

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

**DESENVOLVIMENTO INICIAL, CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL DA FLOR, ANDROSPOROGÊNESE E
ANDROGAMETOGÊNESE EM *Dyckia racinae*
L.B.Sm.(PITCAIRNIOIDEAE-BROMELIACEAE)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariane Paludette Dorneles

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**DESENVOLVIMENTO INICIAL, CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL DA FLOR, ANDROSPOROGENESE E
ANDROGAMETOGÊNESE EM *Dyckia racinae*
L.B.Sm.(PITCAIRNIOIDEAE-BROMELIACEAE)**

Mariane Paludette Dorneles

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

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo Santos de Oliveira

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

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

DORNELES, MARIANE PALUDETTE
DESENVOLVIMENTO INICIAL, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA
FLOR, ANDROSPOROGÊNESE E ANDROGAMETOGÊNESE EM *Dyckia*
racinae L.B.Sm. (PITCAIRNIOIDEAE-BROMELIACEAE) / MARIANE
PALUDETTE DORNELES.-2013.
135 p.; 30cm

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, 2013

1. DESENVOLVIMENTO INICIAL DA FLOR 2. CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL DA FLOR 3. ANDROSPOROGÊNESE 4.
ANDROGAMETOGÊNESE 5. BROMELIACEAE I. OLIVEIRA, JOÃO
MARCELO SANTOS DE II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO INICIAL, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
DA FLOR, ANDROSPOROGÊNESE E ANDROGAMETOGÊNESE EM
Dyckia racinae L.B.Sm.(PITCAIRNIOIDEAE-BROMELIACEAE)**

elaborada por
Mariane Paludette Dorneles

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath (UFRGS)

Prof. Dr.^a Thais Scotti do Canto Dorow (UFSM)

Santa Maria, 15 de Março de 2013.

*Dedico a minha amada amiga
Leticia Ferraz da Cruz e a todos
os outros jovens que partiram
tão cedo deixando a cidade de
Santa Maria arrasada.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado acreditando e apoiando todos meus sonhos, aceitando as ausências, dando força nos momentos difíceis e comemorando as conquistas. Junto com minhas irmãs, meu avô e minha madrinha Marlei formam a base que estrutura minha vida, amo vocês.

Aos demais familiares que participam da minha vida, que torcem pelo meu sucesso, meu muito obrigada por todo carinho e pela ajuda que sempre me ofertaram.

As minhas amigas de longa data Bibiana Cadó, Débora Amarante, Luciane Mutchal, Natália Cadó e Taíse Ribeiro, pessoas maravilhosas com as quais eu tenho a sorte de contar, mesmo que cada uma tenha seguido atrás de seus sonhos nossa amizade continua a mesma. As amigas Jaqueline Durigon e Priscila Crespam que me ensinaram muita botânica e me deram um apoio enorme em Porto Alegre, assim como os demais amigos que fiz lá, vocês estão sempre em meu coração.

Aos meus amigos de Dois Irmãos que sempre me apoiaram muito mesmo sabendo que eu teria que ir embora para realizar meu trabalho, em especial a Eledir Bonato, Fernanda Ponne, Patrícia Crestani e Raíssa Ponne pessoas maravilhosas que cuidaram de mim, me ajudaram sempre e são minha família do Portal da Serra.

As pessoas com as quais dividi apartamento nesses dois anos Patrícia Dorneles, Patric Flores e Letícia da Cruz. Foram dois anos de alegria, companheirismo, parceria, bom humor mesmo nos momentos difíceis, construímos uma família, acumulamos milhares de histórias. A tragédia que aconteceu na Kiss acabou levando a Letícia assim como parte de nosso coração, mas não as lembranças dos momentos felizes que passamos juntos.

Ao meu orientado por ter acreditado em mim e me aceitado como aluna, por toda a dedicação, paciência e parceria nestes dois anos. Aos meus amigos do LABOTE, onde passei uma grande parte destes dois anos na busca de meus resultados, por toda a ajuda, paciência e companheirismo. Fui muito bem recebida por todos, e a amizade de vocês fez toda a diferença, vou sentir muita saudade dessa convivência diária. Em especial: Amanda Gindri, César Carvalho, Cristiele Spat, Jaqueline Sartori, Marisa Binotto, Missiani de Mello, Merielem Martins e Patrícia da Costa.

Aos amigos que fiz na UFSM, colegas do mestrado, professores, companheiros de laboratório. A professora Thais Dorow pelo empenho na identificação da espécie e pelo empréstimo do Microscópio estereoscópico Leica M80.

A CAPES pela bolsa de Mestrado. Ao projeto nº 10/0498-0 Edital FAPERGS/CNPq nº 008/2009 Programa de Apoio à Núcleos de Excelência - PRONEX, coordenado pelo Prof. Dr. Jorge Mariath - UFRGS por todo apoio técnico e pelo financiamento de procedimentos que enriqueceram os resultados do trabalho.

A todos que passaram pela minha vida e colaboraram de alguma maneira para a construção deste trabalho, seus ensinamentos e exemplos ajudaram a formar a pessoa que sou hoje.

Meu muito obrigada.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

LISTA DE IMAGENS

CAPÍTULO II	25
Figura 1.1 - Organogênese floral em <i>Dyckia racinae</i> (Bromeliaceae).	35
Figura 1.2 - <i>Dyckia racinae</i> (Bromeliaceae).	37
Figura 1.3 - Morfologia floral de <i>Dyckia racinae</i> (Bromeliaceae).	39
Figura 1.4 - Estrutura do nectário de <i>Dyckia racinae</i> (Bromeliaceae).	41
CAPÍTULO III	47
Figura 2.1 - Morro em São Pedro do Sul/RS.	49
Figura 2.2 - Formação dos esporângios em <i>Dyckia racinae</i> (Bromeliaceae).	66
Figura 2.3 - Formação dos estratos parietais em <i>Dyckia racinae</i>	68
Figura 2.4 - Diferenciação dos estratos parietais em <i>Dyckia racinae</i>	70
Figura 2.5 - Mobilização dos açúcares acumulados no vacúolo do tapete durante o início da deposição da calose em <i>Dyckia racinae</i>	72
Figura 2.6 - Estrutura da epiderme em <i>Dyckia racinae</i>	74
Figura 2.7 - Estrutura do estômio, endotécio e tapete em <i>Dyckia racinae</i>	76
Figura 2.8 - Ráfides da região do conectivo e do septo em <i>Dyckia racinae</i>	78
Figura 2.9 - Meiose, dissolução da calose e primeira divisão mitótica em <i>Dyckia racinae</i>	80
Figura 2.10 - Processo de maturação do andrófito em <i>Dyckia racinae</i>	82
Figura 2.11 - Testes histoquímicos em andrófito maduro.	84
Figura 2.12 - Composição química da esporoderme em andrófito maduro.	86
Figura 2.13 - Composição química da esporoderme em andrófito maduro.	88
Figura 2.14 - Morfologia da antera e do andrófito maduro em <i>Dyckia racinae</i>	90
CAPÍTULO IV	98
Figura 2.15 - Aspecto geral de <i>Dyckia racinae</i> a campo e desenvolvimento do grão dimórfico.	112
Figura 2.16 - Divisões atípicas encontradas nos andrófitos entre as células generativa e vegetativa.	114
Figura 2.17 - Andrófitos atípicos em diversas fases de desenvolvimento	116
CAPÍTULO V	123
Figura do artigo dinâmica do amido	132

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO INICIAL, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA FLOR, ANDROSPOROGÊNESE E ANDROGAMETOGÊNESE EM *Dyckia racinae* L.B.Sm.(PITCAIRNIOIDEAE-BROMELIACEAE)

Autora: Mariane Paludette Dorneles
Orientador: João Marcelo Santos de Oliveira
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de Março de 2013

Importante família entre as monocotiledôneas neotropicais, as bromeliáceas ampliam a riqueza e a diversidade dos ecossistemas de que fazem parte. Assim, reunir conhecimentos na busca de projetos realmente efetivos para conservação da biodiversidade se torna essencial. Para tanto, informações sobre a estrutura de esporângios e gametófitos contribuirão para a melhor caracterização de processos reprodutivos, além da aplicação dos caracteres em análises taxonômicas e filogenéticas, cujos resultados são de grande valor aos programas de conservação. Este trabalho buscou conhecer a embriologia com ênfase estrutural de *Dyckia racinae* L.B.Sm., caracterizando aspectos de desenvolvimento inicial das estruturas reprodutivas, além da androsporogênese e da androgametogênese. O meristema floral de *D. racinae*, durante a fase inicial de seu desenvolvimento, está organizado em três camadas: dérmica, subdérmica e central. Nas regiões onde os primórdios dos órgãos florais serão projetados é possível identificar um adensamento citoplasmático seguido de uma divisão periclinal na camada subdérmica. A espécie *Dyckia racinae* apresenta flores perfeitas, trímeras e heteroclamídeas, envolvidas por uma bráctea. O androceu é composto por seis estames, o ovário é súpero e trilocular, nectários estão presentes, sendo predominantemente infraloculares. O padrão de formação dos estratos parietais da antera é do tipo básico, o tapete é secretor, a epiderme é papilada, a tétrade de andrósporos se forma de forma sucessiva, sendo tais tétrades decussadas ou isobilaterais. Após a liberação das tétrades da calose, ocorre a maturação dos andrósporos, quando ocorre polarização do citoplasma, seguido da primeira mitose onde são formadas a célula generativa e vegetativa. Em *D. racinae* os andrófitos são bicelulares quando liberados das anteras, com uma abertura, apresentando uma esporoderme constituída por exina, mais externa e resistente, e intina mais interna. *Pollenkitt* é observado na superfície dos andrófitos. Foram observados grãos de pólen dimórficos. Os grãos dimórficos apresentam pouco volume e a região da abertura se mantém côncava, além de citoplasma pouco denso, acúmulo tardio de grãos de amido e regressão parcial e tardia da vacuolação. Em outro grupo de grãos a primeira mitose foi atípico. Em ambos os tipos de grãos as células generativa e vegetativa não são formadas.

Palavras-chave: *Dyckia racinae*, desenvolvimento floral, androsporogênese, androgametogênese.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Postgraduate Program in Agrobiologia
Federal University of Santa Maria

INITIAL DEVELOPMENT, STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF FLOWER, ANDROSPOROGENESIS AND ANDROGAMETOGENESIS IN *Dyckia racinae* L.B.Sm (PITCAIRNIOIDEAE-BROMELIACEAE)

Author: Mariane Paludette Dorneles
Adviser: João Marcelo Santos de Oliveira
Defense Place and Date: Santa Maria, march 15th, 2013.

Important among monocots neotropical family, the bromeliads expand the richness and diversity of the ecosystems where occurs. So gather knowledge in pursuit for implementing projects really effective for biodiversity conservation becomes essential. Therefore, information on the structure of sporangia and gametophytes contribute to a better characterization of reproductive processes, and the application of the characters in taxonomic and phylogenetic analysis, whose results are of great value to conservation programs. This work seeks to understand embryology with emphasis on structural *Dyckia racinae* L.B.Sm., featuring aspects of early development of reproductive structures, androsporogenesis and androgametogenesis. The floral meristem of *D. racinae* in its developmental phase, possess a three layered structure: dermal, subdermal and central. In regions where the floral organs initiate development it is possible to identify a cytoplasmic condensation followed by a periclinal division in the subdermal layer. *D. racinae* shows perfect flowers, being such flowers trimerous, heterochlamydeous and subtended by a bract. The androecium consists of six stamens, and the ovary is superior, trilocular and nectaries are present and predominantly infralocular. The pattern formation of the anther parietal layers is basic type, the tapetum is secretory, the epidermis is papillate, and cytokinesis after meiosis is successive. After tetrads release from callose wall, the androspore maturation occurs, when is observed cytoplasm polarization, followed by first pollen mitosis that gives rise to generative and vegetative cells. In *D. racinae* the androphytes are shed in a two celled state, and sporoderme consist of an outer resistant exine and inner intine. Pollenkitt is observed at the pollen grain surface. Dimorphic pollen was observed. The dimorphic pollen present little volume and the aperture region remains concave, besides relatively less dense cytoplasm, delayed starch accumulation and delayed and partial regression of vacuole. In another grain type abnormal pollen mitosis was observed. In both type of grains vegetative and generative cells are not formed.

Keywords: *Dyckia racinae*, floral development, androsporogenesis, androgametogenesis.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
INTRODUÇÃO GERAL	12
Objetivos	17
CAPÍTULO II	25
DESENVOLVIMENTO INICIAL E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA FLOR EM <i>Dyckia racinae</i> L.B.Sm.	26
Introdução	26
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão	28
Referências Bibliográficas	42
CAPÍTULO III	47
ANATOMIA DA ANTERA EM <i>Dyckia racinae</i> L.B.Sm.	48
Introdução	48
Material e Métodos	49
Resultados e Discussão	52
Referências Bibliográficas	91
CAPÍTULO IV	98
DIMORFISMO POLÍNICO EM <i>Dyckia racinae</i> L.B.Sm. BROMELIACEAE	99
Introdução	99
Material e Métodos	101
Resultados e Discussão	102
Referências Bibliográficas	117
CAPÍTULO V	123
Dynamics of starch reserves of the anther and pollen grains in Bromeliaceae species	124
Introduction	125
Materials and Methods	125
Results and Discussion	126
Conclusions	128
References	128
CAPÍTULO VI	133
CONSIDERAÇÕES FINAIS	134

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

As flores são ramos altamente modificados que contribuíram significativamente com o sucesso evolutivo do grupo das Angiospermas (WEBERLING, 1989). A organização e o número das peças florais determinam em grande parte a aparência geral das flores, proporcionando uma importante fonte de caracteres morfológicos, devido sua constância comparada as outras estruturas vegetativas em Angiospermas (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006). Consequentemente estudos realizados com a finalidade de investigar a estrutura e a ontogenia floral são importantes na filogenia e classificação dos grupos de plantas (WEBERLING, 1989; JUDD et al., 2009).

As monocotiledôneas englobam uma porção considerável de diversidade dentro das Angiospermas, sendo reconhecidas 12 ordens para o grupo (APG III, 2009), com a nova classificação proposta pelo APG, que até o momento já teve três publicações, o grupo teve poucas alterações na posição de seus táxons, contrastando com o que foi observado dentre as eudicotiledôneas e o grupo ANITA (APG I 1998, APG II 2003, APG III 2009). A única mudança está relacionada à família Hydatellaceae que antes era classificada como monocotiledônea, dentro de Poales (APG II, 2003) e agora é colocada em Nymphaeales (APG III, 2009; REMIZOWA et al., 2010). A monofilia do grupo das monocotiledôneas está baseada em características como a distribuição dos feixes vasculares nas folhas e no caule, sistema adventício de raízes e embrião com um único cotilédone (JUDD et al., 2009). Apesar de alguma coerência entre os dados moleculares e morfológicos na determinação das relações filogenéticas das monocotiledôneas, a evolução floral do grupo ainda continua sendo discutida, não tendo sido, portanto, encontrado um consenso (REMIZOWA et al., 2010).

Segundo Endress (2005), estudos morfológicos realizados com monocotiledôneas basais, têm se mostrado importantes na compreensão da evolução das angiospermas em geral. Caracteres reprodutivos são mais estáveis que os caracteres vegetativos e a associação de dados reprodutivos aos moleculares propiciam maior confiabilidade às relações filogenéticas, as quais se encontram ainda em fase de mudanças em Bromeliaceae. A família Bromeliaceae está inserida entre as Poales, maior ordem dentro do grupo das Commelinídeas (APG III, 2009), onde ocupa uma posição basal junto com Rapateaceae e Typhaceae (REMIZOWA et al., 2010). Segundo Judd et al. (2009) a monofilia de Poales é bem sustentada por caracteres de sequência de DNA e possíveis sinapomorfias como corpos silicosos na epiderme, estiletos

separados ou conatos, perda de rafídeos, embora a presença de alguns desses caracteres seja conhecida para Bromeliaceae (SMITH; TILL, 1998).

A monofilia de Bromeliaceae é bem sustentada com base em análises filogenéticas feitas a partir da combinação de dados moleculares e morfológicos (SMITH; TILL, 1998; BARFUSS et al., 2005). A presença de escamas peltadas, corpos silicosos solitários, perianto diferenciado em cálice e corola, estigmas retorcidos e espiralados e número cromossômico básico $n=25$, são sinapomorfias encontradas em Bromeliaceae (BROWN; GILMARTIN, 1989; SMITH; TILL, 1998; PALMA-SILVA et al., 2004).

A família Bromeliaceae é formada por aproximadamente 3140 espécies distribuídas entre 58 gêneros (GIVNISH et al., 2011), dentre os quais podemos encontrar ervas terrícolas, rupícolas ou epífitas. As folhas geralmente se dispõem espiraladamente, em forma de roseta e podem conter bainhas em sua base que permitem a formação de um recipiente onde a água fica acumulada. O limbo se encontra recoberto por tricomas peltados conspícuos. As inflorescências, simples ou compostas, apresentam, em geral, brácteas coloridas. O perianto é heteroclamídeo, trímero, peças florais com segmentos livres entre si, ou fusionados de diversos modos. Os estames com filamentos livres ou conatos ou adnatos às pétalas. O ovário pode ser súpero ou ínfero, três lóculos, com rudimentos seminais anátropos, às vezes campilótopos. Os frutos são cápsulas ou bagas. As sementes nuas, aladas ou plumosas. Os embriões são relativamente pequenos e localizados na base do endosperma (REITZ, 1983; HAUSSEN, 1992; JUDD et al., 2009). Nectários usualmente estão presentes no septo do ovário (JUDD et al., 2009), sua presença em Bromeliaceae é uma condição irregular em Poales onde costumam ser raros ou ausentes (SAJO RUDALL; PRYCHID, 2004). 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).

Segundo Martinelli (2006), Bromeliaceae é uma das famílias mais importantes de monocotiledôneas neotropicais, devido a sua grande riqueza e adaptabilidade aos mais variados nichos. O grupo apresenta grande plasticidade, se adapta as mais diversas condições climáticas, em ambientes que podem variar de mesofíticos a xerofíticos (MARTINELLI, 2006; SMITH; TILL, 1998). São extremamente sensíveis a qualquer mudança ou perturbação das condições ambientais, que acabam resultando na alteração das composições de suas populações. As escamas foliares das espécies epifíticas absorvem umidade e nutrientes direto do ambiente (BENZING, 1998). Essa característica permite que as bromeliáceas absorvam poluentes através de suas folhas, comprometendo não apenas o próprio indivíduo, mas toda a

diversidade de organismos que dependem de uma dada bromélia. Nesse contexto, em que o ambiente é desfavorável, as bromélias podem ser utilizadas em estudos de biomonitoração de elementos químicos (ELIAS et al., 2006). Segundo Brighigna et al. (1997) *Tillandsia caput-medusae* pode ser utilizada como bioindicador para a poluição do ar, recomendando o uso de outras espécies de *Tillandsia* para o mesmo fim.

As características morfológicas permitem as bromélias oferecer alimento, abrigo, água, nutrientes e sítio de reprodução para diversos organismos, ampliando a riqueza e diversidade de espécies nos ecossistemas em que se encontram (ROCHA et al., 2004). A presença de uma grande diversidade de invertebrados nas espécies de *Tillandsia* analisadas por Frank et al. (2004), demonstram a importância das bromélias como hábitat, mesmo que muitas das espécies encontradas não apresentem uma relação obrigatória, estas plantas suportam uma fauna diversificada de invertebrados. As formigas podem estabelecer relações oportunistas com as espécies de bromélia, construindo seus ninhos em seus tanques (BLÜTHGEN et al., 2000) e utilizando seu néctar em troca de proteção contra o ataque dos herbívoros (VESPRINI; GALETTO; BERNARDELLO, 2003).

Dentre as três tradicionais subfamílias, Tillandsioideae e Bromelioideae são monofiléticas e, Pitcairnioideae, parafilética (SMITH; DOWNS 1974). Tillandsioideae configura um grupo cujas espécies são predominantemente epífitas. Quanto a estrutura floral o ovário é súpero e o fruto é uma cápsula deiscente cujas sementes possuem apêndices plumosos; as margens foliares são lisas. Em Bromelioideae, o ovário é ínfero e os frutos são bagas, cujas sementes não possuem apêndices; as folhas possuem margens aculeadas. Pitcairnioideae possui ovário súpero e os frutos usualmente secos, encerrados em cápsula deiscentes com sementes aladas (raramente nuas); as margens das folhas são espinescentes (SMITH; DOWNS 1974, 1977, 1979; REITZ, 1983; BENZING, 1998). Estudos filogenéticos propõem uma nova classificação para a família onde os diferentes clados referentes às antigas Pitcairnioideae, são tratados como novas subfamílias. Neste caso, Bromeliaceae passa a ter oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae (GIVNISH et al., 2007).

A distribuição das bromeliáceas é quase restrita à região Neotropical, tendo seus limites de ocorrência entre o norte dos estados da Virginia, Texas e Califórnia, seguindo através da América Central em direção ao centro da Argentina e Chile, tendo como limite sul a Patagônia (SMITH, 1934). *Pitcairnia feliciana* (A.Chev.) Harms & Mildbr. é a única exceção quanto a essa distribuição geográfica, encontrada no oeste da África, no Guiné, possivelmente tendo chegado até essa região por dispersão a longa distância em um período

relativamente recente (JAQUES-FÉLIX, 2000; GIVNISH et al., 2007). São considerados três os centros de diversidade de espécies, os Andes, o Planalto das Guianas e o leste do Brasil, representado pela Mata Atlântica (SMITH, 1934; SMITH; DOWNS, 1974). Pelo menos 40% das espécies podem ser encontradas no Brasil, fazendo do país o mais importante em termos de diversidade, sendo o ecossistema atlântico o responsável por abrigar várias espécies endêmicas (LEME, 1997). Martinelli et al. (2008) descrevem 603 espécies endêmicas para o domínio Mata Atlântica e para o Rio Grande do Sul são descritas 69 espécies, nove gêneros e nove endêmicas.

Vários trabalhos vêm sendo realizados com Bromeliaceae, em relação à anatomia de órgãos vegetativos, cuja ênfase é dada principalmente à folha (TOMLINSON, 1969; ROBINSON, 1969; BRAGA, 1977; PITA; MENEZES, 2002; ARRUDA; COSTA, 2003; AOYAMA; SAJO, 2003; SEGECIN; SCATENA, 2004; PROENÇA; SAJO, 2004; SOUSA et al., 2005; SCATENA; SEGECIN, 2005; SCATENA et al., 2006; PROENÇA; SAJO, 2007; PROENÇA; SAJO, 2008; DETTKE; MILLANEZE-GUTIERRE, 2008), a morfologia das escamas peltadas são abordadas em Strehl (1983), Varadarajan e Gilmartin (1987) e Mantovani e Iglesias (2005). No entanto, os estudos são escassos em relação à anatomia dos órgãos reprodutivos, valendo salientar os de Kulkarni e Pai (1982), Sajo, Prychid e Rudall (2004a) e Sajo, Rudall e Prychid. (2004b).

A parede da antera em Bromeliaceae é formada pela epiderme, endotécio do tipo fibroso e tapete do tipo secretor (JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992; DAVIS, 1966). Durante a meiose a citocinese é do tipo sucessiva e as tétrades isobilaterais. 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). A androsporogênese foi descrita como sucessiva (PALM, 1920; STENAR, 1925; SARTORI, 2008; FURNESS; RUDALL, 1999; LAKSHMANAN, 1967; RAO; WEE 1979) e é o tipo mais comum em monocotiledôneas (SAJO et al., 2005).

O gênero *Dyckia*, pertencente à subfamília Pitcairnioideae, possui cerca de 130 espécies e sete variedades (LUTHER, 2008). São plantas geralmente terrestres ou rupestres, de natureza xerofítica, crescem em locais de altitude elevada e se distribuem pelo Escudo Brasileiro chegando até a Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (SMITH, 1934; SMITH; TILL, 1998; GIVNISH et al., 2011). Um *checklist* realizado por Martinelli et al. (2008) na Mata Atlântica coloca que o gênero *Dyckia* possui um grande número de espécies indeterminadas ou com identificações imprecisas sugerindo a realização de uma revisão urgente.

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 filamentos 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).

Mesmo sendo possível encontrar uma ampla obra taxonômica sobre a família, muitas controvérsias ainda existem, gerando interpretações diferentes e discordantes (MARTINELLI, 2006). Várias espécies já estão incluídas na lista vermelha publicada pelo IUCN (2011). Uma das principais barreiras para a realização de estudos efetivos na conservação de espécies é o problema de delimitação taxonômica. Contribui para a resolução de tais problemas a integração dos dados obtidos através de diferentes áreas de estudo, dentre elas, a morfologia externa e interna de órgãos vegetativos e, principalmente, de órgãos reprodutivos (ENDRESS 2005), devendo ser considerados para tanto, análises do desenvolvimento de peças periantais e detalhes da diferenciação de esporângios e de suas células reprodutivas, através da área do conhecimento definida como embriologia vegetal. O uso de tais informações para a melhor caracterização taxonômica pode também ser utilizado para a verificação das relações filogenéticas no grupo. Diferentes trabalhos em Bromeliaceae, têm sido realizados na busca da elucidação dessas relações, podendo ser citados os de Gilmartin e Brown (1987), Terry et al. (1997a,b), Horres et al. (2000) e Givnish et al. (2011).

A necessidade de se reunir informações taxonômicas para Bromeliaceae bem como sua importância no panorama da conservação da biodiversidade são os principais argumentos para a realização deste estudo. Nesse contexto, informações sobre a estrutura de esporângios e gametófitos contribuirão para a melhor caracterização de processos reprodutivos, além da aplicação dos caracteres em análises taxonômicas e filogenéticas, cujos resultados são de grande valor aos programas de conservação. Este trabalho busca conhecer a embriologia com ênfase estrutural de *Dyckia racinae* L.B.Sm., caracterizando aspectos de desenvolvimento inicial das estruturas reprodutivas, além da androsporangênese e da androgametogênese. Como justificativa para a escolha do táxon, cabe salientar que a presente proposta de estudo faz parte de um projeto de conservação de Bromeliaceae, que envolve diferentes instituições de ensino superior e de pesquisa, que irá contemplar diversos aspectos biológicos de diversas espécies

das três subfamílias, tradicionalmente descritas para Bromeliaceae, e já comentado acima. Assim, de acordo com os termos gerais do projeto maior (Edital FAPERGS-CNPq, PRONEX 008/2009) já estão sendo desenvolvidos estudos em espécies de duas subfamílias, faltando Pitcairnioideae que, portanto, se pretende contemplar com a presente proposta.

OBJETIVO GERAL

- Realizar a descrição do desenvolvimento inicial das peças florais bem como da ontogênese das anteras em *Dyckia racinae* L.B.Sm.

Objetivos específicos

- Descrever o desenvolvimento inicial das peças florais;
- Caracterizar a estrutura da flor;
- Fornecer a origem dos esporângios a partir do meristema floral;
- Investigar o padrão de formação dos estratos parietais das anteras;
- Caracterizar citologicamente os estratos parietais das anteras ao longo do desenvolvimento;
- Analisar a meiose e padrão de organização dos andrósporos;
- Caracterizar a esporoderme;
- Caracterizar o andrófito (grão de pólen).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APG. An ordinal classification for the families of flowering plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 85, p. 531–553, 1998.
- APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.
- 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.
- ARRUDA, R. C. O.; COSTA, A. F. Foliar anatomy of five *Vriesea* sect. *Xiphion* (Bromeliaceae) species. **Selbyana**, v. 24 (2), p. 180-189, 2003.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 438 p. 2006.
- 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. H. J.; SAMUEL, R.; TILL, W.; STUESSY, T. F. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**, v. 92 (2), p. 337-351, 2005.
- BENZING, D.H. Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes. **Climatic Change**, v.39, p.519-540. 1998.
- BRIGHIGNA, L.; RAVANELLI, M.; MINELLI, A.; ERCOLI, L. The use of an epiphyte (*Tillandsia caput-medusae* Morren) as bioindicator of air pollution in Costa Rica. **The Science of the Total Environment**. v.198, p. 175-180, 1997.
- BRAGA, M. M. N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. **Acta Amazonica**, v.7 (3), p. 1-74, 1977.
- BROWN G. K.; GILMARTIN A. J. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **American Journal of Botany**, v. 76, p. 657– 665, 1989.

BLÜTHGEN N.; VERHAAGH, M.; GOITÍA, W.; BLÜTHGEN, N. Ant nests in tank bromeliads – an example of non-specific interaction. **Insectes Sociaux**, v. 47, p. 313–316, 2000.

CONCEIÇÃO, S. P. **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.

ELIAS, C.; FERNANDES, E. A. N.; FRANÇA, E. J.; BACCHI, M. A Seleção de epífitas acumuladoras de elementos químicos na Mata Atlântica. **Biota neotropica**, v. 6 (1), p. 1-9, 2006.

DETTKE, G. A.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Anatomia vegetativa de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Balduinia**, v. 13, p. 1-14, 2008.

ENDRESS, P. K. **Links between embryology and evolutionary floral morphology**. Current Science, Bangalore, v. 89, p. 749-754, 2005.

FORZZA, R.C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J.A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R.F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B. 2013. *Bromeliaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6061>> Acesso em 23fev. 2013.

FRANK, J. H.; SREENIVASAN, S.; BENSHOFF, B. J.; DEYRUP, M. A.; EDWARDS, G. B.; HALBERT, S. E.; HAMON, A. B. ; LOWMAN, M. D.; MOCKFORD, E. L.; SCHEFFRAHN, R. H.; STECK, G. J.; THOMAS, M. C.; WALKER, T. J.; WELBOURN, W. C. Invertebrate animals extracted from native *Tillandsia* (Bromeliales: Bromeliaceae) in Sarasota Country, Florida. **Florida Entomologist**. v. 87 (2), p. 176 -185, 2004.

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

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

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

HAUSSEN, M.A.A.B. **Biogeografia da família Bromeliaceae Juss. no Rio Grande do Sul**. Tese de mestrado, Universidade do Vale dos Sinos, Rio Grande do Sul, 1992.

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

IUCN. **The IUCN Red list of threatened Species**. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org>> . Version 2011.1. Acessado em: 17 fev. 2013.

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

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

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.

KULKARNI, R. A; PAI, R. M. The floral anatomy of *Puya spathacea* Mez. (Bromeliaceae) with special reference to nectarines. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences Plant Science Section**, v. 91,(6), p. 473-478, 1982

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

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

LUTHER H. E. An alphabetical list of Bromeliad binomials. Florida: The Bromeliad Society International. **Sarasota**, 2008.

MANTOVANI, A.; R. R. IGLESIAS. Quando aparece a primeira escama? Estudo comparativo sobre o surgimento de escamas de absorção em três espécies de bromélias terrestres de restinga. **Rodriguésia**, v. 56, p. 73-84, 2005.

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

MARTINELLI, G.; FORZZA, R. C. *Pitcairnia* L.Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *P. azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *P. racinae* L. B. Sm. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 29 (4), p. 603-607, 2006.

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

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

PALMA-SILVA, C.; SANTOS, D. G.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Chromosome numbers, meiotic behaviour, and pollens viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal of Botany**, v.91(6), p. 804-807, 2004.

PITA, P. B.; MENEZES, N. L. Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. F. e *Encholirium* Mart. Ex Schult & Schult. F. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25 (1), p. 25-34, 2002.

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

PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta botânica brasílica**, v. 21 (3), p. 657-673, 2007.

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

ROBINSON, H. **A monograph on foliar anatomy of the genera *Connelia*, *Cottendorfia*, and *Navia* (Bromeliaceae)**. In Smithsonian Contributions to Botany. n. 2. Smithsonian Institution. Washington, 1969.

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

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

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

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.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 635-649, 2005.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S.; COAN, E. I. Seed morphology and post-seminal development of *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) from the “Campos Gerais”, Paraná, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49 (6), p. 945-951, 2006.

SEGECIN, S.; SCATENA, V.L. Morfoanatomia de rizomas e raízes de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, PR, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 253-260, 2004.

SMITH, L. B. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. **Botanische Jahrbuecher fuer Systematik**, v.66, p. 446-458, 1934.

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

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

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

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

SOUSA, G.M; ESTELITA, M.E.M.; WANDERLEY, M.G.L. Anatomia foliar de espécies brasileiras de *Aechmea* subg. *Chevaliera* (Gaudich, ex Beer) Baker, Bromelioideae-Bromeliaceae. **Revistas Brasileira de Botânica**, v.28(3), p. 603-613, 2005.

STENAR, H. **Die embryologie der Amaryllideen**. PhD Thesis, University of Uppsala, 1925.

STREHL, T. Forma, distribuição e flexibilidade dos tricomas foliares usados na filogenia de Bromeliáceas. **Iheringia, Série Botânica**, v. 31, p. 105-119, 1983.

STREHL, T. Flórmula fanerogâmica da Reserva Biológica do Ibicuí – Mirim, Rio Grande do Sul, Brasil: Bromeliaceae. **Iheringia, Série Botânica**, v. 51 (1), p. 17-37, 1998.

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.

TERRY, R. G.; BROWN, G. K.; OLMSTEAD, R. G. 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.

VESPRINI, J. L.; GALETTO, L.; BERNARDELLO, G. The beneficial effect of ants on the reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant. **Canadian Journal of Botany**, v. 81, p. 24–27, 2003.

WEBERLING, F. **Morphology of flowers and inflorescences**. Cambridge University Press, Cambridge, 1989.

CAPÍTULO II

**DESENVOLVIMENTO INICIAL E CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL DA FLOR EM *Dyckia racinae*
L.B.Sm.(BROMELIACEAE)**

INTRODUÇÃO

Formada por aproximadamente 58 gêneros (GIVNISH et al., 2011) Bromeliaceae é considerada uma das mais importantes famílias neotropicais (MARTINELLI, 2006). Possui vários táxons com números expressivos de espécies indeterminadas ou com identificações imprecisas (BENZING, 2000) dentre os quais podemos citar o gênero *Dyckia* (MARTINELLI et al., 2008). Mesmo sendo possível encontrar uma ampla obra relacionada à família, o desenvolvimento floral de suas espécies ainda não foi descrito.

As modificações responsáveis pela alteração da fase vegetativa para a reprodutiva são controladas pelo meristema apical. Externamente podem incluir a alteração de uma folha em bráctea, mudanças na filotaxia e/ou alongação do eixo. Internamente, são as mudanças fisiológicas que vão agir na efetivação desse processo (TUCKER; GRIMES, 1999).

O meristema reprodutivo possui uma estrutura fundamentalmente diferente do vegetativo. A transição de uma fase para a outra envolve o aumento da atividade mitótica em todas as regiões do meristema vegetativo, indicando que todas essas zonas estão envolvidas na produção das partes reprodutivas da planta (CORSON, 1969). O ápice floral é formado por três camadas LI, LII e LIII, responsáveis pelas mudanças na forma e tamanho do ápice floral durante seu desenvolvimento (SATINA; BLAKESLEE, 1941).

Estudos abordando caracteres da ontogênese floral podem ser utilizados para testar hipóteses filogenéticas e relações taxonômicas (TUCKER, 1992; PRENNER, 2004; PRENNER, 2004b; MOÇO; MARIATH, 2009), utilizando os dados na distinção entre subfamílias, tribos e níveis infragenéricos (TUCKER, 1991, 1993, 1996, 2003; SAMPAIO; MOÇO; MARIATH, 2013). A determinação dos genes envolvidos na ontogênese floral também é importante para a compreensão do processo e tem sido abordada por vários trabalhos (CARPENTER; COEN, 1995; HANTKE; CARPENTER; COEN, 1995; LIU; RUNNING; MEYEROWITZ, 1997; SESSIONS et al., 1997).

Através da investigação do desenvolvimento floral é possível identificar caracteres potenciais para serem utilizados taxonomicamente. Nunes et al. (2012) descrevem o desenvolvimento de *Potamogeton* Richard (Potamogetonaceae), colocam que a forma e a proporção do estigma, assim como o posicionamento e a abertura do carpelo, são características potenciais para serem utilizadas com ênfase taxonômica.

O presente estudo tem como objetivo descrever os estádios iniciais da ontogênese floral de *Dyckia racinae* L.B.Sm., salientando a ordem de iniciação e a contribuição das diferentes camadas na formação dos primórdios dos órgãos que constituem o botão floral.

MATERIAL E MÉTODOS

O processamento e a análise do material foram realizados no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Biologia, CCNE/ UFSM. O material botânico foi coletado no município de São Pedro do Sul, RS, Brasil, nas coordenadas geográficas 29° 35' 22,2" S e 54° 49' 49,4" W. Cabe salientar que 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.

O material testemunho de *Dyckia racinae* encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria – SMDB, com registro 13840. No laboratório da UFSM está sendo mantida uma coleção líquida dos materiais coletados para as análises histológicas, com registro de coleta. Um indivíduo está sendo mantido em coleção viva, sob numeração de registro 0286, na casa de vegetação do Laboratório de Anatomia Vegetal na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Ápices de inflorescências com botões florais em diversos estádios de desenvolvimento foram coletados. Para a análise em Microscopia óptica, em campo claro (MO) o material foi fixado em glutaraldeído 1% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,2 (GABRIEL; 1982; MCDOWELL; TRUMP, 1976), no qual foi adicionado Tween20 2ml/L (FREUDENSTEIN; HARRIS; RASMUSSEN, 2002). Após a fixação o material foi submetido ao vácuo, seguido de lavagem em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,2 (GABRIEL; 1982) e desidratado em série etílica. Posteriormente à desidratação, o material foi submetido a soluções de clorofórmio e etanol absoluto (1:3, 1:1, 3:1, 1:1 e 1:3), finalizando a desidratação com uma etapa de etanol absoluto. O material foi pré-infiltrado com uma solução de hidroxietilmetacrilato (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 de Teflon até sua polimerização (GERRITS; SMID, 1983).

As seções, de 3 µm de espessura, feitas em micrótomo rotativo Leica RM2245, foram coradas com Azul de Toluidina O 0,05% pH 4.4 em tampão de benzoato de sódio (FEDER;

O'BRIEN, 1968). As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio Leica DM2000 com sistema de captura digital de imagem DFC 295. Foram feitas representações da inflorescência nos estádios iniciais de desenvolvimento através da utilização da câmara clara da mesma marca, acoplada ao referido Microscópio, a representação da flor em antese foi realizada em câmara clara do Microscópio estereoscópico Leica M80.

