). Um terceiro ciclo mitótico ocorre, formando quatro núcleos em cada pólo, logo após, ocorre o processo de celularização de forma simultânea em cada pólo. Os núcleos calazais, após celularização, estabelecem as antípodas, voltadas para o pólo calazal (Fig. 5D). Os núcleos polares calazal e micropilar migram para a região mediana da célula central para formar, após fusão, o núcleo da célula média. Após fusão, este núcleo migra em direção ao aparelho oosférico (Fig. 5D,F). Em *Ananas comosus* (Wee & Rao 1974; Rao & Wee 1979), *Vriesea carinata* (Sartori 2008) e *Dyckia polyclada* (Martins 2016) esta fusão dos núcleos polares é similar em relação ao encontrado em *D. ibicuiensis*.

Após a celularização, o gametófito feminino é constituído por oito núcleos e sete células, apresentando o aparelho oosférico formado por duas sinérgides e pela oosfera, dois núcleos polares e três antípodas (Fig. 5D-H). O ginófito funcional, de origem monospórica, estruturado

em sua forma final com sete células e oito núcleos é classificado como sendo do tipo *Polygonum*.

No início da gametogênese, o tegumento interno cresce em direção a placenta formando o canal micropilar. A porção do tegumento que estrutura o canal possui nível de estratificação de quatro a cinco células enquanto a porção que recobre o nucelo apresenta apenas duas camadas de células, no estágio de ginófito funcional. O tegumento interno e externo apresentam o mesmo comprimento na gametogênese (Fig. 2E-D). O tegumento interno apresenta duas camadas celulares e o tegumento externo é pluriestratificado com quatro a cinco camadas celulares na porção mediana lateral ao nucelo (Fig. 2F, 4E). Rudimentos seminiais bitegmentados e crassinucelados foram observados em outras Bromeliaceae como, *Lindmania penduliflora* (Lakshmanan 1967), *Ananas comosus* (Wee & Rao 1974; Rao & Wee 1979), *Dyckia pseudococcineae* (Conceição et al. 2007) e *Billbergia nutans* (Fagundes & Mariath 2014), sendo a de maior predominância em angiospermas (Davis 1966; Bouman 1984; Johri et al. 1992; Endress 2011). A espessura do tegumento interno em Bromeliaceae se mantém constante, com duas camadas celulares. Em relação ao tegumento externo, o número de camadas celulares é o mesmo descrito para *Dyckia racinae* (Martins 2016), com 4-5 camadas celulares, mas difere de outras espécies da família. Foram registradas três camadas celulares em *Vriesea carinata* (Sartori 2008), quatro camadas em *Ananas comosus* (Rao & Wee 1979), três a quatro em *Tillandsia aeranthos* (Spat 2012), *Billbergia nutans* (Fagundes & Mariath 2014) três a seis camadas em *Catopsis paniculata* (Palací et al. 2004) e duas camadas em *Pitcairnia encholirioides* (Mendes 2012), *Quesnelia edmundoi*, *Orthophytum vagans*, *Aechmea conglomerata*, *Puya floccosa*, *Pitcairnia paniculata*, *Brocchinia reducta* e *Tillandsia dura* (Sajo et al. 2004a). Segundo Fagundes & Mariath (2014) esse caráter apresenta variabilidade em nível de família e subfamília para Bromeliaceae e pode ser útil para taxonomia do grupo. Kuhn et al. (2016), em seu estudo com 83 espécies pertencentes a sete gêneros de

Tillandsioideae, relatou que espessura do tegumento externo em três camadas celulares se mostra uma característica conservada, mas em alguns casos pode variar entre os gêneros, como em *Catopsis* cuja espessura do tegumento varia de quatro a seis camadas.

A micrópila é comumente formada pelo tegumento interno (Endress 2011). Em *Dyckia ibicuiensis* o canal micropilar é do tipo endostômico ou seja, formada apenas pelo tegumento interno (Fig. 2E). Segundo Endress (2011) a preponderância de micrópilas com estreitos canais no momento da fecundação indica que esta é uma característica importante para o sucesso da mesma. O tegumento interno é formado por duas camadas de células no terço proximal, três camadas no terço médio e até cinco camadas no terço distal que define a micrópila (Fig. 2E-F).

Ao longo da gametogênese, células do nucelo localizadas em torno do gametófito iniciam um processo de degeneração, atingindo o maior grau após a formação do ginófito funcional (Fig. 5B-H). A mudança mais marcante ocorre na região micropilar a qual, no início da gametogênese apresenta cerca de três camadas, passa a ter apenas uma camada celular (Fig. 5H). A degeneração destas células nucleares também foi observada por Brighina et al. (2006), Spat (2012), Fagundes & Mariath (2014) e Martins (2016), onde persistiu o padrão de degeneração ao longo da gametogênese.

