

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Natividade Ferreira Fagundes

**DESENVOLVIMENTO ESTRUTURAL E DINÂMICA DE
CONSTITUINTES QUÍMICOS NO GINECEU DE *BILLBERGIA*
NUTANS H. WENDL. EX REGEL (BROMELIOIDEAE-
BROMELIACEAE)**

Porto Alegre – RS

2013

Natividade Ferreira Fagundes

**DESENVOLVIMENTO ESTRUTURAL E DINÂMICA DE CONSTITUINTES
QUÍMICOS NO GINECEU DE *BILLBERGIA NUTANS* H. WENDL. EX REGEL
(BROMELIOIDEAE- BROMELIACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Porto Alegre

2013

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.*

(Arthur Schopenhauer)

Dedico este trabalho com muito carinho a todos que incentivaram e contribuíram para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath, pelos ensinamentos ao longo de tantos anos. Sua alegria e vibração diante das diferentes morfologias da natureza, aliados ao rigor científico e à valorização de conceitos clássicos, foram contribuições valiosas para a minha formação.

À toda equipe de professores e alunos do Laboratório de Anatomia Vegetal. À técnica Juliana Troleis, pela amizade e pela gentileza em auxiliar prontamente às demandas do laboratório. Em especial, agradeço às colegas e amigas Carla de Pelegrin, Sofia Kuhn e Fernanda Nogueira, pelo companheirismo e por tornarem meus dias de trabalho mais alegres.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, aos demais professores e colegas, pelo aprendizado durante as disciplinas cursadas.

Aos colegas Martin Grings, Márcia Goetze e Camila Zanella, pela gentileza em coletar alguns indivíduos da espécie estudada.

Ao Prof. Sérgio dos Santos e à Prof. Gissele Cardozo, pelo auxílio referente aos programas Rhinoceros e 3D Max.

À UFRGS, universidade de excelência, que possibilitou essa trajetória acadêmica, desde a graduação até o doutorado.

À Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, pela autorização de coleta na Coleção de Bromeliaceae do Jardim Botânico de Porto Alegre, e aos funcionários da Coleção, pela atenção durante as visitas.

À CAPES, pela bolsa concedida durante os quatro anos de doutorado.

Agradeço muito aos meus pais, Marlei Fagundes e Antônio Fagundes, pelo amor, pelos valores, e pelas escolhas que fizeram ao priorizar os meus estudos acima de tudo. À

minha irmã, Carolina Fagundes, pelo carinho, incentivo e pelos ótimos ensinamentos de português.

Um agradecimento especial ao meu marido, Valdemir Kraemer, meu grande amor, por fazer parte da minha vida. Sua alegria contagiante traz leveza aos dias de trabalho mais pesados. Agradeço ainda a sua compreensão e paciência, sobretudo nos últimos meses, quando me mantive praticamente enclausurada para a produção desta tese. Agradeço também aos meus filhotes felinos, que com certeza alegram demais a minha vida.

Aos familiares e amigos que, de alguma forma, contribuíram para a chegada deste momento. A todos agradeço pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Aqui agradeço, principalmente, a minha madrinha Maria Martins, a minha vó Jenayr Fagundes e a minha tia Maria Landi, pessoas muito especiais que sempre incentivaram os meus estudos.

A todos os cidadãos, contribuintes, que possibilitam o fomento à educação e pesquisa no Brasil.

PREFÁCIO

A presente tese está organizada na forma de capítulos, formatados conforme a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). À exceção do Capítulo I e do Capítulo V, os demais capítulos apresentam conteúdo correspondente ao de artigos científicos, os quais, posteriormente, serão formatados segundo as normas dos periódicos a serem submetidos.

A determinação de uma espécie como alvo de estudo baseou-se em uma escolha consciente da autora, a fim de priorizar uma aprendizagem aprofundada acerca de áreas como a embriologia de angiospermas e de técnicas como a imunocitoquímica. Dentro de Bromeliaceae, a escolha da espécie *Billbergia nutans* decorre de observações prévias realizadas durante o Mestrado da autora, que instigaram as investigações deste trabalho.

O Capítulo I abrange o referencial teórico, com informações sobre o estado da arte do grupo taxonômico em foco, da espécie estudada, das estruturas analisadas e com a exposição dos objetivos do trabalho, constituindo os alicerces para a compreensão dos capítulos em seguimento.

O Capítulo II apresenta uma análise integrada do desenvolvimento dos tecidos do gineceu, em sua anatomia e histoquímica, com enfoque nas modificações histológicas que precedem os eventos de polinização e fecundação.

O Capítulo III é composto pelo estudo da ontogênese do rudimento seminal, com a descrição embriológica dessa estrutura e a representação tridimensional do gametófito feminino, e inclui uma revisão dos caracteres morfológicos e anatômicos do rudimento seminal para a família.

O Capítulo IV abarca um estudo de imunolocalização de determinados componentes de parede celular no interior do ovário, especificamente no rudimento seminal e obturador, antes e após a fecundação, e agrega uma revisão do assunto para as plantas com flores.

Por fim, o Capítulo V apresenta um panorama geral das informações mais relevantes da tese e, ainda, as perspectivas originadas a partir desse trabalho.

RESUMO

No gineceu, ocorre o desenvolvimento de esporos e de gametófitos femininos no ovário, e as várias especializações do gineceu promovem sua interação com o gametófito masculino até a fecundação. Pouco se conhece sobre essas interações na porção ovariana do gineceu. Em Bromeliaceae, o detalhamento histológico do estigma e do estilete é inexistente. Para *Billbergia*, não existem dados embriológicos. *Billbergia nutans* (Bromeliaceae, Poales) é uma espécie importante como fonte de alimento para os polinizadores durante o inverno e apresenta ameaça de extinção em nível estadual. Este estudo visa ampliar o conhecimento sobre as modificações histológicas do gineceu em angiospermas, em preparação à polinização e fecundação; contribuir para o conhecimento da embriologia de Bromeliaceae; e verificar a presença de limitações ou vantagens reprodutivas durante o desenvolvimento embriológico de *B. nutans*. As análises foram executadas em Microscopia de Luz, em campo claro e epifluorescência, e em Microscopia Eletrônica de Varredura. Foram realizados testes histoquímicos e a marcação com anticorpos monoclonais para a detecção de compostos químicos. São registrados dados inéditos sobre a embriologia do gênero, a estrutura histológica do gineceu na família, a reconstrução tridimensional do gametófito feminino em monocotiledôneas e a imunolocalização de determinadas pectinas no ovário de angiospermas. A arquitetura do estigma espiral-conduplicado resulta de vários eventos ao longo do desenvolvimento. Os tricomas estigmáticos, o tecido transmissor e o obturador produzem secreção polissacarídica. Os tricomas estigmáticos armazenam sua secreção em bolsões pécticos no interior da parede periclinal externa. As paredes celulares labirínticas caracterizam as células do tecido transmissor e obturador de *B. nutans* como células de transferência, de composição pecto-celulósica. Há uma dinâmica de amido associada à secreção no gineceu, regulada pelo desenvolvimento. Os grãos de amido são considerados

como fonte de moléculas para a produção da secreção, e os inúmeros campos primários de pontoação devem facilitar esse transporte. O obturador de Bromeliaceae é semelhante ao de espécies de Liliaceae e Asparagaceae. Os rudimentos seminais de Bromeliaceae são anátropos, bitegumentados e crassinucelados, com gametófito do tipo *Polygonum*. Muitos caracteres são sugeridos como úteis para a taxonomia da família. A morfologia do apêndice calazal pode ser um caráter inapropriado para aplicação taxonômica, devido à variabilidade encontrada em *B. nutans*. Quanto à evolução do rudimento seminal em Bromeliaceae, a subfamília que divergiu mais cedo mostra estados reduzidos de vários caracteres. Alguns caracteres parecem ser homoplásicos na família, podendo ser relevantes se aplicados em níveis taxonômicos inferiores. Em Poales, os tegumentos compostos por duas camadas celulares e o reduzido número de rudimentos seminais são, provavelmente, estados de caráter plesiomórficos. Não foram observadas limitações reprodutivas significativas durante o desenvolvimento do rudimento seminal de *B. nutans*. A modulação espacial encontrada entre arabinanos, galactanos e proteínas arabinogalactanos (AGPs) no ovário demarca a trajetória porogâmica do tubo polínico em direção ao gametófito feminino. A produção dessas moléculas é regulada pelo desenvolvimento. Possíveis funções das pectinas e AGPs nesses tecidos são discutidas, como a flexibilidade e expansibilidade da parede celular, sinalização e adesão celular, nutrição e atração do tubo polínico. A detecção química dessa trajetória tem sido observada em outras angiospermas, principalmente com relação às AGPs. Contudo, cada espécie possui um conjunto específico de moléculas, aparentemente não relacionado à posição filogenética. Este estudo mostra que o tubo polínico, possivelmente, aproxima-se do rudimento seminal por sinais direcionais sucessivos do gineceu.