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) o material foi processado conforme Gersterberger e Leins (1978) e submetido à secagem através de ponto crítico com o uso do equipamento BAL-TEC, CPD 030, no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME/UFRGS). Em seguida, as amostras foram montadas em suportes de alumínio e recobertas com ouro no aparelho metalizador BAL-TEC, SCD 050. A análise e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio JEOL 6060, sob 20kV (CME/UFRGS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento Floral Inicial

O meristema floral de *Dyckia racinae*, durante a fase inicial de seu desenvolvimento, após a emissão da bráctea responsável por sua proteção, está organizado em três camadas: dérmica, subdérmica e central (Fig. 1.1 A). Nesse tipo de arranjo, que também é encontrado no ápice caulinar de *Datura* (Solanaceae), a camada dérmica costuma apresentar durante todo seu desenvolvimento apenas divisões anticlinais, na camada subdérmica inicialmente também são observadas apenas divisões perpendiculares, mas podem acontecer no decorrer do desenvolvimento divisões periclinais durante a emissão dos órgãos florais, já na camada central divisões em todos os planos são observadas (SATINA; BLAKESLEE; AVERY, 1940; SATINA; BLAKESLEE, 1941). O ápice floral de *Datura stramonium* L. (Solanaceae) também é formado por três camadas, denominadas L-I, L-II e L-III, modificações estruturais que acontecem no ápice do meristema floral dessa espécie durante seu desenvolvimento resultam da atividade dessas três camadas (SATINA; BLAKESLEE, 1941).

O meristema floral surge como uma elevação na axila da bráctea, resultado de divisões periclinais que ocorrem na camada subdérmica (Fig. 1.1 A). Essa fase inicial é marcada pela atividade mitótica na camada celular subdérmica e, aparentemente, com contribuição de suas derivadas (Fig. 1.1 A e B). Barnard (1960) coloca que o surgimento do primórdio do meristema floral na espécie *Bulbine bulbosa* (R.Br.) Haw. (Xanthorrhoeaceae), acontece na camada subdérmica, através de divisões periclinais, com a colaboração da camada central, no aumento do tamanho do órgão. Em *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vogel (Leguminosae) são as divisões periclinais e oblíquas da camada central as responsáveis pela elevação do meristema floral, sendo este formado exclusivamente por células derivadas dessa camada, a camada dérmica e subdérmica apenas acompanham o crescimento do através de divisões anticlinais (MOÇO; 2002). *D. racinae* e *B. bulbosa* possuem flores com simetria actinomorfa, este tipo de simetria pode ser caracterizada pela inserção dos órgãos florais em verticilos helicoidais, mais ou menos equidistantes entre si, e também por não sofrer nenhum tipo de alteração nessa posição durante a ontogênese floral (TUCKER, 1999) o contrário do que pode acontecer em flores que apresentam simetria zigomorfa como *A. latifolia*, e que no início de seu desenvolvimento apresentam simetria radial (TUCKER, 1999; MOÇO, 2002).

Divisões periclinais e oblíquas, na camada central, contribuem para que o meristema adquira um contorno em domo (Fig.1.1 B). As mudanças no meristema reprodutivo se dão de forma gradual, para que o ápice com contorno de domo adquira uma forma plana (Fig.1.1 C). Nesta fase a camada central, formada por células com grandes vacúolos, está revestida pelas camadas dérmica e subdérmica que apresentam células relativamente pequenas com citoplasma denso, e se dividem, principalmente, anticlinalmente (Fig.1.1 C). Essas mudanças resultam de uma menor atividade mitótica na zona central e uma maior atividade na zona periférica do meristema (ESAU, 1977).

Nas regiões onde os primórdios dos órgãos florais serão projetados é possível identificar um adensamento citoplasmático seguido de uma divisão periclinal na camada subdérmica (Fig.1.1 E). McCoy (1940) observou a mesma origem para pétalas, sépalas e o primórdio estaminal na espécie *Frasera caroliniensis* Walter (Gentianaceae), como ocorre em *D. racinae*, onde as primeiras divisões periclinais acontecem na camada subdérmica. O crescimento axial fica por conta da atividade do grupo de células derivadas da camada subdérmica, com colaboração da camada central (Fig. 1.1 F e I). Já os resultados encontrados por Satina e Blakeslee (1941) expõem que os estames em *D. stramonium* apresentam uma origem diferente das peças periantais.

Diversas linhas de evidências devem ser apresentadas para que conclusões sobre a origem dos órgãos florais possam ser feitas (SATINA; BLAKESLEE, 1941). Fatores genéticos também estão envolvidos na determinação dos órgãos reprodutivos. A identidade do órgão depende de um desenvolvimento característico do primórdio (COEN; CARPENTER, 1995). Os genes funcionam como mecanismos reguladores garantindo a adequada proliferação das células, a comunicação entre elas, o momento de iniciação dos órgãos, assim como a diferenciação e morfogênese celular nos meristemas florais (LIU; RUNNING; MEYEROWITZ, 1997; SESSIONS et al., 1997).

Os três primórdios de sépalas são iniciados em espiral no verticilo, equidistantes, no ápice meristemático, determinando um contorno triangular ao meristema floral (Fig. 1.1 D). A última sépala a ser formada é de posição dorsal (Fig. 1.1 D). Mais tarde, surgem às pétalas em posição alterna em relação às sépalas, sendo neste caso a pétala ventral a última a ser formada (Fig. 1.1 G).

Os três primórdios estaminais, em cada um dos seus verticilos, vão surgindo e no decorrer de seu desenvolvimento é possível identificar uma pequena diferença de tamanho. Os três primórdios alternipétalos são os mais desenvolvidos (Fig. 1.1 H), possivelmente esse fato esteja relacionado ao maior espaço para o seu desenvolvimento inicial ou por uma possível pressão exercida pelas outras peças florais. Remizowa et al. (2012) atribuiu a pequena diferença de tamanho encontrada entre os primórdios das sépalas, de *Xyris grandis* Ridl. (Xyridaceae), ao espaço disponível no botão floral durante o seu desenvolvimento.

O desenvolvimento inicial das folhas carpelares é similar aos dos outros órgãos florais (Fig. 1.1 I), uma vez que foram observadas divisões periclinais na região subdérmica. A partir desse momento, é observada proliferação celular ventral mais intensa no primórdio, dando origem a uma concavidade ventral. O aumento da atividade mitótica marginal, onde tais margens se encontram pareadas em cada folha carpelar, associado ao crescimento direcionado ao centro do meristema floral, possibilita a formação de um espaço transitoriamente fendido. No primórdio carpelar, as células da região dorsal, nessa fase, se apresentam vacuoladas e com núcleos proeminentes. A fusão da fenda carpelar acontece depois como resultado de um crescimento lateral contínuo. A iniciação dos órgãos florais se dá numa ordem acrópeta em *D. racinae*, as primeiras estruturas emitidas são as sépalas, seguidas das pétalas, estames e carpelos, esse tipo de desenvolvimento é muito comum, embora existam exceções (TUCKER, 2003).

Durante o desenvolvimento das peças florais é possível identificar uma diferença de tamanho entre as peças do mesmo verticilo. Em algumas plantas a metade abaxial da flor

apresenta um atraso em seu desenvolvimento inicial, se supõe que esse pequeno atraso pode ser causado pela bráctea que protege o botão floral, onde tal órgão usaria parte do meristema que dá origem a flor, enfraquecendo o meristema no lado em que se desenvolve (ENDRESS, 1999), outra explicação coloca que a pressão exercida pelo contato direto da bráctea com o meristema floral, poderia estar causando o atraso em seu desenvolvimento (ENDRESS, 1999). O gradiente também pode ser inverso como em *Trochodendron* (Trochodendraceae) onde os estames da face adaxial são mais atrasados no início de seu desenvolvimento quando comparados com os da face abaxial (ENDRESS, 1986).

Poderia também não aparecer como em *Potamogeton* (Potamogetonaceae) onde a bráctea floral se apresenta bem reduzida e não é possível identificar um atraso significativo (POSLUSZNY; SATTLER, 1974). Sugere-se que em *D. racinae* o pouco espaço disponível para o desenvolvimento dos órgãos florais seja a causa dessa pequena diferença de tamanho encontrada entre as peças florais do mesmo verticilo, o que estaria relacionado à presença de uma bráctea floral (Figs. 1.1 D, 1.3 H) que pressionaria os botões durante o início de seu desenvolvimento e com o crescimento do escapo da inflorescência essa pressão cessaria impedindo a visualização desta diferença nos estádios posteriores de desenvolvimento.

Descrição flor madura e nectário

A espécie *Dyckia racinae* (Fig. 1.2 A-B) apresenta flores perfeitas, trímeras, heteroclamídeas e cada flor está envolvida por uma bráctea (Fig.1.1 D). As sépalas são concrecidas na base, esverdeadas, com manchas marrons (Fig. 1.3 A). As pétalas são parcialmente conatas e de cor amarela (Fig. 1.2 G). As sépalas são mais curtas que as pétalas (Fig. 1.3 A). O androceu é composto por seis estames, os quais são adnatos a corola, além de apresentarem leve união na base (Fig. 1.3 E). O ovário é súpero, trilocular (Fig. 1.3 D), com um grande número de rudimentos por lóculo, os quais se encontram agrupados muito próximos uns aos outros (Fig. 1.3 B).

Nectários estão presentes, sendo predominantemente infraloculares, (Figs.1.4 AF). Tais nectários são estruturados, a epiderme é múltipla, do tipo secretora (Figs. 1.4 E-F) e ráfides estão presentes (Fig. 1.4 E). O aporte vascular é profuso e difuso através do parênquima se desenvolvendo até o terço basal ovariano na região septal (Fig. 1.4 A). Além disso, o nectário se organiza como labiríntico, sua diferenciação acontece na porção abaixo

dos lóculos e dos septos. Aparentemente, as porções de nectário abaixo dos lóculos também possuem continuidade com os mesmos (Figs. 1.4 A-C). O que sugere esta suposição são duas camadas de células, vistas em seção longitudinal (Fig. 1.4 B), que apresentam entre si um pequeno espaço celular ligando o nectário e o lóculo (Fig. 1.4 C). Quanto a função desta ligação, podemos sugerir que o lóculo funcionaria como um possível local para armazenamento de néctar, quando este fosse produzido em grande quantidade e os visitantes florais não aparecessem, dessa forma não desperdiçaria energia, mas ainda são necessárias mais análises para confirmar esta suposição.

Nectários septais estruturados, labirínticos, diferenciados em parênquima nectarífero e epitélio secretor foram descritos para Bromeliaceae por Bernardello; Galetto e Juliani (1991). Sajo; Rudall e Prychid (2004) classificam o nectário do gênero *Dyckia* como infralocular, labiríntico, inserido na região do receptáculo floral e se estendendo pelo ovário por fendas parcialmente apocárpicas. A presença de nectários florais em Bromeliaceae é considerada uma condição plesiomórfica dentro das Poales, onde sua presença costuma ser rara. Mas estes nectários são bem comuns em outras monocotiledôneas, desaparecendo e reaparecendo várias vezes durante o curso da evolução (SAJO; RUDALL; PRYCHID, 2004). Kriek (2008) coloca que *D. encholirioides* teria nectário extrafloral nas sépalas, o que contraria os resultados descritos por este trabalho para *D. racinae*.

Durante as coletas realizadas no período reprodutivo da espécie, foi possível observar a presença de formigas em toda a extensão da inflorescência de *D. racinae* (Fig.1.2 F). Em *Dyckia floribunda* Griseb. o néctar é secretado durante todo o período reprodutivo a partir de gemas em desenvolvimento até a quase maturação dos frutos. Durante esse período as formigas são encontradas patrulhando a inflorescência e coletando o néctar, agindo de maneira agressiva, acabam protegendo a planta dos ataques de herbívoros (VESPRINI; GALETTO; BERNARDELLO, 2003). O néctar extrafloral das espécies de Bromeliaceae utilizadas no estudo de Galetto e Bernardello (1992) é composto de sacarose quase pura e aminoácidos, sugerindo que este pode ser visto como um possível componente nutricional para as formigas que utilizam este recurso. Essa interação mutualística entre as formigas e espécies de Bromeliaceae (BLÜTHGEN et al., 2000; VESPRINI; GALETTO; BERNARDELLO, 2003; SCHMID et al., 2010; LEROY et al., 2012) pode representar uma desvantagem por afastar possíveis polinizadores, mas isso é compensado pela proteção contra os herbívoros (VESPRINI; GALETTO; BERNARDELLO, 2003). O sucesso reprodutivo de *D. floribunda*, relacionado com o número de frutos produzido por planta, número de sementes

por fruto e número de sementes, foi fortemente afetado em plantas onde as formigas foram excluídas (VESPRINI; GALETTO; BERNARDELLO, 2003).

Para *D. encholirioides* existe a descrição de interação entre uma espécie de formiga cortadeira, que leva para seu ninho partes das flores e dos frutos em desenvolvimento para o cultivo de fungos, afetando negativamente a reprodução da espécie (KRIECK, 2008). Durante as coletas e observações feitas em campo não identificado em qualquer momento que as espécies de formiga que visitavam a inflorescência de *D. racinae* estavam carregando partes das flores, apenas foi visualizado a coleta de néctar. Como os trabalhos foram realizados em locais diferentes, um em Santa Catarina outro no Rio Grande do Sul, possivelmente as espécies de formigas que visitam as inflorescências sejam diferentes e busquem também outros tipos de recurso na mesma espécie, e no caso do presente trabalho as formigas poderiam estar contribuindo para o processo reprodutivo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo traz a descrição inédita do desenvolvimento floral para Bromeliaceae, sugerindo que ao abranger um número significativo de espécies dentro do gênero, em trabalhos futuros, possíveis variações encontradas na ontogênese floral poderiam ser utilizadas como características úteis na delimitação de espécies problemáticas.

A caracterização das camadas LI, LII e LIII, a identificação dos padrões de divisões que ocorrem no meristema floral, a determinação da camada onde acontece a divisão periclinal que dá início a projeção do primórdio e sua ordem de iniciação, podem ser consideradas como caracteres com potencial taxonômico em *D. racinae*.

Figura 1.1, A-I. Organogênese floral em *Dyckia racinae* (Bromeliaceae). Seções longitudinais em ML em A, B, C, E, F, H e I. Eletromicrografias em MEV em D e G. A. Meristema floral mostrando a bráctea protetora, as camadas dérmica, subdérmica e central e a divisão periclinal da camada subdérmica (seta). B. Meristema floral com contorno em domo, divisões periclinais e oblíquas (setas) da camada central. C. Meristema floral com forma plana. D. Meristema floral no estágio de iniciação dos primórdios das pétalas. E. Meristema floral no estágio de iniciação dos primórdios dos estames. F. Detalhe da figura E mostrando a iniciação dos primórdios estaminais. G. Meristema floral no estágio de iniciação dos primórdios estaminais. H. Crescimento em extensão do primórdio estaminal, que acontece na camada subdérmica (seta) com colaboração da camada central (setas). I. Crescimento em extensão do primórdio carpelar, que acontece na camada subdérmica (seta) com colaboração da camada central (seta). Abreviaturas: B, bráctea; C, camada central; D, camada dérmica; E, estame; P, pétala; SD, subdérmica; S, sépala. Barra = 20 µm em A, B, E, F, I; =50µm em C, G e H; =100µm em D.

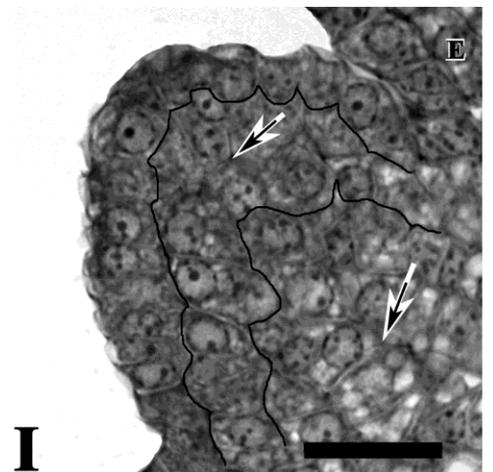
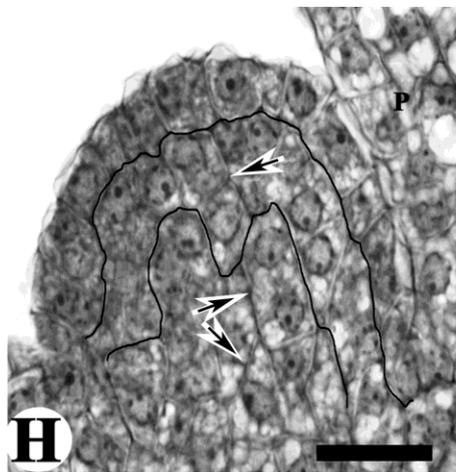
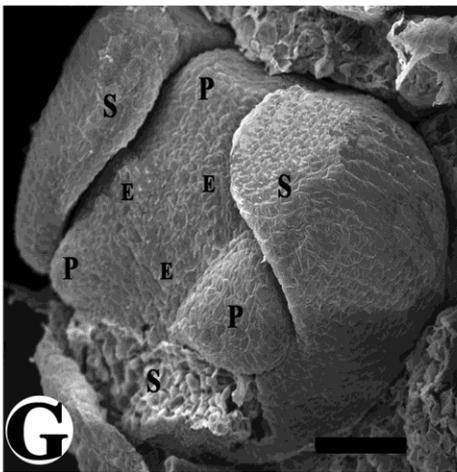
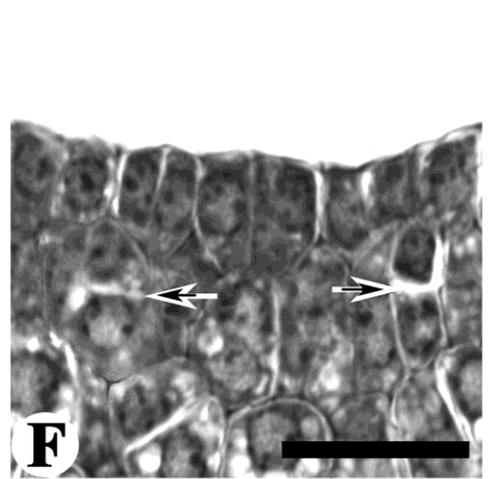
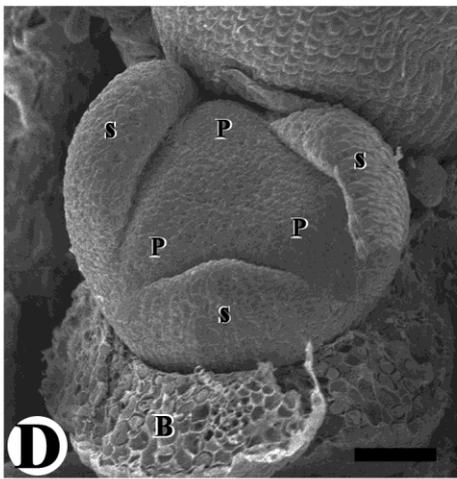
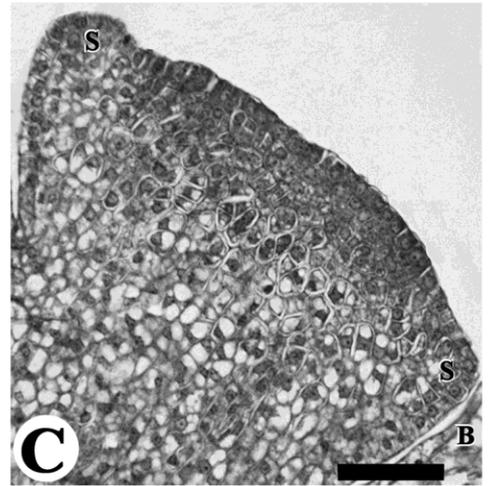
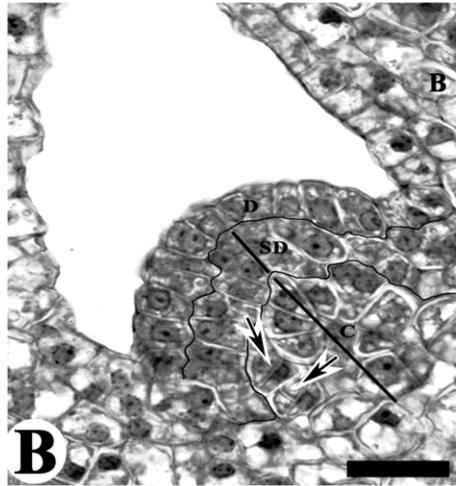
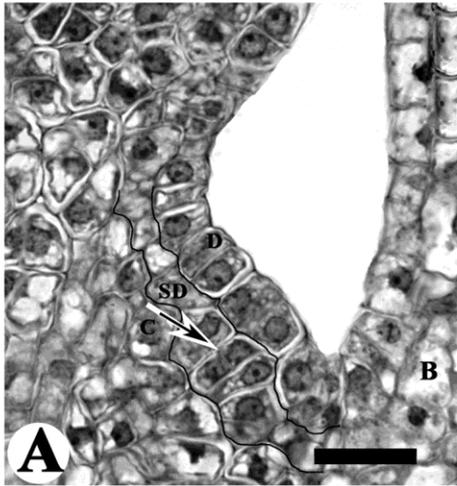
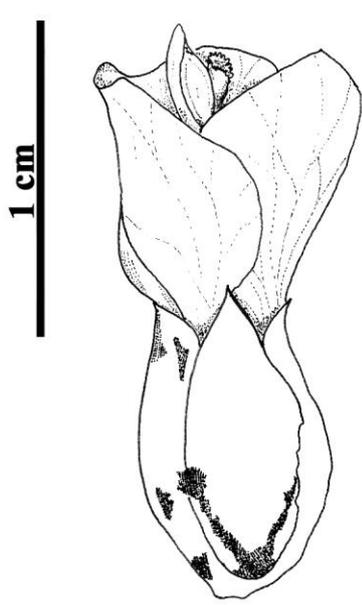


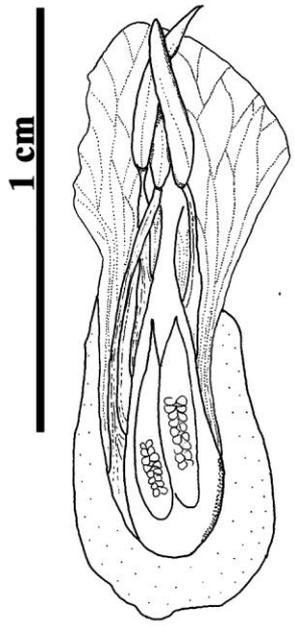
Figura 1.2, A-H. *Dyckia racinae* (Bromeliaceae). A. Aspecto geral da planta com inflorescência. B. Parte vegetativa. C. Detalhe ramificação da inflorescência. D. Ápice da inflorescência. E. Inflorescência jovem no interior da roseta. F. Formigas patrulhando a inflorescência. G. Detalhe da flor. H. Cápsula do fruto após a liberação das sementes. Barra = 40 cm em A, = 18 mm em B, C e D, = 9 mm em E, F e H. Fotos: Mariane Paludette Dorneles.



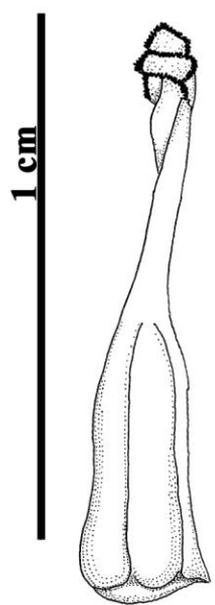
Figura 1.3, A-H. Morfologia floral de *Dyckia racinae* (Bromeliaceae). Representações feitas em câmara clara. A-G. Microscópio estereoscópico. H. Microscópio de luz, em campo claro. A. Flor em antese. B. Corte longitudinal da flor em antese. C. Gineceu. D. Corte transversal do ovário, mostrando os três carpelos e os rudimentos. E. Estames conatos na base. F. Estame. G. Detalhe da antera, em vista ventral e dorsal. H. Inflorescência durante o desenvolvimento inicial dos botões.



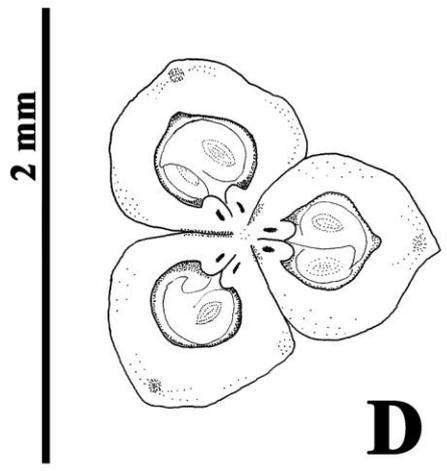
A



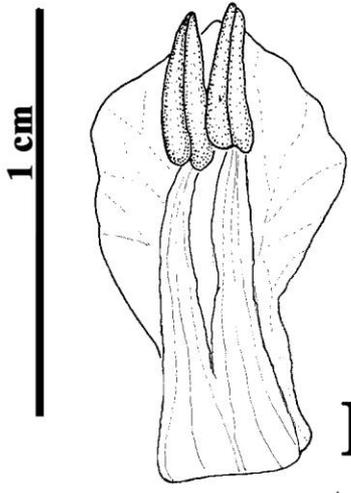
B



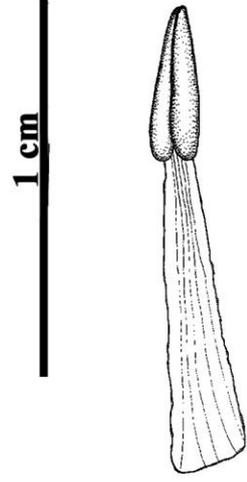
C



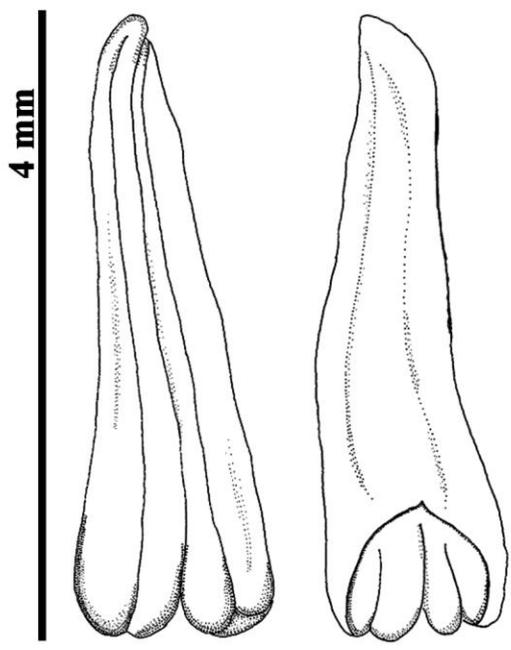
D



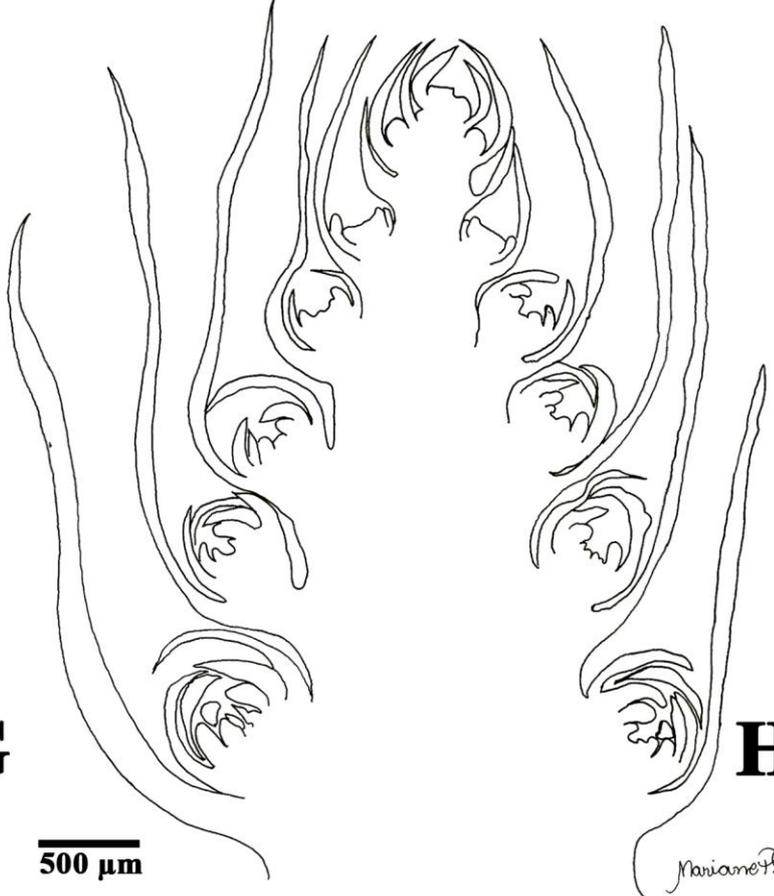
E



F



G

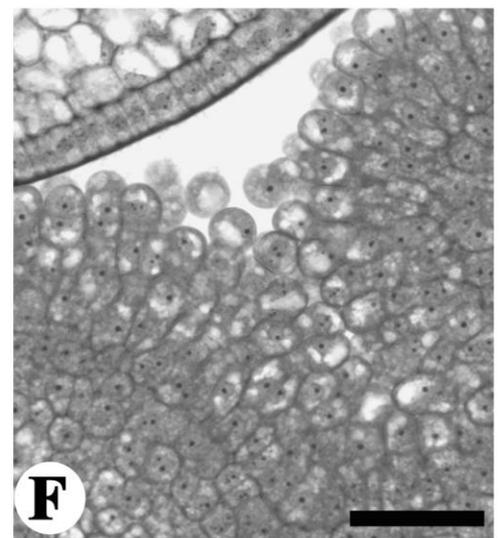
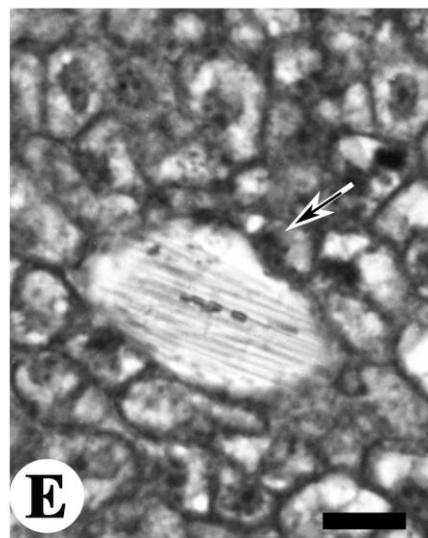
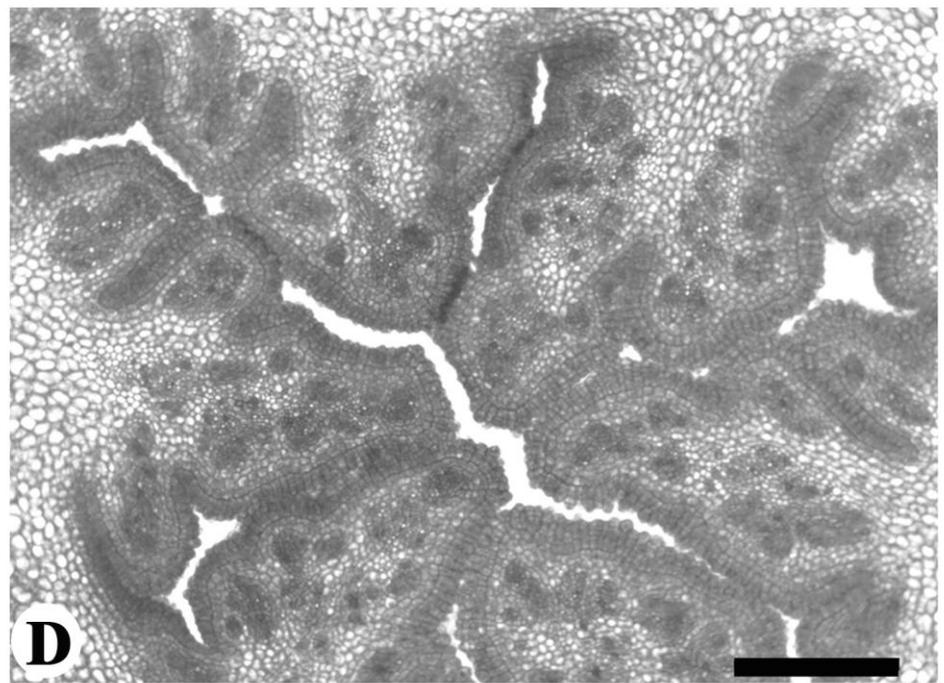
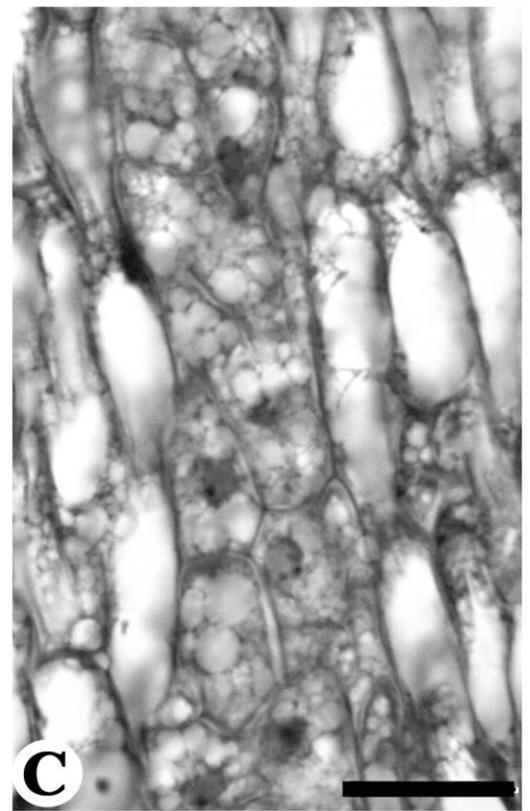
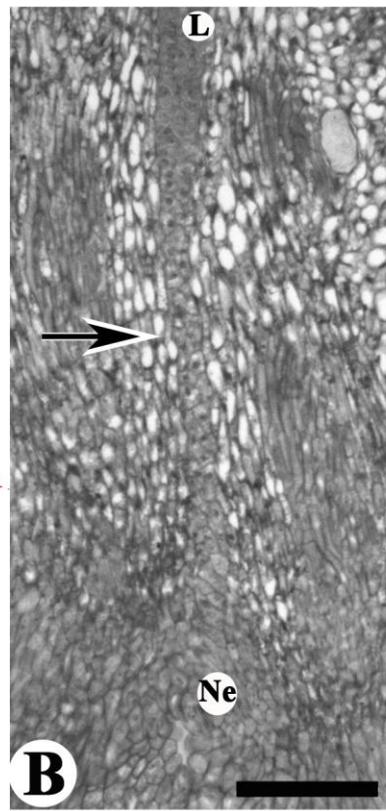
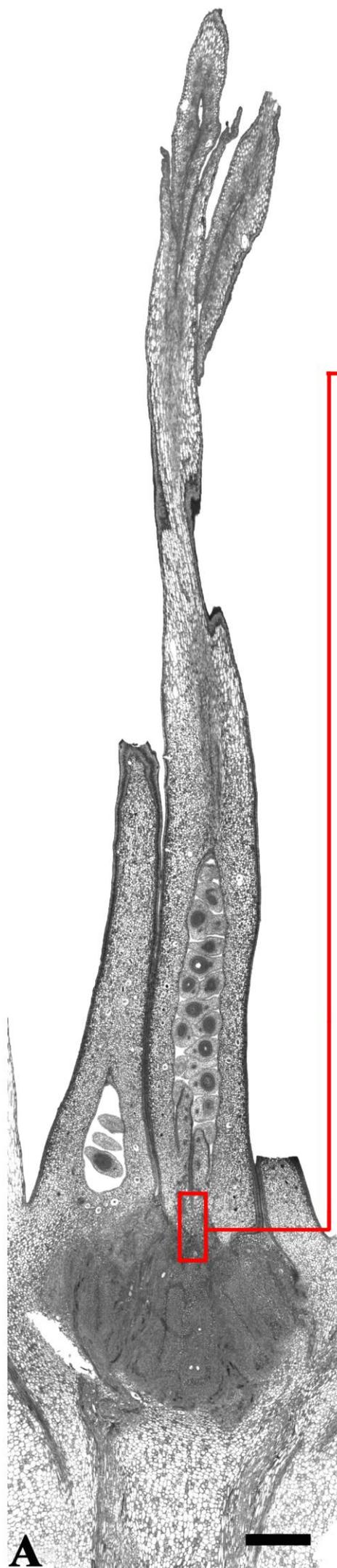


H

500 μ m

Mariano P.

Figura 1.4, A-F. Estrutura do nectário de *Dyckia racinae* (Bromeliaceae). Seções longitudinais em ML em A, B, C, D, E e F. A. Aspecto geral do ovário e do receptáculo. B. Detalhe mostrando a possível ligação (seta) do nectário (Ne) com o lóculo (L). C. Detalhe das células que fariam esta ligação. D. Corte transversal do nectário. E. Presença de ráfides (seta). F. Detalhe das células secretoras. . Barra = 20 μm em C e E =100 μm em B, D, F; =200 μm em D.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNARD, C. Floral histogenesis in the Monocotyledons. IV. The Liliaceae. **Australian Journal of Botany**, v. 8, p. 213-225, 1960.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
- BERNARDELLO, L. M.; GALETTO, L.; JULIANI, H. R. Floral nectar, nectary structure and pollinators in some Argentinean Bromeliaceae. **Annals of Botany**, (London), v. 67, p. 401-411, 1991.
- BLÜTHGEN, N.; VERHAAGH, M.; GOITÍA, W.; BLÜTHGEN, N. Ant nests in tank bromeliads – an example of non-specific interaction. **Insectes Sociaux**, v. 47, p. 313–316, 2000.
- CARPENTER, R.; COEN, E. S. Transposon induced chimeras show that floricaula, a meristem identity gene, acts non-autonomously between cell layers. **Development**, v. 121 (1), p. 19-26, Jan. 1995.
- CORSON, G. E. Jr. Cell division studies of the shoot apex of *Datura stramonium* during transition to flowering. **American Journal of Botany**, v. 56, p. 1127–1134, Nov-Dez, 1969.
- ENDRESS, P. K. Floral structure, systematics, and phylogeny in *Trochodendrales*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, V. 73, P. 297–324, 1986.
- ENDRESS, P. K. Symmetry in flowers: diversity and evolution. **International Journal of Plant Sciences**, v. 160 (6 Suppl.), p. 3-23, 1999.
- ESAU, K. **Anatomy of Seed Plants**. 2^a. ed. New York: John Willey e Sons, 1977.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique. Some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, p. 123-142, 1968.
- FREUDENSTEIN; J. V.; HARRIS, E. M.; RASMUSSEN, F. N. The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the vandoid complex. **American Journal of Botany**, v. 89(11), p. 1747–1755, 2002.

GABRIEL, B.L. **Biological Electron Microscopy**. Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1982.

GALETTO, L.; BERNARDELLO, L. M. Extrafloral nectaries that attract ants in Bromeliaceae: structure and nectar composition. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 1101–1106, 1992.

GERRITS, P. O.; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v. 132, p. 81-85, 1983.

GERSTERBERGER, P.; LEINS, P. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae) Anwendung einer neuen Präparationsmethode. **Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 91, p.381-387, 1978.

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

HANTKE, S.; CARPENTER, R.; COEN, E. S. Expression of floral meristem identity genes in single cell layers of periclinal chimeras can activate downstream homeotic genes in all layers of floral meristems. **Development**, V. 121 (1), p. 27-35, Jan. 1995.