O aparelho oosférico é formado pela oosfera e por duas sinérgides, dispostas lado a lado em posição ventral (Fig. 5D,F), com aparelho fibrilar na porção micropilar de natureza péctica (Fig. 5I). Em *D. ibicuiensis*, o aparelho fibrilar possui grande volume com cerca de um terço do tamanho das sinérgides enquanto em *D. polyclada* (Martins 2016) essa estrutura atinge metade do volume das sinérgides, segundo Willense & Went (1984) e Ünal et al. (2013) o tubo polínico penetra na sinérgide através do aparelho fibrilar e sua principal função seria a de guiar o crescimento do tubo polínico entre as sinérgides. A oosfera possui núcleo voltado para a região calazal do gametófito e um vacúolo voltado para região micropilar do gametófito, padrão que difere de outras espécies da família já estudada, como *D. polyclada* (Martins 2016) e

Bilbergia nutans (Fagundes & Mariath 2014), nas quais a oosfera encontra-se lateralizada em relação as sinérgides. Em *D. ibicuiensis* após o aparelho oosférico estar totalmente organizado, as células alongam-se e ocupam grande parte do pólo micropilar no gametófito. Este padrão está de acordo com o observado nas angiospermas (Batygina 2002). O ginófito possui formato piriforme, sendo a região calazal, onde ficam as antípodas, relativamente estreita e afunilada e a região micropilar mais ovalada (Fig. 5D-H). Essa constrição na região calazal é uma característica estável na família, pois foi observado em espécies de *Ananas*, *Tillandsia* e *Bilbergia*, (Fagundes 2013) como também em *D. polyclada* (Martins 2016).

Conclusões

Os resultados estruturais e anatômicos obtidos para o rudimento seminal demonstraram que *Dyckia ibicuiensis* apresenta características comuns com as espécies de *Dyckia*, como também para as demais Bromeliaceae, já estudadas, com caracteres poucos explorados dentro da família e alguns inéditos.

Neste estudo, foi descrito pela primeira vez a vascularização do tegumento interno para uma Bromeliaceae, um aspecto que deve ser ampliado e que traz perspectivas de estudos nas demais espécies da subfamília e família.

Estudos acerca da dinâmica de metabólitos no esporângio e sobre aspectos fisiológicos e genéticos, envolvendo a divisão dos esporos, determinação do esporo funcional, no rudimento podem também gerar novas compreensões de processos fisiológicos, que apresentam peculiaridades importantes, como apresentado no presente trabalho.

Cabe salientar que os resultados obtidos para *D. ibicuiensis* são eficientes ferramentas com potencial para serem utilizadas nas determinações taxonômicas, na compreensão das relações filogenéticas dentro da família. São importantes para melhor compreensão do funcionamento do seu processo reprodutivo, auxiliando na conservação da mesma, visto que a

espécie encontra-se no status de criticamente ameaçada (CR), além de ser endêmica da região central do Rio Grande do Sul.

Referências Bibliográficas

- Bhandari NN. 1984. The microsporangium. In: Johri BM (Ed.). Embryology of angiosperms. Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag. p 53-121.
- Billings FHA. 1904. Study of *Tillandsia usneoides*. Botanical Gazette 38(2): 99-121.
- Bouman F. 1984. The ovule. In: Johri BM. (Ed.). Embryology of the Angiosperms. Berlin: Springer-Verlag. p.123-157.
- Brown GK, Gilmartin AJ. 1984. Stigma structure and variation in Bromeliaceae – neglected taxonomic characters. Brittonia, 36: 364-374.
- Brown, GK, Gilmartin, A.J. 1988. Comparative ontogeny of Bromeliaceae stigmas. In P. Leins, S.C. Tucker, P.K. Endress (eds.). Aspects of floral development. Berlin, Stuttgart. p. 191-204.
- Brown GK, Gilmartin AJ. 1989. Chromosome numbers in Bromeliaceae. American Journal of Botany, 76: 657– 665.
- Carvalho JDT, Oliveira JMS, Freitas CC, Martins MS. 2016. Stamen morphoanatomy of *Dyckia* Schult.f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) species: new data for taxonomic use. Acta Botanica Brasílica 30(3): 389-400.
- Conceição SP, De Toni KLG, Costa CG. 2007. Particularidades do nucelo de *Dyckia pseudococcinea* L.B. Smith (Bromeliaceae) Revista Brasileira de Biociências 1: 846-848.
- Corner EJH. 1976. The seeds of dicotyledons, 1, 2. Cambridge: Cambridge University Press.
- 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): 265-277.

Fagundes NF. 2013. Desenvolvimento Estrutural E Dinâmica De Constituintes Químicos No Gineceu De *Billbergia nutans* H. Wendl. Ex Regel (Bromelioideae- Bromeliaceae). Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Fagundes NF, Mariath JEA. 2010. A. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. *Acta Botanica Brasilica* 24 (3): 765-779.

Fagundes NF, Mariath JEA. 2014. Ovule ontogeny in *Bilbergia nuttans* in the evolutionary context of Bromeliaceae (Poales). *Plant Systematic Evolution*, 300: 1323-1336.