Palavras-chave: gineceu, imunolocalização, ovário, rudimento seminal, tecido transmissor.

ABSTRACT

In the gynoecium, the development of spores and female gametophytes occurs within the ovary, and the various specializations of the gynoecium promote its interaction with the male gametophyte until fertilization. Little is known about these interactions in the ovarian portion of the gynoecium. In Bromeliaceae, the histological detailing of the stigma and style is unknown. There are no embryological data for *Billbergia*. *Billbergia nutans* (Bromeliaceae, Poales) is an important species as a source of food for pollinators during winter and is under threat of extinction at the state level. This study aims to expand the knowledge about the histological changes of the gynoecium in preparation for pollination and fertilization in angiosperms; to contribute to knowledge of the embryology of Bromeliaceae; and to verify the presence of reproductive limitations or advantages in the embryological development of *B. nutans*. The analyses were performed with Light Microscopy, under bright field and epifluorescence, and in Scanning Electron Microscopy. Histochemical tests and labelling with monoclonal antibodies were performed for the detection of chemical components. Unpublished data are recorded on the embryology of the genus, the histological structure of the gynoecium in the family, the three-dimensional reconstruction of the female gametophyte in monocotyledons and the immunolocalization of certain pectins in the ovary of angiosperms. The architecture of the conduplicate-spiral stigma results from several events throughout the development. The stigmatic trichomes, the transmitting tissue and the obturator produce a polysaccharidic secretion. The stigmatic trichomes store the secretion in pectic pockets inside its outer periclinal wall. The labyrinthic cell walls are composed by cellulose and pectins and characterize the cells of the transmitting tissue and obturator of *B. nutans* as transfer cells. Starch dynamics associated with secretion are observed in the gynoecium, and are developmentally regulated. The starch grains are considered as a source

of molecules for the production of secretion and many primary pit fields may facilitate such transport. The obturator of Bromeliaceae is similar to those of Liliaceae and Asparagaceae species. The ovules of Bromeliaceae are anatropous, bitegmic and crassinucellate, with a *Polygonum*-type gametophyte. Many characters are suggested as useful for the taxonomy of the family. The morphology of the chalazal appendage may not be an appropriate character for taxonomic use, due to the variability found in *B. nutans*. Regarding the evolution of the ovule in Bromeliaceae, the earliest-divergent subfamily shows a reduced state of several characters. Some characters appear homoplasious in the family and may be relevant when applied to lower taxonomic levels. Within Poales, the two-layered integuments and the small number of ovules are probably plesiomorphic character states. Reproductive limitations during ovule development of *B. nutans* were not found to be significant. The spatial modulation found between arabinan, galactan and arabinogalactan proteins (AGPs) in the ovary delineates the porogamic pollen tube pathway into the female gametophyte. The production of these molecules is developmentally regulated. Possible roles for pectins and AGPs in these tissues are discussed, such as the flexibility and expansibility of the cell wall, cell signaling, cell adhesion, nutrition and attraction of the pollen tube. The chemical detection of this pathway has been observed in other angiosperms, especially with respect to AGPs. However, each species has a specific set of molecules, apparently unrelated to the phylogenetic position. This study shows that the pollen tube possibly approaches the ovule by successive directional cues from the gynoecium.

Keywords: gynoecium, immunolocalization, ovary, ovule, transmitting tissue.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO I | 1 |
| Referencial teórico | 1 |
| Família Bromeliaceae | 2 |
| Morfologia e Anatomia Reprodutiva em Bromeliaceae | 7 |
| Gineceu | 10 |
| Rudimento seminal | 12 |
| Imunolocalização | 14 |
| Espécie estudada - <i>Billbergia nutans</i> H. Wendl. ex Regel | 16 |
| Objetivos | 18 |
| Referências bibliográficas | 19 |
| CAPÍTULO II | 33 |
| Desenvolvimento do estigma, estilete e obturador em <i>Billbergia nutans</i> (Bromeliaceae), com destaque para as modificações histológicas antes e durante a fase progâmica | 33 |
| Resumo | 34 |
| Introdução | 35 |
| Material e métodos | 37 |
| Resultados | 39 |
| Discussão | 44 |
| Referências bibliográficas | 53 |
| CAPÍTULO III | 67 |
| Ontogenia do rudimento seminal em <i>Billbergia nutans</i> no contexto evolutivo de Bromeliaceae (Poales) | 67 |
| Resumo | 68 |

| | |
|---|------------|
| Introdução | 69 |
| Material e métodos | 71 |
| Resultados | 73 |
| Discussão | 76 |
| Referências bibliográficas | 84 |
| CAPÍTULO IV | 98 |
| Imunolocalização de pectinas e proteínas arabinogalactanos no rudimento seminal e obturador de <i>Billbergia nutans</i> (Bromeliaceae, Poales) antes e após a fecundação | 98 |
| Resumo | 99 |
| Introdução | 100 |
| Material e métodos | 103 |
| Resultados | 105 |
| Discussão | 107 |
| Referências bibliográficas | 116 |
| CAPÍTULO V | 127 |
| Considerações finais | 127 |

CAPÍTULO I

Referencial teórico

Família Bromeliaceae

Bromeliaceae abrange, atualmente, 3172 espécies distribuídas em 58 gêneros (Luther, 2008). Sua distribuição no planeta é tipicamente neotropical (Smith & Downs, 1974), com exceção da espécie *Pitcairnia feliciana* (A.Chev.) Harms & Mildbr., que ocorre no Oeste Africano (Porembski & Barthlott, 1999). Seus representantes habitam quase todos os tipos de ecossistemas - desde o nível do mar até o topo das montanhas da cadeia andina, em ambientes úmidos a semi-áridos ou até desérticos (Leme, 1993). São ervas epífitas, rupícolas ou terrícolas, que apresentam características particulares como as folhas dispostas em espiral, formando uma roseta, e a presença de tricomas denominados escamas peltadas recobrimdo suas folhas. As flores são trímeras, os frutos constituem bagas ou cápsulas e as sementes podem ser nuas, aladas ou plumosas (Smith & Downs, 1974, 1977, 1979; Reitz, 1983).

No domínio da Mata Atlântica no Brasil, estão presentes 31 gêneros, 803 espécies e 150 táxons infraespecíficos, sendo seis gêneros endêmicos dessa região (Martinelli *et al.*, 2008). No estado do Rio Grande do Sul, existem cerca de 70 espécies descritas para a família, pertencentes a 10 gêneros (Winkler, 1982; Haussen, 1992; Larocca & Sobral, 2002; Waechter, 2007). Waechter (2007), em um levantamento com amostragem de diferentes florestas do Rio Grande do Sul, compilou 46 espécies de bromélias epifíticas pertencentes a sete gêneros.