KRIECK, C. **Ecologia Reprodutiva de *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides* (Gaud) Mez. (Bromeliaceae) em Costões Oceânicos em Florianópolis, Santa Catarina**. 2008, 67 f. Dissertação (Mestre em Ciências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LEROY, C.; CORBARA, B.; PÉLOZUELO, L.; CARRIAS, J. F.; DEJEAN, A.; CÉRÉGHINO, R. Ant species identity mediates reproductive traits and allocation in an antgarden Bromeliad. **Annals of Botany**, v. 109, p. 145–152, 2012.

LIU, Z.; RUNNING, M. P.; MEYEROWITZ, E. M. TSO1 functions in cell division during *Arabidopsis* flower development. **Development**, v. 124, p. 665–672, 1997.

- MARTINELLI, G. Manejo de populações e comunidades vegetais: um estudo de caso na conservação de Bromeliaceae. **Biologia da Conservação**, Essências. 1 ed. São Carlos: Rima, v. 1, p. 479-503, 2006.
- MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**. v. 59 (1), p. 209-258, 2008.
- MCCOY, R. W. Floral organogenesis in *Frasera carolinensis*. **American Journal of Botany**, v. 27, p. 600-609, Out. 1940.
- MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. R. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 1000, p. 405-414, 1976.
- MOÇO, M.C.C. **Desenvolvimento floral em *Adesmia latifolia* (spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae)**; 2002, 131 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- MOÇO, M. C. C.; MARIATH, J. E. A. Comparative floral ontogeny in *Adesmia* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae). **Australian Journal of Botany**, v. 57, p. 65–75, 2009.
- NUNES, E. L. P.; LIMA, M. C.; MOÇO, M. C. C.; COANA, A. I. Floral development in **Potamogeton** (Potamogetonaceae, Alismatales) with emphasis on gynoecial features. **Aquatic Botany**, v. 100, p. 56– 61, 2012.
- POSLUSZNY, U.; SATTLER, R. Floral development of *Potamogeton richardsonii*. **American Journal of Botany**, v. 61, p. 209–216, 1974.
- PRENNER, J. Floral Ontogeny in *Calliandra angustifolia* (Leguminosae: Mimosoideae: Ingeae) and Its Systematic Implications. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165 (3), p. 417-426, 2004.
- PRENNER, J. Floral development in *Daviesia cordata* (Leguminosae: Papilionoideae: Mirbelieae) and its systematic implications. **Australian Journal of Botany**, v. 52, p. 285–291, 2004.
- REMIZOWA, M. V.; KUZNETSOV, A. N.; KUZNETSOVA, S. P.; RUDALL, P. J.; NURALIEV, M. S.; SOKOLOFF, D. D. Flower development and vasculature in *Xyris*

grandis (Xyridaceae, Poales); a case study for examining petal diversity in monocot flowers with a double perianth. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, p. 93–111, 2012.

SAJO, M. G.; RUDALL, P. J.; PRYCHID, C. J. Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectaries in commelinid monocots. **Plant Systematic and Evolution**, v. 247, n. 3-4, p. 215-231(17), Ago. 2004.

SAMPAIO, D.; MOÇO, M. C. C.; MARIATH, J. E. A. Floral ontogeny of *Aeschynomene falcata* and *A. sensitiva* (Leguminosae: Papilionoideae) supports molecular phylogenetic data. **Plant Systematics & Evolution**, v. 299 (3), p. 499, 2013.

SATINA, S.; BLAKESLEE, A. F.; AVERY, A. G. Demonstration of the Three Germ Layers in the Shoot Apex of *Datura* by Means of Induced Polyploidy in Periclinal Chimeras. **American Journal of Botany**, v. 27, n.º. 10, p. 895-905, 1940.

SATINA, S.; BLAKESLEE, A. F. Periclinal Chimeras in *Datura stramonium* in Relation to Development of Leaf and Flower. **American Journal of Botany**, v. 28, n.º. 10, p. 862-871, 1941.

SCHMID, V. S.; SCHMID, S.; STEINER, J.; ZILLIKENS, A. High diversity of ants foraging on extrafloral nectar of bromeliads in the Atlantic rainforest of southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 45:1, p. 39-53, 2010.

SESSIONS, A.; NEMHAUSER, J.; MCCOLL, A.; ROE, J.; FELDMANN, K.; ZAMBRYSKI, P. ETTIN patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. **Development**, v. 124, p. 4481–4491, 1997.

TUCKER, S.C. The role of floral development in studies of legume evolution. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p. 692-700, 1992.

TUCKER, S. C. Floral ontogeny in *Sophoreae* (Leguminosae: Papilionoideae). I. *Myroxylon* (Myroxylon group) and *Catanospermum* (Angylocalyx group). **American Journal of Botany**, v. 80 (1), p. 65-75, 1993.

TUCKER, S. C. Trends in evolution of floral ontogeny in *Cassia* sensu stricto, *Senna*, and *Chamaecrista* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae: Cassiineae): a study in convergence. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 687–71, 1996.

TUCKER, S. C. Evolutionary lability of symmetry in early floral development. **International Journal of Plant Science**, v. 160(6 suppl.), p. 25-39, 1999.

TUCKER, S. C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**, v.131, p. 911-926, mar. 2003.

TUCKER, S. C.; GRIMES, J. The inflorescence: introduction. **The Botanical Review**, v. 65 (4), p. 303-316, Out. 1999.

VESPRINI J.L., GALETTO L., BERNADELLO G. The beneficial effect of ants on the reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae) an extrafloral nectary plant. **Canadian Journal of Botany**, v. 81, p. 24– 27, 2003.

CAPÍTULO III

ANATOMIA DA ANTERA EM

Dyckia racinae L.B.Sm.

INTRODUÇÃO

As bromeliáceas vêm sofrendo um grande declínio em suas populações, resultante da destruição dos habitats onde são encontradas, além da coleta extrativista realizada devido ao seu alto valor ornamental e o interesse que desperta aos colecionadores particulares (MARTINELLI, 2006). Várias espécies de Bromeliaceae, incluindo espécies de *Dyckia*, já estão incluídas na “Lista Vermelha” publicada pelo IUCN (2011). A Instrução Normativa para o estabelecimento da política Nacional da Biodiversidade caracteriza espécies em “ameaçadas” e com “deficiência de dados”. O entendimento de “deficiência de dados”, diz respeito a falta de informações de distribuição geográfica, ameaças/impactos e usos, entre outras (MMA, 2008). Embora *D. racinae* não esteja oficialmente na lista citada, atualmente a falta de informações científicas enquadraria a mesma na situação de um entendimento de deficiência de dados, pois, por exemplo, o conhecimento da distribuição da espécie é incompleto.

A família possui um número grande de gêneros questionáveis (BENZING, 2000) justificando a necessidade de trabalhos que contribuam para a determinação das espécies principalmente dos grupos mais problemáticos, que segundo Martinelli et al (2008) na Mata Atlântica são representados por *Aechmea*, *Cryptanthus*, *Neoregelia*, *Billbergia*, *Hohenbergia* e *Dyckia*. A necessidade dos trabalhos de base, como morfológicos e taxonômicos, se tornam cada vez mais importantes, em função da grande diversidade dos táxons e da deterioração de seus respectivos ambientes. Assim, as atividades de conservação são dificultadas pela falta de informações (MARTINELLI, 2006).

A descrição da estrutura e dos processos que envolvem a formação do esporângio e do gametófito pode ser aplicada em análises filogenéticas e taxonômicas (ENDRESS, 2005), onde a caracterização da antera e do grão de pólen é potencialmente informativa (FURNESS; RUDALL, 2001). Informações de diversas áreas do conhecimento, incluindo as embriológicas, são importantes para o estabelecimento de programas de conservação (MARTINELLI, 2006). Os aspectos embriológicos gerais para antera em Bromeliaceae consistem em aspectos da estrutura dos androsporângios, da morfologia das tétrades e dinâmica da meiose, além de aspectos do tecido tapetal e da estrutura do grão de pólen (DAVIS, 1966; JOHRI et al.,1992; FURNESS; RUDAL, 1998; SAJO, 2005). As informações para *Dyckia* são baseadas em estudos de poucas espécies. Dados sobre estrutura básica da

antera, tipo de espessamento do endotécio, e esterilidade tapetal e polínica foram descritos para *Dyckia hebdingii* L. B. Sm. (SAJO et al., 2005). *Dyckia pseudococcinea* L.B.Sm (MENDES; COSTA; DE TONI, 2012) recebeu análise detalhada sobre a formação dos estames, principalmente dos esporângios, além da esporogênese e gametogênese, tendo as autoras explorado suas informações de pesquisa como base para cultura *in vitro* de anteras e de grãos de pólen aplicáveis a programas de conservação. Considerando que *Dyckia* possui cerca de 130 espécies (LUTHER, 2008), fica evidente que os estudos embriológicos atuais, embora relevantes, ainda não podem ser considerados para efeitos de generalização do referido táxon.

Com base nas informações apresentadas acima, este trabalho busca descrever a embriologia com ênfase na estrutura da antera e do pólen de *Dyckia racinae*, caracterizando aspectos de desenvolvimento inicial dos esporângios, além da androsporangênese e da androgametogênese.

MATERIAL E MÉTODOS

O processamento e a análise do material foram realizados no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Biologia, CCNE/ UFSM. O material botânico foi coletado no município de São Pedro do Sul, RS, Brasil, nas coordenadas geográficas 29° 35' 22,2'' S e 54° 49' 49,4'' W. Cabe salientar que 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 (Fig. 2.1).

O material testemunho de *Dyckia racinae* encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria – SMDB, com registro 13840. No laboratório da UFSM está sendo mantida uma coleção líquida dos materiais coletados para as análises histológicas, com registro de coleta. Um indivíduo está sendo mantido em coleção viva, sob numeração de registro 0286, na casa de vegetação do Laboratório de Anatomia Vegetal na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).



Figura 2.1, Morro em São Pedro do Sul/RS, onde foi feita a coleta de *Dyckia racinae*. Foto: João Marcelo Santos de Oliveira.

Flores em diversos estádios de desenvolvimento foram coletados (Fig. 1.2 E). Para a análise em Microscopia de luz, em campo claro (ML) o material foi fixado em glutaraldeído 1% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,2 (GABRIEL; 1982; MCDOWELL; TRUMP, 1976), no qual foi adicionado Tween20 2ml/L (FREUDENSTEIN; HARRIS; RASMUSSEN, 2002). Após a fixação o material foi submetido ao vácuo, seguido de lavagem em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,2 (GABRIEL; 1982) e desidratado em série etílica. Posteriormente à desidratação, o material foi submetido a soluções de clorofórmio e etanol absoluto (1:3, 1:1, 3:1, 1:1 e 1:3), finalizando a desidratação com uma etapa de etanol absoluto. O material foi pré-infiltrado com uma solução de hidroxietilmetacrilato (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 de Teflon até sua polimerização (GERRITS; SMID, 1983).

As seções, de 3 μ m de espessura, feitas em micrótomo rotativo Leica RM2245, foram coradas com Azul de Toluidina O 0,05% pH 4.4 em tampão de benzoato de sódio (FEDER;

O'BRIEN, 1968). As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio Leica DM2000 com sistema de captura digital de imagem DFC 295.

A análise do espessamento do endotécio foi realizada através da dissociação de anteras maduras em ácido láctico 60%, montadas em lâminas semi-permanentes com glicerina alcoólica (MANNING, 1996) e analisadas em microscopia de luz polarizada.

Para a realização dos testes histoquímicos, as seguintes técnicas foram utilizadas: Ácido periódico-Reativo de Schiff (PAS), para polissacarídeos totais (O'BRIEN; MCCULLY, 1981); Alcian Blue (8GX), para a detecção polissacarídeos da esporoderme (LILLIE, 1965); Sudan Black B, para a localização de lipídios (SASS, 1951); Sudan III, para a localização de substâncias lipídicas (*pollenkitt*) (O'BRIEN; MCCULLY, 1981), para esse teste utilizou-se pólen de anteras maduras maceradas; Coomassie Blue 0.1%, para compostos proteicos (HESLOP-HARRISON et al., 1973); para a identificação do amido foi utilizado IKI (solução de Lugol) (JOHANSEN, 1940); Vermelho de Rutênio para mucopolissacarídeos ácidos e ácidos pécticos (JENSEN, 1962); Auramina O em concentração 0,01%, para a detecção de lipídios na esporoderme (NEPI; FRANCHI 2000); Calcofluor White, em solução aquosa 0,01% para celulose (HUGHES; MCCULLY, 1975); Azul de Anilina, para calose (MARTIN; 1959); Sudan Red 7B, detecção dos lipídios totais; (BRUNDRETT; KENDRICK; PETERSON, 1991); Nile Red, permite detectar lipídios, discriminando lipídios polares e não polares (GREENSPA; MAYER; FOWLER, 1985; DIAZ et al., 2008). A combinação de Ácido periódico-Reativo de Schiff (PAS) (O'BRIEN; MCCULLY, 1981), Azul de Astra 1, 5 % em solução aquosa e Fucsina Básica 0,05 % em solução aquosa (KRAUS et al., 1998).

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) o material foi processado conforme Gersterberger e Leins (1978) e submetido à secagem através de ponto crítico com o uso do equipamento BAL-TEC, CPD 030, no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME/UFRGS). Em seguida, as amostras foram montadas em suportes de alumínio e recobertas com ouro no aparelho metalizador BAL-TEC, SCD 050. A análise e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio JEOL 6060, sob 20kV (CME/UFRGS).

A metodologia para a microtomia de congelamento foi realizada com auxílio do Dr. Rinaldo Pires dos Santos, no Laboratório de Anatomia Vegetal na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde tal metodologia se encontra em preparação para publicação e foi solicitado a não divulgação da mesma. Micrótopo: Criostato Leica CM1850.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primórdios estaminais depois de projetados adquirem, em seus estádios iniciais, um formato elipsóide, em secção transversal. Nessa fase as células do primórdio, de maneira geral, são poliédricas e isodiamétricas, o núcleo é volumoso com heterocromatina periférica e, usualmente, apresenta um nucléolo; no citoplasma também é possível identificar a presença, embora pouco evidente, de vacúolos (Fig. 2.2 A).

Com o crescimento, os primórdios desenvolvem um formato trapezoidal, revelado pela secção transversal mediana, onde é possível identificar a protoderme uniestratificada, o meristema fundamental e, próximo à região central, o tecido pró-vascular, cujas células são relativamente menores, além de apresentarem citoplasma denso (Fig. 2.2 B e C). Na protoderme ocorrem apenas divisões anticlinais (Fig. 2.2 C). No tecido fundamental é possível identificar divisões periclinais, anticlinais e oblíquas (Fig. 2.2 C). O estame em secção longitudinal apresenta leve curvatura em função da expansão vacuolar nas células da região dorsal (Fig. 2.2 G).

Na fase posterior, células da região dorsal da antera, situadas entre a epiderme e a região dos feixes vasculares, se caracterizam pela presença de vacúolos proeminentes (Fig. 2. H). A região central do conectivo é formada por células do tecido pró-vascular, que sofrem divisões dando origem a derivadas de menor diâmetro, mais alongadas horizontalmente e com citoplasma denso (Fig. 2.2 E e G). A protoderme, diferenciada em epiderme, acompanha o crescimento em volume do primórdio estaminal através de divisões anticlinais. O crescimento na região ventral, onde ocorre no sentido radial, através de divisões periclinais da camada subdérmica (Fig. 2.2 D). Diferentes padrões de desenvolvimento são necessários para que a antera inicie a projeção de seus esporângios, sendo possível considerar o formato bilobado um momento crítico durante sua formação. Davis (1966) e Pozner (2011), entre outros, propõem que o desenvolvimento inicial dos esporângios acontece através de divisões periclinais em células que possuem características meristemáticas, localizadas na camada subdérmica dos primórdios, formando as iniciais subdérmicas. Como descrito para a espécie, são as células localizadas na camada subdérmica as responsáveis pela formação dos esporângios.

Durante o período de diferenciação dos esporângios, células da camada subdérmica se dividem periclinamente formando as células precursoras da camada parietal primária (CPP) e das células esporogênicas (CE), voltadas para a epiderme e as células precursoras do tapete

interno (Fig. 2.2 H e I). Posteriormente, as células subjacentes à epiderme sofrem uma divisão periclinal originando a camada parietal primária (CPP) e as células esporogênicas (CE) (Fig. 2.3 A e B). Após essa divisão acontecer, as células precursoras do tapete interno também sofrem divisões mitóticas, iniciando o acúmulo de células na porção interna do esporângio. De maneira geral, o esporângio em diferenciação apresenta células com formato retangular, ou levemente isodiamétricas, além do citoplasma denso (Fig. 2.3 A e B).

A literatura nos mostra que ainda existem divergências com relação à origem do tapete interno. Este poderia ser gerado através da diferenciação das camadas de células esporogênicas que estão em contato com o conectivo (BOKE, 1949), pela diferenciação das células do conectivo (VIJAYARAGHAVAN; RATNAPARKHI, 1973; GUPTA; NANDA, 1978; NANDA; GUPTA, 1978) ou do tecido central, que ainda mantendo características meristemáticas, daria origem ao tapete interno e ao conectivo (BITTENCOURT, 1995; BITTENCOURT; MARIATH, 1997; OLIVEIRA; MARIATH; BUENO, 2001; MOÇO, 2002). Em *Dyckia pseudococcinea* L.B.Sm. o tapete interno se originaria das células esporogênicas, diferenciando-se destas por seu formato retangular, em seção transversal, em vez de isodiamétrico (MENDES; COSTA; DE TONI, 2012). Por outro lado em *D. racinae* as análises sugerem que as células precursoras do tapete interno teriam origem no início do desenvolvimento, a partir da camada subdérmica, como em *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) (OLIVEIRA, 2001).

Gradualmente a antera assume uma forma tetralobada (Fig. 2.3 C). As células que constituem o conectivo são menos densas, se distribuindo em torno de tecido pró-vascular e entre os esporângios. Possivelmente o número de camadas do conectivo na região dorsal e ventral é o mesmo, mas as células dorsais se distinguem das ventrais pelos vacúolos proeminentes e espaços intercelulares, sendo que essa organização contribui para a expansão da região dorsal. A diferenciação de idioblastos cristalíferos, próximos ao tecido pró-vascular, inicia nesse estágio (Fig. 2.3 C), sendo comuns mitoses acitocinéticas, seguidas de fusões nucleares (Fig. 2.4 C).

A CPP se divide periclinalmente formando a camada parietal secundária externa (CPSE) e a camada parietal secundária interna (CPSI) (Fig. 2.3 D). Nesta fase as células iniciais esporogênicas são maiores e apresentam núcleos bem proeminentes, além de começar a sofrer sucessivas mitoses formando o tecido esporogênico e dando forma aos esporângios (Fig. 2.4 D). Em seguida, as células derivadas da CPSE e da CPSI dão origem aos estratos parietais, que logo após a divisão se apresentam com formato retangular. A seguir as células apresentam crescimento tangencial devido a menor frequência de divisões anticlinais e ao

crescimento do tecido esporogênico no centro de cada esporângio. As derivadas da CPSE resultam no endotécio e na camada média externa, as derivadas da CPSI formam a camada média interna e o tapete (Figs. 2.3 E e F). Com base nas características de desenvolvimento dos estratos parietais descritas, se considera que o padrão de formação em *D. racinae* é do tipo básico (DAVIS, 1966).

Mesmo com a predominância do padrão monocotiledôneo entre as espécies de Bromeliaceae (DAVIS, 1966; JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992; SAJO et al. 2005) essa classificação não deve ser tomada como uma generalização dentro da família. Já que o padrão básico foi descrito para as espécies de *Vriesea carinata* Wawra (SARTORI, 2008) e *Dyckia pseudococcinia* (MENDES; COSTA; DE TONI, 2012) e também é observado em Rapateaceae, família basal próxima de Bromeliaceae (VENTURELLI; BOUMAN, 1988), recomendam mais estudos que abranjam um número maior de espécies. Mendes, Costa e De Toni (2012) sugerem que o tipo básico encontrado em *D. pseudococcinia* seria uma reversão a um estado plesiomórfico, uma vez que espécies de *Dyckia* caracterizam-se como derivadas em filogenias de Bromeliaceae.

Epiderme

A epiderme é uniestratificada (Fig. 2.6 A) durante todo o desenvolvimento da antera, acompanhando o crescimento do esporângio através de divisões anticlinais. As células epidérmicas, durante o processo de diferenciação, se tornam papilosas (Fig. 2.6 B) e sua parede periclinal externa se torna mais espessa, principalmente na região central, através de incremento de material péctico, celulósico e lipídico (Fig. 2.6 C-H). Estrias epicuticulares são observadas (Figs. 2.6 I e J). O incremento de material, que acaba gerando a papilosidade, inicia durante o crescimento radial das células do endotécio, estando totalmente finalizado após o depósito dos espessamentos fibrosos do mesmo (Figs. 2.6 A e B).

As células estomiais (Figs. 2.7 A-C), localizadas entre os esporângios, no local onde irá ocorrer a deiscência da antera, não apresentam crescimento celular após a fase de tétrade, ao contrário das demais células, principalmente as células adjacentes, que apresentam arranjo e paliçada (Figs. 2.7 B e C). As células estomiais no início de seu desenvolvimento se apresentam vacuoladas (Fig. 2.7 A) e próximo à liberação do andrófito não é possível mais visualizar vacúolos (Figs. 2.7 B e C).

Endotécio

O endotécio em *D. racinae* se apresenta uniestratificado (Figs. 2.3 F e 2.4 B), como já descrito para outras espécies da família Bromeliaceae (SAJO et al., 2005; SARTORI, 2008; MENDES; COSTA; DE TONI, 2012; SPAT, 2012). Sendo a família considerada basal dentro do grupo das Poales (LINDER; RUDALL, 2005) este resultado vai de encontro com o que foi colocado por Bhandari (1984) em que a presença de múltiplas camadas no endotécio pode ser considerada uma característica plesiomórfica, já que é comum em famílias relativamente mais primitivas, e existe uma tendência filogenética para a redução desse tecido.

Durante o período de diferenciação das células-mãe de andrósporo as células do endotécio começam a mostrar um aumento considerável de seu volume celular, além de um alongamento anticlinal. Após a primeira meiose dos andrósporos, as células que fazem parte do endotécio já apresentam espessamento composto por celulose e polissacarídeos (Figs. 2.7 D e E), os quais se lignificam (Figs. 2.6 B).

São observados espessamentos em forma de “U”, dos quais é comum se desenvolverem ramificações na porção voltada para parede periclinal interna (Figs. 2.7 F-H). O espessamento em forma de “U” foi verificado nas espécies *Vriesea carinata* (SARTORI, 2008), *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. (SPAT, 2012) e *Dyckia brevifolia* Baker (MANNING, 1996), não tendo sido descritas ramificações como no presente estudo. O espessamento helicoidal foi encontrado em todas as espécies de Bromeliaceae analisadas por Sajo et al. (2005), incluindo *D. hebdingii*, assim como em *D. pseudococcinea* (MENDES; COSTA; DE TONI 2012).

Camada média

Observa-se a presença de duas camadas médias com duas origens em *D. racinae*, uma da CPSi e outra da CPSe. Suas células são alongadas anticlinalmente durante a diferenciação, mostrando uma redução bastante drástica em sua espessura na fase de CMA (Fig. 2.5 B).

Durante o processo de maturação da antera a camada média se degenera, sendo considerada efêmera (BHANDARI, 1984; JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992). A redução nas células da camada média pode estar relacionada com uma economia de espaço

necessária durante este estágio de desenvolvimento. Cabe salientar que com a diferenciação dos estratos parietais as células do tapete aumentam seu volume assim como as células do tecido esporogênico (Fig. 2.4 G e 2.5 B) e possivelmente pelo menos uma parte desse espaço seria cedida pela degeneração da camada média.

Tapete

Durante o início da diferenciação do tapete, que acontece na fase de proliferação do tecido esporogênico, suas células apresentam citoplasma denso, com pequenos vacúolos, núcleo volumoso com nucléolo e heterocromatina conspícuos (Fig. 2.3 F). Com o crescimento do esporângio as células do tapete sofrem divisões em diversos planos dando ao tecido um arranjo irregular, bem característico, que pode se apresentar em algumas regiões do esporângio com até três camadas (Fig. 2.4 B).

No início da meiose já são observadas células tapetais binucleadas (Fig. 2.5 B). Fusões entre os núcleos também são identificadas, formando células tapetais com núcleos bem volumosos, contendo dois ou mais nucléolos (Fig. 2.5 B). As células aumentam de tamanho e se projetam em direção ao lóculo do esporângio (Figs. 2.5 B, E e H). Vacúolos evidentes, armazenando polissacarídeos também são encontrados (Figs. 2.5 B e E). Ainda durante a prófase meiótica se observa aumento da densidade citoplasmática, mobilização dos açúcares acima citados e vacuolação das células. A mobilização dos açúcares é concomitante ao aumento do espessamento das paredes calósicas observada nos meiócitos (Figs. 2.5 G-I). Nas próximas etapas da meiose as células adquirem uma densidade citoplasmática maior e o citoplasma se retrai (Fig. 2.7 J), provavelmente já indicando a morte das células tapetais. Não foram observadas células do tapete entre os meiócitos e suas paredes celulares ainda podem ser identificadas, mesmo na fase de tétrade onde estas já se encontram em degradação (Fig. 2.7 L).

Durante a liberação dos andrósporos da calose, as células do tapete entram em colapso, podendo durante tal fase e logo após se perceber o rompimento da parede celular (Figs. 2.7 L). Com a degeneração ocorre a liberação no fluido locular de material lipídico que formará o *pollenkitt* (Fig 2.12 A). Células tapetais colapsadas são observados no fluido locular, principalmente na periferia do lóculo (Fig. 2.7 L). Após a primeira mitose do

andrósporo apenas a membrana tapetal pode ser visualizada junto à camada média colapsada (Fig. 2.7 M).

A degeneração das células do tapete pode ser resultante de uma morte celular programada, que possivelmente se encontra relacionada com a importância que os restos celulares liberados no fluido locular, têm para o desenvolvimento de andrófitos viáveis (PAPINI; MOSTI; BRIGHIGNA, 1999). As características que precedem a morte celular programada são a redução geral da célula e do núcleo, a condensação da cromatina na periferia da membrana nuclear, o aumento dos retículos endoplasmáticos e a persistência das mitocôndrias junto com os microtúbulos até os últimos estágios de degeneração do tapete, está última relacionada a necessidade do fornecimento de energia e da manutenção da forma da célula por mais um tempo mesmo depois da parece celular ter sido rompida (PAPINI; MOSTI; BRIGHIGNA, 1999). No contexto do processo reprodutivo, outro exemplo que pode ser citado de morte celular programada é a degeneração de três células resultantes da meiose no gametófito feminino, restando apenas o megásporo funcional e possivelmente nesse caso a deposição assimétrica de calose na tétrade estaria relacionada à escolha de quais células irão degenerar (PAPINI et al., 2011).

O tapete é um tecido especializado no fornecimento de nutrientes essenciais ao desenvolvimento dos andrósporos (BHANDARI, 1984; PACINI; FRANCHI; HESSE, 1985; BATYGINA, 2002). Sua função nutritiva provavelmente começa após a diferenciação dos estratos parietais, sendo inicialmente mais sutil devido à presença da parede celular nas células arqueosporias e, mais tarde, da calose nos meiócitos. A perda das paredes citadas intensifica o fluxo de nutrientes (PACINI; FRANCHI; HESSE, 1985). Suas células exercem a função secretora (PACINI, 1997) estando envolvidas na síntese e liberação de materiais que participam da deposição de *tryphine* e *pollenkitt* (BHANDARI, 1984), assim como a liberação da enzima responsável pela despolimerização da parede de calose das tétrades (MEPHAM; LANE, 1969; STIEGLITZ, 1997). É usualmente multinucleado, sendo a variação no número de núcleos dependente do estágio de desenvolvimento e do tipo de tapete (PACINI, 1997). No estágio de CMA as células possuem apenas um núcleo (PACINI, 1997). Problemas no tapete podem resultar em esterilidade polínica (BHANDARI, 1984).

Foi observado para *D. racinae* o tapete do tipo secretor, predominante entre as Angiospermas (PACINI; FRANCHI; HESSE, 1985) inclusive nas Angiospermas basais (FURNESS; RUDALL, 2001a), considerado o mais primitivo entre todos os tipos de tapete (PACINI; FRANCHI; HESSE, 1985). Em Poales o tipo secretor é considerado o mais comum (FURNESS; RUDALL, 2001), descrito também para Bromeliaceae por Johri (1992) e Davis

(1966), embora Furness e Rudall (1998) tenham descrito como plasmodial. O tipo secretor também foi observado em *D. pseudococcinia* (MENDES; COSTA; DE TONI 2012), onde a degeneração das células tapetais foi descrita por iniciar durante a meiose.

No tapete do tipo secretor as células permanecem na posição original e degeneram posteriormente (BATYGINA, 2002) e o lóculo se mantém cheio de fluido responsável pela transmissão dos nutrientes aos andrófitos (PACINI, 1997). Durante as fases iniciais de desenvolvimento do tecido secretor, as células demonstram uma forte polarização, absorvendo nutrientes em um dos polos e liberando os produtos produzidos pelo polo secretor (PACINI, 1997). Com relação à vantagem e desvantagem desse tipo de tapete, podemos citar, respectivamente, que as anteras podem ser grandes e conter muitos andrósporos por lóculo, mas com isso têm que manter os lóculos cheios de fluido para evitar a desidratação e permitir a transferência de nutrientes a todos os andrósporos, o que pode se tornar um problema em ambientes áridos (PACINI; FRANCHI; HESSE, 1985). Mesmo assim, o tipo secretor é mais comum em plantas que se desenvolvem em ambientes secos (PACINI; FRANCHI; HESSE, 1985), estando *D. racinae* localizada em um ambiente mais favorável ao stress hídrico, logo estaria corroborando com esta informação.

Ráfides

Idioblastos cristalíferos, nos quais se diferenciam ráfides, são encontrados no conectivo, principalmente próximos aos feixes vasculares, na região estomial e na camada subdérmica conectival (Fig. 2.8 A-B). Começam a se diferenciar durante a proliferação do tecido esporogênico (Fig. 2.4 A e C) e aqueles que estão localizados na região do estômio alcançam seu total desenvolvimento próximo ao período de deiscência da antera (Fig. 2.8 CF).

Na espécie *Capsicum annum* L. os idioblastos cristalíferos também são encontrados na região do conectivo e do estômio, e como em *D. racinae* também apresentam uma pequena diferença no desenvolvimento, sendo os da região conectival os primeiros a acumular cristais devido a sua proximidade com a região vascular (HORNER; WAGNER, 1980).

Os cristais de oxalato de cálcio resultariam do metabolismo (PRYCHID; RUDALL, 1999) celular e poderiam ser acumulados para servir como reservatório de cálcio ou como

defesa contra a herbivoria (PRYCHID; RUDALL, 1999; WEBB, 1999; RUDALL, 2007) ou ainda envolvidos no processo de deiscência da antera (HORNER; WAGNER, 1980).

A presença ou ausência de cristais nas plantas pode servir como caracteres taxonômicos importantes em alguns grupos de plantas (PRYCHID; RUDALL, 1999; WEBB, 1999). As ráfides são o tipo de cristais mais comuns entre as monocotiledôneas (PRYCHID; RUDALL, 1999) e são um dos caracteres utilizados por Gilmartin e Brown (1987) para entender as relações filogenéticas entre os táxons incluindo as Bromeliaceae.

Androsporogênese e Androgametogênese

Com o estabelecimento dos quatro esporângios e a diferenciação dos estratos parietais (FIGS. 2.4 A, B, F e G), as divisões mitóticas que vinham ocorrendo em ritmo acelerado no tecido esporogênico diminuem sua frequência e as células aumentam de volume, assim como sua densidade citoplasmática e o tamanho de seus núcleos, além de pequenos vacúolos (Fig. 2.4 E). Nessa fase não foram encontrados grãos de amido nas CMA, embora sejam comuns no endotécio e camada média.

Com o início do processo meiótico as células do tecido esporogênico se diferenciam em células-mãe de andrósporo (CMA), alcançando seu tamanho máximo, não apresentam mais vacúolos e o núcleo ocupa uma grande parte do citoplasma (Fig. 2.5 C e F). O depósito de calose inicia pelos vértices das CMA e se expande ao redor de toda a célula (Fig. 2.5 I). Canais citoplasmáticos interligam as CMA, sendo possível, também, observar plasmodesmos (Fig.2.5 D).

Durante a prófase, se observa que os meiócitos iniciam separação da lamela média, o que origina espaços intercelulares típicos através de todo o tecido (Fig. 2.5 G e I). Acredita-se que a funcionalidade do processo residiria na facilitação de distribuição de enzimas tapetais que atuariam na dissolução dos diferentes carboidratos que ocorrem na parede das células mãe de andrósporos e a própria calose. Cabe salientar que o tecido meiótico é volumoso em *D. racinae*, quando observado em seção transversal, e se o mesmo se mantivesse compacto o tempo de dissolução periférica e central poderia ser relativamente diferente. Além disso, a sugestão de separação ou desagregação da lamela média parece interessante para explicar que a mínima inserção de enzimas para tornar o tecido frouxo poderia gerar dissolução assimétrica

da calose. Espaços intercelulares similares são observados em *D. pseudococcinea*, através da análise das imagens publicadas em trabalho de Mendes, Costa e De Toni (2012).

Foi observada uma acentuada sincronia entre os meiócitos de um mesmo esporângio. No final da meiose I, uma parede de calose separa as díades (Figs. 2.9 B e C), como resultado de uma meiose do tipo sucessiva. A meiose do tipo sucessiva é descrita como predominante para Bromeliaceae, sendo descrita para muitos gêneros (LAKSHMANAN, 1967; HESS, 1991; FURNESS; RUDALL, 1999; SAJO et al., 2005; SARTORI, 2008; SPAT, 2012) assim como para *D. pseudococcinea* (MENDES; COSTA; DE TONI, 2012). Após a meiose II ocorre a citocinese formando tétrades isodiamétricas ou decussadas (Figs. 2.9 D-G). A primexina começa a se formar um pouco antes da dissolução total da calose (Fig. 2.9 D).

Com a liberação dos andrósporos no fluído locular, após a dissolução da calose, mudanças importantes para o desenvolvimento deste se iniciam. Um período de rápida e considerável expansão de seu volume é observado, ao mesmo tempo em que ocorre o espessamento da esporoderme através da deposição da exina e intina (Fig. 2.9 H). Vários vacúolos com formato irregular começam a se desenvolver (Fig. 2.9 H), formando mais tarde dois vacúolos maiores responsáveis pelo deslocamento do núcleo para a região polar, ou polo generativo (Fig. 2.9 J), o que foi observado como mais comum durante o desenvolvimento. Pequenos grãos de amido são visualizados nesta fase dispersos pelo citoplasma (Fig. 2.9 I), marcando o início da amilogênese.

Posterior a todas estas transformações, acontece à primeira divisão mitótica, assimétrica, originando a célula vegetativa e a célula generativa (Fig. 2.9 L e M). Não há sincronia entre as mitoses em um mesmo esporângio, podendo se observar em um mesmo corte diversas fases mitóticas, dessincronia que continua sendo observada nos estágios que seguem. Durante a citocinese a célula generativa adquire formato lenticular e usualmente se localizada no polo generativo oposto à abertura, comprimida contra a esporoderme (Fig. 2.10 A). A célula vegetativa acaba ficando com a maior parte do citoplasma, seu núcleo inicialmente apresenta uma forma irregular com nucléolo proeminente, mas com a retomada de sua posição central o núcleo adquire formato esférico (Fig. 2.10 A). A parede que separa as células possui constituição péctica e celulósica, a qual se mostra contínua a intina em formação (Figs. 2.9 N e 2.11 D).

Nos estágios subseqüentes do desenvolvimento, a célula generativa começa a ser englobada pela vegetativa (Fig. 2.10 C), os grandes vacúolos que polarizaram anteriormente o andrósporo, gradualmente reduzem em tamanho e acabam desaparecendo (Fig. 2.10 C). A célula generativa, quando totalmente englobada, se torna esférica e segue para a região central

do andrófito (Fig. 2.10 D e E) onde adquire formato fusiforme (Fig. 2.10 F), o núcleo da célula vegetativa também sofre alterações em sua forma (Fig. 2.10 E e F). Essas alterações caracterizam a formação da unidade germinativa masculina (Fig. 2.10 H).

Em *D. racinae* os andrófitos são apresentados como bicelulares quando liberados das anteras (Fig. 2.10 I), com uma abertura (Fig. 2.14 D e E), apresentando uma esporoderme constituída por exina, mais externa e resistente, e intina mais interna (Fig. 2.11 E e C, 2.14 D-F), como descrito para a família em outros trabalhos (JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992; DAVIS, 1966; LAKSHMANAN, 1967; CONCEIÇÃO, 2005).

A presença de grãos de amido dispersos no citoplasma da célula vegetativa no momento em que atinge a seu ápice (Fig. 2.10 G) é marcada por uma progressiva assimilação dessas reservas durante as fases seguintes, resultando em andrófitos maduros sem amido no momento da dispersão. Este amido poderia estar sendo hidrolisado para a forma de polissacarídeos armazenados no citoplasma, o que explicaria a reação positiva encontrada no teste de PAS dos andrófitos durante o processo de maturação (Figs. 2.11 B e C). No andrófito maduro ainda é possível identificar estes polissacarídeos mesmo que em uma quantidade bem reduzida. Baker e Baker (1979) também observaram que o andrófito em Bromeliaceae é disperso sem amido, sendo classificado como do tipo *starchless*, rico em açúcares e óleos.

Lipídios polares e apolares foram identificados no citoplasma dos andrófitos maduros, através de testes histoquímicos (Figs. 2.11 A, 2.13 B e C). A maior intensidade de fluorescência específica foi observada para os lipídios polares (Fig. 2.13 C), sugerindo haver uma secreção em maior quantidade do que a dos lipídios apolares (Fig. 2.13 B).

Os andrófitos do tipo *starchless* tendem a ter um tamanho reduzido, produzidos em grandes quantidades e ricos em lipídios, servindo como parte da recompensa recebida por abelhas e moscas (BAKER; BAKER, 1979). As abelhas possivelmente utilizariam esses óleos no desenvolvimento das larvas, na construção de ninhos e até mesmo para a nutrição dos adultos (BUCHMAN, 1987). Krieck (2008) ao investigar os visitantes florais na espécie de *D. racinae* coletava néctar e pólen das flores visitadas, sendo que os demais visitantes em sua maioria procuravam apenas pelo néctar. A constatação da presença de lipídios no andrófito maduro de *D. racinae*, tanto no citoplasma quando aderidos na exina como *pollenkitt*, poderia ter como uma de suas possíveis funções atrair um número maior e mais diversificado de visitantes florais, e conseqüentemente polinizadores. Sendo a espécie *D. racinae* classificada com tendo um sistema de autoincompatibilidade, formando sementes viáveis apenas através da polinização cruzada (KRIECK, 2008), sugerindo-se assim a importância da manutenção de um variado número de polinizadores.