Forzza RC, Costa A, Siqueira Filho JA, et al. 2015. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB34334>>. 10 Oct. 2015.

Freudenstein JV, Harris EM, Rasmussen FN. 2002. The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the vandoid complex. *American Journal of Botany* 89(11): 1747–1755.

Gabriel BL. 1982. *Biological Electron Microscopy*. New York, Van Nostrand Reinhold Company.

Gerrits 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.

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/](http://encyclopedia.florapix.nl/). University Botanic Gardens, Utrecht. Acessado em: 17 de janeiro de 2017.

Herrero M, Hormaza JI. 1996. Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction* 9: 343-347.

Herrero M. 2000. Changes in the Ovary Related to Pollen Tube Guidance. *Annals of Botany* 85 (Supplement A): 79-85.

Heslop-Harrison J, Shivanna KR. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. *Annals of Botany* 41: 1233-1258.

Hughes J, McCully M. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology* 50(5): 319-329.

- Jacques-Félix H. 2000. The Discovery of a Bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. *Selbyana* 21(2): 118–124.
- Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. New York, macgraw-Hill.
- Johri BM, Ambegaokar, KB, Srivastava PS. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms. Springer, Berlin.
- Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava OS. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms. Berlin, Springer.
- 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.
- Kuhn SA, Nogueira FM, Fagundes NF, Mariath JEA. 2016. Morphoanatomy of the ovary and ovule in Bromeliaceae subfamily Tillandsioideae and its systematic relevance. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 343–361.
- Lakshmanan KK. 1967. Embryological studies in the Bromeliaceae. I. *Lindmania penduliflora* (C. H. Wright) Stapf. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* 65: 49-55.
- Linder HP, Rudall PJ. 2005. Evolutionary history of Poales. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 107-124.
- Martin FV. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technolgy* 34: 125-128.
- Maheshwari P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. Mcgraw-Hill Publishing Company Ltd., New Delhi.
- Martins MS. 2016. Desenvolvimento embriológico em *Dyckia polyclada* L.B. Sm. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae). 98 páginas. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Medowell EM, Trump BF. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100: 405-414.
- 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.
- 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.

- Paoli AAS. 2006. Semente. In Anatomia do fruto e da semente (LA Souza, org). UEPG, Ponta Grossa. p. 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.
- 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 PJ. 2002. Homologies of inferior ovaries and septal nectaries in monocotyledons. International Journal Plant Science 163(2):261-276.
- 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.
- Sartori, J. S. 2008. Desenvolvimento Floral em *Vriesea carinata* Wawra (Tillandsioideae – Bromeliaceae). Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica – UFRGS. Porto Alegre, RS.
- Schmid, R. 1985. Functional interpretation of the morphology and anatomy of septal nectaries. Acta Botanica Neerlandica 34: 125-128.
- Sidman RL, Mottla PA, Feder N. 1961. Improved polyester wax embedding for histology. Stain Technology 36: 279-284.
- Smith LB, Downs RJ. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Flora Neotrópica Monographs 4: 1-658, 1974.
- 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.
- Tilton VR, Horner 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.

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 seeds development in pineapple. Current Science 43(6): 171-173.

Willense MTM & Van Went JL. 1984. The female gametophyte. In: Johri BM (Ed.). Embryology of the Angiosperms. Berlin: Springer-Verlag 159-196.

Figura 1. Aspectos gerais de *Dyckia ibicuiensis* e nectário. A: Indivíduo em habitat natural; B-D: Flor evidenciando os verticilos; E: Nectário septal infralocular e labiríntico; F: Detalhe das células do nectário com uma única camada celular. B: bráctea. S: sépala. P: pétala. E: Estames e. Estg: estigma. Est: estilete. Ov: ovário. Ne: nectário. Barras: A: 30cm; B, C: 2,5cm; D: 4mm; E: 200 μ m; F: 50 μ m.