A importância ecológica da família reside, principalmente, no micro-habitat que proporciona o corpo dessas plantas, abrigando uma alta diversidade de seres vivos (Richardson, 1999; Martinelli, 2000; Blüthgen *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2004). As bromélias também são importantes componentes dos ecossistemas devido às recompensas florais providas aos seus polinizadores – beija-flores, morcegos e artrópodes, como o abundante néctar produzido pelos nectários septais, ou mesmo o pólen em algumas espécies com flores

pequenas (Benzing, 2000). Os açúcares sacarose, frutose e glicose ocorrem com frequência no néctar de diferentes representantes da família (Bernardello *et al.*, 1991) e, segundo Stiles & Freeman (1993), algumas espécies ornitófilas apresentam a concentração de açúcares até duas vezes maior em relação àquela considerada típica em outras famílias. Além das recompensas florais, os frutos carnosos, característicos de Bromelioideae, também oferecem alimento a uma fauna diversificada. Embora os estudos sobre a dispersão de sementes sejam escassos na família, sabe-se que animais como aves, formigas, morcegos e alguns outros mamíferos beneficiam-se desses frutos (Benzing, 2000; Carvalho *et al.*, 2009). Cabe ainda ressaltar que as bromélias epífitas são importantes na ciclagem de nutrientes dos ecossistemas, contribuindo com significativa produção de serrapilheira (Oliveira, 2004).

As bromélias são plantas bastante comercializadas como ornamentais, sendo utilizadas em decorações de interior e projetos paisagísticos. Em função da demanda cada vez maior pelas espécies de bromélias de valor ornamental, o extrativismo ilegal em seus ambientes naturais tem se intensificado nos últimos anos, colocando algumas espécies em risco de extinção (Negrelle *et al.*, 2012). Além disso, a perda e a fragmentação dos habitats são uma grande ameaça para as espécies de Bromeliaceae, sobretudo com relação à Mata Atlântica, devido ao seu alto grau de endemismo e expressivo valor ecológico (Martinelli, 2000; Martinelli *et al.*, 2008). No momento atual, existe um total de 338 táxons de Bromeliaceae ameaçados de extinção, que estão incluídos em diversas listas oficiais (Martinelli *et al.*, 2008), 38 espécies oficialmente ameaçadas em nível federal (Brasil, 2008) e 102 táxons ameaçados em nível estadual (Rio Grande do Sul, 2003). Tendo em vista que os membros dessa família influenciam significativamente processos florestais importantes e provém substrato e outros recursos para a fauna, sua preservação é vital para os esforços mais amplos de conservação da natureza (Dimmitt, 2000).

Além do seu valor ornamental, a importância econômica da família é também evidenciada pelo fruto do abacaxi, *Ananas comosus* (L.) Merrill, muito apreciado na alimentação, e por várias espécies utilizadas para produção de fibras (Bennett, 2000). As enzimas proteolíticas, chamadas popularmente de “bromelina”, presentes em espécies de *Bromelia*, *Ananas* e *Pseudoananas* são utilizadas como compostos terapêuticos e aplicadas largamente em processos industriais. Recentemente, foram isoladas novas proteases a partir do fruto maduro de *Bromelia antiacantha* Bertol (Vallés *et al.*, 2007), uma espécie nativa do Rio Grande do Sul. Nos últimos anos, foram identificadas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias a partir de folhas e raízes de *Nidularium procerum* (Amendoeira *et al.*, 2003; Vieira-de-Abreu *et al.*, 2005), espécie também nativa do Rio Grande do Sul. Espécies do gênero *Tillandsia* podem ser utilizadas pelo homem como bioindicadores de poluição atmosférica nos grandes centros urbanos, já que tais plantas absorvem água e nutrientes a partir da atmosfera por meio de suas escamas peltadas, estando intimamente ligadas a este ambiente (Brighigna *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 2008).

Quanto às relações taxonômicas e filogenéticas, atualmente, Bromeliaceae está incluída na ordem Poales, ao lado de outras 15 famílias (APG, 2009). Dentro de Poales, Bromeliaceae é a família que provavelmente divergiu mais cedo, posicionando-se como grupo-irmão das demais famílias e, juntamente com Typhaceae e Rapateaceae, compõe um grado basal, com a posterior divergência dos clados das ciperídeas, xirídeas, restiídeas e graminídeas (Fig. 1) (Linder & Rudall, 2005; Givnish *et al.*, 2010).

De acordo com Smith & Downs (1974), a família era tradicionalmente dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, diferenciadas principalmente pela morfologia de flores, frutos e sementes. Com base em recentes filogenias moleculares, são reconhecidas atualmente oito subfamílias: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae, como

evidenciado pela Fig. 2 (Givnish *et al.*, 2007; Givnish *et al.*, 2011). Nessa nova proposta, foram descritas quatro novas subfamílias e ratificada uma subfamília descrita anteriormente

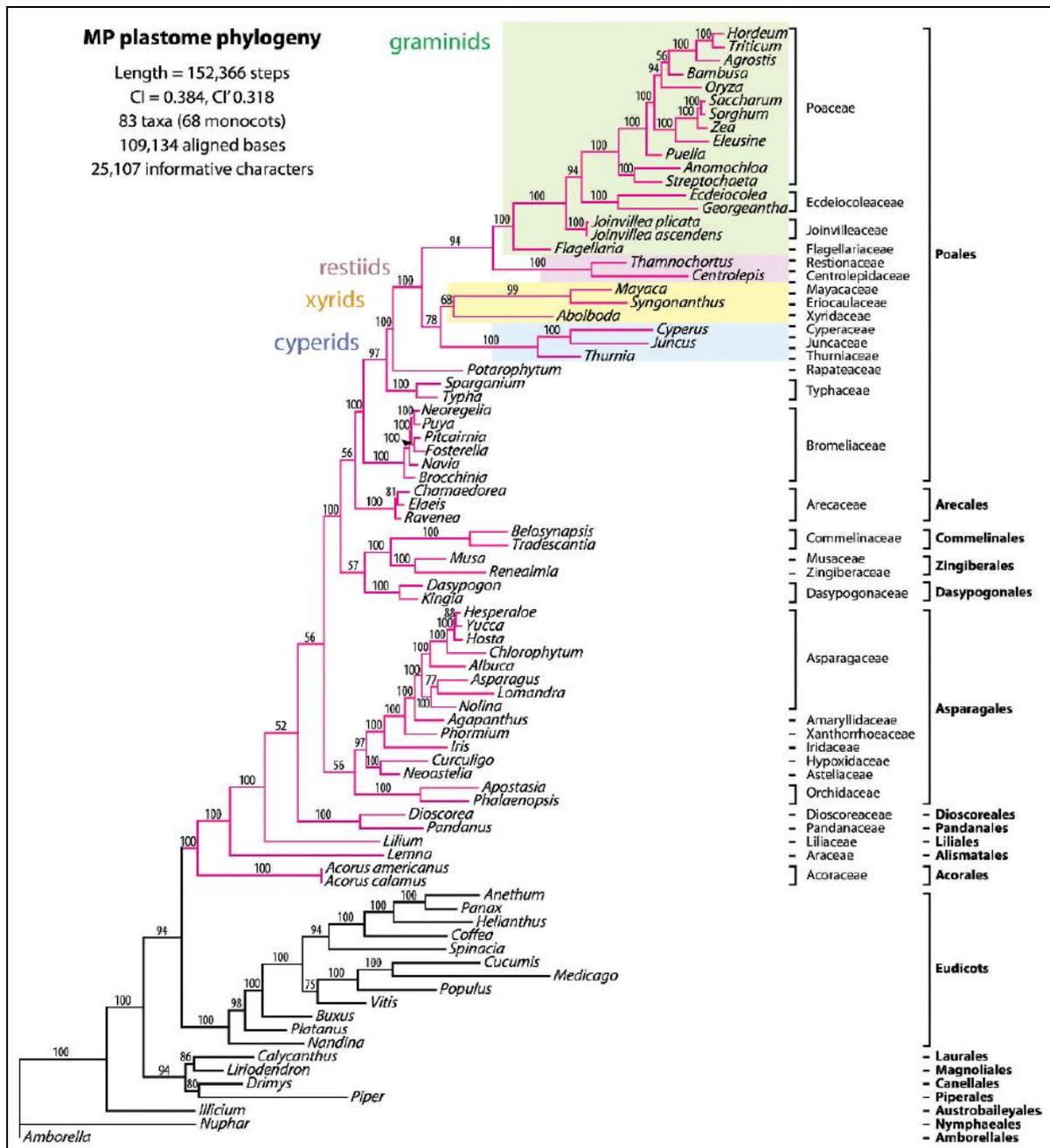


Figura 1. Filogenia das monocotiledôneas, mostrando Poales e os diferentes grupos dentro da ordem, a partir de Givnish *et al.* (2010).