A presença no andrófito maduro de compostos altamente energéticos, sugere que estes possam ter um papel importante nas estratégias de polinização de *D. racinae*, contribuindo assim para o sucesso do processo de fecundação.

A exina em *D. racinae* possui como constituintes proteínas e lipídios (Tabela 1) (Figs. 2.11 E e F, 2.13 A). A participação de enzimas na síntese de esporopolenina foi discutida por Santos (2000) em *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (Aquifoliaceae), no entanto, essa participação não seria estrutural, já que não se observa nitrogênio entre os elementos formadores da mesma (KAWASE; TAKAHASHI, 1995). Assim, as proteínas encontradas, nesse estudo, não participariam da estrutura da exina, mas associadas a esta, sugerindo uma origem esporofítica, que a literatura comprova como sendo resultado da degradação tapetal. As proteínas e os lipídios encontrados entre as ondulações da exina (Fig. 2.14 C) podem estar relacionados às mais variadas funções, como a adesão do pólen a polinizadores, manutenção da hidratação durante sua dispersão, protegendo o grão de pólen dos efeitos da radiação solar e do ataque de possíveis patógenos. Além de participar dos processos de reconhecimento do grão de pólen ao estigma receptivo, interferindo diretamente nos processos de germinação (PACINI; FRANCHI, 1993; PIFFANELLI; ROSS; MURPHY, 1998; EDLUND; SWANSON; PREUSS, 2004).

Foi possível identificar que o *pollenkitt* está presente em forma de gotículas lipídicas aderidas a superfície externa do grão de pólen e entre as ondulações da exina (Figs. 2.11 G, 2.12 A - B). O *pollenkitt* se forma no final da degeneração do tapete (PACINI, 1997) ele pode ser produzido independentemente do tipo de tapete, plasmodial ou secretor (PACINI; HESSE, 2005), sendo depositado em volta da exina de maneira homogênea ou não (PACINI; HESSE, 2005). Ele começa a desempenhar sua função assim que a antera se abre e continua durante a dispersão do pólen e *racinae* identificou entre eles a presença de três espécies de abelha colocando que esta possivelmente cessa quando o pólen se reidrata no estigma (PACINI; HESSE, 2005). Constituído principalmente de lipídios e carotenoides, como descrito para espécie de *Lilium* L. (Liliaceae) por Heslop-Harrison (1968). Pode estar envolvido em diversas funções relacionadas à polinização e a germinação do pólen (EDLUND; SWANSON; PRESS, 2004; PACINI; HESSE, 2005).

Foram identificados como constituintes da intina (Tabela 1) polissacarídeos, ácidos pécnicos e celulose (Fig. 2.11 C e D, 2.12 B e C). Na região da abertura a intina apresenta duas camadas em função da reação ao teste de PAS (Fig. 2.11 C). Após a primeira mitose do pólen a exintina se deposita na região equatorial e polar ventral. A endintina é celulósica e apresenta reação positiva ao teste para proteínas (Figs. 2.11 F). Tal estrato possui uma

espessura homogênea. A intina é estruturalmente mais simples do que a exina e é composta principalmente de polissacarídeos (pectinas, hemiceluloses e celulosas) (RUDALL, 2007). A intina começa a ser depositada durante a maturação do andrósporo já liberado da calose. Antes da primeira mitose na região da abertura já é observada a porção externa da intina com grande espessura, sendo mais delgada nas margens da abertura. Tal porção da intina é polissacarídica e péctica. As aberturas representam regiões especializadas em que a exina é reduzida ou ausente e a intina espessada (RUDALL, 2007).

Tabela 1. Testes histoquímicos empregados para a identificação dos compostos constituintes da esporoderme (intina e exina) dos grãos pólen de *Dyckia racinae*.

Corante ou reagente	Especificidade	Estratos da esporoderme	
		Intina	Exina
PAS	Polissacarídeos totais	+	–
Alcian Blue	Ácidos Pécnicos	+	–
Coomassie Blue	Proteínas totais	–	+
Sudan III	Lipídios	–	+
Sudan Black B	Lipídios (incluindo fosfolipídios)	–	+
Vermelho de Rutênio	Ácidos Polissacarídeos e Ácidos Pécnicos	+	–
Auramina	Lipídios	–	+
Calcofluor White	Celulose	+	–

Figura 2.2. A-I. Formação dos esporângios em *Dyckia racinae*. Seções transversais em ML em A, B, C, D, F, H e I. Seções longitudinais em ML em E e G. A. Primórdio estaminal com formato elipsoide, a seta aponta para os vacúolos. B. Primórdio estaminal com formato trapezoidal, tecido pró-vascular (estrela). C. Antera adquirindo formato bilobado, tecido pró-vascular (estrela). D. Divisão periclinal na camada subdérmica. . E. Células do tecido pró-vascular. F. Antera bilobada. G. Seção longitudinal, mostrando a curvatura do primórdio e células vacuoladas da região dorsal. H Antera bilobada, seta apontando para as células vacuoladas na região dorsal, tecido pró-vascular (estrela). I. Detalhe do esporângio mostrando a célula precursora do tapete interno (*), Camada esporogênica (seta) e camada parietal primária (estrela). Barra = 20µm em A, B, C, D, E, F, H e I=100µm em I..

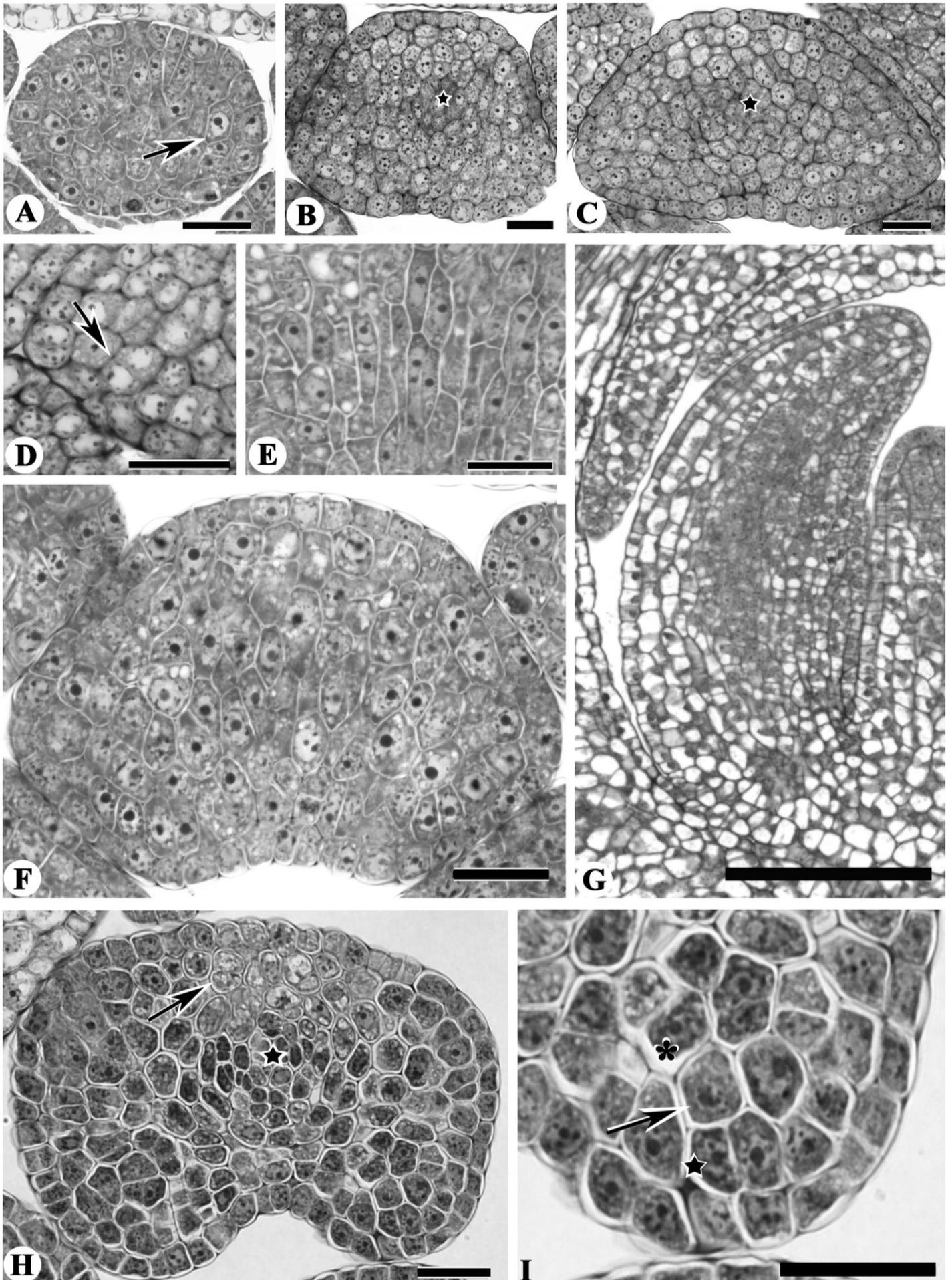


Figura 2.3, Formação dos estratos parietais em *Dyckia racinae*. Seções transversais em ML em A-F. A. Antera bilobada durante a formação do esporângio. B. Detalhe do esporângio mostrando célula da camada parietal primária (estrela), camada esporogênica (seta) e tapete interno (*). C. Antera tetralobada durante a formação dos estratos parietais, idioblasto no início de sua diferenciação (*). D. Detalhe do esporângio mostrando a divisão da camada parietal primária em camada parietal secundária (CPSE) interna e externa (CPSI), tecido esporogênico (TE) e Tapete interno (TI). E. Antera durante a formação dos estratos parietais. F. Detalhe do esporângio logo após a divisão da CPSE e CPSI formando os estratos parietais. Abreviaturas: Ed, endotécio; cm, camada média; t, tapete. Barra = 20µm em A, B, D e F =40µm em C e E.

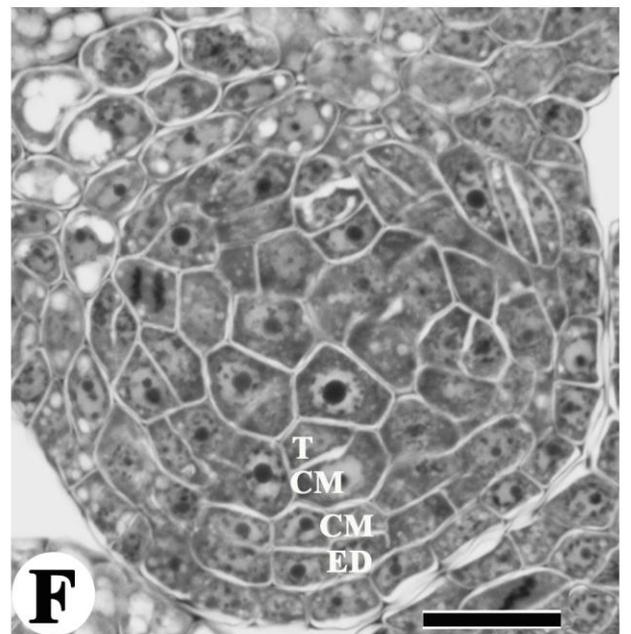
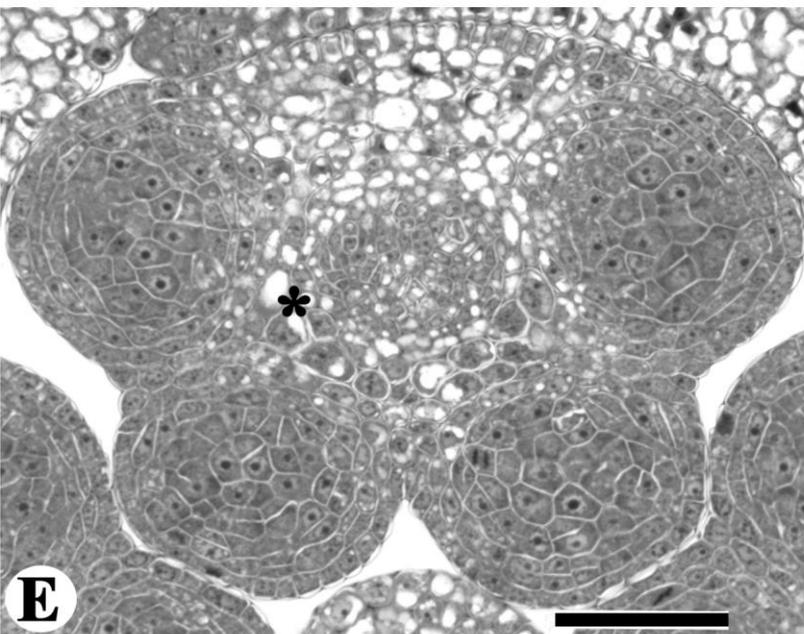
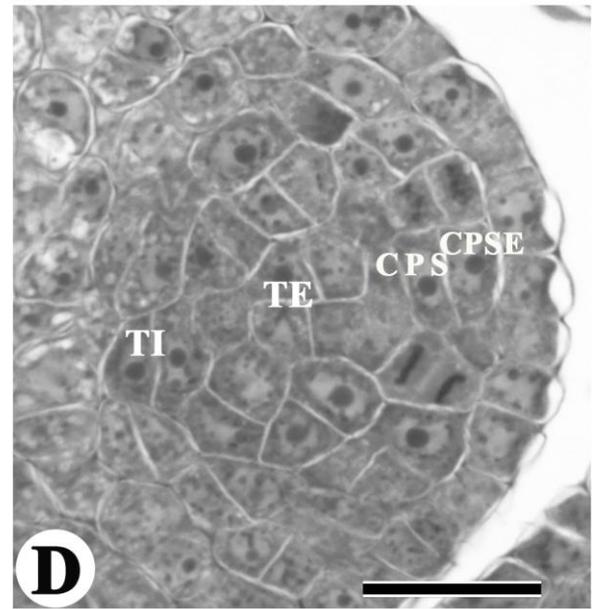
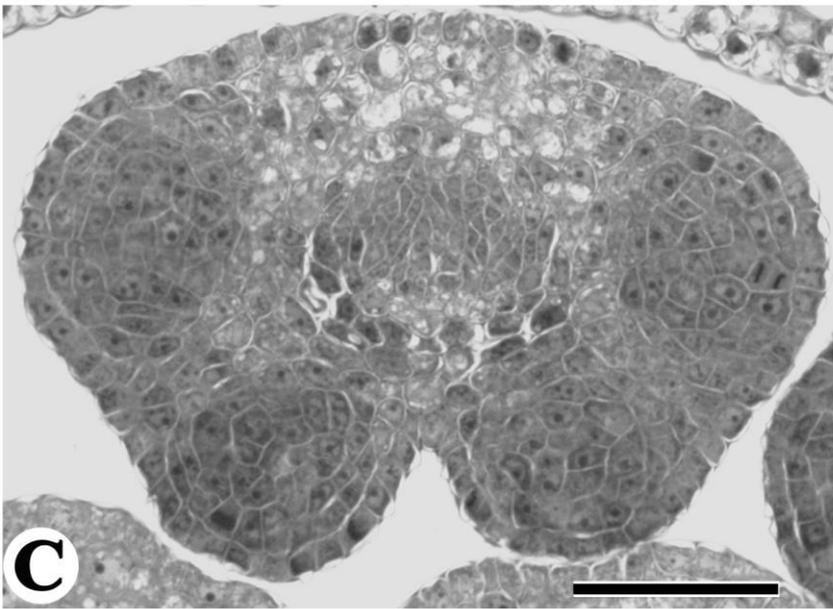
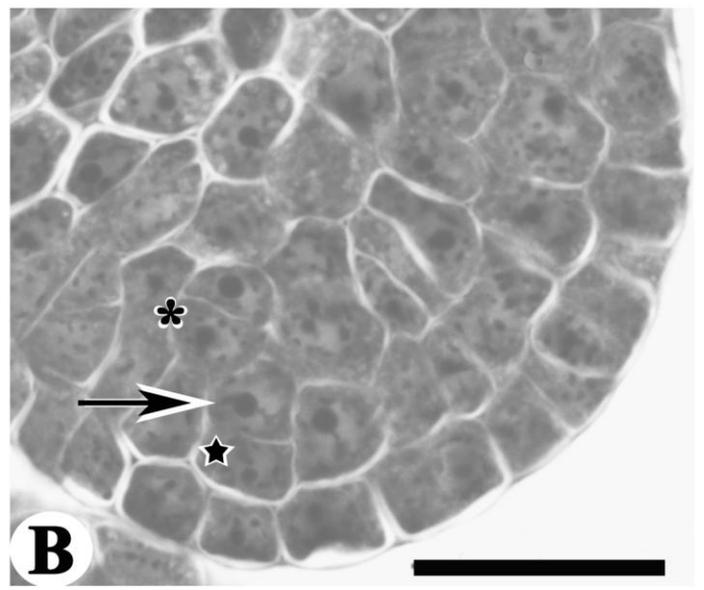
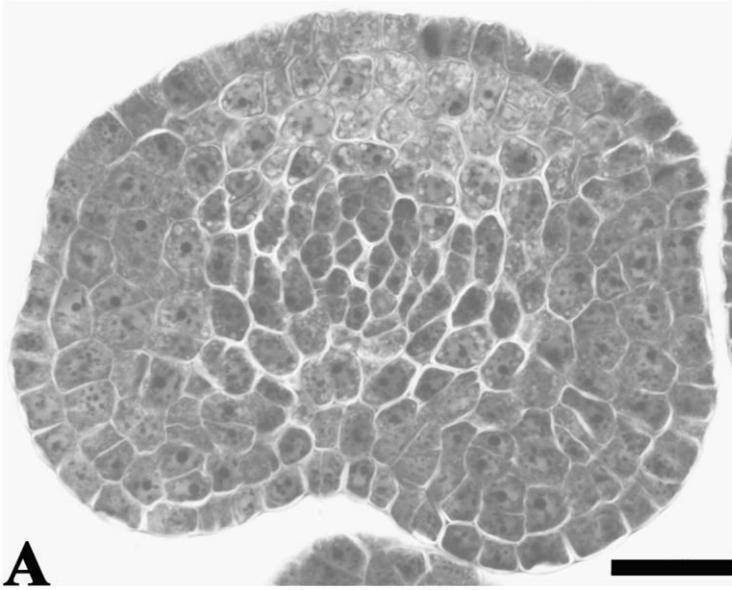


Figura 2.4, Diferenciação dos estratos parietais em *Dyckia racinae*. Seções transversais em ML em A-G. A. Antera tetralobada. B. Detalhe do esporângio mostrando a diferenciação dos estratos parietais. C. Idioblasto da região conectival, detalhe da célula poliploide. D. Detalhe mostrando o tecido esporogênico durante sua proliferação E. Detalhe da célula mãe de andrósporo em interfase, vacúolo (seta). F. Aspecto geral da antera. G. Detalhe do esporângio. Abreviaturas: Ed, endotécio; cm, camada média; t, tapete; te, tecido esporogênico. Barra = 20µm em B, C, D, E e G =100µm em A e F.

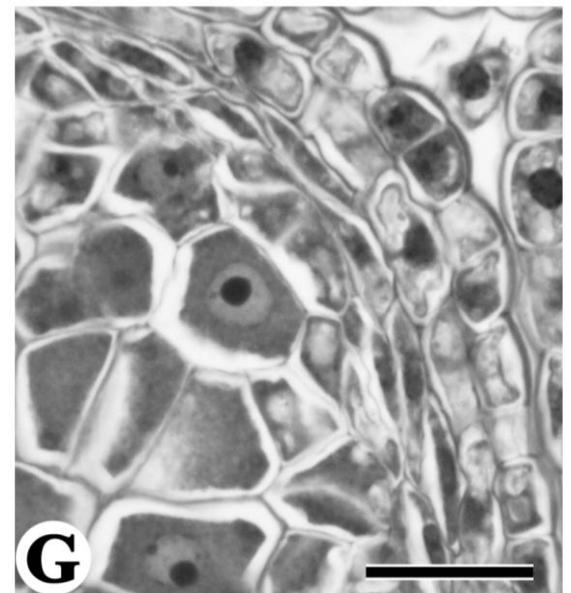
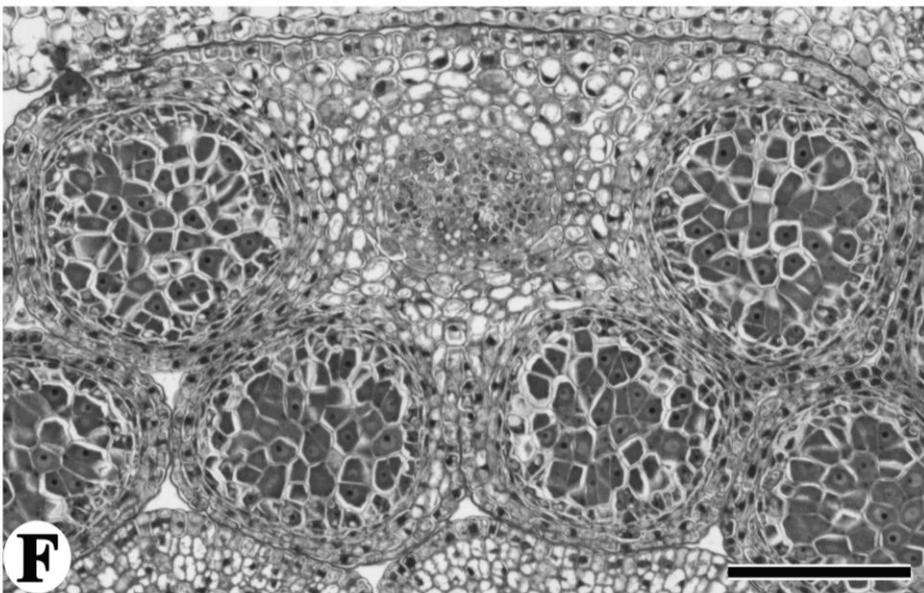
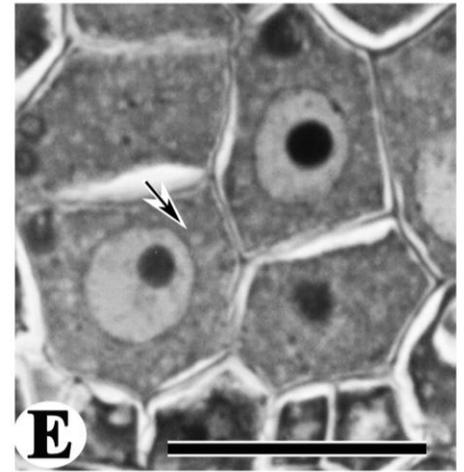
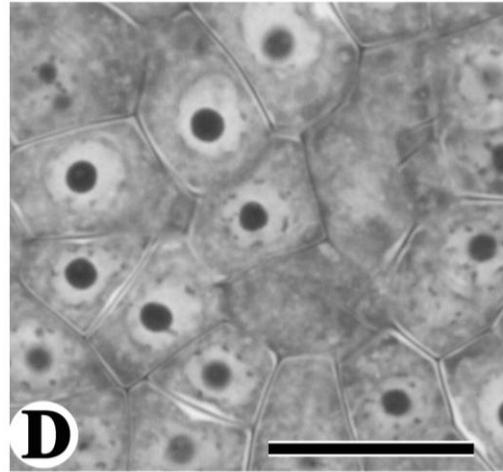
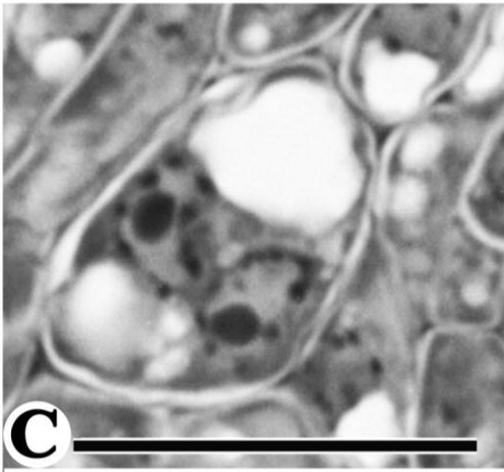
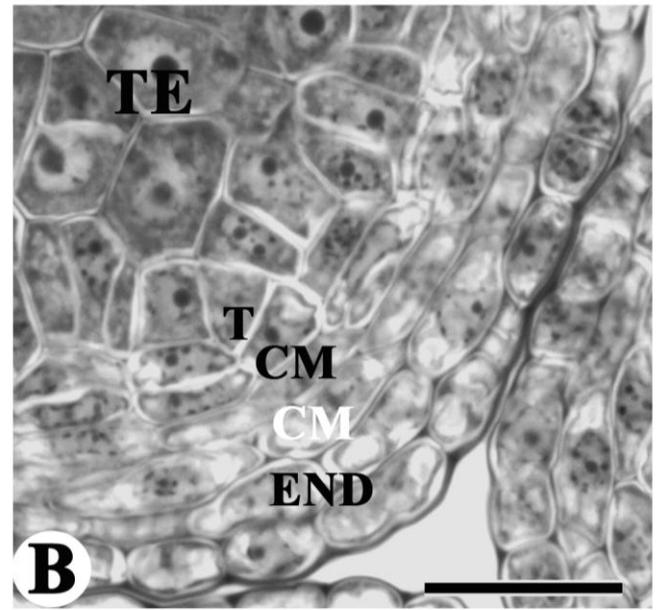
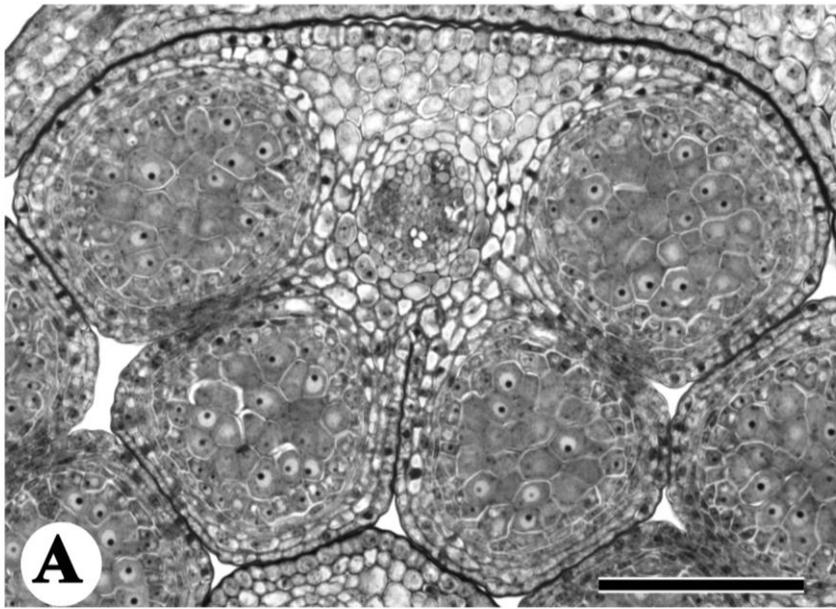


Figura 2.5, Mobilização dos açúcares acumulados no vacúolo do tapete durante o início da deposição da calose em *Dyckia racinae*. Seções transversais em ML em A-I. A. Aspecto geral da antera. B. Detalhe do esporângio mostrando a diferenciação dos estratos parietais, vacúolos armazenando polissacarídeos insolúveis (estrela), célula tapetal binucleada (seta). C. Célula mãe de andrósporo no início da prófase. D. Aspecto geral da antera corada com azul de Astra, fucsina e PAS. E. Detalhe do esporângio mostrando vacúolos PAS positivos (seta). F. Célula mãe de andrósporo com citoplasma PAS positivo (seta). G. Aspecto geral da antera. H. Detalhe do esporângio mostrando vacúolos sem os polissacarídeos (estrela). I. Célula mãe em prófase, plasmodesmos são mostrados pela seta e a deposição de calose. Barra = 20µm em B, C, H e I = 50µm E e F=100µm em D e G = 200 µm em A.

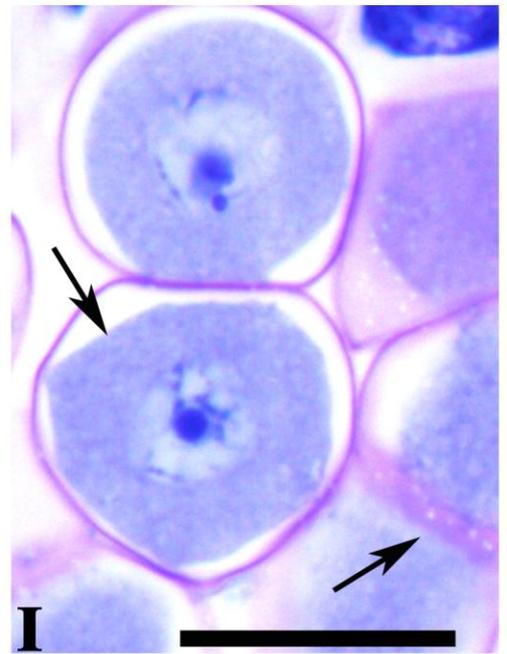
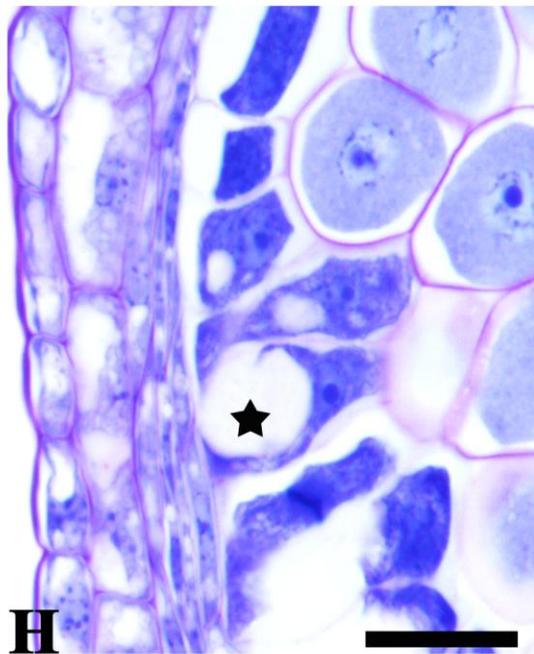
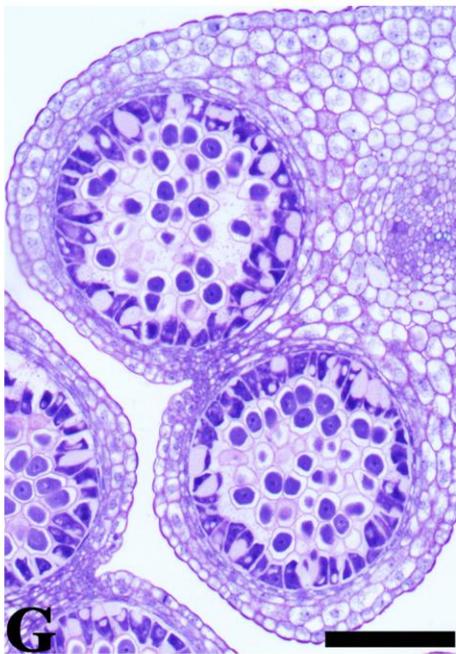
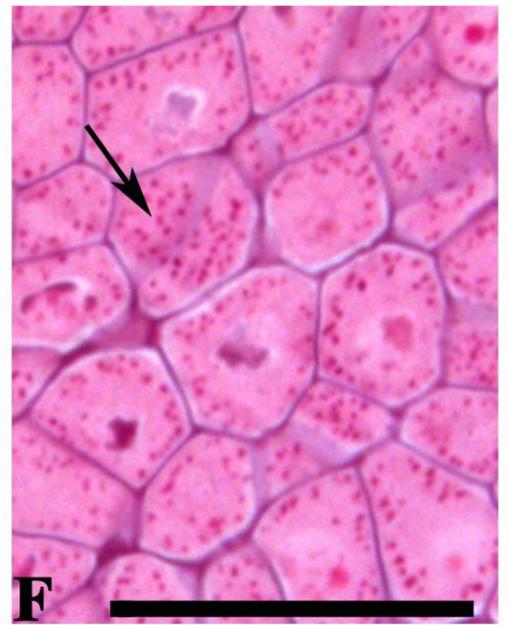
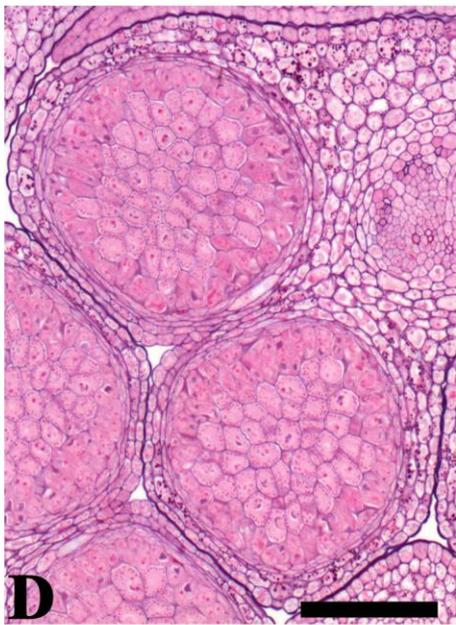
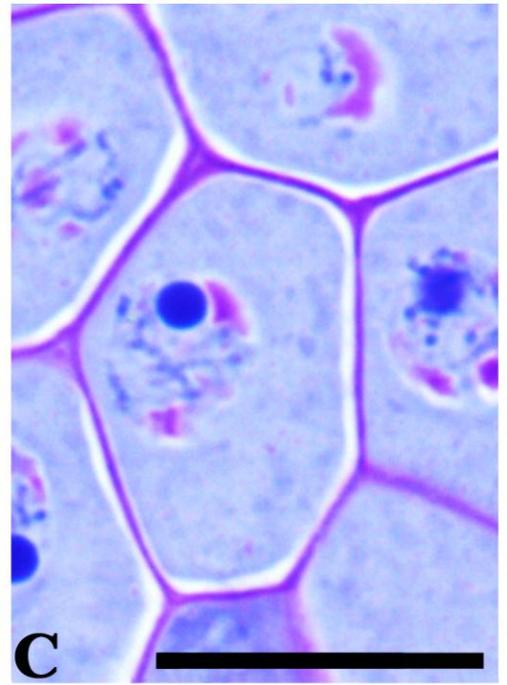
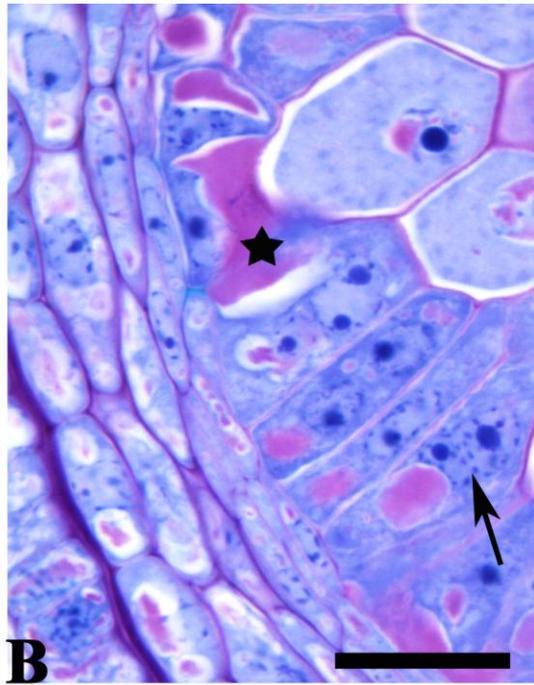
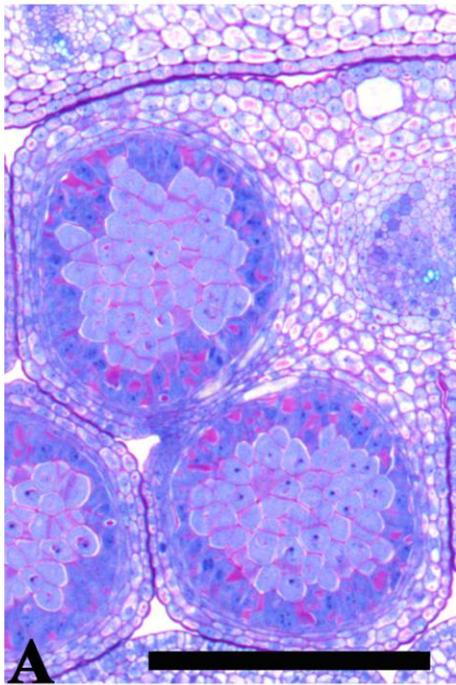


Figura 2.6, Estrutura da epiderme em *Dyckia racinae*. Seções transversais em ML em AH. Eletromicrografias em MEV em I e J. A. Estrato parietal antes do espessamento, no início do incremento de material que gera a papiliosidade. B. Epiderme papilosa. C. Parede periclinal externa da epiderme com acúmulo de celulose (Calcofluor). D. Parede periclinal externa da epiderme com acúmulo de ácidos pécticos (Alcian Blue). E. Parede periclinal externa da epiderme com acúmulo de lipídios (Sudan Black B) F. Parede periclinal externa da epiderme com acúmulo de lipídios (Sudan III). G. Parede periclinal externa da epiderme com acúmulo de ácidos polissacarídeos e ácidos pécticos (Vermelho de rutênio). H. Parede periclinal externa da epiderme com acúmulo de polissacarídeos insolúveis (PAS). I. Estrias epicuticulares. J. Estrias epicuticulares. Barra= 10 µm em I e J= 20µm em A, B, D, E, F, G e H = 50µm em C.