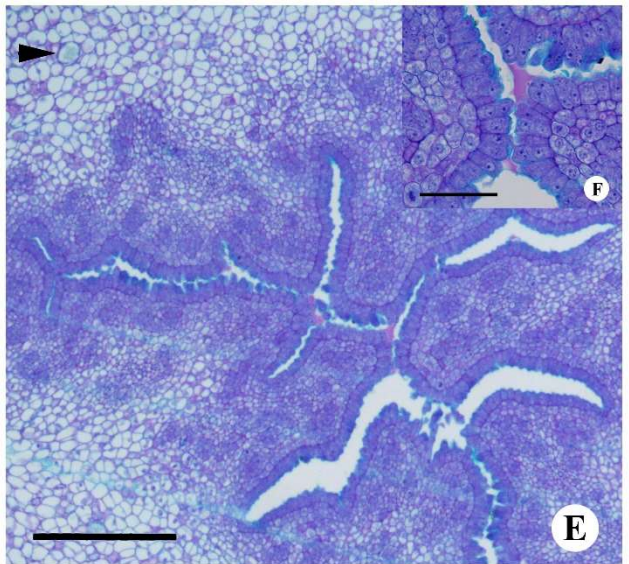
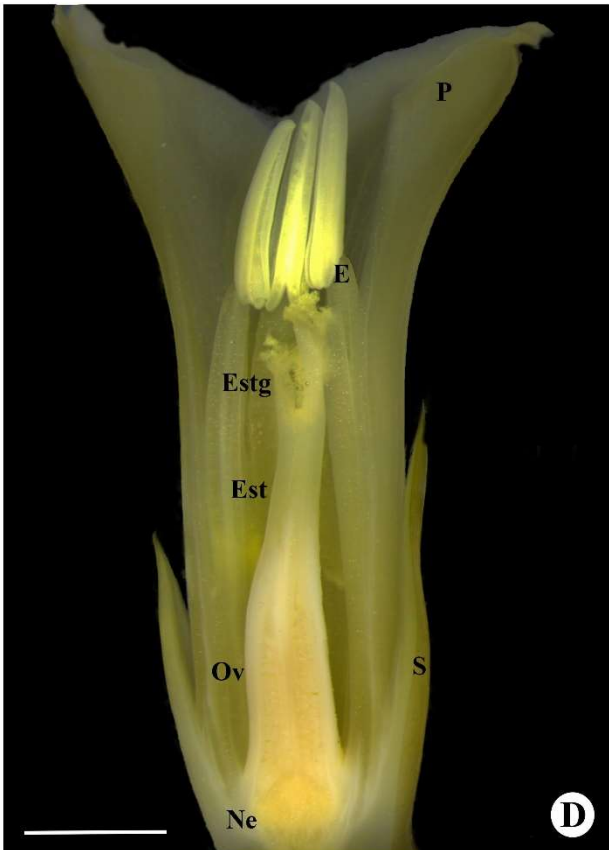
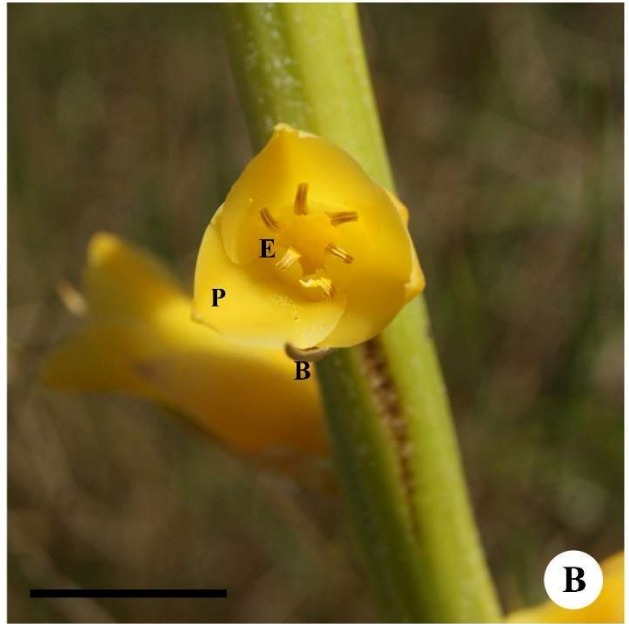


Figura 2. Morfologia do gineceu de *D. ibicuiensis*, obturador e vascularização do tegumento. A: Ovário sincárpico, tricarpelar, trilocular e plurispérmico. B: Detalhe da parede ovariana, evidenciando a epiderme dorsal estomatífera, epiderme ventral e mesofilo com idioblastos e espaços intercelulares. C: aspecto geral do rudimento seminal. D, F feixe vascular partindo da placenta até a calaza e ramificando para o tegumento externo. E: Porção terminal do canal micropilar, obturador funicular revestindo toda a região placentária exibindo células vacuolada e alongadas perpendicularmente ao longo de desenvolvimento. epi: epiderme ventral, epe: epiderme dorsal, esp: espaços intercelulares no mesofilo, fv: feixe vascular, rfv: progressão do feixe vascular para o tegumento externo. obt: obturador, te: tegumento externo, ti: tegumento interno. cabeça de seta preta: idioblastos. Cabeça de seta branca: estômato, asterisco: apêndice calazal. Barras: A: 750 μ m; B, E, F: 50 μ m; C: 20 μ m, D: 100 μ m;.