(Givnish *et al.*, 2007) a partir da identificação de Pitcairnioideae como grupo parafilético, conforme já havia sido detectado em outros estudos (Terry & Brown, 1996; Terry *et al.* 1997; Horres *et al.*, 2000). Essa classificação tornou-se natural, pois as subfamílias reconhecidas são

monofiléticas. Brocchiniioideae está posicionada como grupo-irmão das demais subfamílias, assim como apontavam estudos filogenéticos anteriores, e Bromelioideae é apresentada como a subfamília que divergiu mais tarde.

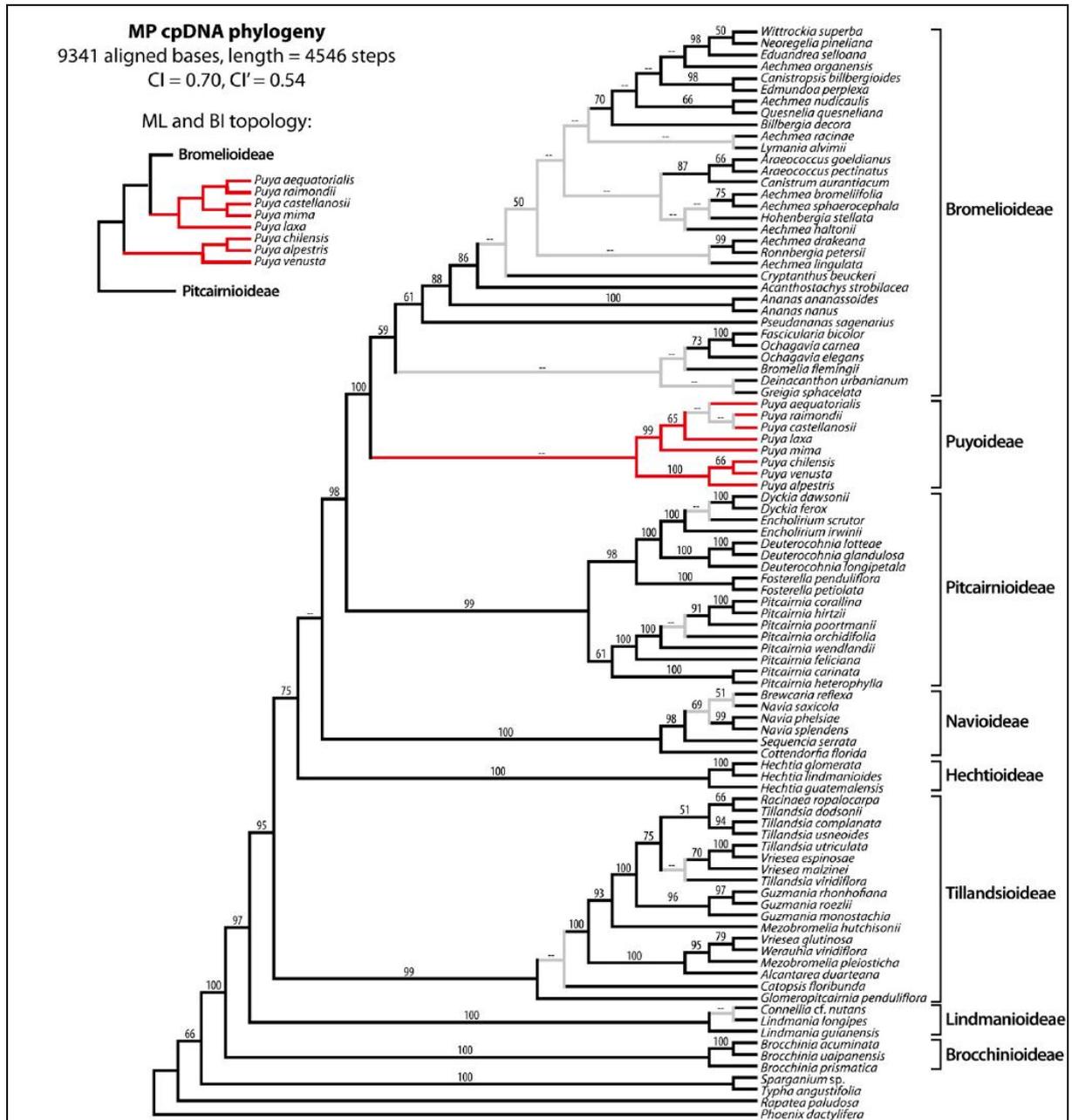


Figura 2. Filogenia de Bromeliaceae, com suas oito subfamílias, a partir de Givnish *et al.* (2011).

Embora a origem monofilética da família tenha sido confirmada (Horres *et al.*, 2000; Barfuss *et al.*, 2005) e as relações filogenéticas entre as subfamílias estejam mais claras

(Givnish *et al.*, 2007; Givnish *et al.*, 2011), as circunscrições dos gêneros e a delimitação taxonômica das espécies ainda necessitam de esforços para o seu esclarecimento. As relações inter- e infragenéricas na subfamília Bromelioideae são as menos conhecidas dentro da família (Benzing, 2000). Faria *et al.* (2004) afirmaram que *Aechmea*, *Hohenbergia*, *Streptocalyx* e *Quesnelia* são parafiléticos ou polifiléticos, assim como a maioria dos subgêneros de *Aechmea*. Na filogenia de Schulte *et al.* (2009), essas relações tornam-se mais resolvidas e demonstram o conceito genérico altamente problemático de *Aechmea* e *Quesnelia*, como grupos polifiléticos, assim como observado por Almeida *et al.* (2009). Sass & Specht (2010), em seu estudo filogenético das “core Bromelioids” baseado em 150 espécies, demonstraram que a maioria dos gêneros não são monofiléticos, entre eles *Aechmea* e *Quesnelia*. A partir das nove espécies de *Billbergia*, um grupo composto por sete espécies é fortemente suportado como monofilético, ao contrário dos seus subgêneros.

Morfologia e Anatomia Reprodutiva em Bromeliaceae

Ao longo do tempo, a literatura referente à morfologia e anatomia de Bromeliaceae esteve mais concentrada em descrições acerca dos seus órgãos vegetativos, sobretudo as folhas, partindo de obras abrangentes e clássicas, como Tomlinson (1969) e Robinson (1969), até artigos mais recentes (Braga, 1977; Strehl, 1983; Varadarajan & Gilmartin, 1987; Pita & Menezes, 2002; Arruda & Costa, 2003; Aoyama & Sajo, 2003; Segecin & Scatena, 2004; Proença & Sajo, 2004; Sousa *et al.*, 2005; Scatena & Segecin, 2005; Mantovani & Iglesias, 2005; Proença & Sajo, 2007; Proença & Sajo, 2008; Dettke & Millaneze-Gutierrez, 2008). Os estudos referentes à morfologia e anatomia reprodutiva da família são menos frequentes e agregam, em sua maioria, dados morfológicos sobre o estigma e os grãos de pólen, como pode ser verificado a seguir.