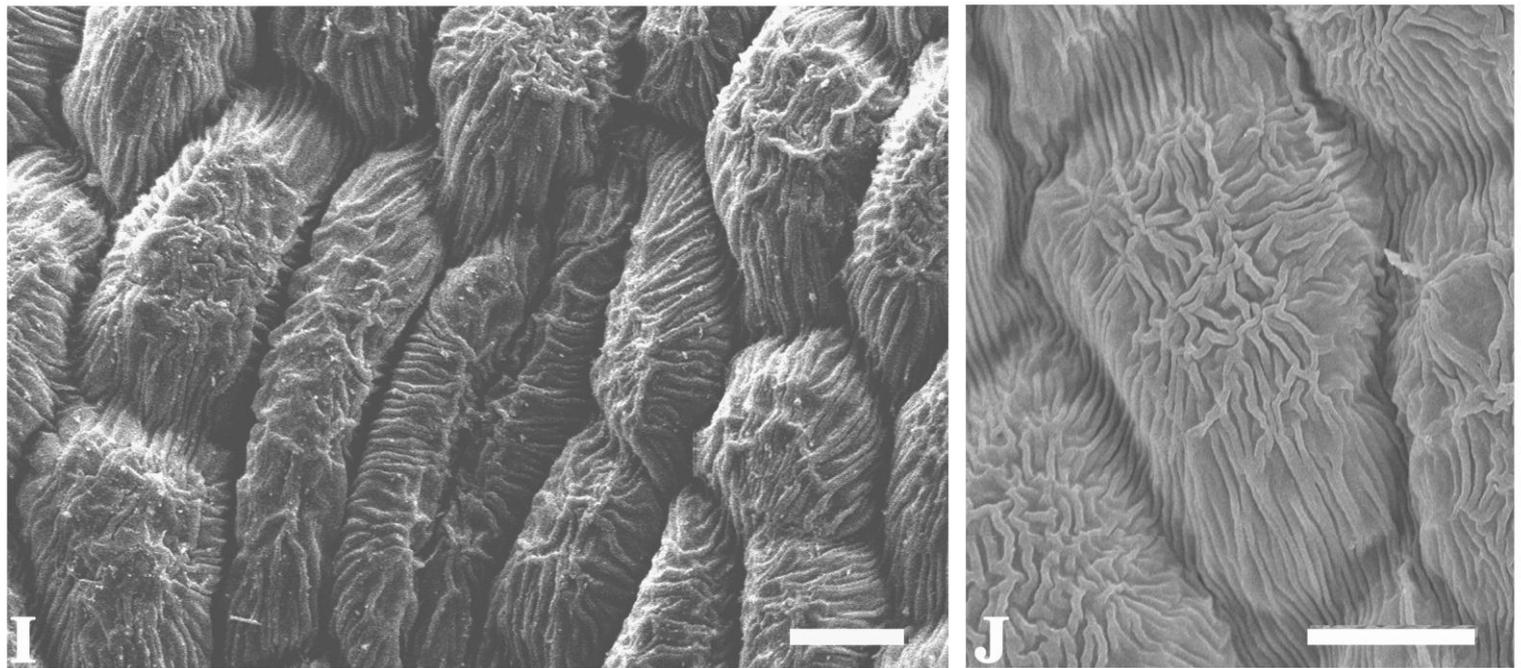
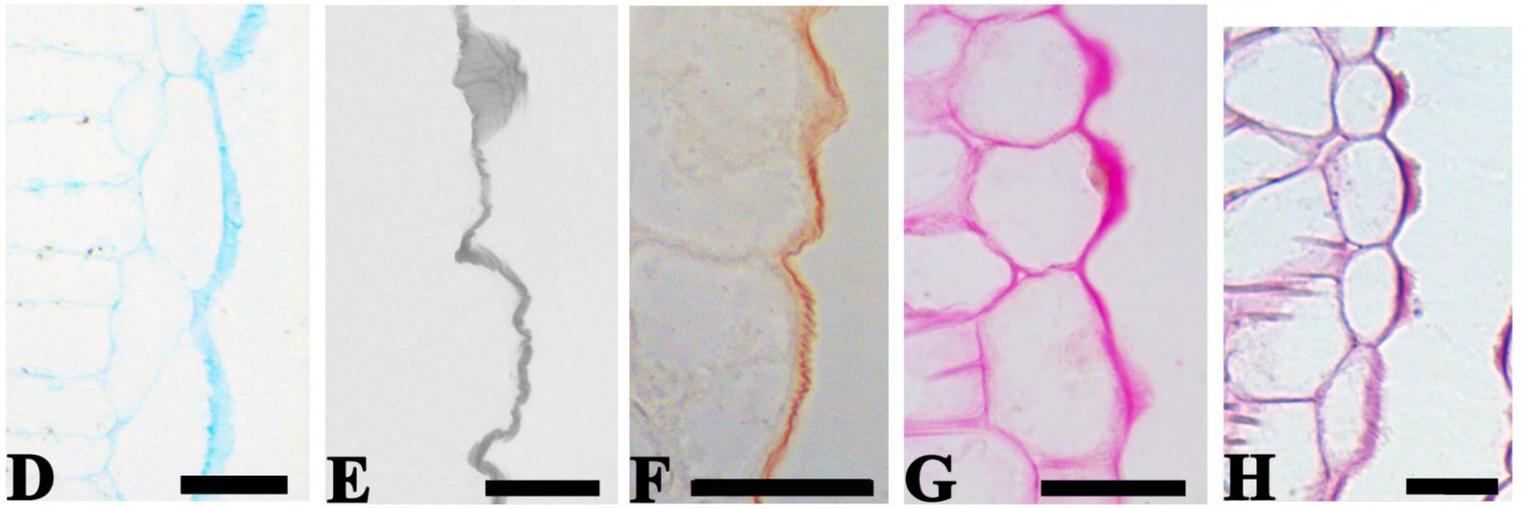
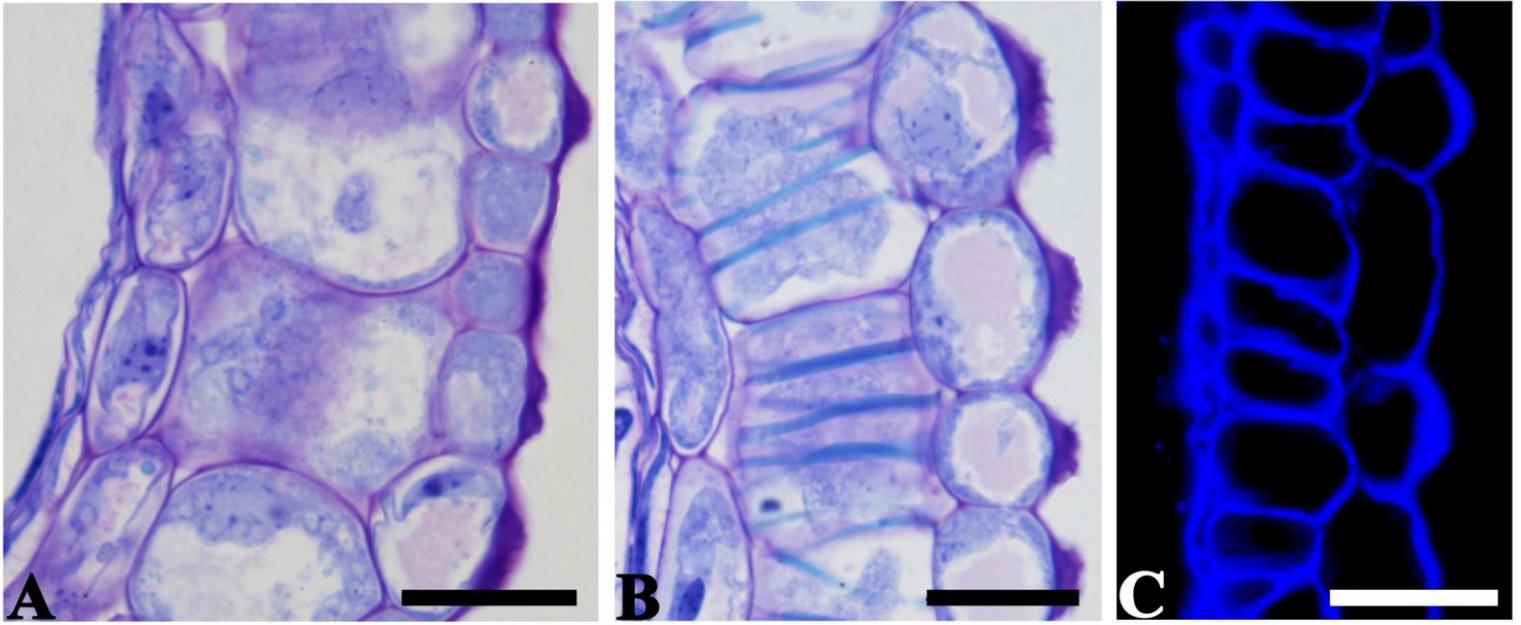


Figura 2.7, Estrutura do estômio, endotécio e tapete em *Dyckia racinae*. Seções transversais em ML em A, B, C, E, I, J, L e M. Seção transversal em Fluorescência em D. Dissociação em ácido láctico, MO com luz polarizada em F, G e H. A. Região estomial no início de seu desenvolvimento. B. Região estomial próximo da deiscência da antera. C. Detalhe mostrando as células estomiais. D. Endotécio celulósico (Calcofluor). E. Endotécio com polissacarídeos insolúveis (PAS) F. Ramificações no espessamento do endotécio (seta). G. Espessamento do endotécio em forma de “U” isolado. H. Espessamento do endotécio. I. Tapete no estágio de célula mãe em prófase, detalhe da divisão (seta). J. Tapete em estágio de tétrade, início da degeneração, seta aponta para o material secretado. L. Tapete após a liberação dos andrósporos, parede celular já rompida (seta). M. restos de células tapetais durante o estágio de maturação dos andrófitos. Barra= 20µm em A, B, C, I, E, J, L e M = 50µm em D, E, F, G e H.

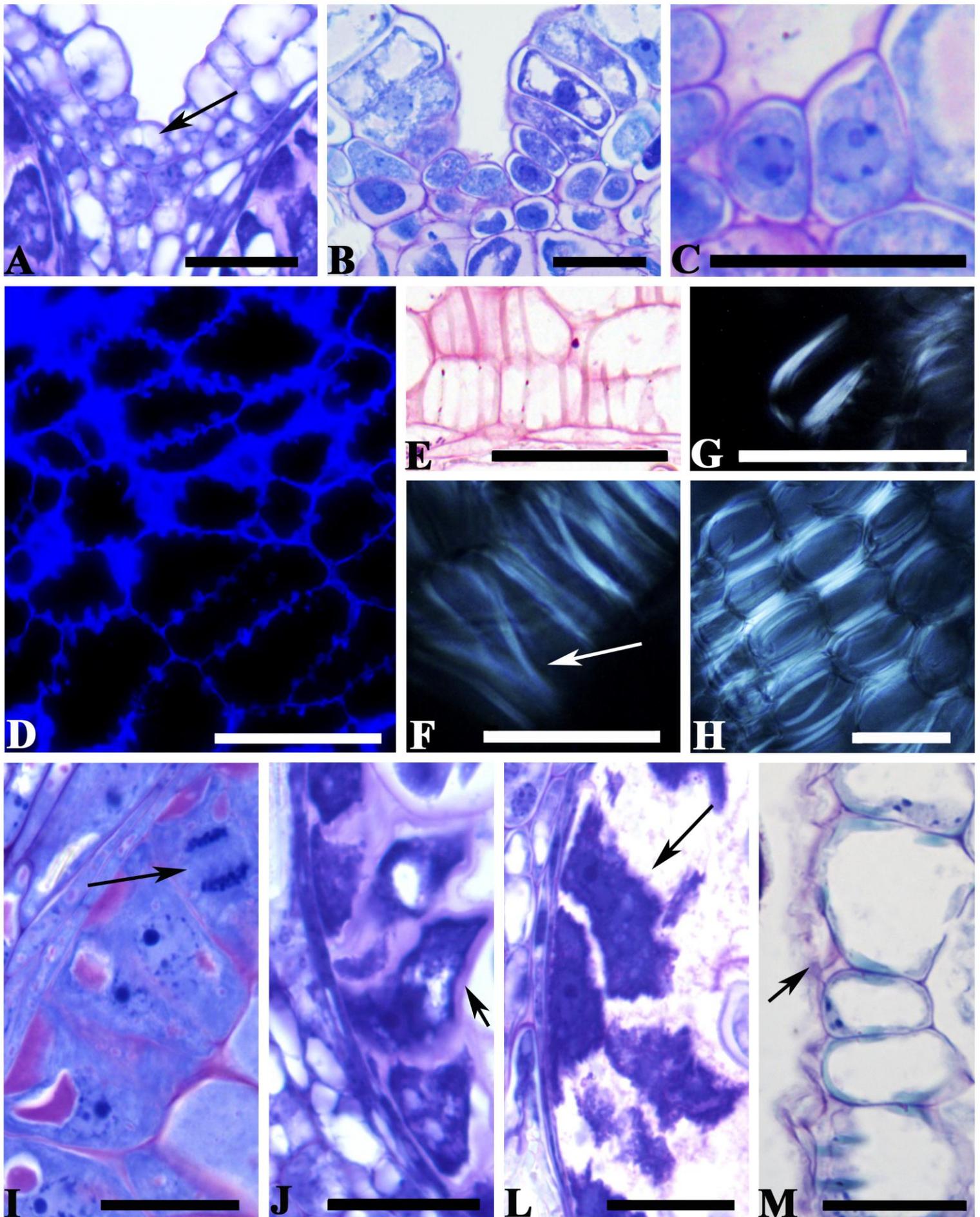


Figura 2.8, Ráfides da região do conectivo e do septo em *Dyckia racinae*. Seções transversais em ML em A, B, D e F. Eletromicrografias em MEV em E. Dissociação em ácido láctico, ML com luz polarizada em C. A. Ráfides da região dorsal do conectivo. B. Início de acúmulo de cristais na região do septo. C. Ráfides. D. Região do septo no estágio de andrófito maduro. E. Ráfides. F. Detalhe das ráfides da região do septo. Barra = 10 μ m em E= 20 μ m em A, B e F= 50 μ m em C = 100 μ m em D.

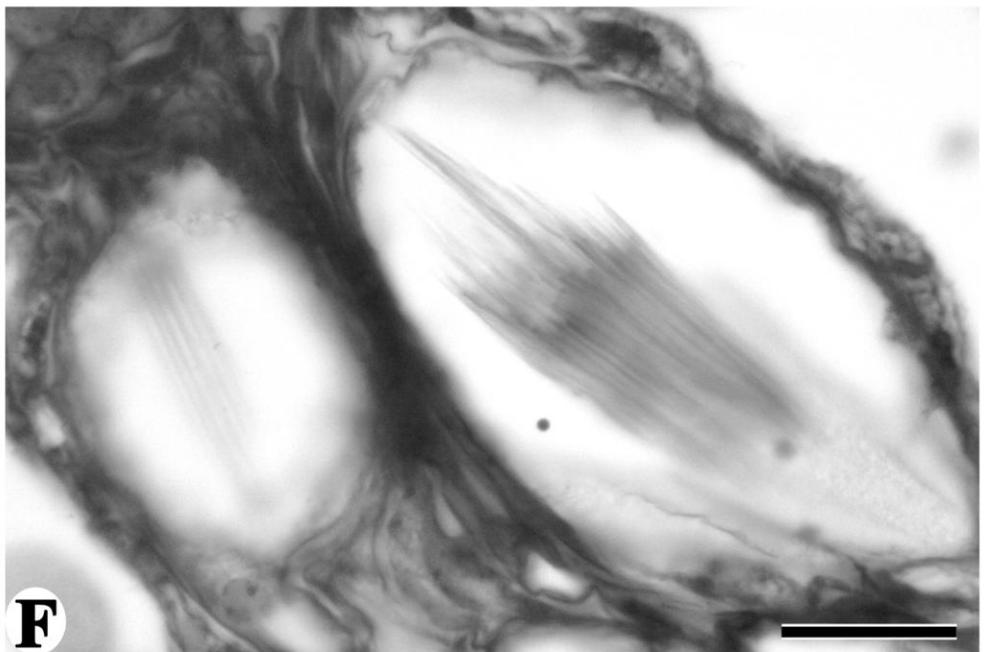
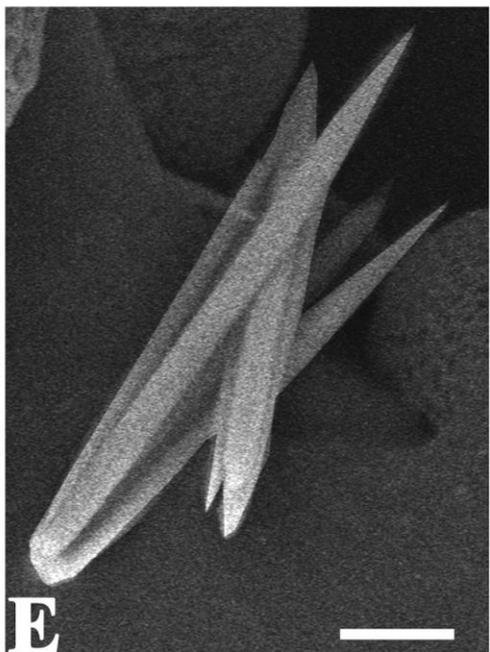
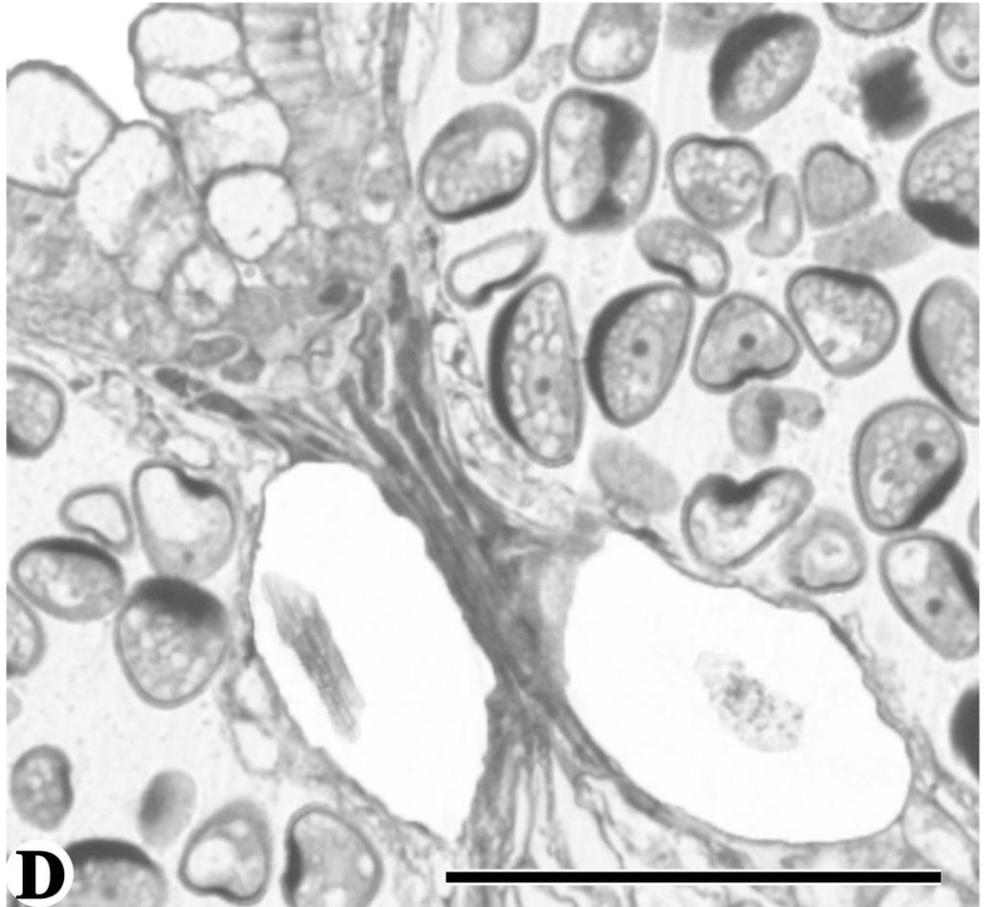
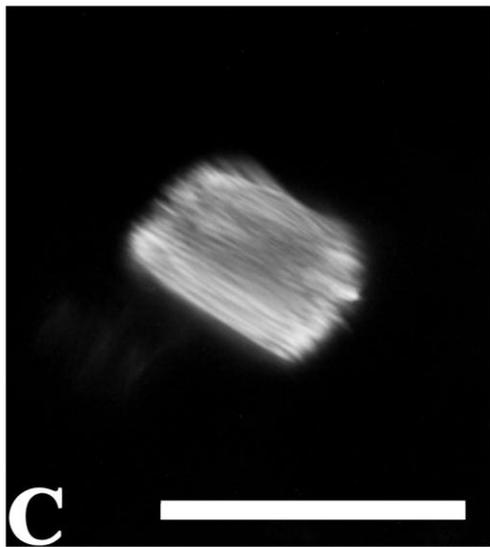
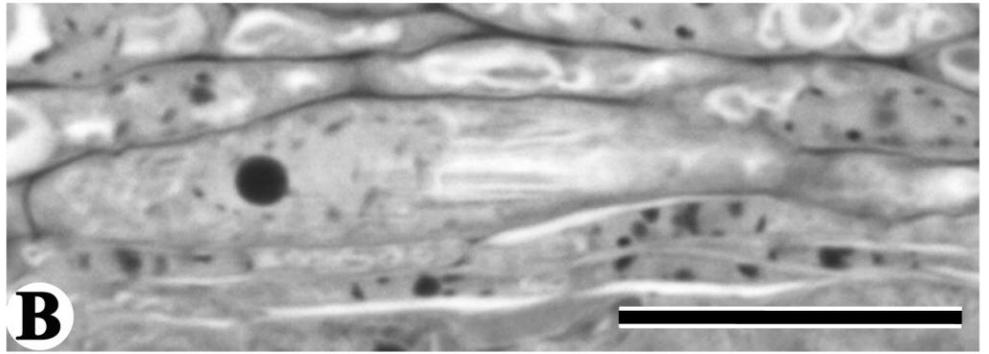
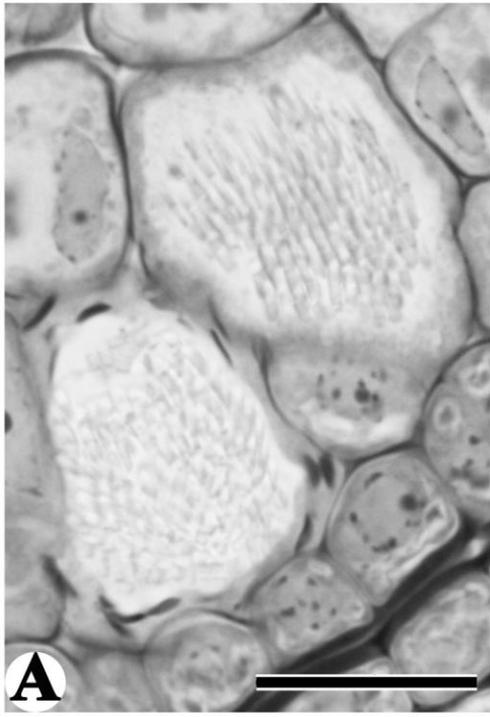


Figura 2.9, Meiose, dissolução da calose e primeira divisão mitótica em *Dyckia racinae*. ML em A, B, D, F, H, I, J, L, M e N. Fluorescência em C, E e G. A. Meiócito . B. Díade. C. Detalhe mostrando a presença de calose (seta) separando as díades. D. Tétrade isodiamétrica, primexina depositada (seta) E. Calose em tétrade isométrica. F. Tétrade decussada. G. Calose em tétrade decussada. H. Andrófito unicelular, início da vacuolação (seta). I. Presença de amido (seta) (Lugol). J. Vacúolos responsáveis pela polarização do núcleo (setas) (calcofluor). L. Anáfase mitótica. M. Célula generativa (*) e célula vegetativa (seta). N. Presença de celulose separando a célula generativa da vegetativa (seta). Barra= 10 µm de A-N.

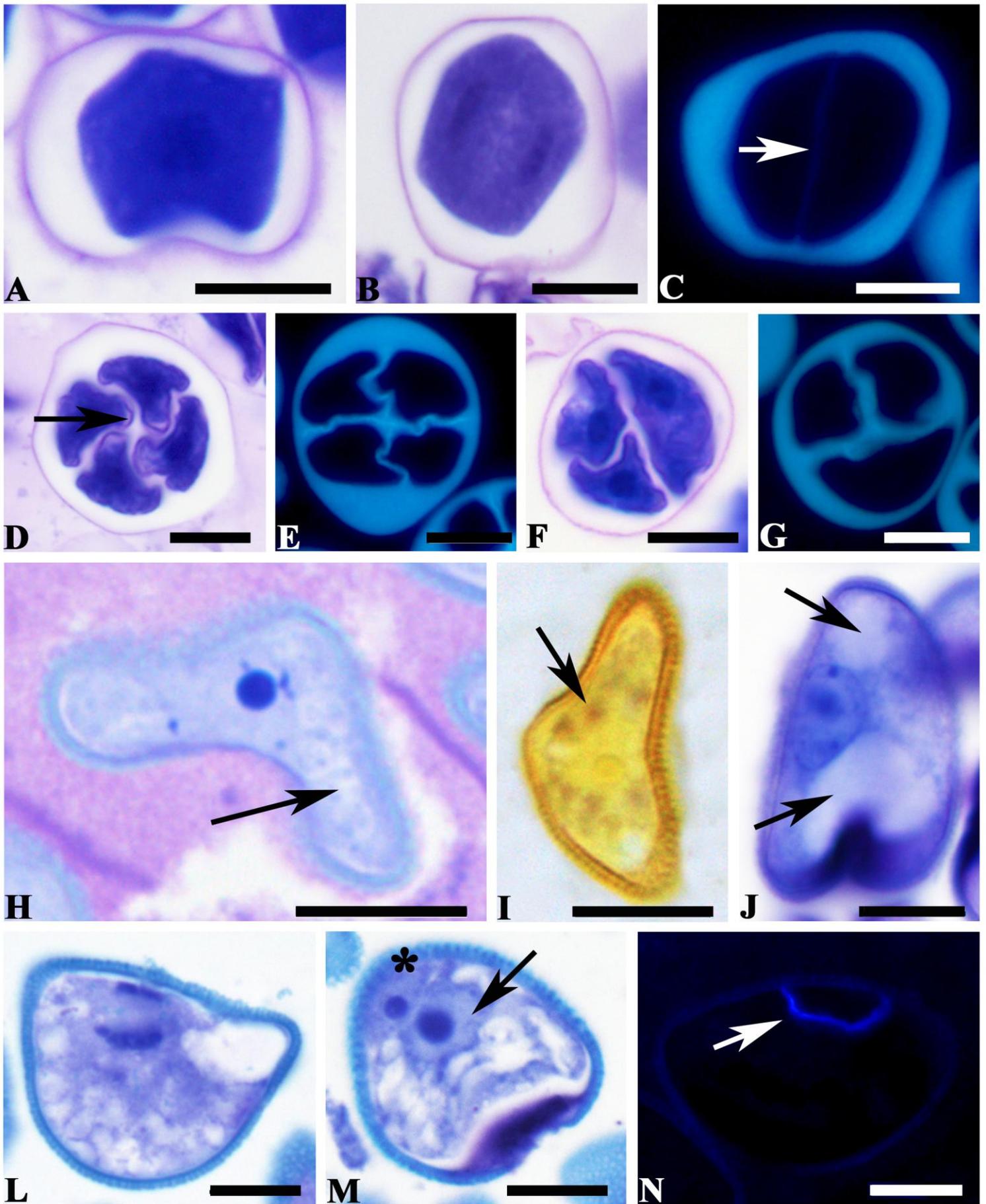


Figura 2.10, Processo de maturação do andrófito em *Dyckia racinae*. ML em A-I. A. Núcleo da célula vegetativa seguindo para a posição central. B. Célula generativa começa a ser englobada pela vegetativa. C. Célula generativa sendo englobada pela vegetativa. D. Célula generativa após ser englobada totalmente. E. Célula generativa com formato esférico se aproximando do núcleo da célula vegetativa. F. Célula generativa com formato fusiforme. G. Grãos de amido acumulados no citoplasma da célula generativa (Lugol). H. Unidade generativa masculina formada. I. Andrófito maduro. *: Célula generativa; seta: célula vegetativa. Barra= 10 μ m de A-I.

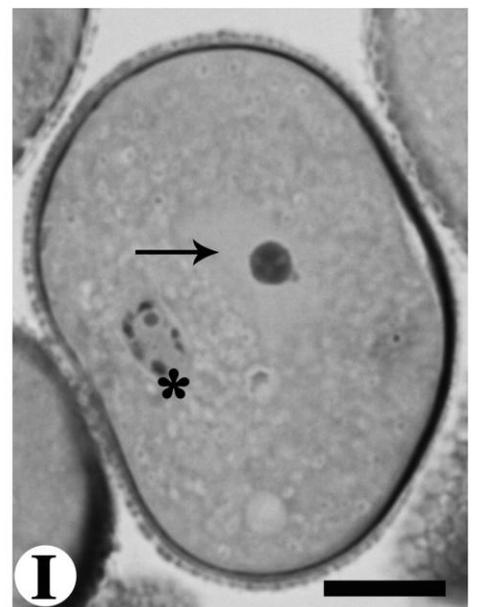
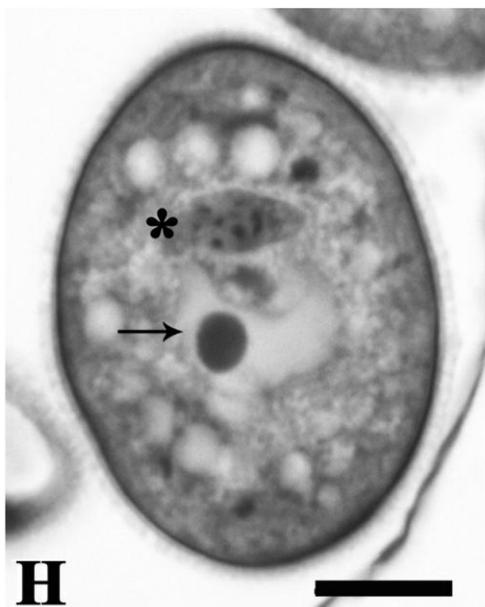
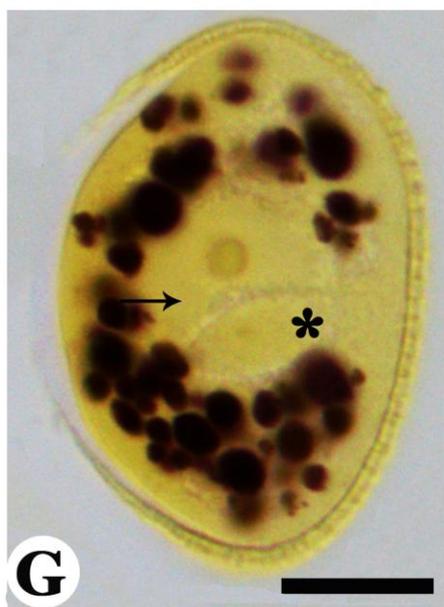
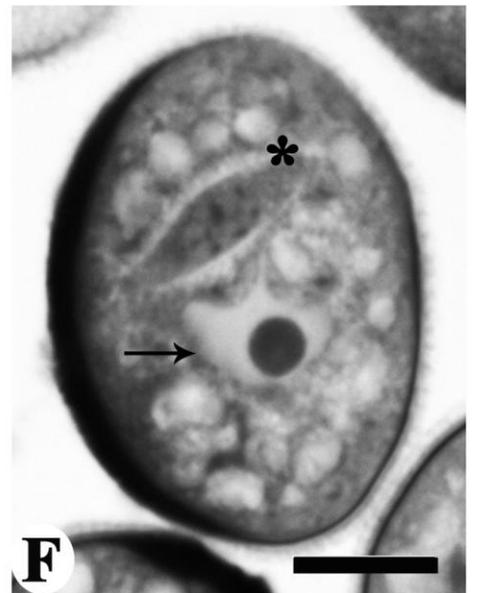
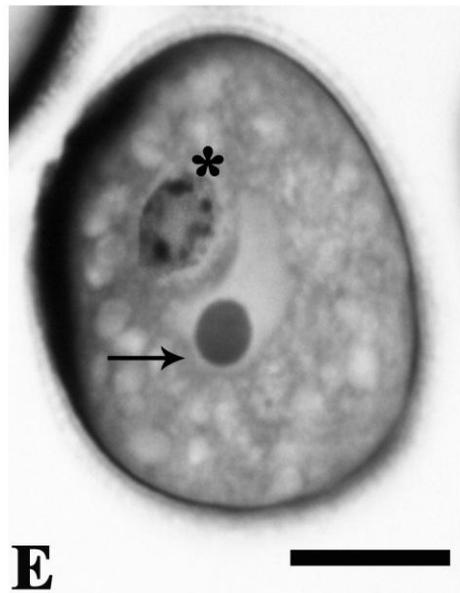
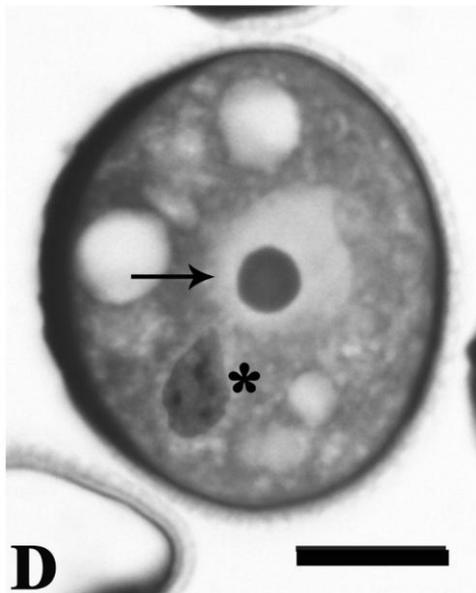
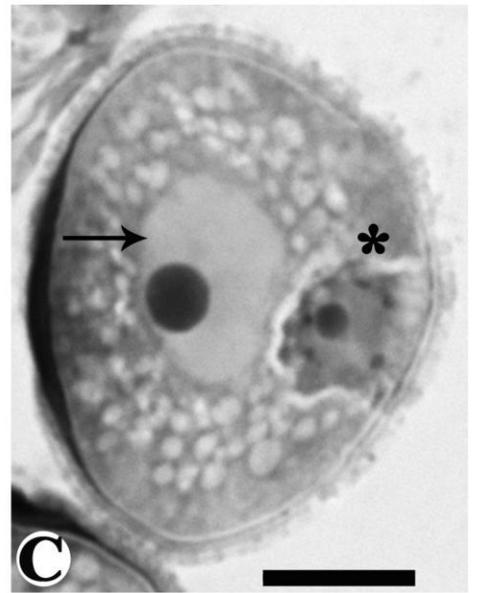
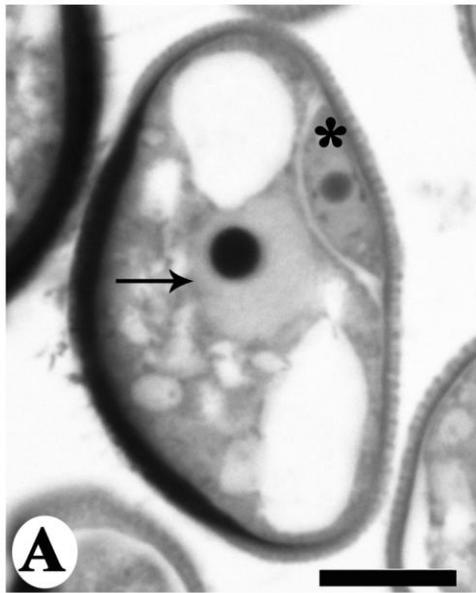


Figura 2.11, Testes histoquímicos em andrófito maduro. ML em A-G. A. Sudan Red 7B, detecção dos lipídios totais no citoplasma do andrófito (seta). B. PAS, polissacarídeos presentes no citoplasma (seta) durante o processo de maturação do andrófito. C. PAS, porção polissacarídica da intina, seta apontando para região de abertura. D. Vermelho de Rutênio, ácidos polissacarídeos e ácidos pécticos presentes na intina principalmente na região de abertura (seta). E. Sudan Black B, lipídios na exina (seta). F. Coomassie Blue, compostos proteicos encontrados na exina (seta). G. Sudan III, substâncias lipídicas (*pollenkitt*) aderidas à exina (seta). Barra= 10 µm em B-G, =20 µm em A.

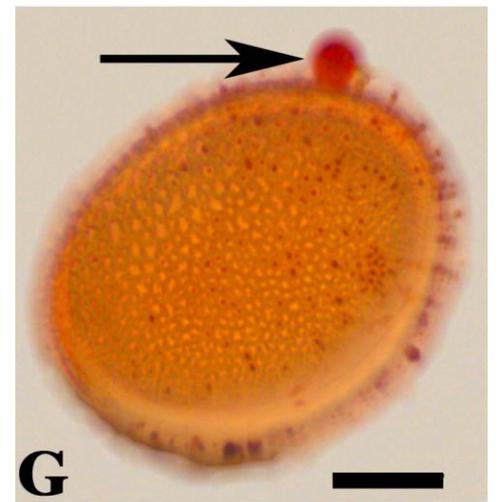
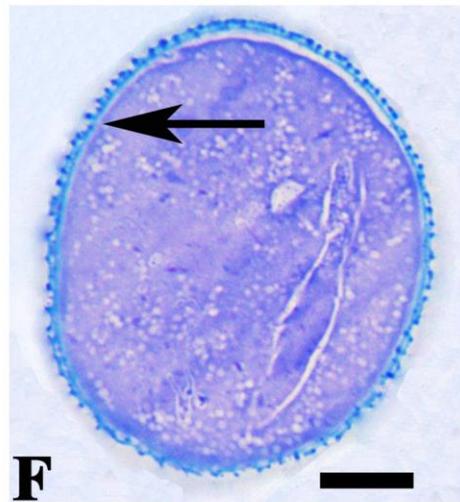
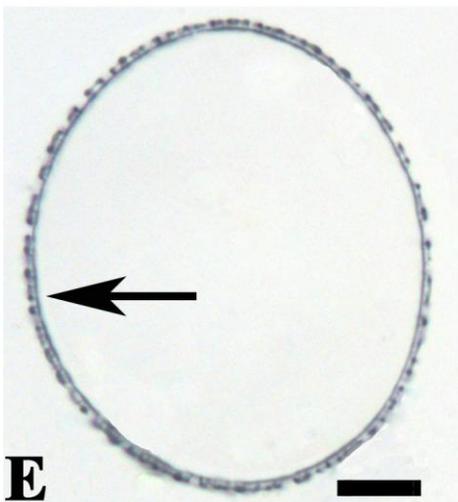
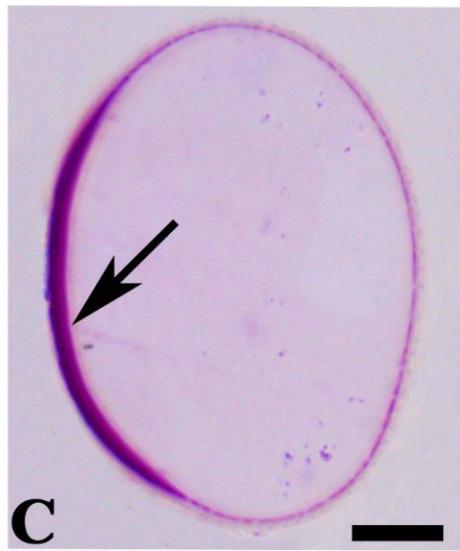


Figura 2.12, Composição química da esporoderme em andrófito maduro. Corte em micrótomo de congelamento em A-C. Fluorescência em C. A. Andrófito maduro, com intina péctica, espessada na região de abertura (*) e *pollenkitt* (seta). B. Alcian Blue, mostrando a presença de ácidos pécticos da intina, região de abertura (*) e *pollenkitt* (seta). C. Calcofluor, mostrando a presença de celulose na constituição da intina, região de abertura (*). Barra= 20µm em A, B e C.