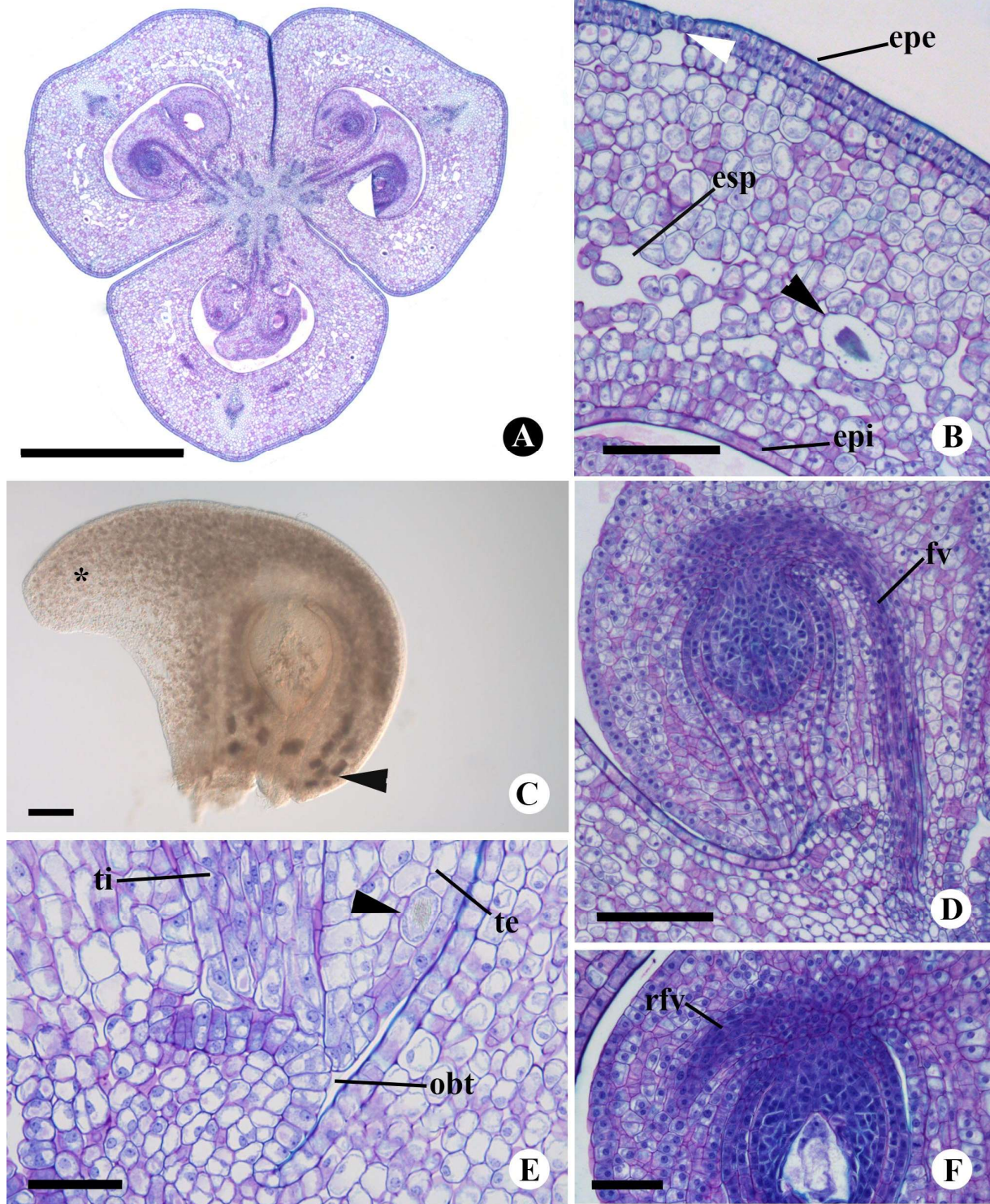


Figura 3. Morfoanatomia do estigma e estilete de *D. ibicuiensis*. A: estigma do tipo espiral conduplicado, B: corte longitudinal do estigma e estilete. C: detalhe do estigma mostrando os três carpelos não fusionados em suas margens. d: Secção transversal do estigma - detalhe das células das epidermes e do feixe vascular. E: células papiladas do estigma, com vacúolos com substâncias de natureza polissacarídica em seu interior. Estg: estigma. Est: estilete. FV: feixe vascular. Epe: epiderme externa. Epi: epiderme interna; cabeça de seta: estrias; seta: idioblasto; asterisco: vacúolo. Barras: A: 2mm; B: 500 μ m; C, D: 20 μ m.