Os estudos de anatomia floral são raros em Bromeliaceae e estão centrados na caracterização dos nectários septais e da vascularização floral (Kulkarni & Pai, 1982; Sajo *et al.*, 2004a). Desse modo, não existe um detalhamento dos diferentes verticilos florais em nível histológico nesses estudos. Já a estrutura estigmática de representantes da família foi investigada mais extensivamente, porém caracterizada apenas em sua morfologia (Brown & Gilmartin, 1984, 1988, 1989; Varadarajan & Brown, 1988; Heslop-Harrison & Shivanna, 1977; Tardivo & Rodrigues, 1998; Vervaeke *et al.* 2003), sendo classificada em cinco categorias conforme Brown & Gilmartin (1989): simples-ereto, cupulado, espiral-conduplicado, lâmina-convoluta e coraliforme. Segundo o clássico estudo de Heslop-Harrison & Shivanna (1977), que caracterizaram a superfície estigmática de cerca de 1000 espécies pertencentes a 250 famílias de angiospermas, o estigma de Bromeliaceae é classificado como seco com papilas multisseriadas ou úmido com papilas, dependendo do gênero. Sajo *et al.* (2004b), estudando o desenvolvimento do rudimento seminal em algumas espécies da família, citaram a presença de obturador na região da placenta, porém não realizaram nenhum tipo de descrição. A anatomia do ovário e obturador, em continuidade ao desenvolvimento do fruto, foi abordada para seis representantes da família por Fagundes & Mariath (2010), com a indicação de numerosos caracteres importantes para a taxonomia da família, inclusive a morfologia do obturador. Em contraponto aos aspectos mencionados, a estrutura anatômica dos tecidos do estigma e do estilete é desconhecida para Bromeliaceae.

A morfologia polínica vem sendo investigada com frequência nessa família, o que resultou na constatação de uma ampla diversidade de formas polínicas, com a presença de grãos de pólen sulcados, porados e inaperturados, incluindo subtipos (Ehler & Schill, 1973; Erdtman & Praglowski, 1974; Wanderley & Melhem, 1991; Halbritter, 1992; Sousa *et al.*, 1997; Halbritter & Till, 1998; Forzza & Wanderley, 1998; Tardivo & Rodrigues, 1998; Vervaeke *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2005; Moreira, 2007).

A embriologia de Bromeliaceae tem sido alvo de um número considerável de investigações, principalmente nos últimos anos (Billings, 1904; Lakshmanan, 1967; Wee & Rao, 1974; Rao & Wee, 1979; Sajo *et al.*, 2004b; Sajo *et al.*, 2005; Conceição *et al.*, 2007; Sartori, 2008; Mendes *et al.*, 2010; Mendes, 2012; Mendes *et al.*, 2012; Spat, 2012). Outros tipos de estudos ainda complementam os dados embriológicos para a família, como Palací *et al.* (2004) e Papini *et al.* (2011). No total, são conhecidas 31 espécies para a família cujo desenvolvimento embriológico foi averiguado, parcial- ou completamente. Dentre os estudos mencionados, os que incluem aspectos da ontogenia do rudimento seminal são: Billings (1904), Lakshmanan (1967), Wee & Rao (1974), Rao & Wee (1979), Palací *et al.* (2004), Sajo *et al.* (2004b), Conceição *et al.* (2007), Sartori (2008), Papini *et al.* (2011), Mendes (2012) e Spat (2012). Entretanto, a maioria desses estudos não são detalhados ou descrevem apenas uma parte do desenvolvimento do rudimento seminal. Com relação ao gênero *Billbergia*, não existem referências sobre a sua embriologia.

Estudos anatômicos de fruto são escassos na família (Okimoto, 1948; Morra *et al.*, 2002; Fagundes & Mariath, 2010; Silva, 2011), porém foram suficientes para destacar a sua importância taxonômica, com a constatação de caracteres distintivos de subfamílias, gêneros e espécies, conforme Fagundes & Mariath (2010) e Silva (2011). No que se refere à semente, os estudos estruturais são mais frequentes e, de modo similar, evidenciam caracteres potenciais para a delimitação de táxons (Gatin, 1911; Szidat, 1922; Downs, 1974; Rao & Wee, 1979; Gross, 1988; Varadarajan & Gilmartin, 1988; Morra *et al.*, 2002; Palací *et al.*, 2004; Scatena *et al.*, 2006; Strehl & Beheregaray, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Silva & Scatena, 2011; Magalhães & Mariath, 2012).

Gineceu

As plantas com flores desenvolvem seus rudimentos seminiais no interior de estruturas laminares, no mínimo, parcialmente fechadas – os carpelos, uma característica que dá origem ao nome formal do grupo (angiosperma = “semente coberta”) (Specht & Bartlett, 2009). O conjunto de carpelos compõe o gineceu, que é diferenciado em três porções: o estigma, o estilete e o ovário. Desse modo, o gineceu abrange a formação de esporos e dos gametófitos femininos no seu interior (Johri, 1984).

Além disso, o gineceu é uma estrutura especializada para as interações com o gametófito masculino durante a reprodução sexuada, oferecendo suporte à germinação dos grãos de pólen, ao crescimento dos tubos polínicos e ao processo de fecundação (Herrero & Hormaza, 1996). A presença de secreção, tanto nos estigmas úmidos quanto nos estigmas secos, é o principal requisito para a germinação do pólen, que ocorre de maneira autotrófica a partir das reservas do grão de pólen, enquanto o crescimento dos tubos polínicos é heterotrófico, às expensas das reservas estilares (Herrero e Hormaza, 1996; Heslop-Harrison, 2000; Herrero, 2000). Com base em sua morfologia, o estilete pode ser classificado como sólido, semi-sólido ou oco. Nos estiletos ocos, comuns em monocotiledôneas, como *Lilium*, os tubos polínicos crescem por um canal repleto de secreção, ao longo do tecido transmissor (Sanchez *et al.*, 2004). Essa secreção, que preenche a matriz extracelular do tecido transmissor, auxilia na nutrição dos tubos polínicos e pode incluir açúcares livres, polissacarídeos, glicoproteínas, proteoglicanas e lipídios (Cheung, 1996; Erbar, 2003). O período entre a polinização e a fecundação, onde ocorrem essas interações pólen-pistilo, é denominado fase progâmica (Herrero & Hormaza, 1996).

Com esse delineamento investigativo, poucos trabalhos foram realizados com enfoque na porção ovariana do gineceu, os quais indicam que pode haver uma forte interação pólen-

pistilo nessa região (Herrero, 2000). Geralmente, não existe um tecido transmissor no interior do ovário e, portanto, os tubos polínicos crescem aleatoriamente até contatar os rudimentos seminais (Stösser, 1986; Herrero, 2000). Entretanto, diversos táxons, especialmente em membros das famílias Euphorbiaceae, Rosaceae e Liliaceae, apresentam um tecido transmissor denominado obturador, que abarca uma grande variação em sua origem, morfologia, anatomia e desenvolvimento (Tilton & Horner, 1980). Até o atual momento, pouco se conhece sobre a sua função (Herrero, 2000).

No que se refere à funcionalidade do gineceu em relação ao crescimento dos tubos polínicos, além da nutrição, propõe-se que o gineceu também forneça sinais químicos para a orientação dos tubos polínicos (Lush *et al.*, 2000; Lord, 2003). Chao (1971, 1977, 1979), estudando espécies de *Paspalum* (Poaceae), mostrou que uma substância mucilaginosa conspicua, composta principalmente por um polissacarídeo, preenche os espaços entre as células do tecido nucelar próximo à micrópila e também o canal micropilar e concluiu que essa substância atrai os tubos polínicos e fornece nutrientes. Em *Nicotiana tabacum*, a proteoglicana TTS, purificada a partir do tecido transmissor, foi demonstrada como uma substância que atrai e estimula o crescimento dos tubos polínicos (Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995). Ademais, a proposta de que as sinérgides são fonte de um atrativo para o tubo polínico em *Torenia fournieri* (Scrophulariaceae) foi confirmada por Higashiyama *et al.* (2001). Um papel na atração do tubo polínico também foi atribuído ao GABA (ácido γ -aminobutírico) em *Arabidopsis*, visto que essa molécula forma um gradiente no gineceu com a maior concentração no tegumento interno do rudimento seminal (Palanivelu *et al.*, 2003). Em *Zea mays*, identificou-se recentemente uma proteína, denominada ZmEA1, expressa de forma exclusiva no aparelho oosférico e que contribui para a atração do tubo polínico (Martón *et al.*, 2005).