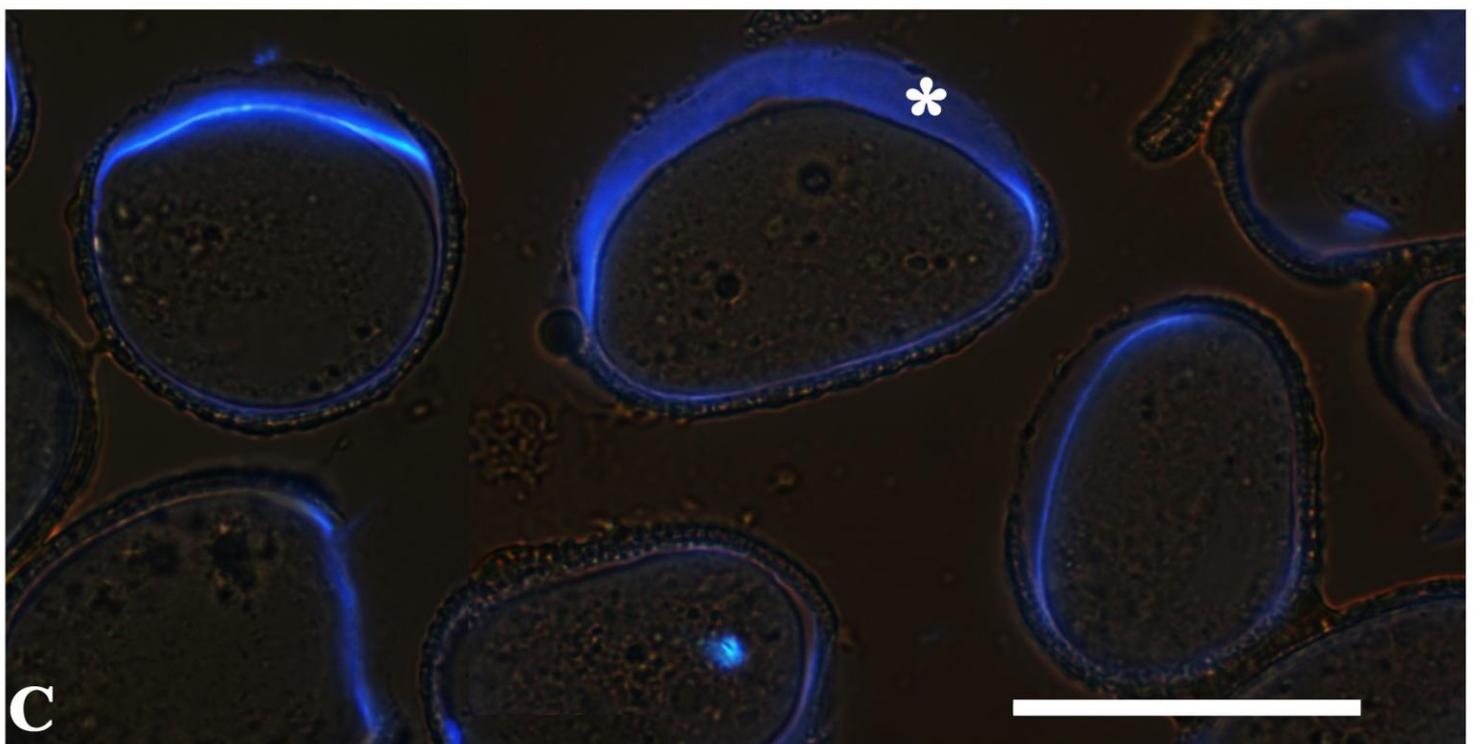
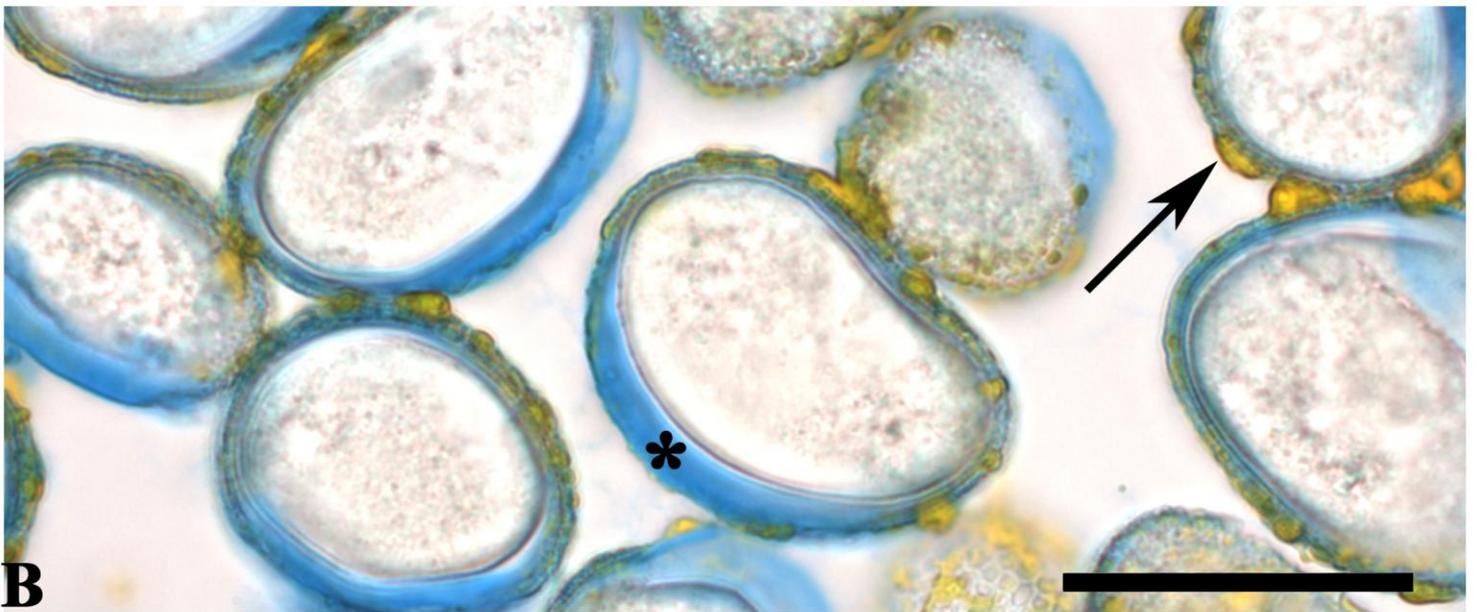
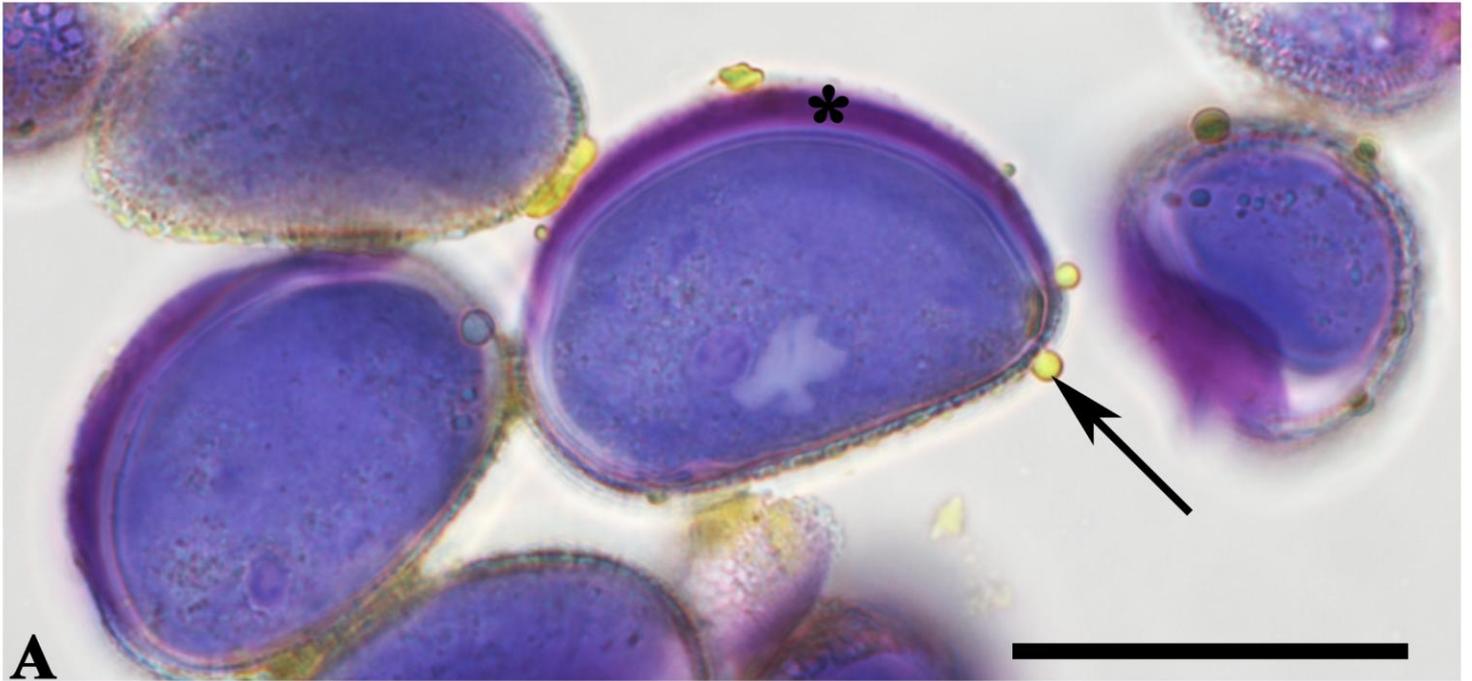


Figura 2.13, Composição química da esporoderme em andrófito maduro. Corte em micrótomo de congelamento em A-C. Fluorescência em A-C. A. Auramina, mostrando a porção lipídica da exina (seta). B. Nile red, lipídios polares no citoplasma (seta). C. Nile red, lipídios apolares no citoplasma (seta). Barra= 20µm em A, B e C.

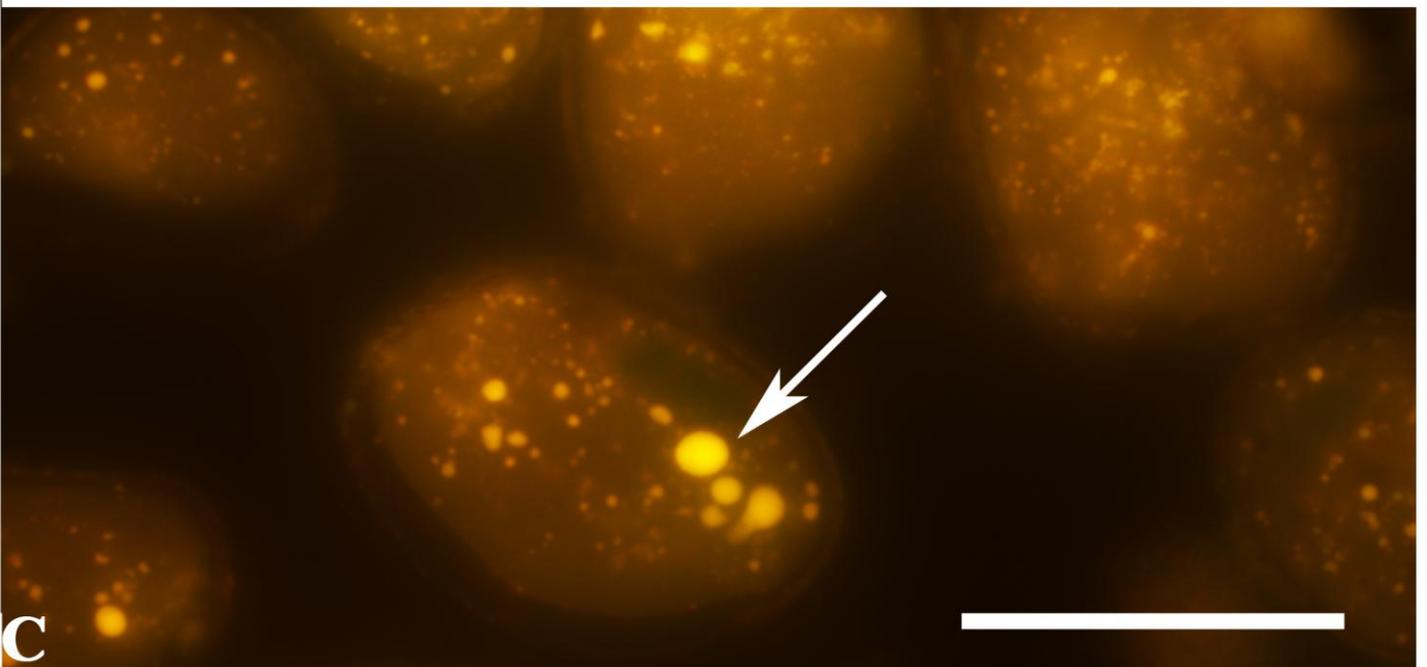
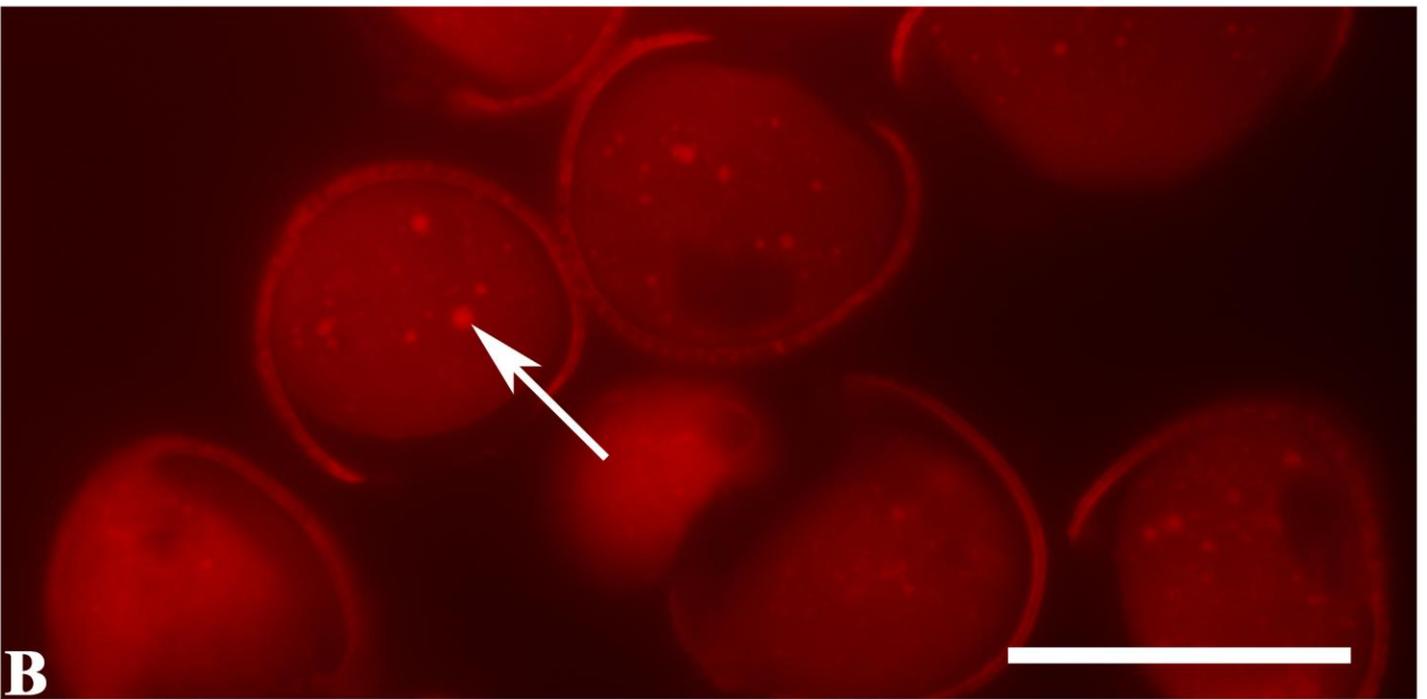
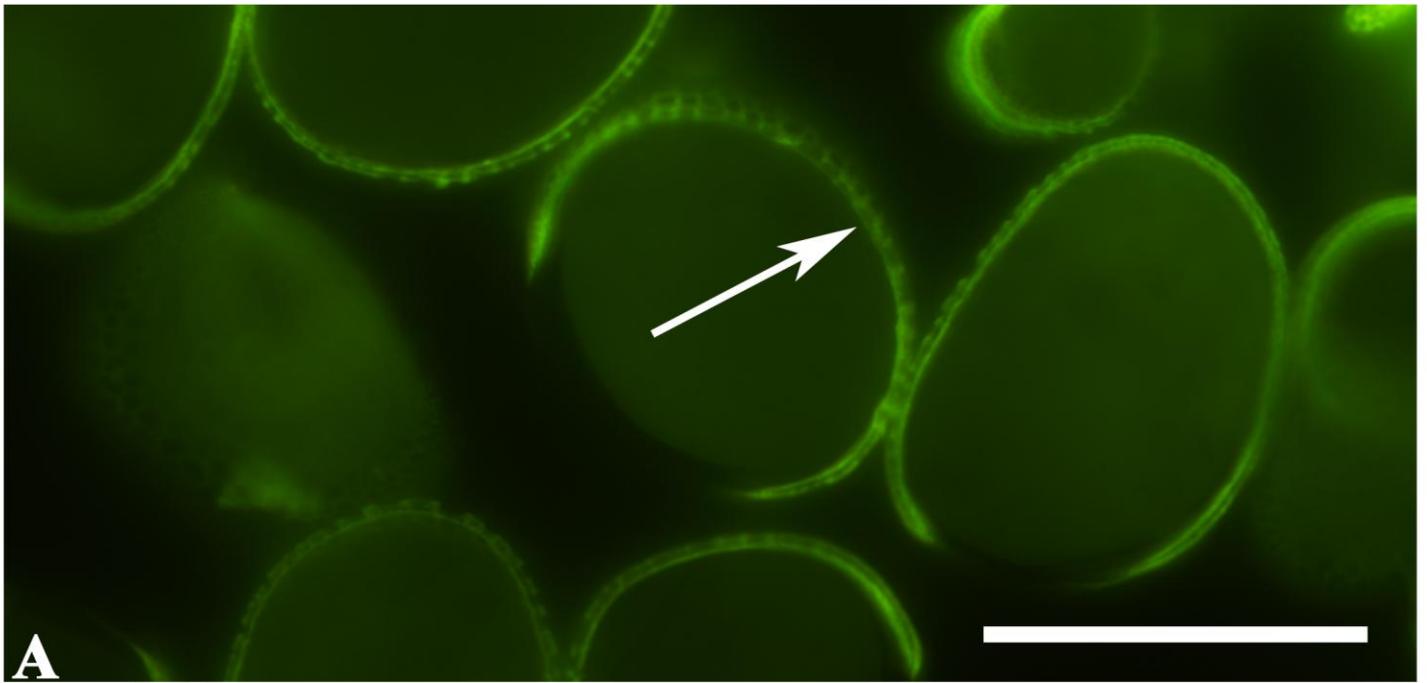
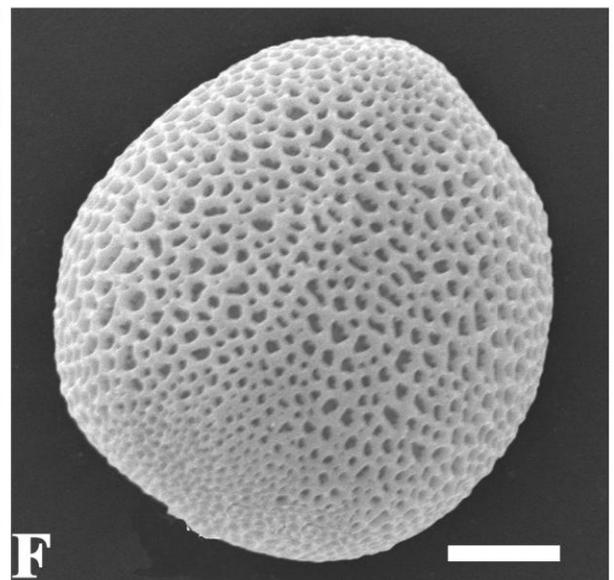
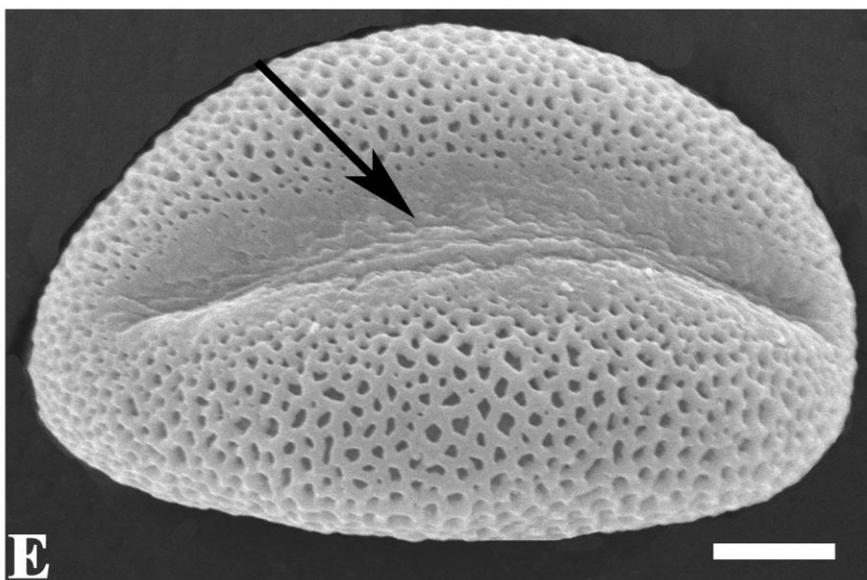
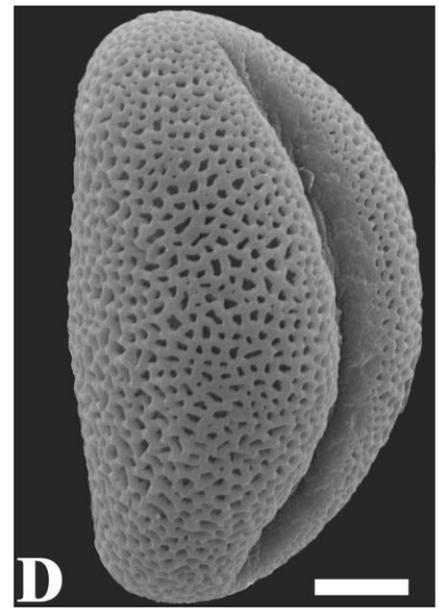
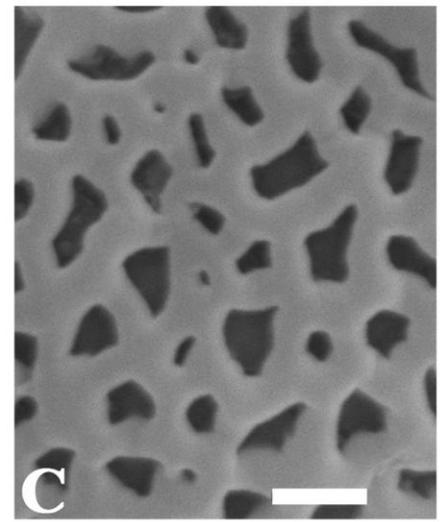
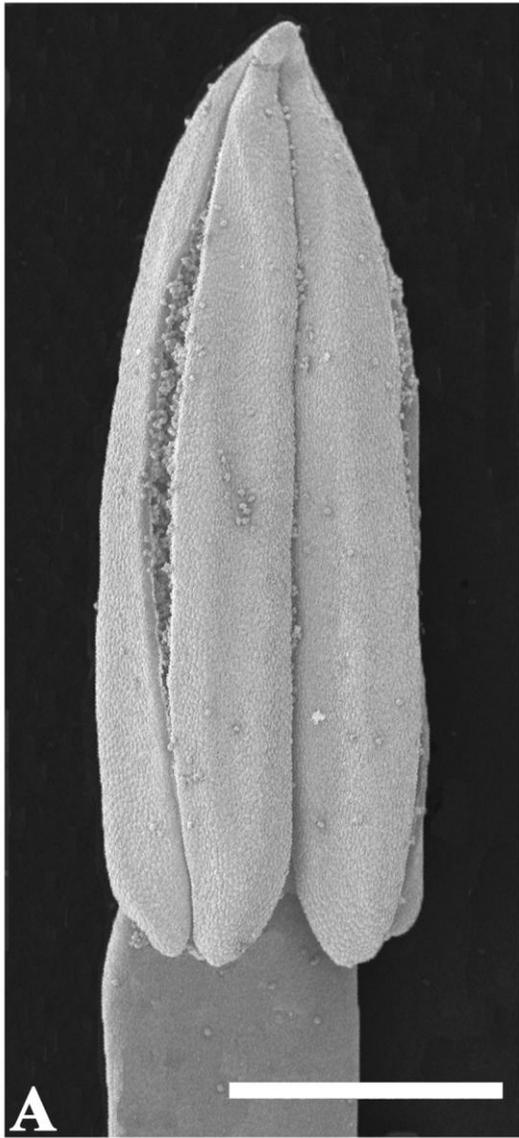


Figura 2.14, Morfologia da antera e do andrófito maduro em *Dyckia racinae*. Eletromicrografias em MEV em A-F. A. Face ventral do estame. B. Face dorsal do estame. C. Detalhe da exina. D. Vista lateral do andrófito. E. Face dorsal do andrófito mostrando a abertura (seta). F. Face ventral do andrófito. Barra= 1 mm em A = 500 μ m B= 5 μ m em D, E e F = 1 μ m em C.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER HG, BAKER I. **Starch in Angiosperm pollen grains and its evolutionary significance.** *American Journal of Botany* 66: 591-600, 1979.

BATYGINA, T. B. **Embryology of flowering plants-Terminology and concepts.- Generative organs of flower.** v.1, Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd ed. New Dheli, 2002.

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

BHANDARI, N.N. The microsporangium. In: JOHRI, B.M. (Ed.). **Embryology of angiosperms.** Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag, p. 53-121, 1984.

BITTENCOURT, N. S. Jr. **Ontogenia da antera e do rudimento seminal de *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae).** 1995, 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

BITTENCOURT, N. S. Jr.; MARIATH, E. A. Ontogenia dos estratos parietais da antera de *Tabebuia pulcherrima* Sandw. (Bignoneaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.11, p. 9-30, 1997.

BOKE, N. H. Development of stamens and carpels in *Vinca rosea* L. **American Journal of Botany**, v. 36, p. 535-549, 1949.

BRUNDRETT, M.C.; KENDRICK, B; PETERSON, C. A. Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7B or fluorol yellow 088 in polyethylene glycol glycerol. **Biotech Histochem**, v. 66, p.111-116, 1991.

BUCHMANN, S. L. The Ecology of Oil Flowers and their Bees. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 343-369, 1987.

CONCEIÇÃO, S. P. **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 Ed., New York, 1966.

DIAZ, G.; MELIS, M.; BATETTA, B.; ANGIUS, F.; FALCHI, A. M. Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. **Micron**, v. 39, p. 819–824, 2008.

EDLUND, A. F.; SWANSON, R.; PREUSS, D. Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. **The Plant Cell**, v. 16, p. 84–97, Supplement, 2004.

ENDRESS, P. K. Links between embryology and evolutionary floral morphology. **Current Science, Bangalore**, v. 89, p. 749-754, 2005.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique. Some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, p. 123-142, 1968.

FREUDENSTEIN, J. V.; HARRIS, E. M.; RASMUSSEN, F. N. The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the vandoid complex. **American Journal of Botany**, v. 89(11), p. 1747–1755, 2002.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. The tapetum and systematics in monocotyledons. **Botanical Review**, v.64(3), p. 201-239, 1998.

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

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. The tapetum in basal angiosperms: early diversity. **International Journal of Plant Sciences**, v. 162(2), p. 375-392, 2001a.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Pollen and anther characters in monocots systematic. **Grana**, v. 40(1-2), p. 17-25, 2001.

GABRIEL, B.L. **Biological Electron Microscopy**. Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1982.

GREENSPAN, P.; MAYER, E. P.; FOWLER, S. D. Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipids droplets. **Journal of Cell Biology**, v. 100, p. 965–973, 1985.

GERRITS, P. O.; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v. 132, p. 81-85, 1983.

GERSTERBERGER, P.; LEINS, P. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae) Anwendung einer neuen Präparationsmethode. **Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 91, p.381-387, 1978.

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.

GUPTA, S. C. & NANDA, K. Studies in the Bignoniaceae. I. ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Pyrostegia*. **American Journal of Botany**, v. 65 (4), p. 395-399, 1978.

HESLOP-HARRISON, J. Tapetal origin of pollen-coat substances in *Lilium*. **New Phytologist**. v. 67, p. 779-786, 1968.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; KNOX, R. B.; HOWLETT, B. Pollen-wall Proteins: 'gametophytic' and 'sporophytic' Fractions in the Pollen Walls of the Malvaceae. **Annals of Botany**, v. 37, p. 403-12, 1973.

HESS, M. W. Ultrastructure of organelles during microsporogenesis in *Tillandsia pallidoflavens* (Bromeliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 176 (1-2), p. 63-74, 1991.

HORNER, H. T.; WAGNER, B. L. The association of druse crystals with the developing stomium of *Capsicum annuum* (Solanaceae) anthers. **American Journal of Botany**, v. 67, p. 1347-1360, 1980.

HUGHES, J.; MCCULLY, M. The use of an optical brightener in the study of plant structure. **Stain Technology**, v 50(5), p. 319-329, 1975.

IUCN. **The IUCN Red list of threatened Species**. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org>> Version 2011.1. Acessado em: 17 fev. 2013.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. São Francisco, W.H. Freeman, 1962.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, MacGraw-Hill, 1940.

JOHRI, B.M., AMBEGAOKAR, K.B., SRIVASTAVA, P.S. **Comparative Embryology of Angiosperms**. Springer, Berlin, 1992.

KAWASE, M.; TAKAHASHI, M. Chemical composition of sporopollenin in *Magnolia grandiflora* (Magnoliaceae) and *Hibiscus syriacus* (Malvaceae). **Grana**, v. 34, p. 242-245, 1995

KRAUS, J.E.; SOUZA, H.C.; REZENDE, M.H.; CASTRO, N.M.; VECCHI, C.; LUQUE, R. Astra blue and basic fuchsin Double staining for plant material. **Biotechnic Histochemistry**, v. 73, p. 235-243, 1998.

KRIECK, C. **Ecologia Reprodutiva de *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides* (Gaud) Mez. (Bromeliaceae) em Costões Oceânicos em Florianópolis, Santa Catarina**. 2008, 67 f. Dissertação (Mestre em Ciências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LAKSHMAN, K.K., Embryological studies in Bromeliaceae. I. *Lindmania penduliflora* (Ch Wright) Stapf. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B**, v. 65, p. 49–55, 1967.

LILLIE, R.D. **Histopathologic technique and practical histochemistry**. McGraw-Hill, New York, 1965.

LINDER, H. P.; RUDALL, P. J. Evolutionary history of Poales. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 36, p. 107-124, 2005.

LUTHER H. E. An alphabetical list of Bromeliad binomials. Florida: The Bromeliad Society International. **Sarasota**, 2008.

MANNING, J. C. Diversity of endothelial patterns in the angiosperms. p.136-158. In **The anther: form, function and phylogeny**. W. G. D'Arcy & R. C. Keating. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 1996.

MARTIN, F.W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technolgy**, v. 34, p. 125-128, 1959.

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

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

MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. R. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 1000, p. 405-414, 1976.

MENDES, S. P., COSTA, C. G., DE TONI, K. L.G. De. Androecium development in the bromeliad *Dyckia pseudococcinea* L.B.Sm. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered species endemic to Brazil: implications for conservation. **Flora**, v. 207 (2012), p.622– 627, 2012.

MEPHAM, R. H.; LANE, G. R., Formation of the tapetal periplasmodium in *Tradescantia bracteata*. **Protoplasma**, v. 68, p. 175-192, 1969.

MMA – **Ministério do Meio Ambiente, Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**, 2008. Disponível em <<http://www.mma.gov.br>>. Acessado em 23 fev. 20013.

MOÇO, M.C.C. **Desenvolvimento floral em *Adesmia latifolia* (spreng.) Vog. (leguminosae-papilionoideae)**; 2002, 131 f. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002

NANDA, K.; GUPTA S. C. Studies in the Bignoniaceae. II. Ontogeny of Dimorphic Anther Tapetum in *Tecoma*. **American Journal of Botany**, v. 65 (4), p. 400-405, 1978.

NEPI, M.; FRANCHI, G.G. Cytochemistry of mature angiosperm pollen. **Plant Systematic and Evolution**, v. 222, p. 45-62, 2000.

OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A; BUENO, D. M. Desenvolvimento floral e estaminal no clone CP76 de *Anacardium occidentale* L.: cajueiro-anão precoce (Anacardiaceae). **Revista brasileira de Botânica**, v. 24 (4), p. 377-388, 2001.

OLIVEIRA, J. M. S. **Androsporogênese e androgametogênese em *Spondias mombin* L. (cajazeira-Anacardiaceae)**. 2001, 125 f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2001.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcarphi Pty Ltd, Melbourne, 1981.

PACINI, E. Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. **Canadian Journal of Botany**, v.75(9), p. 1448-1459, 1997.

PACINI, E.; FRANCHI, G. G.; HESSE, M. The tapetum: its form, function, and possible phylogeny in Embryophyta. **Plant Systematic and Evolution**, v.149(3-4), p. 155-185, 1985.

PACINI, E.; FRANCHI, G.G. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. In: HESSE, M.; PACINI, E.; WILLEMSE, M. Tapetum: cytology, function, biochemistry and evolution. **Plant Systematics and Evolution**, v.7, p. 1-11, 1993.

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

PAPINI, A; MOSTI, S.; BRIGHIGNA, L. Programmed-cell death events during tapetum development of angiosperms. **Protoplasma**, v. 207, p. 213-221, 1999.

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

PIFFANELLI, P.; ROSS, J.; MURPHY, D. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. **Sexual Plant Reproduction**, v. 11, p. 65-80, 1998.

POZNER, R. Approach to the early sporangial development in angiosperms considering meiosis control and cellular differentiation. **Plant Systematic and Evolution**. v. 230, p. 25–42, 2001.

PRYCHID, C.J.; RUDALL, P.J. Calcium oxalate crystals in Monocotyledons: a review of their structure and systematic. **Annals of Botany**, v. 6, p. 725-739, 1999.

RUDALL, P. **Anatomy of Flowering Plants – An Introduction to Structure and Development**. 3^a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

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

SANTOS, R. P. **Ontogenia da esporoderme em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae)**. Tese, 160 p. UFRGS, Porto Alegre, 2000. 2^a ed. Iowa: State College Press, 228 p., 1951.

SARTORI, J. S. **Desenvolvimento Floral em *Vriesea carinata* Wawra (Tillandsioideae – Bromeliaceae)**. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 2^a ed. Iowa: State College Press, 228 p, 1951.

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

STIEGLITZ, H., Role of β -1,3-Glucanase in Postmeiotic Microspore Release. **Developmental Biology**, v. 57, p. 87-97, 1977.

VENTURELLI, M.; BOUMAN, F. Development of ovule and seed in Rapateaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 97, p. 267–294, 1988.

VIJAYARAGHAVAN, M. R.; RATNAPARKHI, S. Dual origin and dimorphism of the anther tapetum in *Alectra thomsoni* Hook. **Annals of Botany** v. 37, p. 355-359, 1973.

WEBB, M. A. Cell-Mediated Crystallization of Calcium Oxalate in Plants. **The Plant Cell**, v. 11, p. 751–761, 1999.

CAPÍTULO IV

**DIMORFISMO POLÍNICO EM *Dyckia racinae*
L.B.Sm.(BROMELIACEAE)**

INTRODUÇÃO

Dyckia com 130 espécies (LUTHER, 2008), pertence a subfamília Pitcairnioideae (Bromeliaceae), sendo considerada um gênero monofilético (GIVNISH et al., 20011), estudos filogenéticos tem sugerido uma recente radiação do gênero (KRAPP; WEISING, 2011), tal hipótese poderia explicar o grande número de espécies indeterminadas ou com identificações imprecisas (MARTINELLI et al., 2008), geradas pela grande dificuldade na determinação das mesmas, resultante da falta de caracteres consistentes e taxonomicamente úteis (LEME; RIBEIRO; MIRANDA, 2012). Informações mais específicas sobre a estrutura de esporângios e gametófitos e das etapas pelas quais passam durante seu desenvolvimento, contribuirão para a melhor caracterização de processos reprodutivos.

O desenvolvimento embriológico nas anteras está caracterizado com a androsporogênese como momento inicial, onde estão contempladas diferentes etapas, desde a formação inicial dos estames até a diferenciação final dos andrósporos para o início da gametogênese (BHANDARI, 1984; KNOX, 1984; RAGHAVAN, 1997). A androgametogênese masculina culmina com a formação de andrófitos funcionais os quais consistem em uma célula vegetativa e uma célula generativa (KNOX, 1984; JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992; RAGHAVAN, 1997). A androsporogênese e a androgametogênese, de maneira geral, envolvem processos biológicos básicos em plantas como organização de meristemas, proliferação celular através de mitoses, meiose e diferenciação celular. Dentre os processos de diferenciação a divisão celular, a divisão assimétrica é fundamental para a formação das células generativa e vegetativa (TWELL; PARK; LALANNE, 1998, UEDA et al., 2012). A interrupção do processo gametofítico de desenvolvimento *in vivo* ocorre em um grande número de espécies de angiospermas (DUNWELL, 2010) a semelhança do observado em *Dyckia racinae* L.B.Sm.(DORNELES; OLIVEIRA, 2013 – nesta Dissertação). Assim, além do processo de desenvolvimento gametofítico foram observados grãos que interromperam seu desenvolvimento e grãos que apresentaram erros na primeira mitose (DORNELES; OLIVEIRA, 2013 – nesta Dissertação). Diversos trabalhos apontam que fatores que induzem estresse, como temperatura e falta de nutrientes podem estar relacionados à interrupção do processo gametofítico (HEBERLEBORS, 1985; TELMER; NEWCOMB; SIMMONDS, 1993; SMÝKAL, 2000; ZORINIANTS et al., 2005). A interrupção do desenvolvimento gametofítico é considerada, teoricamente,

como uma indicação da totipotência da célula vegetal, onde uma única célula poderia regenerar uma planta inteira (ZORINIANTS et al., 2005). Andrósporos ou andrófitos *in vivo* foram descritos como capazes de originar embriões *in vivo* em híbridos entre espécies de *Solanum* L. (Solanaceae) (RAMANNA, 1974) e entre espécies de *Narcissus* L. (Amaryllidaceae) (KOUL; KARIALOO, 1977), porém *in vitro* podem, após interromper e alterar o padrão de desenvolvimento gametofítico, gerar novas plantas (GUHA; MAHESHWARI, 1964). Desde a descoberta de tal potencialidade de andrósporos e andrófitos (GUHA; MAHESHWARI, 1964) muitos esforços têm sido dedicados em estudo básicos e aplicados sobre o desenvolvimento esporofítico a partir de andrósporos e andrófitos (BABBAR; KUMARI; MISHRA, 2004).