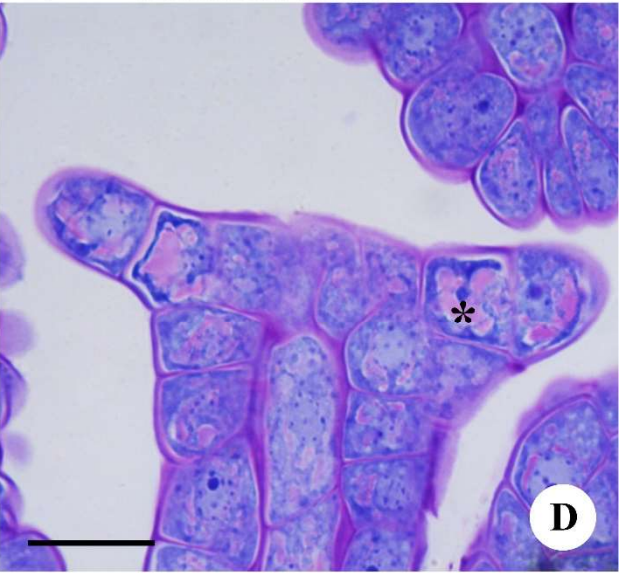
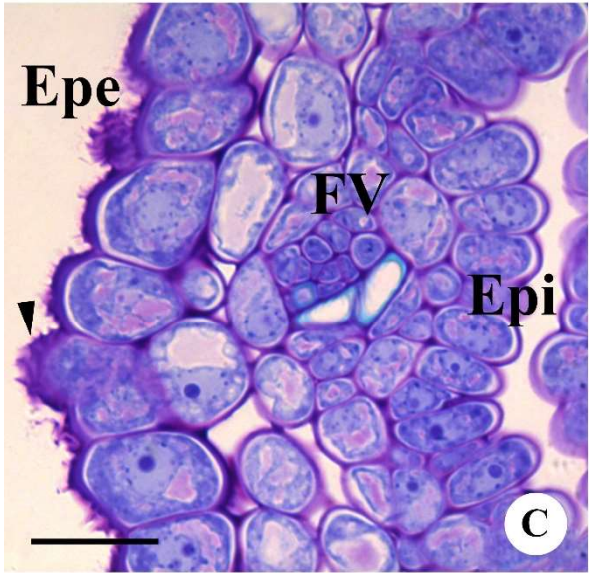
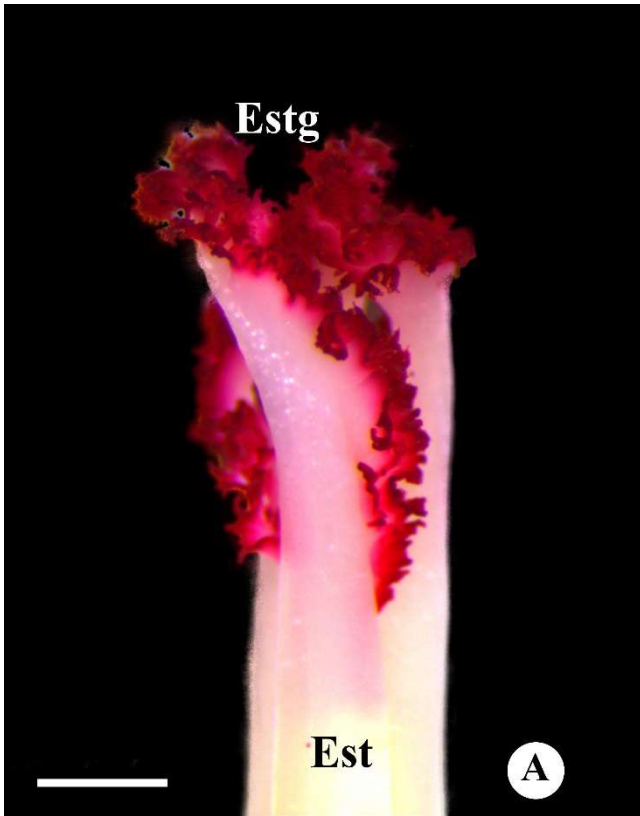


Figura 4. Formação inicial do rudimento e esporogênese em *Dyckia ibicuiensis*. A- Primórdios trizonados dos rudimentos seminais. B: Células parietais. C- Origem dérmica do tegumento externo. D: célula mãe de ginósporo (CMG), organizando-se para o primeiro ciclo meiótico. E: díades. F: tríades. G: início da degeneração dos ginósporos ainda em tríade. H: Ginósporo funcional calazal expandindo enquanto os demais degeneram. I: esporângio submetido ao Calcofluor White indicando a ausência de parede celulósicas entre os ginósporos. cmg: célula mãe de ginósporo, pe: derivadas parietais ti: tegumento interno. te: tegumento externo. gf: ginósporo funcional. gd: ginósporos degenerativos. L1, L2, L3: camadas meristemáticas. Cabeça de seta branca: acúmulo de metabólitos secundários no tecido nucelar. Barras: A: 20µm. B-I: 50µm.