Alguns estudos indicam que moléculas como proteínas e glicoproteínas, ao longo do gineceu, induzem o quimiotropismo dos tubos polínicos, como em *Lilium longiflorum* (Kim *et al.*, 2003) e *Torenia fournieri* (Okuda *et al.*, 2009). Há muito tempo existe a hipótese de que os tubos polínicos são orientados através de um gradiente químico no gineceu, contudo algumas investigações comparativas dos mecanismos químicos de orientação em diferentes células evidenciaram um problema principal nos modelos de orientação dos tubos polínicos, que é a distância proposta para essa orientação. Nessa nova perspectiva, concluiu-se que esses modelos são inválidos ou que os tubos polínicos são estruturas responsivas de modo singular na natureza, havendo necessidade de pesquisas mais avançadas sobre esse assunto (Lush, 1999). Independentemente da existência de um gradiente quimiotrópico, o conjunto de informações agregadas acerca das interações pólen-pistilo sugerem a presença de sinais químicos ao longo do gineceu que auxiliam na condução dos tubos polínicos até o seu destino.

Rudimento seminal

Apesar de sua estrutura básica relativamente estável, os rudimentos seminais alcançaram uma ampla diversidade de formas em angiospermas. Os principais aspectos relacionados à variabilidade morfológica são os seguintes: tamanho do rudimento seminal, grau de curvatura, espessura do nucelo, número de tegumentos e sua espessura, formação da micrópila, comprimento do funículo, grau de vascularização, além de inúmeros aspectos histológicos (Endress, 2011).

Os estudos embriológicos, de modo geral, são enfatizados como úteis para o estudo da sistemática vegetal, havendo a especificação de diversos caracteres para cada estrutura reprodutiva (Herr, 1984; Tobe, 1989). De acordo com Herr (1984), entre os vários tipos de

investigação embriológica, aquelas direcionadas ao gametófito feminino possivelmente apresentam o maior valor para fins taxonômicos.

Recentemente, estudos taxonômicos com foco na morfologia e anatomia do rudimento seminal têm detectado caracteres importantes para a delimitação de gêneros e subfamílias, levantando hipóteses evolutivas que corroboram ou não as filogenias atuais, a exemplo das famílias Ranunculaceae (Wang & Ren, 2007), Lentibulariaceae (Plachno & Swiatek, 2009) e Rubiaceae (Mariath & Cocucci, 1997; De Toni & Mariath, 2008, 2010). Além disso, estudos embriológicos do rudimento seminal, aliados às filogenias mais recentes, vêm modificando hipóteses de ancestralidade em angiospermas que perduraram por mais de um século, através da descoberta de novos arranjos celulares formando o gametófito feminino, como os tipos *Amborella* e *Nuphar/Schisandra*, diferentes de *Polygonum*, o tipo mais comum e considerado até então como o gametófito feminino ancestral das plantas com flores (Friedman & Ryerson, 2009).

Além da importância do rudimento seminal para a compreensão da taxonomia e filogenia das plantas com sementes, é fundamental ressaltar que qualquer abordagem para a conservação deve estar baseada em estudos aprofundados da biologia reprodutiva das espécies. Assim, os processos de desenvolvimento dos gametas, polinização, desenvolvimento do endosperma e do embrião e outras características reprodutivas podem fornecer informações importantes sobre as restrições reprodutivas das plantas. Embora a fragmentação dos ambientes e a exploração demasiada de seus recursos sejam fatores notáveis para o risco de extinção das espécies, as falhas dos processos reprodutivos, em face às modificações ambientais, são com frequência a principal razão para a perda de espécies (Moza & Bhatnagar, 2007).

Imunolocalização

A técnica de imunolocalização é utilizada para a identificação da composição química dos tecidos e células, de modo que moléculas-alvo são detectadas por anticorpos, os quais são obtidos a partir de ratos ou camundongos (Knox, 1997). A utilização de anticorpos monoclonais é uma das abordagens mais diretas para a compreensão da arquitetura molecular da parede celular e tem contribuído para a detecção de marcadores de estádios de desenvolvimento e para a percepção de sinais derivados da parede celular (Willats *et al.*, 2000).

As paredes celulares ricas em celulose, uma das características que definem as plantas, são de fundamental importância para o normal crescimento e desenvolvimento vegetal (Popper, 2008). A complexidade estrutural dos polímeros de parede celular, aliada à existência de grandes famílias de genes envolvidas na síntese e modificação desses componentes, resulta em uma ampla diversidade de configurações macromoleculares de parede celular no contexto de tecidos e órgãos e entre as diferentes espécies (Knox, 2008). De acordo com Pennell (1998), as interações célula-célula podem ser determinadas pelas paredes celulares.

As pectinas constituem a família de polissacarídeos mais complexa estruturalmente, compondo cerca de 35% das paredes celulares primárias na maioria das angiospermas, 2-10% das paredes celulares primárias em gramíneas e outras monocotiledôneas comelinídeas e até 5% das paredes celulares em tecidos lignificados (Mohnen, 2008). São constituídas por três polissacarídeos pécnicos principais, os homogalacturonanos (HG), os ramnogalacturonanos I (RGI) e os ramnogalacturonanos II (RGII), todos com a presença de ácido galacturônico em sua composição (Ridley *et al.*, 2001; Willats *et al.*, 2006; Caffall & Mohnen, 2009). As pectinas são extremamente hidrofílicas, formando géis que variam o seu grau de fluidez de

acordo com determinados fatores, como a temperatura, pH, tipo de polissacarídeo, grau de metil-esterificação e grau de acetilação (Willats *et al.*, 2006). Múltiplas linhas de evidências indicam um papel para as pectinas no crescimento, desenvolvimento e morfogênese vegetal, defesa contra patógenos, estrutura e porosidade da parede celular, adesão celular, sinalização celular, expansão celular, crescimento do tubo polínico, hidratação da semente, abscisão de folhas e desenvolvimento do fruto (Mohnen, 2008). Um papel na sinalização celular também é atribuído às pectinas através da atividade dos oligogalacturonídeos, liberados pela fragmentação de HGs (Ridley *et al.*, 2001; Mohnen, 2008).

Já as proteínas arabinogalactanos (AGPs) são macromoléculas pertencentes à classe das glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) e são caracterizadas por uma alta proporção de carboidratos, dos quais arabinose e galactose são os monossacarídeos predominantes (Fincher *et al.*, 1983; Showalter, 1993; Showalter, 2001; Seifert & Roberts, 2007). Estudos histológicos, citológicos e bioquímicos têm demonstrado que estas moléculas, encontradas na superfície celular, estão envolvidas em funções como comunicação e reconhecimento célula-célula, adesão célula-matriz e célula-célula e interação da célula com o ambiente (Pennell *et al.*, 1991; Showalter, 1993; Cheung & Wu, 1999; Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000). Estudos descritivos e experimentais implicam as AGPs em muitos processos biológicos de proliferação e sobrevivência celular, formação de padrões morfológicos, crescimento e de interações das plantas com microorganismos (Seifert & Roberts, 2007).