Os grãos que interrompem, ou alteram, seu processo de desenvolvimento acabam apresentando características estruturais, fisiológicas, bioquímicas e moleculares comuns e foram denominados dimórficos (HEBERLE-BORS, 1985). Através da análise microscópica diferenças na estrutura nuclear e citoplasmática são usualmente descritas e consideradas como marcadores morfológicos durante o desenvolvimento *in vivo* e/ou *in vitro* dos grãos dimórficos bem como seu desenvolvimento em embriões (HEBERLE-BORS; REINERT, 1980; RASHID; SIDDIQUI; REINERT, 1981; ZAKI; DICKINSON, 1991; TELMER; NEWCOMB; SIMMONDS, 1993).

Smykal (2000) comenta que a hipótese de que existem grãos de pólen pré-formados competentes para embriogênese ser abandonada. A ocorrência de grãos dimórficos figura como indicação de potencialidade de um caminho de desenvolvimento relacionado a desdiferenciação ou interrupção do desenvolvimento gametofítico o qual, se explorado, pode resultar em embriões haploides ou duplo-haplóides (HEBERLE-BORS, 1985).

Assim, o presente estudo objetiva descrever aspectos estruturais de andrósporos e andrófitos dimórficos que ocorrem entre andrósporos e andrófitos típicos em *Dyckia racinae* L.B. Sm. como base para estudos embriológicos e androgenéticos futuros como perspectiva importante para a conservação de espécies de Bromeliaceae.

MATERIAL E MÉTODOS

O processamento e a análise do material foram realizados no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Biologia, CCNE/ UFSM. O material botânico foi coletado no

município de São Pedro do Sul, RS, Brasil, nas coordenadas geográficas 29° 35' 22,2" S e 54° 49' 49,4" W. Cabe salientar que 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 (Fig. 2.1).

O material testemunho de *D. racinae* encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria – SMDB, com registro 13840. No laboratório da UFSM está sendo mantida uma coleção líquida dos materiais coletados para as análises histológicas, com registro de coleta. Um indivíduo está sendo mantido em coleção viva, sob numeração de registro 0286, na casa de vegetação do Laboratório de Anatomia Vegetal na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Flores em diversos estádios de desenvolvimento foram coletados (Fig. 1.2 E). Para a análise em Microscopia de luz, em campo claro (ML) o material foi fixado em glutaraldeído 1% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,2 (GABRIEL; 1982; MCDOWELL; TRUMP, 1976), no qual foi adicionado Tween20 2ml/L (FREUDENSTEIN; HARRIS; RASMUSSEN, 2002). Após a fixação o material foi submetido ao vácuo, seguido de lavagem em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,2 (GABRIEL; 1982) e desidratado em série etílica. Posteriormente à desidratação, o material foi submetido a soluções de clorofórmio e etanol absoluto (1:3, 1:1, 3:1, 1:1 e 1:3), finalizando a desidratação com uma etapa de etanol absoluto. O material foi pré-infiltrado com uma solução de hidroxietilmetacrilato (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 de Teflon até sua polimerização (GERRITS; SMID, 1983).

As seções, de 3 µm de espessura, feitas em micrótomo rotativo Leica RM2245, foram coradas com Azul de Toluidina O 0,05% pH 4.4 em tampão de benzoato de sódio (FEDER; O'BRIEN, 1968). As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio Leica DM2000 com sistema de captura digital de imagem DFC 295.

Para a realização dos testes histoquímicos, as seguintes técnicas foram utilizadas: Ácido periódico-Reativo de Schiff (PAS), para polissacarídeos totais (O'BRIEN; MCCULLY, 1981), para a identificação do amido foi utilizado IKI (solução de Lugol) (JOHANSEN, 1940).

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) o material foi processado conforme Gersterberger e Leins (1978) e submetido à secagem através de ponto crítico com o uso do equipamento BAL-TEC, CPD 030, no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME/UFRGS). Em seguida, as amostras

foram montadas em suportes de alumínio e recobertas com ouro no aparelho metalizador BAL-TEC, SCD 050. A análise e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio JEOL 6060, sob 20kV (CME/UFRGS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Grãos típicos

De maneira geral o processo final de esporogênese em *D. racinae* (Figs. 2.15 A e B) é similar ao descrito para as angiospermas, principalmente para Bromeliaceae (JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992). Os andrósporos são envoltos por uma parede calósica na fase de tétrade (Fig. 1C). Após a liberação da calose apresentam formato irregular (Figs. 2.15 D e E) embora na maturidade aumentam em volume e expressam simetria típica (Fig. 2.15 G). O núcleo dos esporos apresenta densidade homogênea, sem heterocromatina, possuem usualmente um nucléolo volumoso, ou raramente dois (Figs. 2.15 D e G). Antes de ser observável uma vacuolação generalizada é observado início de amilogênese (Fig. 2.15 F). A esporoderme já apresenta a exina totalmente diferenciada e a intina em diferenciação, principalmente na região da abertura (Figs. 2.15 E, G e H).

A preparação para a primeira mitose pode ser percebida através da vacuolação citoplasmática e polarização nuclear (Fig. 2.15 G), seguido da uma mitose assimétrica (Fig. 2.15 H), resultando nas células generativa e vegetativa. A célula generativa, inicialmente lenticular (Fig. 2.15 I), tem sua parede composta por pectinas, a qual é contínua com a intina, além de celulose (DORNELES; OLIVEIRA, 2013 – nesta Dissertação). A célula vegetativa herda quase todo o citoplasma do andrósporo genitor. O polo generativo é oposto a região da abertura, podendo a célula generativa ficar na região equatorial (Figs. 2.15 I e J) ou, menos frequente deslocada para um dos polos (Fig. 2.16 A). Posteriormente, a célula generativa migra em direção ao núcleo da célula vegetativa (Fig. 2.15 J), onde formam a unidade germinativa masculina (Figs. 2.6 B e D). Como características marcantes, associadas aos volumes celulares diferentes, núcleo da célula vegetativa altamente transcrito, nucléolo proeminente devido alta atividade (Figs. 2.15 I e J, 2.16 B-D), grande condensação

cromatínica do núcleo da célula generativa (Figs 2.16 B e D). De maneira geral, a mudança diferencial na concentração de histonas, em ambas as células, está associada a polaridade estabelecida antes da primeira mitose, aos padrões de estruturação nuclear e aos diferentes destinos de funções das derivadas como consequência direta da primeira mitose assimétrica (TWELL; PARK; LALANNE, 1998; UEDA et al., 2000, RANGANATH, 2005). De acordo com Ranganath (2005) a formação de duas derivadas distintas a partir de uma célula-mãe é um processo complexo que envolve posicionamento de núcleo e formação de fuso em local específico, polarização celular através de fatores citoplasmáticos de diferenciação e citocinese. Nesse contexto, em relação a presença de celulose na parede inicial entre as células generativa e vegetativa, poderia estar relacionado a manutenção da polaridade que impediria a difusão dos fatores ou determinantes citoplasmáticos de diferenciação.

Algumas dessas características podem ser consideradas como padrão para as angiospermas (MAHESHWARI, 1950; KNOX, 1984) e foram descritas para espécies como *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) (YU; RUSSEL, 1994), *Plumbago zeylanica* L. (Plumbaginaceae). (RUSSELL et al. 1996) e para *Dyckia pseudococcinea* (MENDES; COSTA; DE TONI, 2012). Assim, após a primeira mitose assimétrica é garantida a formação da célula vegetativa (ou célula sifonogênica) e da célula generativa (ou célula gametogênica), as quais são fundamentais para o processo de formação do tubo polínico e de dupla fecundação em angiospermas (TANAKA, 1997; TWELL; PARK; LALANNE, 1998; UEDA et al. 2000).

Grãos atípicos

Entre os grãos de pólen com desenvolvimento típico foram observados grãos de pólen atípicos, onde as células generativa e vegetativa não são formadas, ou por não ocorrer a primeira mitose (Figs. 2.17 A-G), pela primeira mitose não produzir uma célula generativa lenticular ou em função da primeira mitose ser simétrica (Figs. 2.16 B-D, F e G). De maneira geral, cada variação em relação ao padrão típico de desenvolvimento possui um conjunto de características típicas, as quais poderiam ser consideradas como variantes do processo normal. De acordo com Dunwell (2010) a quase totalidade das espécies de angiospermas produzem, *in vivo*, andrósporos ou grãos de pólen atípicos em uma baixa frequência. Como principais características de tais grãos atípicos se destacam atraso no desenvolvimento ou atraso na

primeira mitose do pólen e/ou divisões celulares supranumerárias nas derivadas gametofíticas (DUNWELL, 2010).

Dentre as variações observadas no presente estudo àquela que mostra a interrupção do desenvolvimento, sem a ocorrência da primeira mitose do pólen é a mais frequente. A frequência pode ser percebida tanto pela constância nos lóculos (Figs. 2.15 F, 2.16 A, B e E) quanto pela constância em todas as anteras e flores analisadas. Como conjunto de características de tais grãos podem ser descritos a ocorrência de três a seis nucléolos relativamente menores em relação àqueles apresentados pelos grãos que efetivamente sofrem a primeira mitose (Fig. 2.17 C). O núcleo se mostra mais translúcido, com heterocromatina periférica. A posição de tais núcleos também difere, uma vez que é usual os mesmos ocorrem junto da região equatorial (Fig. 2.16 E). O citoplasma de tais grãos é normalmente menos denso, após coloração, quando comparados com as andrófitos típicos (Fig. 2.17 B e D).

Em *Lilium longiflorum* Thunb. e em *Tulipa gesneriana* L., ambas pertencentes a Liliaceae, foi descrito que o decréscimo de histonas tipo H1, no núcleo da célula vegetativa, é responsável pelo padrão de estruturação do mesmo, além de estar associado ao desenvolvimento da célula vegetativa, sendo tais histonas perdidas apenas após a primeira divisão no pólen (TANAKA; ONO; FUKUDA, 1998). O padrão de estruturação nuclear citados para *L. longiflorum* e para *T. gesneriana* (TANAKA; ONO; FUKUDA, 1998) são muito similares aos observáveis em *D. racinae* e descrito para diversas outras espécies, além de outras características como aumento de densidade citoplasmática e acúmulo de metabólitos (JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992, RAGHAVAN, 1997). Após a primeira mitose é detectada a expressão de genes específicos da fase gametofítica, tanto na célula vegetativa quanto na célula generativa (TWELL, 1992; UEDA et al., 2000; UEDA et al., 2012), sendo considerada a primeira mitose, portanto, como uma fase crítica para o desenvolvimento do gametófito masculino (BEDINGER, 1992).

Nos grãos dimórficos o volume é pouco incrementado e a região da abertura se mantém côncava, permitindo clara distinção, principalmente quando seccionados através da região polar (Figs. 2.17 C e G). A amilogênese em tais grãos inicia tardiamente, quando os grãos típicos estão maduros e as anteras já estão próximas ao período de deiscência (Fig. 2.17 E). A constatação de amilogênese tardia é importante, pois demonstra que os grãos estão funcionais, porém com atraso no início do desenvolvimento ou que possuem desenvolvimento lento. Somado ao descrito acima, a vacuolação inicialmente estabelecida não regride totalmente. Assim, ao se analisar o lóculo se percebe clara distinção na ocorrência de grãos relativamente menores, de citoplasma pouco denso e vacuolado dentre grãos mais volumosos,

às vezes quase esféricos, com citoplasma denso, com acúmulo de grãos de amido e lipídios além da diferenciação das células generativa e vegetativa (Figs. 2.17 B e D). Bhojwani; Dunwell e Sunderland (1973) observaram que o conteúdo proteico e de RNA em grãos atípicos foi muito menor em relação aos grãos típicos, cuja relevância ao presente estudo seria a percepção de coloração citoplasmática menos intensa nos grãos de pólen atípicos, que poderia estar indicando redução dos processos metabólicos que usualmente geram a intensidade de coloração típica.

Foi observado em *Hordeum vulgare* L. (Poaceae) (DALE, 1975) e em *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) (OLIVEIRA; BUENO; MARIATH, 2001) a ocorrência de grãos dimórficos entre anteras, os quais também apresentaram atraso no desenvolvimento. Dale (1975) verificou que os grãos dimórficos ocorriam predominantemente na porção basal da antera, porém, em *A. occidentale* (OLIVEIRA, BUENO, MARIATH, 2001), a semelhança de *D. racinae* a distribuição dos grãos atípicos foi uniforme nos esporângios. Em *N. tabacum* (HEBERLE-BORS; REINERT, 1979) foram denominados de ‘pólen P’ todos aqueles grãos atípicos que, além do atraso ou interrupção no desenvolvimento apresentavam fraca reação ao carmim acético e tamanho inferior aos grãos típicos. Grãos desse tipo foram observados, também, em outras espécies *in vivo* e *in vitro* (BUYSER; PICARD, 1975, HORNER; STREET, 1978; RASHID, 1983). Em espécies de *Paeonia* L. (Paeoniaceae) (SUNDERLAND; HUANG, 1987) os andrósporos que apresentavam atraso no desenvolvimento foram denominados de ‘residuais’, onde tal fato estaria relacionado por algum fator externo aos andrósporos.

Com uma ocorrência menos frequente, porém típica no androceu em algumas flores, se destacam aqueles grãos de pólen cuja citocinese foi atípica. Assim, foram observadas células cuja derivada menor é lenticular, porém com volume citoplasmático maior em relação à célula generativa (Fig. 2.16 B) ou divisões que separaram as células em metades iguais ou quase iguais (Figs. 2.16 C e F), com paredes celulares sendo formadas através do eixo polar ou equatorial, e ainda oblíquo (Fig. 2.16D). Foram também observadas paredes incompletas e paredes com descontinuidades similares a perfurações, as quais permitiam continuidade citoplasmática entre as derivadas (Figs. 2.16 F e G). Os erros na citocinese, com descritos acima, foram descritas *in vivo* (OLIVEIRA; BUENO; MARIATH, 2001) e *in vitro* (BUYSER; PICARD, 1975, HORNER; STREET, 1978, RASHID, 1983; SUNDERLAND; HUANG, 1987) e, de maneira geral, são considerados relacionados com os grãos atípicos (HEBERLE-BORS, 1985; DUNWELL, 2010). No presente estudo tal correlação se torna difícil em função do método de análise, onde as anteras são fixadas, o que impede o

acompanhamento do grão de pólen ao longo do seu desenvolvimento. Cabe salientar que o atraso no desenvolvimento pode estar configurando aspecto diferente e, portanto, não relacionado às divisões anômalas, pois é implícito ao atípico a não ocorrência de divisão. Além disso, nas citocineses anômalas as derivadas acabam usualmente diferenciando características de células vegetativas, as quais podem ser resultado da expressão gênica específica para a célula vegetativa como descrito em outros trabalhos (HEBERLE-BORS, 1985; DUNWELL, 2010).

No presente estudo, nos casos com citocinese anômala, foi observado que ambas as células derivadas apresentavam as mesmas características de uma célula vegetativa, ou seja, ambas acumularam em seus citoplasmas reservas nutritivas e seus núcleos apresentaram gradual difusão cromatínica além de nucléolos grandes. O mesmo foi observado por Tanaka e Ito (1981) e Tanaka; Ono e Fukuda, (1998). Bouharmont (1977) e Wilson; Mix e Foroughi-Wehr (1978) demonstraram que em botões florais, submetidos a baixa temperatura, ocorreu um aumento no número de andrósporos que se dividem em duas células iguais, onde Rashid e Reinert (1983) também atribuíram ao pré-tratamento a frio, associado a outros fatores, o aumento da frequência de embriões haploides. Telmer; Newcomb e Simmonds (1993) observaram que micrósporos se dividiram simetricamente após terem sido submetidos plantas ou micrósporos isolados a temperatura elevada. A análise ultraestrutural mostrou que a temperatura afetou a polaridade dos grãos, não afetou o fuso mitótico e que a divisão foi precedida pela formação de uma banda pré-profásica que é inexistente na divisão assimétrica dentro do padrão gametofítico típico (TELMER; NEWCOMB; SIMMONDS, 1993).

Os estudos sobre efeitos da falta de açúcares para alteração da rota gametofítica de desenvolvimento têm sido utilizados em grãos de pólen em cultivo, botões florais, anteras excisadas ou até plantas completas (HEBERLE-BORS, 1979). Segundo Zorinants et al. (2005) o nível de açúcares é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento típico de andrósporos e andrófitos férteis. Os níveis de açúcares em tecidos vegetativos também tem sido estudados (YU, 1999), aspectos da floração (CORBESIER; LEJEUNE ;BERNIER, 1998; ROLDAN et al., 1999), além de grãos de pólen (GARRIDO, et al., 1995, ZORINIANTS et al., 2005). Nas células de tecidos somáticos a falta de açúcares gera interrupção do desenvolvimento e crescimento, rápido consumo de carboidratos e de lipídios celulares, e degeneração de proteínas entre outras a nível bioquímico (YU, 1999). Em grãos de pólen de *N. tabacum*, sob regime de cultivo *in vitro*, foi demonstrado que a falta de açúcares induz a desdiferenciação de plastídios, ao consumo de açúcares e ao aparecimento de um amplo vacúolo (GARRIDO et al., 1995). Algumas das características chamam a atenção

quando comparadas às características dos grãos atípicos descritas para *D. racinae*, no presente estudo, como a interrupção do desenvolvimento e crescimento além da presença de um único vacúolo. A menor coloração do citoplasma dos grãos atípicos, não apenas em *D. racinae*, poderia estar relacionada a eventual perda de lipídios e, principalmente, de proteínas.

O andrósporo recém-liberado das tétrades é altamente sensível para uma grande variedade de estresses abióticos (DOLFERUS; JI; RICHARDS, 2011). Oliver et al. (2005) colocam que o arroz que é exposto a baixas temperaturas durante o pico da atividade tapetal, na liberação dos andrósporos da tétrade, causam o acúmulo de açúcares na antera. O estresse hídrico na antese afeta principalmente o tamanho do grão e na fase de desenvolvimento do andrósporo jovem é causa a esterilidade do grão de pólen (JI et al., 2010). No caso do pólen do trigo é provável que o estresse hídrico interfira diretamente na função do tapete (JI et al., 2010). O tapete é particularmente sensível ao estresse abiótico, baixas temperaturas ou falta de água podem acabar atrasando seu desenvolvimento, já a exposição a altas temperaturas causariam seu desenvolvimento precocemente (PARISH; PHAN; IACUONE, 2012).

O estresse térmico, como a alta temperatura induz variações no desenvolvimento polínico em espécies de *Brassica* L. (Brassicaceae) (KELLER; ARMSTRONG, 1979). O estresse nutricional, pela ausência de açúcares, induz alterações similares em *N. tabacum* (TOURAEV et al. 1996). Além disso, o programa de desenvolvimento gametofítico parece favorecer o desenvolvimento da célula vegetativa, independentemente de haver ou não divisão celular ou da divisão ser ou não simétrica, uma vez que em qualquer situação genes específicos na diferenciação da referida célula serem detectados (TWELL; PARK; LALANNE, 1998). A diferenciação da célula generativa parece ser intimamente ligada a divisão assimétrica. Assim, conforme sugere Twell; Park e Lalanne (1998), o programa de desenvolvimento gametofítico e, principalmente, da célula vegetativa é influenciado por fatores externos como nutrientes, hidratação e variação térmica.

Em *D. racinae*, como comentado por Martins et al. (2013 – nesta Dissertação), o florescimento e o local de ocorrência dos indivíduos ocorre em meio a altas temperaturas e solo raso e pedregoso, o que pode estar induzindo a uma relativa alta demanda metabólica, incluindo anteras e grãos de pólen, o que é indiretamente indicado pela grande quantidade de açúcares armazenados do tecido estaminal e nos grãos de pólen. Outra hipótese sugerida seria a de que a sacarose que deveria chegar até os andrósporos jovens é bloqueada, devido o estresse abiótico, e com isso acaba se acumulando na parede da antera em forma de grãos de amido.

Os estudos que envolvem a indução da divisão simétrica no grão de pólen, tanto por agentes químicos quanto físicos, usualmente incluem como procedimento metodológico a definição de fases de desenvolvimento de andrósporos e andrófitos, onde se demonstra que a fase responsiva aos tratamentos é a fase de vacuolação ou que precede a primeira mitose (BOUHARMONT, 1977; WILSON; MIX ; FOROUGHI-WEHR, 1978; ZAKI; DICKINSON, 1991; TELMER; NEWCOMB; SIMMONDS, 1993; SMÝKAL, 2000; BABBAR; KUMARI; MISHRA, 2004; DUNWELL, 2010). Em *D. racinae* se acredita que a menor ocorrência de divisões simétricas ou quase simétricas, possui relação com a necessidade de coincidência entre a fase do desenvolvimento e o momento do dia em que os botões florais estão sob a maior exposição ao calor. Em *Brassica napus* um período de exposição dos grãos por oito horas à temperatura de 32,5°C é suficiente para indução de divisões simétricas e perda do desenvolvimento gametofítico durante a fase de andrósporo uninucleado (CUSTERS et al., 1994; BABBAR; KUMARI; MISHRA, 2004) e 42°C ao grão de pólen já bicelular (ZORINIANTS et al., 2005).

Foi demonstrado que após a movimentação do núcleo, através de vacuolação, o mesmo é ancorado à membrana plasmática por microtúbulos (HAUSE; HAUSE; VAN LAMMEREN, 1992; BABBAR; KUMARI; MISHRA, 2004). Tratamentos com temperatura elevada promovem a despolimerização de microtúbulos (ZHAO; SIMMONDS; NEWCOMB, 1996; SIMMONDS; KELLER, 1999) que resultam no retorno do núcleo a sua posição central (SIMMONDS; KELLER, 1999), fato que está relacionado a perda do padrão de desenvolvimento gametofítico, ocorrendo ou não citocinese, uma vez que a célula generativa não se desenvolve.

Após a primeira mitose ocorrem mudanças típicas na esporoderme, célula generativa e na célula vegetativa. Quando analisadas em conjunto, tais características permitem clara distinção em relação aos grãos que não mantêm o mesmo modo de desenvolvimento. A melhor conclusão sobre a ocorrência de atraso no desenvolvimento, interrupção do mesmo, ou até abortamento, depende de aplicação de outras metodologias, principalmente se fossem incluídas análises fisiológicas ou bioquímicas.

CONCLUSÕES

Variações no programa de desenvolvimento gametofítico em grãos de pólen podem ser consideradas como uma rota androgênica importante bem como andrófitos bicelulares simétricos, ou quase. Os estudos das rotas androgênicas de desenvolvimento resultaram em grandes avanços na produção de embriões sintéticos, os quais podem ser aplicados com sucesso em diferentes aspectos, dentre eles a conservação de espécies.

As variantes rotas de desenvolvimento polínico *in vivo*, observadas no presente estudo podem ser obtidas *in vitro*, através da influência de meios de cultura. Em tais condições é comum ser explorado o potencial embriogênico das células.

Sugere-se, com base na discussão apresentada acima, que as alterações de rotas de desenvolvimento possam ser resultado de competição dos andrósporos por açúcares, em quantidade suficiente ou, tais grãos poderiam ser menos hábeis na absorção de açúcares. A demanda metabólica, que induz ao maior consumo de açúcares poderia resultar em alterações no desenvolvimento pela ausência de nutrientes em momento crítico do desenvolvimento. Os erros nas divisões, que ocorrem em frequência muito menor, poderiam estar refletindo aspectos limiares do estresse térmico, típico do ambiente local, que poderiam influenciar cada um dos andrósporos ou andrófitos.

A constatação de ocorrência de dimorfismo polínico em *Dyckia racinae* gera perspectivas de novos estudos em diferentes áreas tanto básicas quanto aplicadas. Considerando que *D. racinae* possui ocorrência restrita na região central do Rio Grande do Sul e cujos acessos são usualmente difíceis, ou em função das pequenas populações ocorrerem em áreas privadas, os programas de conservação se tornam extremamente relevantes. A proposta de manutenção de coleções vivas através do edital PRONEX (FAPERGS/CNPq), que fomentou o presente estudo, se mostrou em curto espaço de tempo fundamental para o contexto de *D. racinae*.

Atualmente as informações sobre eventual vulnerabilidade ou risco de extinção são desconhecidas para a referida espécie, como era desconhecida a própria ocorrência da espécie na região. Assim, os resultados do presente estudo também se tornam relevantes, pois além de descrever um aspecto embriológico desconhecido em Bromeliaceae, apresentam as bases morfológicas para estudos em diversas áreas tanto básicas quanto aplicadas, figurando, também, como informação importante para a conservação da espécie.

Figura 2.15 Aspecto geral de *Dyckia racinae* a campo e desenvolvimento do grão dimórfico. A. aspecto geral do indivíduo em floração na localidade de São Pedro do Sul. B. Detalhe da flor em antese. C. Tétrade em calose, com microscopia óptica e fluorescência. D. Detalhe de andrósporos típicos recém liberados da calose. E. Aspecto geral de andrósporos típicos livres com formato irregular. F. Aspecto geral de lóculo mostrando contraste entre andrófitos típicos e atípicos. G. Andróspero típico maduro, vacuolado e polarizado no sentido polar. H. Detalhe da primeira mitose. I. Células generativa (asterisco) e vegetativa (seta = núcleo da célula vegetativa). J. Célula generativa (asterisco) sendo englobada pela célula vegetativa. (seta = núcleo da célula vegetativa).

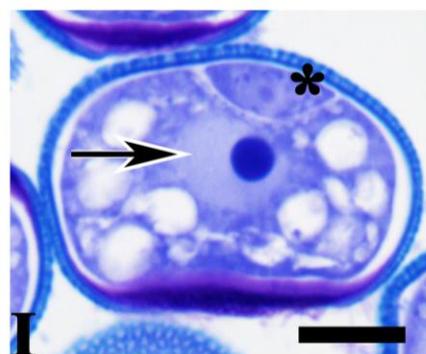
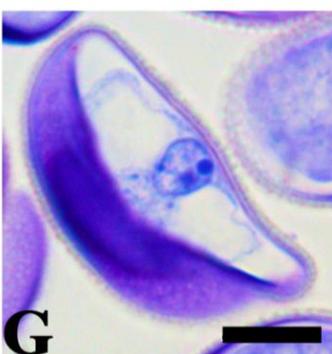
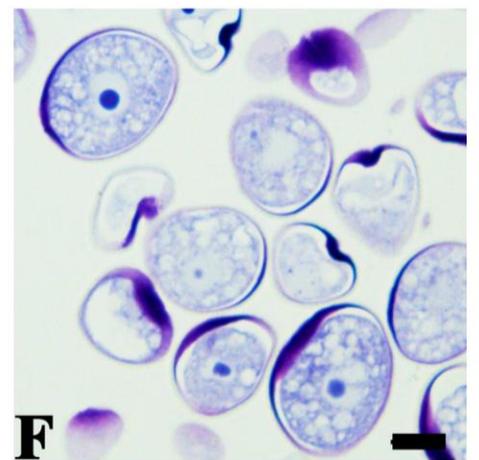
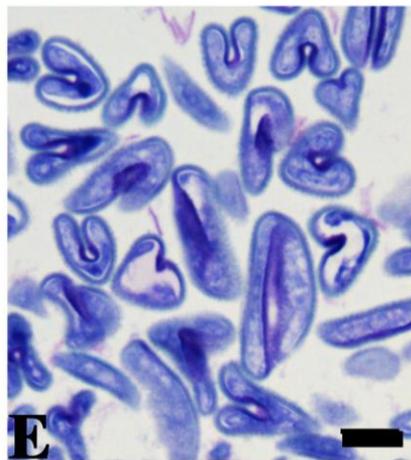
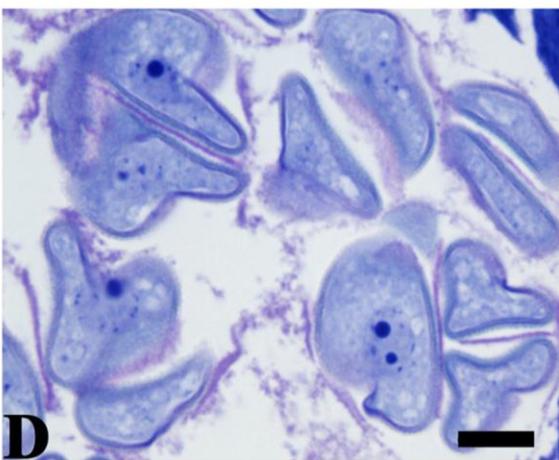
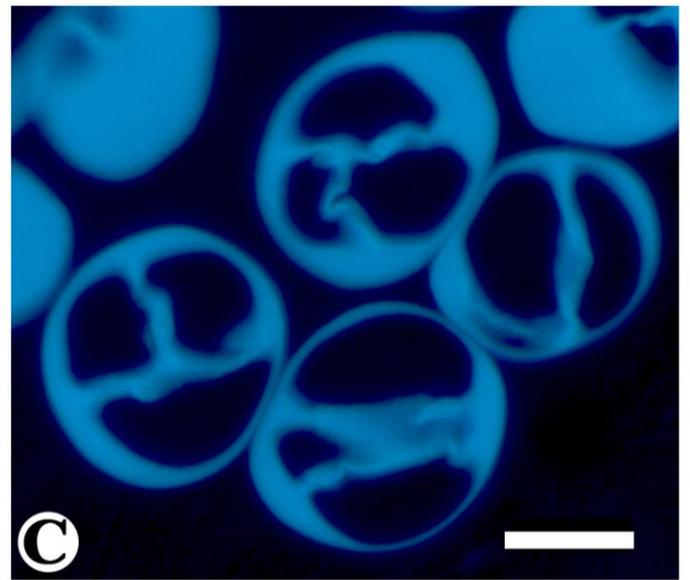


Figura 2.16 Divisões atípicas encontradas nos andrófitos entre as células generativa e vegetativa. A. Célula generativa (asterisco) em posição equatorial. (seta = núcleo da célula vegetativa). B. Seta indica possível célula generativa com volume celular alterado. C. Setas indicam paredes celulares após mitose assimétrica anômala. D. Seta indica parede celular em posição oblíqua. E. Detalhe de grão atípico, polarizado em seu eixo equatorial, com desenvolvimento interrompido na fase vacuolada. F. seta indica perfuração na parede celular, após mitose simétrica. G. Setas indicam núcleos próximos após primeira mitose atípica.

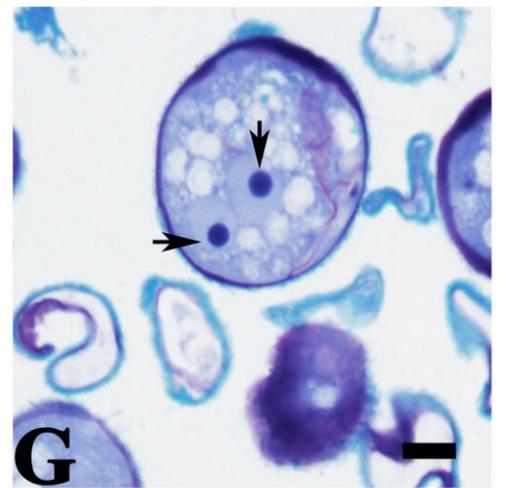
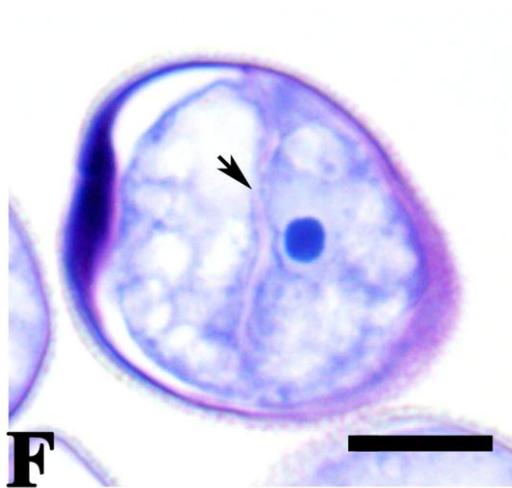
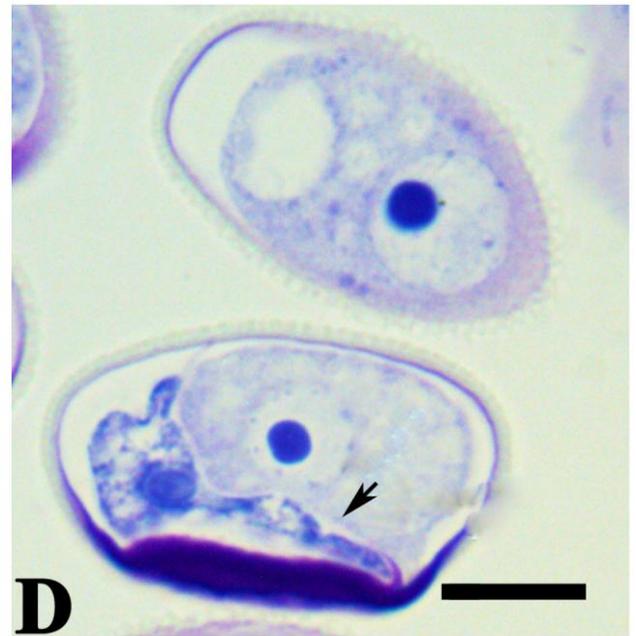
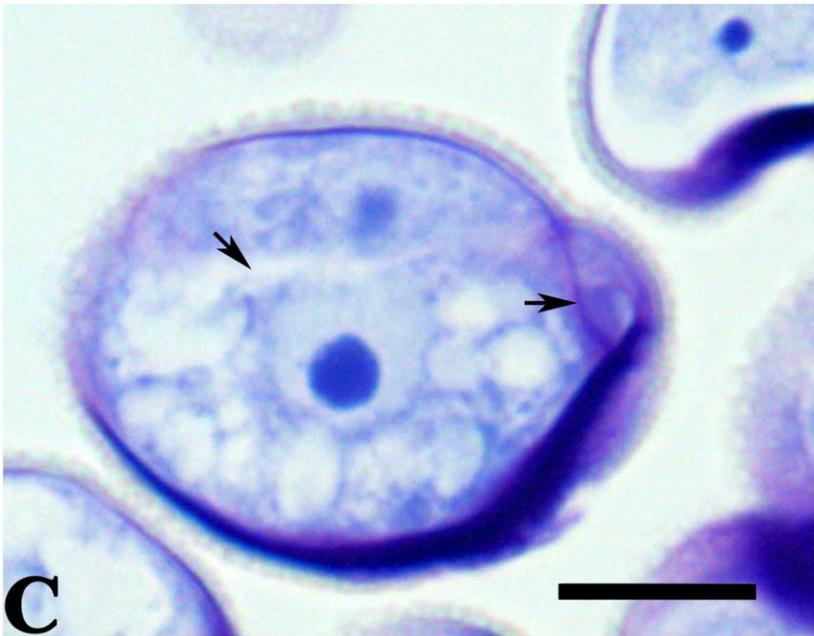
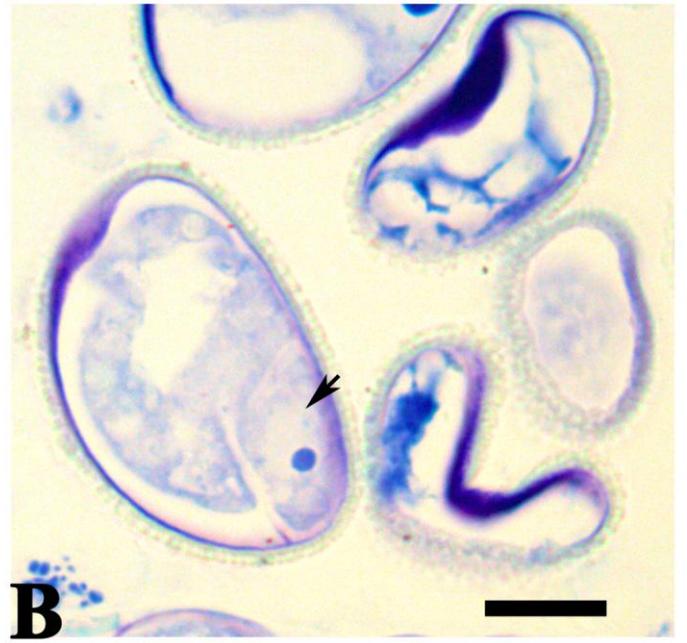
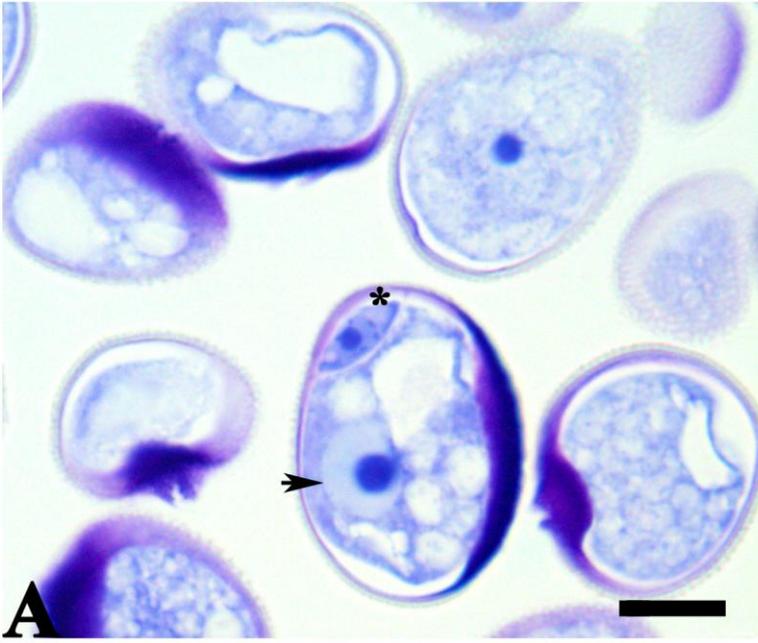
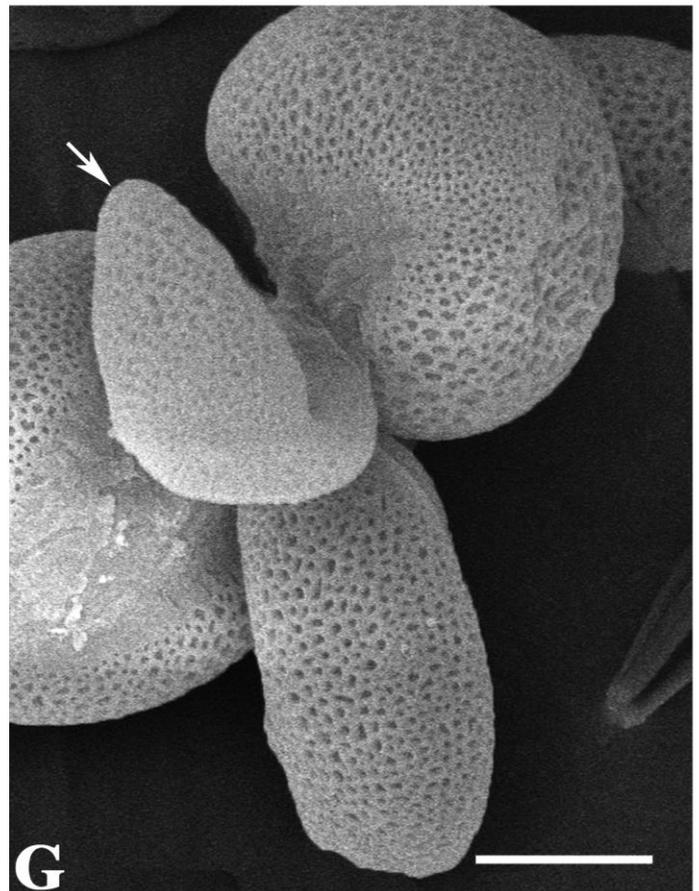
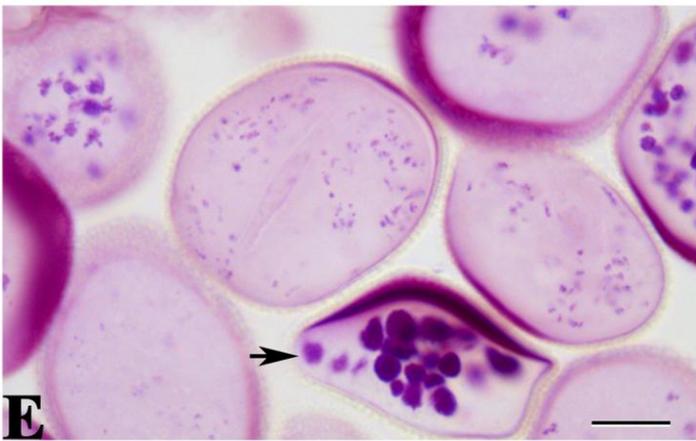
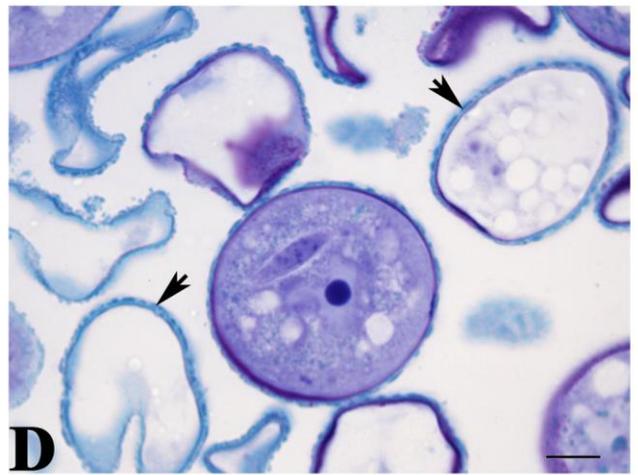
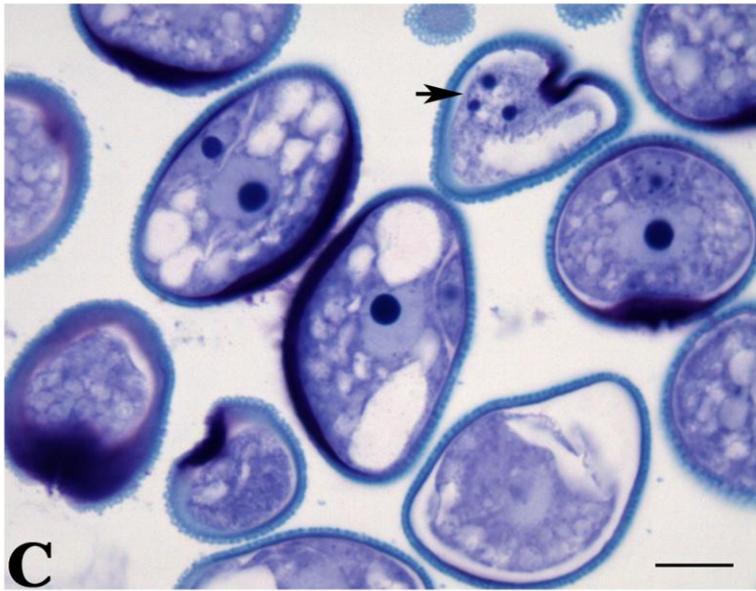
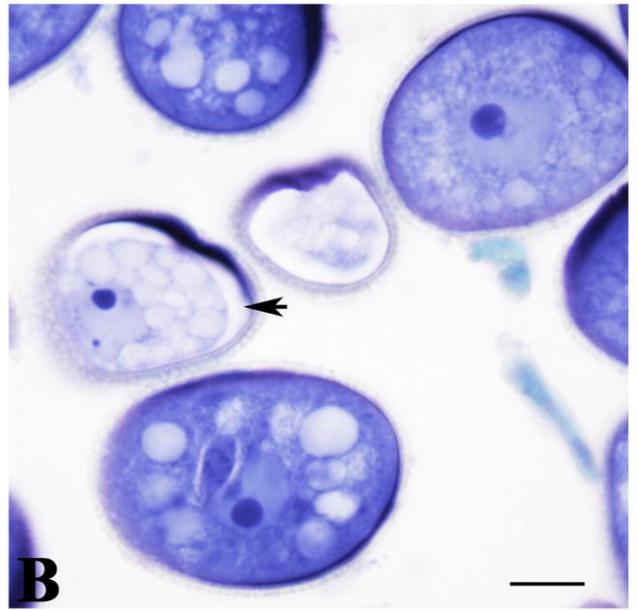
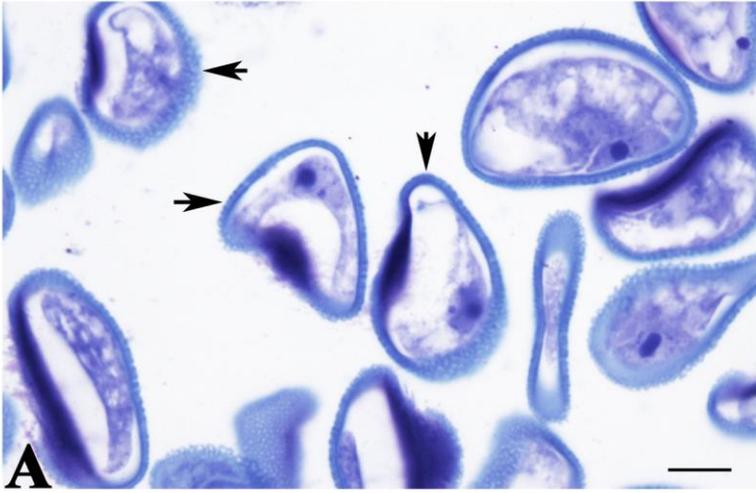