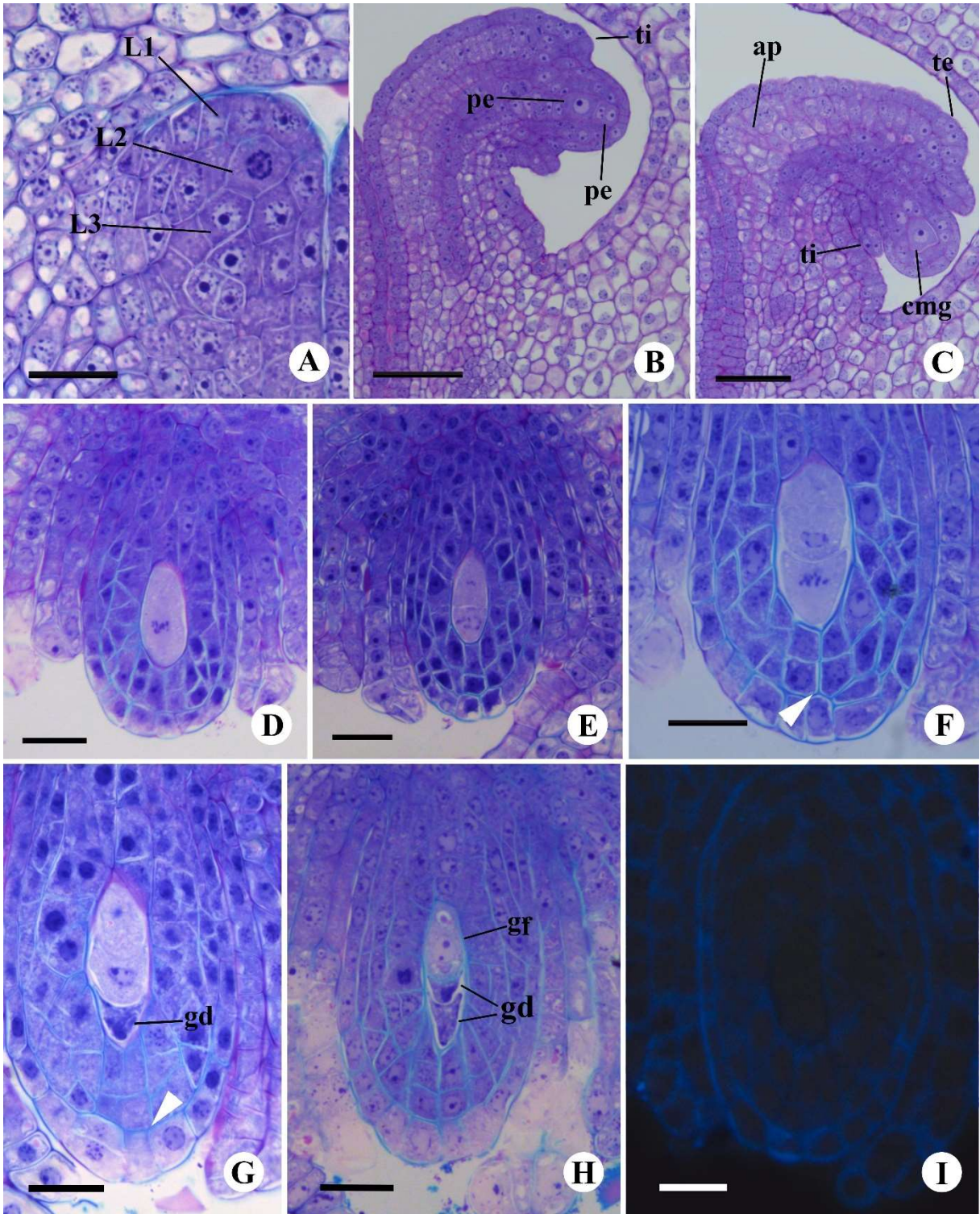
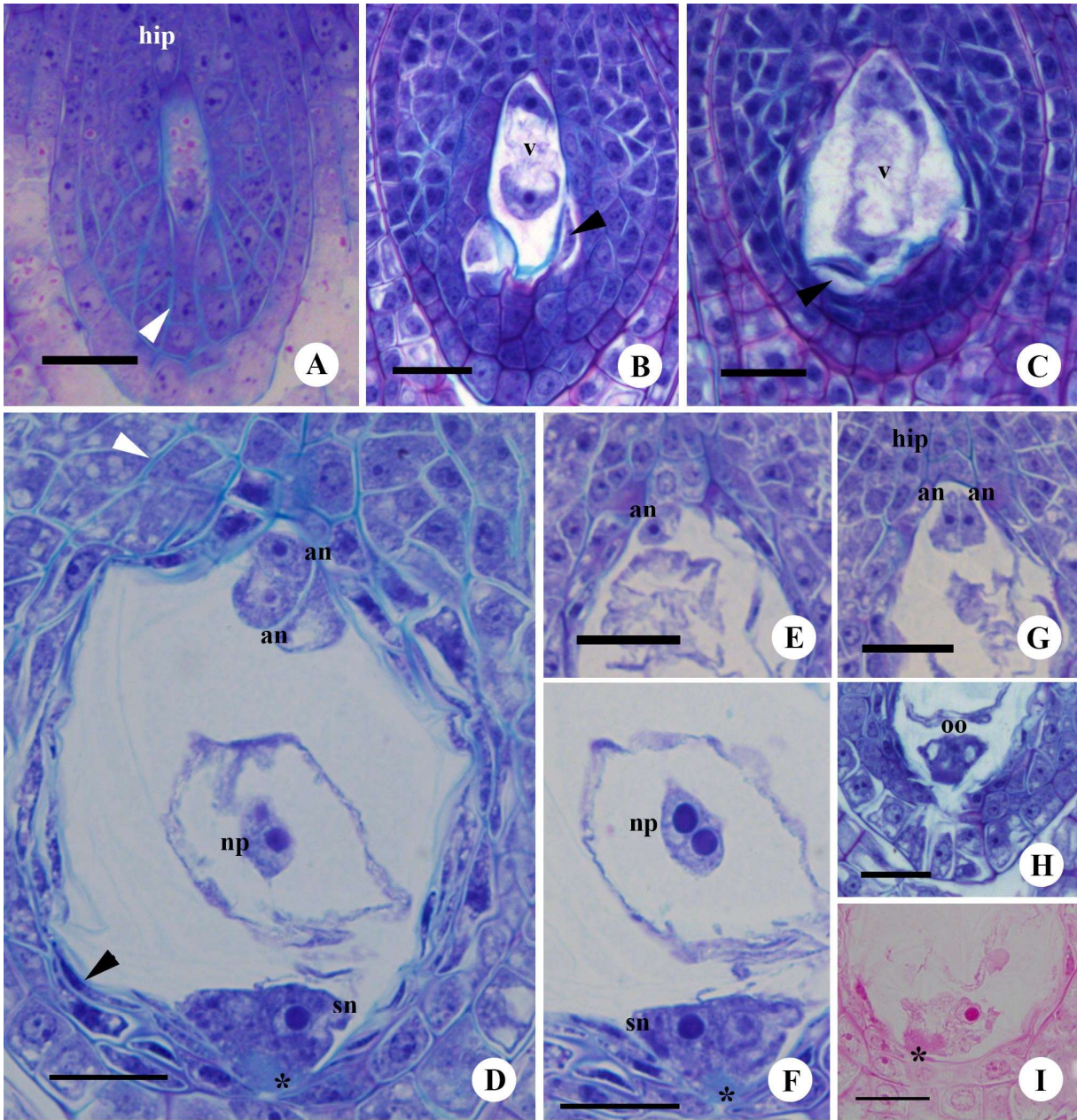