No estudo da embriologia vegetal, a imunolocalização tem sido utilizada principalmente para a caracterização do grão de pólen, o gametófito masculino, cuja estrutura da parede celular já revelou a presença de diferentes pectinas, hemiceluloses e AGPs, em estudos como os de Anderson *et al.* (1987), Pennell *et al.* (1991), Van Aelst & Van Went (1992), Li *et al.* (1994), Li *et al.* (1995), Jauh & Lord (1996), Abreu & Oliveira (2004),

Pereira *et al.* (2006), Coimbra *et al.* (2007), Dardelle *et al.* (2010), Nguema-Ona *et al.* (2012), Costa *et al.* (2013), Mollet *et al.* (2013). No que se refere ao rudimento seminal e gametófito feminino, esses estudos são mais raros e, além disso, são focados principalmente na detecção de AGPs em espécies de eudicotiledôneas (Pennell *et al.*, 1991; Coimbra & Salema, 1997; Coimbra & Duarte, 2003; Chudzik *et al.*, 2005; Coimbra *et al.*, 2007; Chudzik *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013). Um desses estudos foi conduzido em *Amaranthus hypocondriacus* L. e identificou a marcação de AGPs no tecido nucelar entre a micrópila e o ginófito, demonstrando que esta região é estrutural- e funcionalmente especializada para a entrada do tubo polínico (Coimbra & Salema, 1997). Coimbra & Salema (1997) e Costa *et al.* (2013) enfatizaram que são necessárias futuras investigações com uma gama de espécies, a fim de se comprovar a abrangência desse fenômeno durante a reprodução sexual de angiospermas, e compreender a diversidade e funcionalidade das moléculas envolvidas nesse processo.

Espécie estudada - *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel

Billbergia Thunberg é um gênero ornamental, com 63 espécies conhecidas, as quais estão distribuídas desde o México até Argentina e Brasil (Luther, 2008). No Rio Grande do Sul, existem três espécies: *Billbergia distachia*, *B. nutans* e *B. zebrina* (Haussen, 1992). O gênero está dividido em dois subgêneros, *Billbergia* e *Helicodea*, diferenciados por caracteres como a textura da inflorescência, a posição das pétalas na antese e a morfologia da exina dos grãos de pólen (Gaiotto, 2005).

Billbergia nutans H. Wendl. ex Regel (Fig. 3) é uma espécie da Mata Atlântica (Martinelli *et al.*, 2008), que está distribuída geograficamente nas regiões sul e sudeste do Brasil, Uruguai, Paraguai e norte da Argentina (Smith & Downs, 1979; Martinelli *et al.*, 2008; Versieux *et al.*, 2008), sendo conhecida na região sul do Brasil como “gravatá-de-brinco”

(Reitz, 1983). É uma espécie ornamental, comercializada no Brasil e no exterior, e conhecida internacionalmente como “queen’s tears” (“lágrimas-de-rainha”). Segundo Holmes (1966), essa espécie é extremamente resistente ao frio. Sua floração ocorre no período de inverno, nos meses de julho e agosto (Reitz, 1983), e a polinização é realizada por beija-flores (Favreto *et al.*, 2010). Dessa forma, constitui uma fonte importante de alimento para os seus polinizadores durante o período de baixas temperaturas.

Benzing (2000) aponta essa espécie como auto-incompatível, porém não demonstra as bases experimentais para essa afirmativa. A sua suposta auto-incompatibilidade é um fator que não contribui para a regeneração da espécie em locais de populações reduzidas e que, além disso, torna a reprodução sexuada da espécie dependente dos seus agentes polinizadores. Ainda com relação à conservação da espécie, sabe-se que uma de suas três variedades (var. *schimperiana* (Wittmack) Baker) está ameaçada de extinção nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, estando enquadrada, respectivamente, na categoria “vulnerável” (Rio Grande do Sul, 2003) e na categoria “em perigo” (Klein, 1990).



Figura 3. Morfologia de *Billbergia nutans*. A. Aspecto geral da planta, com inflorescências. B. Inflorescência jovem, no interior da roseta. C. Flor aberta. Barras: 5cm (A); 1cm (B-C).

Objetivos

Objetivos gerais

- Registrar dados inéditos sobre a anatomia do gineceu em Bromeliaceae;
- Apresentar um estudo embriológico para *Billbergia*, um gênero ainda não averiguado, e contribuir para o conhecimento da embriologia da família Bromeliaceae;
- Verificar a presença de limitações ou vantagens reprodutivas no desenvolvimento embriológico da espécie em questão;
- Ampliar o conhecimento sobre os componentes de paredes de células do rudimento seminal e do obturador em angiospermas, com a análise de um representante do grupo das comelinídeas;
- Expandir o conhecimento sobre as modificações estruturais e químicas que ocorrem no gineceu em preparação para os eventos de polinização e fecundação em angiospermas.

Objetivos específicos

- Caracterizar a anatomia e histoquímica do gineceu em desenvolvimento em *Billbergia nutans*, antes e durante a fase progâmica;
- Descrever a ontogenia do rudimento seminal em *B. nutans*, incluindo a ginosporigênese e a ginogametogênese;
- Identificar as pectinas e AGPs presentes no rudimento seminal e obturador de *B. nutans*, antes e após a fecundação, através de imunolocalização.

Referências bibliográficas

- ABREU, I.; OLIVEIRA, M. Immunolocalisation of arabinogalactan proteins and pectins in *Actinidia deliciosa* pollen. **Protoplasma**, v. 224, p. 123-128, 2004.
- ALMEIDA, V. R. *et al.* Morphological phylogenetics of *Quesnelia* (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Systematic Botany**, v. 34, n. 4, p. 660-672, 2009.
- ALVES, E. S.; MOURA, B. B.; DOMINGOS, M. Structural analysis of *Tillandsia usneoides* L. exposed to air pollutants in São Paulo City – Brazil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 189, p. 61-68, 2008.
- AMENDOEIRA, F. C. *et al.* Antinociceptive effect of *Nidularium procerum*: a Bromeliaceae from the Brazilian coastal rain forest. **Phytomedicine**, v. 12, p. 78–87, 2003.
- ANDERSON, M. A. *et al.* Immuno-gold localization of α -L-arabinofuranosyl residues in pollen tubes of *Nicotiana glauca* Link et Otto. **Planta**, v. 171, p. 438-442, 1987.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 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, p. 105-121, 2009.
- AOYAMA, E. M.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de *Aechmea* Ruiz & Pav. Subgênero *Lamprococcus* (Beer) Baker e espécies relacionadas (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 4, p. 461-473, 2003.
- ARRUDA, R. C. O.; COSTA, A. F. Foliar anatomy of five *Vriesea* sect. *Xiphion* (Bromeliaceae) species. **Selbyana**, v. 24, n. 2, p. 180-189, 2003.
- BARFUSS, M. H. J. *et al.* Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 337-351, 2005.
- BENNETT, B. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: BENZING, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 587-608.
- BENZING, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- BERNARDELLO, L. M.; GALETTO, L.; JULIANI, H. R. Floral nectar, nectary structure and pollinators in some Argentinian Bromeliaceae. **Annals of Botany**, v. 67, p. 401-411, 1991.
- BILLINGS, F. H. A Study of *Tillandsia usneoides*. **Botanical Gazette**, v. 38, n. 2, p. 99-121, 1904.