Figura 2.17 Andrófitos atípicos em diversas fases de desenvolvimento. A-F. Microscopia óptica. G. Microscopia eletrônica de varredura. A. Setas indicam grãos atípicos durante o início da gametogênese. B. Seta indica grão atípico, gametófito típico ainda com reservas metabólicas, durante início da formação da unidade germinativa masculina. C. Seta indica núcleo do pólen atípico com três nucléolos periféricos e cariolinfa menos densa. D. Setas indicam grãos atípicos durante gametogênese tardia. E. Seta indica grão atípico com reserva de amido durante gametogênese tardia. F. Seta indica grão atípico sem reservas de amido durante amilogênese no início da gametogênese. G. Morfologia comparada de grãos atípicos (seta) e típicos.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABBAR SH.B., KUMARI N., MISHRA J.K. ***In Vitro* androgenesis: events preceding its cytological manifestation**. In Plant Biotechnology and Molecular Markersrivastava P.S., Narula A., Srivastava Sh. New Delhi: Anamaya Publishers, p. 1-17, 2004.
- BEDINGER, P. The remarkable biology of pollen. **Plant Cell**, v.4, p. 879–887, 1992.
- BHANDARI, N.N. The microsporangium. In: JOHRI, B.M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag, p. 53-121, 1984.
- BHOJWANI, S.S., DUNWELL, J.M.; SUNDERLAND, N. Nucleic acid and protein contents of embryogenic tobacco pollen. **Journal of Experimental Botany**, v.24, p. 863–871, 1973.
- BOUHARMONT, J. Cytology of microspores and calli after anther culture in *Hordeum vulgare*. **Caryologia**, v. 30, p. 351-360, 1977.
- BUYSER, J.; PICARD, E. Observation de divisions supplémentaires dans les grains de pollen de plants homozygotes de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) obtenues par androgénese in vitro. **Comptes Rendus Academy des Sciences**, v. 281, p.1153-1156, 1975.
- CUSTERS JBM, GORDEWENER JHG, NOLLEN Y, DONS JJM, VAN LOOKEREN-CAMPAGNE MM Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore culture of *Brassica napus*. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 267–271, 1994.
- DALE, P.J. Pollen dimorphism and anther culture in barley. **Planta**, v. 127, p. 213-220, 1975.
- DOLFERUS, R; JI, X; RICHARDS, R. A Abiotic stress and control of grain number in cereals. **Plant Science**, v. 181, p. 331-34, 2011.
- DUNWELL J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 377–424, 2010.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique. Some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, p. 123-142, 1968.

FREUDENSTEIN, J. V.; HARRIS, E. M.; RASMUSSEN, F. N. The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the vandoid complex. **American Journal of Botany**, v. 89(11), p. 1747–1755, 2002.

GABRIEL, B.L. **Biological Electron Microscopy**. Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1982.

GARRIDO, D.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E.; RODRIGUEZ-GARCÍA, M.I. Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. **Protoplasma**, v. 186, p. 220-230, 1995.

GERRITS, P. O.; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v. 132, p. 81-85, 1983.

GERSTERBERGER, P.; LEINS, P. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae) Anwendung einer neuen Präparationsmethode. **Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 91, p.381-387, 1978.

GUHA, S.; MAHESHWARI, S.C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. **Nature**, p. 204: 497, 1964.

HAUSE G.; HAUSE B.; VAN LAMMEREN A. A. M. Microtubular and actin filament configurations during microspore and pollen development in *Brassica napus* cv. Topas, **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 1369–1376, 1992.

HEBERLE-BORS, E. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 71, 361-374, 1985.

HEBERLE-BORS, E.; REINERT, J. Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum*: dependence upon pollen development. **Protoplasma**, v.99, p.237-245, 1979

HEBERLE-BORS, E.; REINERT, J. Isolated pollen cultures and pollen dimorphism. **Naturwissenschaften**, v.67, p.311-312, 1980.

HORNER, M.; STREET, H.E. Pollen dimorphism - origin and a significance in pollen plant formation by anther culture. **Annals of Botany**, v. 42, p.763-771, 1978.

JI, X.; SHIRAN, B.; WAN, J.; LEWIS, D.C.; JENKINS, C.L.D.; CONDON, A.G.; RICHARDS, R.A.; DOLFERUS, R. Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. **Plant Cell Environ**, v. 33, p. 926–942, 2010.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, MacGraw-Hill, 1940.

JOHRI, B.M., AMBEGAOKAR, K.B., SRIVASTAVA, P.S. **Comparative Embryology of Angiosperms**. Springer, Berlin, 1992.

KELLER, W.A.; ARMSTRONG, K.C. Stimulation of embryogenesis in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 55, p. 65–67., 1979.

KNOX, R.B. **The pollen grain**. In Embryology of angiosperms (B.M. Johri, ed.). Springer Verlag, Berlin, p.197-271, 1984.

KOUL, A. K.; KARIHALOO, J. L. *In vivo* embryoids from anthers of *Narcissus biflorus* Curt. **Euphytica**, v. 26, (1), p 97-102, 1977.

KRAPP, F.; WEISING, K. **Young and successful: phylogeny and evolutionary history of the large genus *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequence data**. In: Biosystematics Berlin 2011, programme and abstracts. Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Freie Universität Berlin, p. 21, 2011.

LEME, E. M. C., RIBEIRO, O. B. C.; MIRANDA, Z. J. G. New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. **Phytotaxa**, v. 67, p. 9–37, 2012.

LUTHER H. E. An alphabetical list of Bromeliad binomials. Florida: The Bromeliad Society International. **Sarasota**, 2008.

MAHESHWARI, P. **An introduction to the embryology of angiosperms**. McGraw-Hill Publishing Company Ltd., New Delhi, 1950.

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

MENDES, S. P., COSTA, C. G., DE TONI, K. L.G. De. Androecium development in the bromeliad *Dyckia pseudococcinea* L.B.Sm. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered species endemic to Brazil: implications for conservation. **Flora**, v. 207 (2012), p.622– 627, 2012.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcarphi Pty Ltd, Melbourne, 1981.

OLIVEIRA, J. M. S.; BUENO, D. M.; MARIATH, J. E. A. Grãos de pólen anômalos no clone CP76 de *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 425-433, 2001.

OLIVER, S.N.; VAN DONGEN, J.T.; ALFRED, S.C.; MAMUN, E.A.; ZHAO, X.C.; SAINI, H.S.; FERNANDES, S.F.; BLANCHARD, C.L.; SUTTON, B.G.; GEIGENBERGER, P.; DENNIS, E.S.; DOLFERUS, R. Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4 is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. **Plant Cell Environ**, v. 28, p. 1534–1551, 2005.

PARISH, R. W.; PHAN, H. A.; IACUONE, S.; LI, S. F. Tapetal development and abiotic stress: a centre of vulnerability. **Functional Plant Biology**, v.39, p. 553–559, 2012.

RAGHAVAN, V. **Molecular embryology of flowering plants**. Cambriedge University Press, 690p, 1997.

RAMANNA, M. S. The origin of unreduced microspores due to aberrant cytokinesis in the meiocytes of potato and its genetic significance. **Euphytica**, v. 23, n. 1, p. 20-23, 1974.

RANGANATH, R. M. Asymmetric cell divisions in flowering plants—one mother, “two-many” daughters. **Plant Biology**, v. 7, p. 425–448, 2005.

RASHID, A. Pollen dimorphism in relation to pollen plant formation. **Physiologia Plantarum**, v. 58, p. 544-548, 1983.

RASHID, A.; REINERT, J. Differentiation of embryogenic pollen in cold treated buds of *Nicotiana tabacum* var. *Badischer* Burley and nutritional requirements of the isolated pollen to form embryos. **Protoplasma**, v.106, p. 137-144, 1981.

RUSSELL, S. D; STROUT, G. W; MISLAN, T. W; THOMPSON, R. A; STRAMSKI, A. K; SCHOEMANN, L. M. Microgametogenesis in *Plumbago zeylanica* (Plumbaginaceae). 1.

Descriptive cytology and threedimensional organization. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 1435–1453, 1996.

SIMMONDS, D. H.; KELLER, W. A. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. **Planta**, v. 208, p. 283–391, 1999

SMÝKAL, P., Pollen embryogenesis: the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development, current status and future prospects, **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 481–489, 2000.

SUNDERLAND, N.; HUANG, B. Ultrastructural aspects of pollen dimorphism. **International Review of Cytology**, v. 107, p. 175-220, 1987.

TANAKA, I. Differentiation of generative and vegetative cells in angiosperm pollen. **Sexual Plant Reproduction**, v. 10, p. 1-7, 1997.

TANAKA, I., ONO, K.; FUKUDA, T. The developmental fate of angiosperm pollen is associated with a preferential decrease in the level of histone H1 in the vegetative nucleus. **Planta**, v. 206, p. 561-569, 1998.

TANAKA, I.; ITO, M. Control of division patterns in explanted microspores of *Tulipa gesneriana*. **Protoplasma**, v.108, p. 329-340, 1981.

TELMER, C. A.; NEWCOMB, W.; SIMMONDS, D. H.,. Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division *in vivo* and *in vitro*. **Protoplasma**, v. 172, p. 154-165, 1993.

TOURAEV, A.; INDRIANTO, A.; WRATSCHKO, I.; VICENTE, O; HEBERLE-BORS, E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. **Sexual Plant Reproduction**, v. 9, p. 209–215, 1996.

TWELL, D. Use of a nuclear-targeted b-glucuronidase fusion protein to demonstrate vegetative cell-specific gene expression in developing pollen, **The Plant Journal**, v. 2, p. 887–892, 1992.

TWELL, D., PARK, S. K.; LALANNE, E. Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. **Trends Plant Science**, v. 3, p. 305–310, 1998.

UEDA, K.; KINOSHITA, Y.; XU, Z.; IDE, N.; ONO, M.; AKAHORI, Y.; TANAKA, I.; INOUE, M. Unusual core histone specifically expressed in male gametic cells of *Lilium longiflorum*. **Chromosoma**, v. 108, p. 491-500, 2000.

UEDA, K.; ONO, M.; IWASHITA, J.; WABIKO, H.; INOUE, M. Generative cell-specific activation of the histone gH2A gene promoter of *Lilium longiflorum* in tobacco. **Sexual Plant Reproduction**, v. 25, p. 247–255, 2012.

WILSON, H. M.; MIX, G.; FOROUGH-WEHR, B. Early microspore division and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anthers of *Hordeum vulgare* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 29 (108), p. 227-238, 1978.

YU, H.; RUSSEL, S.D. Male reproductive cell development in *Nicotiana tabacum*: male germ unit associations and quantitative cytology during sperm maturation. **Sexual Plant Reproduction**, v. 7, p. 324-332, 1994.

YU, S. M. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. **Plant Physiology**, v. 121, p. 687–693, 1999.

ZAKI, M.A.M.; DICKINSON, H.G. Microspore derived embryos in *Brassica*: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. **Sexual Plant Reproduction**, v. 4, p. 48-55, 1991.

ZHAO, J.P.; SIMMONDS, D.H.; NEWCOMB, W. Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. **Topas. Planta**, v. 198, p. 433–439, 1996.

ZORINIANTS, S.; TASHPULATOV, A. S.; HEBERLE-BORS, E.; TOURAEV, A. The Role of Stress in the Induction of Haploid Microspore Embryogenesis. In **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Haploids in Crop Improvement**, v. 56, p 35 – 52, 2005.

CAPÍTULO V

ARTIGO

DYNAMICS OF STARCH RESERVES OF THE ANTHOR AND POLLEN GRAINS IN BROMELIACEAE SPECIES

(Artigo foi redigido de acordo com as normas para autores do periódico 'Iheringia, Serie Botânica')

Dynamics of starch reserves of the anther and pollen grains in

Bromeliaceae species¹

Merielem Saldanha Martins², Cristiele Spat³, Mariane Paludette Dorneles⁴, Cesar Carvalho de Freitas², Jaqueline Sarzi Sartori⁵, João Marcelo Santos de Oliveira⁶

RESUMO: O objetivo deste estudo é investigar a dinâmica do amido nas anteras e nos grãos de pólen de três espécies de *Bromeliaceae*: *Aechmea recurvata* (Klotzsch) L.B.Sm., *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. e *Dyckia racinae* L.B.Sm.. Estas espécies apresentam grãos de pólen do tipo “starchless”, com pouco amido, no momento da dispersão. Por outro lado, acredita-se que o acúmulo de amido no conectivo e nos esporângios, exclusivamente na *Dyckia racinae*, seja uma estratégia relacionada ao estresse ambiental e à demanda metabólica.

PALAVRAS-CHAVE: andrósporos, antera, carboidratos.

ABSTRACT: **Dynamics of starch reserves of the anther and pollen grains in *Bromeliaceae* species.** The aim of this study is to investigate the dynamics of starch in anthers and pollen grains from three *Bromeliaceae*: *Aechmea recurvata* (Klotzsch) L.B.Sm., *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. and *Dyckia racinae* L.B.Sm. These species exhibit starchless pollen grains at the time of dispersal. On the other hand, it is believed that starch accumulation in connective and sporangia, exclusively on *Dyckia racinae*, is a strategy related to both environmental stress and metabolic demand.

KEYWORDS: androsporo, anther, carbohydrate

¹ Parte dos resultados obtidos através do projeto ‘Sistemática e Conservação de Bromeliaceae’. Edital PRONEX nº 008/2009, FAPERGS-CNPq.

² Graduanda(o). Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

³ Mestra. Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Departamento de Biologia (CCNE, UFSM).

⁴ Mestranda. Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Departamento de Biologia (CCNE, UFSM).

⁵ Pós-Doutoranda, projeto ‘Sistemática e Conservação de Bromeliaceae’. Edital PRONEX, FAPERGS-CNPq nº 008/2009.

⁶ Professor Adjunto. Laboratório de Botânica Estrutural (LABOTE), Departamento de Biologia (CCNE, UFSM). Avenida Roraima, nº 1000, Cidade Universitária. Departamento de Biologia, Prédio 16. Sala 3253. Bairro Camobi, Santa Maria – RS. CEP 97105-900. E-mail: linneau@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

INTRODUCTION

Pollen viability is one of the most important botanical parameters, responsible for ensuring that fertilization occurs satisfactorily in plants (Delph *et al.*, 1997). Carbohydrates are accumulated during pollen grains development, being used in different ways (Pacini *et al.*, 2006). In this sense, starch is one of the polysaccharide reserves most commonly found in pollen grains (Pacini, 1996).

According to Baker & Baker (1979), it can be found two classes of pollen grains among Angiosperms: type "starchless", with pollen grains containing little starch at the time of dispersal; and type "starchy", with dispersed pollen grains containing large amounts of starch.

Thus, the present study aims to show changes in starch reserves in anther and during the formation of male gametophyte in three *Bromeliaceae*: *Aechmea recurvata*, *Tillandsia aeranthos* and *Dyckia racinae*.

MATERIALS AND METHODS

In order to investigate the dynamics of starch in anthers and pollen grains, inflorescences with flower buds were collected at different stages of development of *Tillandsia aeranthos* (Fig. 3), in Santa Maria, RS (coordinates S29°38'36,3"/W53°54'14,4"), and in São Sepé, RS (coordinates S29°54'47,9"/W53°41'07,2"); of *Aechmea recurvata* (Fig. 2), in Santa Maria, RS (coordinates S29°36'095"/W53°42'840"); and, finally, of *Dyckia racinae* (Fig. 1), in São Pedro do Sul, RS (coordinates 29° 35' 22,2" /W54°49'49,4").

The flower buds were dissected under Leica EZ4D stereoscopic microscope before being fixed. Then the material was fixed in 1% glutaraldehyde and 4% formaldehyde (McDowell & Trump, 1976) in 0,1M sodium phosphate buffer pH 7.2 (Gabriel, 1982), dehydrated in a graded ethylic series, and included on hydroxyethylmethacrylate (Gerrits & Smid, 1983). Subsequently, sections of 2 to 5µm thick were made in Leica RM2245 rotary

microtome. We have used IKI for starch identification (Johansen, 1940). The analysis and the photomicrographs were held at Leica DM2000/ DFC 295 microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

We have defined three distinct stages of development in the three species studied in order to observe and make a comparative analysis of the dynamics of starch both in the sporangium and in the arquesporial tissue.

In androspores, during the dyad and tetrad stages, still surrounded by callose, starch grains were not detected in the three species. In the sporangium and in the cells of the connective, the reaction was negative for the presence of starch in *Aechmea recurvata* and in *Tillandsia aeranthos*, contrasting with *Dyckia racinae*, in which showed large amount of starch grains (Fig. 4).

The androspores when still enclosed by callose do not show starch accumulation (Figs. 4, 5 and 6). Shortly after the androspores release in the locular fluid, small grains of starch were seen in the cytoplasm in the three species (Figs. 7, 8 and 9).

The third stage is soon after the first mitosis in the pollen grain. The accumulation of starch grains proved relatively more intense at this stage, being it just in vegetative cell (Figs. 10, 11 and 12).

Pacini (1996) has described developmental stages and intensity of amylogenesis similar to that described in this work. Pacini & Franchi (1988) have observed that in the species where occur two peaks of amylogenesis, the second peak is more intense. From the maximum amylogenesis observed in this study, the later stages were marked by a progressive assimilation of these reservations, culminating in pollen grains without starch in the dispersion phase.

Baker & Baker (1979) have considered for *Bromeliaceae* the presence of starchless pollen, similar to what we have found in this work. On the ecological context, the distribution

of this type of reservation would be related to strategies adopted on the basis of pollination syndrome (Baker & Baker, 1979).

Speranza *et al.* (1997), to relate the different types of metabolic reserves, have found that starchless pollen grains at maturity are those that present greater longevity during the dispersal. Such longevity would be linked to the presence of sugars from amylolysis in the cytoplasm, and that would be associated with dehydration.

Temperature variations during the development of the pollen can also influence content of starch (Pressmam *et al.*, 2002; Sears, 1926), as well as there are species in which the starch reserve changes according to the seasons (Zona, 2001) or on the basis of different latitudes in which species are located (Baker & Baker, 1979). In addition, it has also been reported that plants exposed to extreme environmental conditions can store an increased amount of starch at the time of pollen grain dispersal (Pacini, 2006). After the dissolution of the callose, the androspores begin to store carbohydrates that will be extremely important to pollen grain in its development (Eva *et al.*, 2006).

Starch grains were not found in the cytoplasm of the generative cell in the three species analyzed, contrasting with the vegetative cell cytoplasm, which is rich in this type of reserve. As activities inherent to vegetative cell, it may be mentioned the construction of intine, the participation in the formation of male germ unit, and the formation of pollen tube, in which carbohydrates are used both metabolically and structurally. Eva *et al.* (2006), analyzing *Tillandsia seleriana* Mez, demonstrated that the vegetative cell was responsible for the supply of reserves used during development of the generative cell, and then to the emission of the pollen tube.

CONCLUSIONS

In the present study, we note that the pollen grains in *Dyckia racinae*, *Tillandsia aeranthos* and *Aechmea recurvata* are not dispersed with starch, although the first species occur on relatively stressful environment.

In addition, *Dyckia racinae* is the only species of terrestrial habit, located in never shaded environment, exposed to higher intensity of winds, where the soil is shallow, stony and with higher altitude. The other two species have epiphytical habit, located usually in shaded areas, with higher moisture content.

Dyckia racinae was the only species that showed accumulation of starch in the sporangium. This difference can be reflecting strategies related to environment due to the relative major metabolic demand and to the higher risk of environmental stress on the processes of sporogenesis and gametogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to FAPERGS-CNPq financial support [PRONEX n° 008/2009]; to CAPES by Mariane Paludette Dorneles master scholarship; and to REUNI PRPPG/UFSM financial support of scientific initiation scholarship granted to Merielem Saldanha Martins.

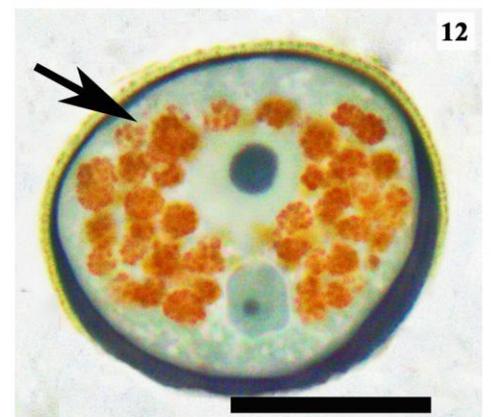
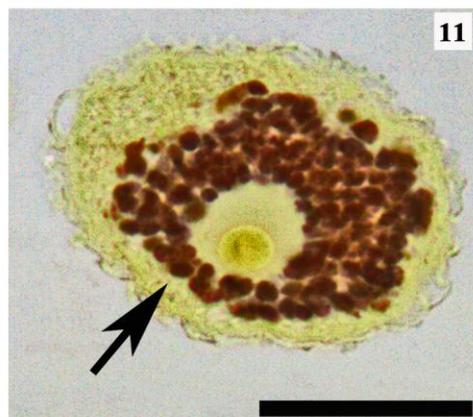
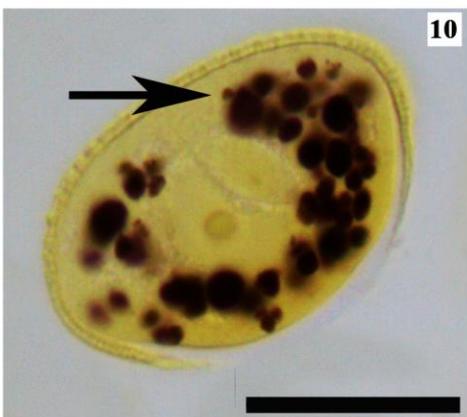
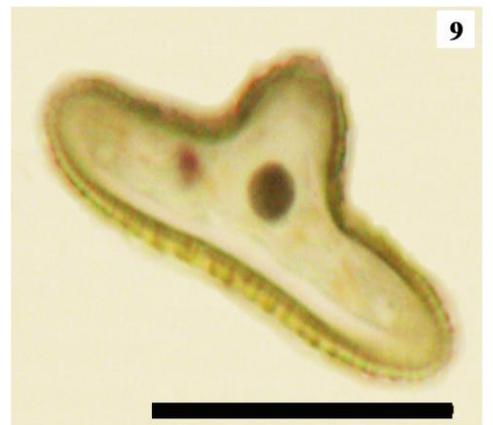
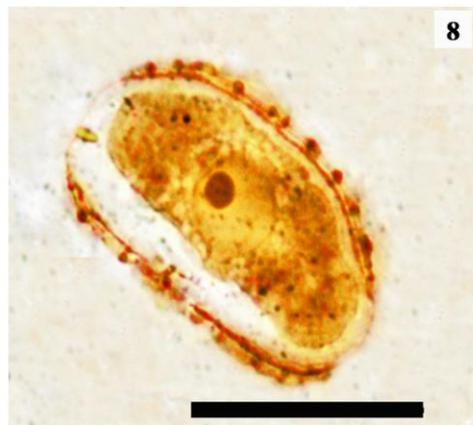
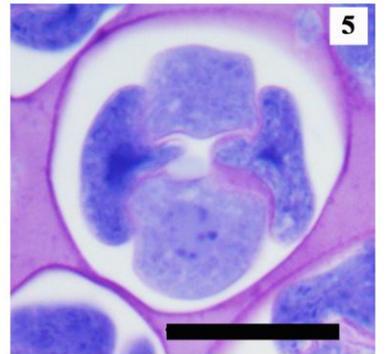
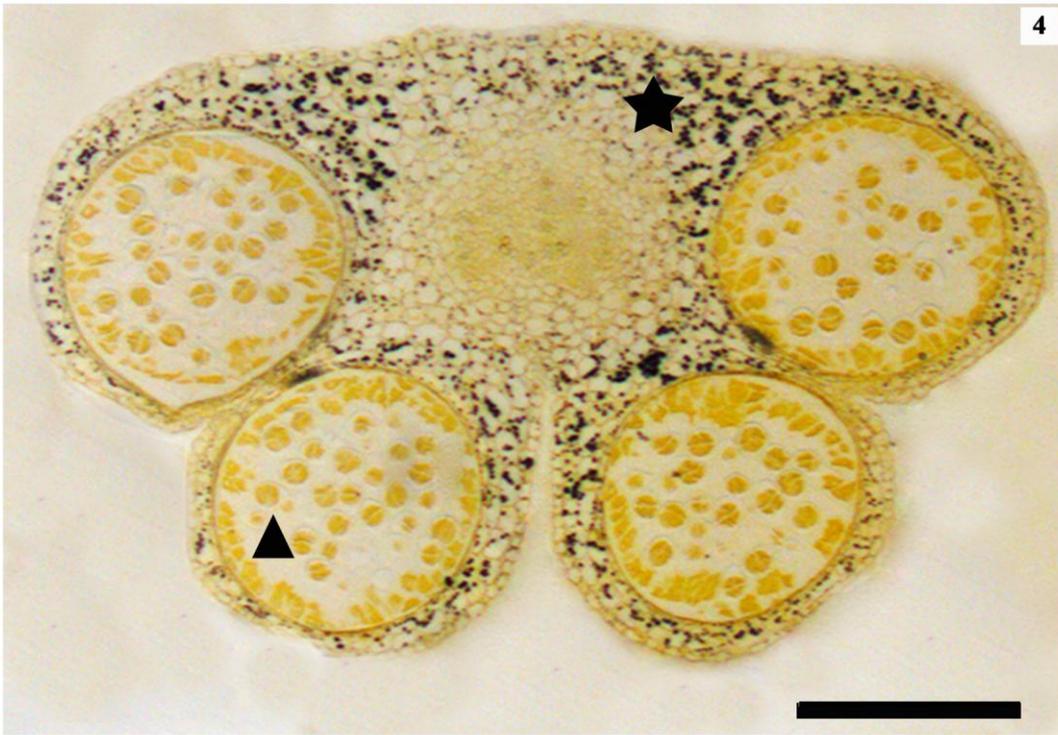
REFERENCES

- Baker, H.G. & Baker, I. 1979. Starch in Angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *American Journal of Botany*, 66:591-600.
- Brighigna, L., Cecchi-Fiordi, A. & Palandri, M.R. 1981. Ultrastructural investigation on two-nucleate pollen grain of *Tillandsia caput-medusae* Morr. *American Journal of Botany*, 68(8):1033-1041.
- Delph, L.F., Johannsson, M.H. & Stephenson, A.G. 1997. How environmental factors affect pollen performance: ecological and evolutionary perspectives. *Ecology*, 78(6):1632-1639.

- Eva, M., Papini, A. & Brighigna, L. 2006. Ultrastructural studies on bicellular pollen grains of *Tillandsia seleriana* Mez (*Bromeliaceae*), a neotropical epiphyte. *Caryologia*, 59(1):88-97.
- Gabriel, B.L. 1982. *Biological Electron Microscopy*. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 264p.
- Givnish, T.J., Millam, K.C., Berry, P.E. & Sytsma, K.J. 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of *Bromeliaceae* inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso*, 23:3-26.
- Gerrits, P.O. & 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.
- Guarnieri, M., Speranza, A., Nepi, M., Artese, D. & Pacini, E. 2006. Ripe pollen carbohydrate changes in *Trachycarpus fortunei*: the effect of relative humidity. *Sexual Plant Reproduction*, 19(3):117-124.
- Johansen, D.A. 1940. McGraw-Hill Book Company Inc., New York. 523p.
- Martinelli, G. 2006. Manejo de populações e comunidades vegetais: um estudo de caso na conservação de *Bromeliaceae*. In *Biologia da conservação: essências* (C.F.D. Rocha, H.G. Bergallo, M. Van Sluys & M.A.S. Alves, eds.). Editora Rima, São Carlos, p. 479-503.
- Mcdowell, E.M. & Trump, B.R. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 100:405-414.
- Pacini, E. 1996. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, 9(6):362-366.
- Pacini, E. & Franchi, G.G. 1988. Amylogenesis and amyolysis during pollen grain development. In *Sexual reproduction in higher plants* (M. Cresti, P. Gori & E. Pacini, eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, p.181-186.

- Pacini, E., Guarnieri, M. & Nepi, M. 2006. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. *Protoplasma*, 228:73-77.
- Pressman, E., Peet, M.M. & Phar, D.M. 2002. The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Annals of Botany*, 90(5):631-636.
- Sears, P.B. & Metcalf, E. 1926. The behavior of pollen starch in a *Geranium* and its bud sport. *Journal of Genetics*, 17(1):33-42.
- Speranza, A., Calzoni, G.L. & Pacini, E. 1997. Occurrence of mono or disaccharides and polysaccharides reserves in mature pollen grain. *Sexual Plant Reproduction*, 10(2):110-115.
- Zona, S. 2001. Starchy pollen in Commelinoid Monocots. *Annals of Botany*, 87(1):109-116.

Fig. 1: Inflorescences with flower buds at different stages of development of *Tillandsia aeranthos*. Fig. 2: Inflorescences with flower buds at different stages of development of *Aechmae recurvata*. Fig. 3: Inflorescences with flower buds at different stages of development of *Dyckia racinae*. Figura 4: Endothecium and middle layer showing large amount of starch grains in *Dyckia racinae*. Fig. 5: Small grains of starch displayed in the androspore cytoplasm in *Aechmea recurvata*. Fig. 6: Small grains of starch displayed in the androspore cytoplasm in *Tillandsia aeranthos*. Fig. 7: Small grains of starch displayed in the androspore cytoplasm in *Dyckia racinae*. Fig. 8: Accumulation of starch grains after the first pollen mitosis - vegetative cell in *Aechmea recurvata*. Fig. 9: Accumulation of starch grains after the first pollen mitosis - vegetative cell in *Tillandsia aeranthos*. Figs. 10 - 12: Accumulation of starch grains after the first pollen mitosis in vegetative cell. 10: *Dyckia racinae*. 11: *Aechmea recurvate*. 12: *Tillandsia aeranthos*. Escala bars: = 8 mm em 1 = 39,0 mm = em 2 = 2,7 mm em 3 = 10 µm em 5 e 6 = 20 µm em 7 - 12 = 200µm em 4



CAPÍTULO VI

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os resultados encontrados neste trabalho, a descrição do desenvolvimento inicial das peças florais traz resultados inéditos para o gênero *Dyckia* mostrando outros aspectos morfológicos e de desenvolvimento que podem ser utilizados como futuros parâmetros na determinação taxonômica bem como na compreensão das relações filogenéticas dentro da família.

Com relação ao padrão de formação dos esporângios da antera, bem como a diferenciação dos estratos parietais e seu desenvolvimento durante a formação dos grãos de pólen, foram descritos pela primeira vez para *Dyckia racinae* L.B.Sm. Mesmo sendo um tema já trabalhado 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.

Outro ponto interessante tem a ver com as substâncias energéticas encontradas durante as fases de desenvolvimento dos grãos de pólen e sua dinâmica no decorrer destes processos. Sugere-se que estejam envolvidas no desenvolvimento de grãos viáveis e na garantia do sucesso das estratégias de polinização, bem como nos processos de germinação deste no estigma, além da fecundação.

Já a recorrente presença de grãos de pólen dimórficos no material analisado, possibilitou a especulação da existência de diferentes rotas no desenvolvimento destes, que serviriam como alternativas relacionada a possíveis imprevistos aos quais a planta se encontra exposta, ou apenas seriam o resultado de um desenvolvimento incompleto devido a falta de nutrientes para todos os grãos de pólen em determinados momentos críticos. Para maiores esclarecimentos são necessárias a aplicação de outras metodologias, além de análises fisiológicas ou bioquímicas.

Os resultados encontrados no trabalho acabaram gerando diversos questionamentos que merecem a atenção em abordagens futuras:

- Como se dá o processo de ginospogênese e ginogametogênese nesta mesma espécie?
- Qual a importância das substâncias de reserva encontradas no grão de pólen maduro, na garantia do sucesso das estratégias de polinização?
- As condições ambientais as quais a espécie se encontra exposta no local onde ocorreram as coletas podem estar influenciando os processos reprodutivos? Quais seriam as

diferenças encontradas se o material da casa de vegetação fosse comparado com o do campo?

- Qual o tipo de relação que as formigas encontradas visitando as inflorescências têm com a espécie?
- A superfície do estigma teria alguma relação direta com as substâncias encontradas revestindo a esporoderme, no processo de reconhecimento e germinação do grão de pólen?
- A possível ligação do nectário septal, descrito para a espécie, estaria relacionada a importância da presença do néctar para os rudimentos, ou apenas serviria como um possível local de armazenamento?