Figura 5. Aspectos da Gametogênese em *Dyckia ibicuiensis*. A: início da diferenciação do ginófito. B: gametófitos binucleados. C: gametófito tetranucleado. D: organização geral do gametófito, com as antípodas no pólo calazal, os núcleos polares fusionando-se próximo as sinérgides com aparelho fibrilar localizadas no pólo micropilar. E, G: disposição das antípodas no gametófito. F: núcleos polares fusionados. H: oosfera vacuolada voltada para o pólo calazal. I: coloração com vermelho de rutênio evidenciando natureza péctica do aparelho fibrilar. sn: sinérgide. oo: oosfera. an: antípodas. np: núcleo polar. v: vacúolos com polissacarídeos. Cabeça de seta preta: células nucelares, entorno do gametófito, degeneradas. Cabeça de seta branca: metabolitos secundários no tecido nucelar região e na da hipóstase. Asterisco: aparelho fibrilar. Barras: A: 50 μm . B,C,E,G,H: 25 μm . D,F,I: 20 μm .



3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários aspectos abordados neste estudo merecem destaque, dentre eles podemos citar:

- O androceu de *D. polyclada*, apresentou semelhanças com as demais espécies do pouco estudado "complexo maritima", como, estames ligeiramente conados ou livres, muitas vezes excertos, com um tubo comum curto com as pétalas, filetes antessépalos e antepétalos semelhantes e finos, anteras pequenas não distribuídas radialmente em torno do gineceu, diferentemente do observado em *D. racinae* e *D. ibicuiensis*, espécies relacionadas de *Dyckia* de um segundo grupo aparentemente heterogêneo.
- As características morfoanatômicas do androceu, tais como o espessamento das células do conectivo, a curvatura das anteras, os tipos de espessamentos fibrosos encontrados no endotécio, as particularidades de cada verticilo de estames e a vascularização dos mesmos, mostraram um grande potencial taxonômico tanto para revisões de espécies já descritas quanto para caracterização de novas espécies de *Dyckia*.
- A formação dos rudimentos seminiais, o ginófito do Tipo *Polygonum* com desenvolvimento monospórico, formação dos tegumentos e seu desenvolvimento, a descrição do apêndice calazal e obturador, descrição do estigma, estilete e nectários florais foram descritos pela primeira para *D. ibicuiensis*, e também dados inéditos para a família tais como, a vascularização do tegumento interno, a presença de metabólitos secundário no nucelo e a ausência de calose.

Com relação aos aspectos morfoanatômicos e embriológicos abordados no neste trabalho, foram descritos pela primeira vez para *Dyckia ibicuiensis* Strehl Mesmo sendo um algumas características já trabalhadas dentro de Bromeliaceae, a descrição detalhada dos processos trouxe algumas informações novas, ressaltando a importância de mais estudos e da utilização das mais variadas técnicas para a formulação de conclusões, para o entendimento do processo reprodutivo da espécie, podendo ser utilizados como parâmetros em análises

taxonômicas, assim como, em análises filogenéticas, auxiliando no processo de conservação da espécie e da biodiversidade da família.