- BLÜTHGEN, N. *et al.* Ant nests in tank bromeliads – an example of non-specific interaction. **Insects Socioux**, v. 47, p. 313-316, 2000.
- BRAGA, M. M. N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. **Acta Amazonica**, v. 7, n. 3, p. 1-74, 1977.
- BRASIL. Instrução Normativa nº6, de 23 de setembro de 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2013.
- BRIGHIGNA, L. *et al.* 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.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma structure and variation in Bromeliaceae – neglected taxonomic characters. **Brittonia**, v. 36, n. 4, p. 364-374, 1984.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Comparative ontogeny of bromeliaceous stigmas. *In*: XIV INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS, 1987, Berlin. LEINS, P.; TUCKER, S.; ENDRESS, P. (Ed.). **Aspects of Floral Development**. Stuttgart: Gebr. Borntraeger Verlagsbuchhandlung, 1988. pp. 191-204.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma types in Bromeliaceae – a systematic survey. **Systematic Botany**, v. 14, n. 1, p. 110-132, 1989.
- CAFFALL, K.H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1879-1900, 2009.
- CARVALHO, F.; FABIÁN, M. E.; MENDONÇA, R. A. Nota sobre o consumo de frutos de *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) por *Sturnira lilium* (Chiroptera, Phyllostomidae) no sul do Brasil. **Chiroptera Neotropical**, v. 15, n. 2, 482-486, 2009.
- CHAO, C. Y. A periodic acid-Schiff's substance related to the directional growth of pollen tube into embryo sac in *Paspalum* ovules. **American Journal of Botany**, v. 58, p. 649-654, 1971.
- CHAO, C. Y. Further cytological studies of a periodic acid-Schiff's substance in the ovules of *Paspalum orbiculare* and *P. longifolium*. **American Journal of Botany**, v. 64, p. 921-930, 1977.
- CHAO, C. Y. Histochemical study of a PAS substance in the ovules of *Paspalum orbiculare* and *P. longifolium*. **Phytomorphology**, v. 29, p. 381-387, 1979.
- CHEUNG, A. Y. Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 2, p. 45-51, 1996.

- CHEUNG, A. Y.; WANG, H.; WU, H. M. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. **Cell**, v. 82, p. 383-393, 1995.
- CHEUNG, A. Y.; WU, H. M. Arabinogalactan proteins in plant sexual reproduction. **Protoplasma**, v. 208, p. 87-98, 1999.
- CHUDZIK, B.; ZARZYKA, B.; SNIEZKO, R. Immunodetection of arabinogalactan proteins in different types of plant ovules. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 47, n. 1, p. 139-146, 2005.
- CHUDZIK, B. *et al.* The structure of the ovule of *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby after pollination. **Acta Agrobotanica**, v. 63, n. 2, p. 3-11, 2010.
- COIMBRA, S. *et al.* Arabinogalactan proteins as molecular markers in *Arabidopsis thaliana* sexual reproduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 15-16, p. 4027-4035, 2007.
- COIMBRA, S.; DUARTE, C. Arabinogalactan proteins may facilitate the movement of pollen tubes from the stigma to the ovules in *Actinidia deliciosa* and *Amaranthus hypochondriacus*. **Euphytica**, v. 133, p. 171-178, 2003.
- COIMBRA, S.; SALEMA, R. Immunolocalization of arabinogalactan proteins in *Amaranthus hypochondriacus* L. ovules. **Protoplasma**, v. 199, p. 75-82, 1997.
- CONCEIÇÃO, S.; DE TONI, K. L. G.; COSTA, C. G. Particularidades do nucelo de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, Suplemento 1, p. 846-848, 2007.
- COSTA, M. *et al.* Immunolocalization of arabinogalactan proteins (AGPs) in reproductive structures of an early-divergent angiosperm, *Trithuria* (Hydatellaceae). **Annals of Botany**, v. 111, p. 183-190, 2013.
- DARDELLE, F. *et al.* Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis* pollen tube cell wall. **Plant Physiology**, v. 153, p. 1563-1576, 2010.
- DE TONI, K. L. G.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny in Rubiaceae (Juss.): *Chomelia obtusa* (Cinchonoideae– Guettardeae) and *Ixora coccinea* (Ixoroideae–Ixoreae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 272, p. 39-48, 2008.
- DE TONI, K. L. G.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny of *Relbunium* species in the evolutionary context of Rubiaceae. **Australian Journal of Botany**, v. 58, p. 70-79, 2010.
- DETTKE, G. A.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Anatomia vegetativa de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Baldunia**, v. 13, p. 1-14, 2008.

- DIMMITT, M. Endangered Bromeliaceae. *In*: BENZING, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 609-620.
- DOWNS, R. J. Anatomy and physiology. *In*: Smith, L. B.; Downs, R. J. (Ed.). Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *In*: **Flora Neotropica Monograph**, v. 14, n. 1. New York: Hafner Press, 1974. p. 3-28.
- EHLER, N.; SCHILL, R. Die Pollenmorphologie der Bromeliaceae. **Pollen et Spores**, v. 10, n. 1, p. 13-15, 1973.
- ENDRESS, P. K. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. **Annals of Botany**, v. 107, n. 9, p. 1465-1489, 2011.
- ERBAR, C. Pollen tube transmitting tissue: place of competition of male gametophytes. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. S5, p. S265–S277, 2003.
- ERDTMAN, G.; PRAGLOWSKI, K. A note on pollen morphology. *In*: Smith, L. B.; Downs, R. J. (Ed.). Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *In*: **Flora Neotropica Monograph**, v. 14, n. 1. New York: Hafner Press, 1974. p. 28-33.
- FAGUNDES, N. F.; MARIATH, J. E. A. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. **Acta botanica brasílica**, v. 24, n. 3, p. 765-779, 2010.
- FARIA, A. P. G.; WENDT, T.; BROWN, G. K. Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 91, p. 303-319, 2004.
- FAVRETTO, M. A. *et al.* Beija-flores visitantes de bromélias no Parque Natural Municipal Rio do Peixe, Joaçaba, Santa Catarina, Brasil. **Atualidades Ornitológicas**, v. 158, p. 11-13, 2010.
- FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.
- FORZZA, R. C.; WANDERLEY, M. G. L. Considerações sobre a morfologia polínica de *Dyckia*, *Encholirium* e *Pitcairnia*. **Bromelia**, v. 5, p. 50-53, 1998.
- FRANK, J. H. *et al.* Invertebrate animals extracted from native *Tillandsia* (Bromeliales: Bromeliaceae) in Sarasota County, Florida. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 2, p. 176-185, 2004.
- FRIEDMAN, W. E.; RYERSON, K. C. Reconstructing the ancestral female gametophyte of angiosperms: Insights from *Amborella* and other ancient lineages of flowering plants. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 1, p. 129-143, 2009.

- GAIOTTO, D. F. **Estudo taxonômico do gênero *Billbergia* Thumb. (Bromeliaceae) no estado do Paraná, Brasil.** 2005. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.
- GATIN, M. C.-L. Premières observations sur l'embryon et la germination des broméliacées. **Revue générale de Botanique**, v. 23, n. 1, p. 49-66, 1911.
- GIVNISH, T. J. *et al.* Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. **Aliso**, v. 23, p. 3-26, 2007.
- GIVNISH, T. J. *et al.* Assembling the tree of the Monocotyledons: Plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 97, p. 584-616, 2010.
- GIVNISH, T. J. *et al.* Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872-895, 2011.
- GROSS, E. Bromelienstudien IV. Zur Morphologie der Bromeliaceen-Samen unter Berücksichtigung Systematisch-taxonomischer Aspekte. **Tropische und Subtropische Pflanzenwelt**, v. 64, p. 415–625, 1988.
- HALBRITTER, H. Morphologie und Systematische Bedeutung des Pollens der Bromeliaceae. **Grana**, v. 31, p. 197-212, 1992.
- HALBRITTER, H.; TILL, W. Morfologia polínica do Complexo Nidulariíode. *In*: PEREIRA, M. V. (Ed.). **Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Salamandra, 1998.
- HAUSSEN, M. A. A. B. **Biogeografia da família Bromeliaceae Juss. no Rio Grande do Sul.** 1992. Dissertação de Mestrado, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, 1992.
- HERR, J. M. Embryology and taxonomy. *In*: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 647-696.
- HERRERO, M. Changes in the ovary related to pollen tube guidance. **Annals of Botany**, v. 85, Supplement A, p. 79-85, 2000.
- HERRERO, M.; HORMAZA, J. I. Pistil strategies controlling pollen tube growth. **Sexual Plant Reproduction**, v. 9, p. 343-347, 1996.
- HESLOP-HARRISON, Y. Control gates and micro-ecology: The pollen-stigma interaction in Perspective. **Annals of Botany**, v. 85, Supplement. A, p. 5-13, 2000.
- HESLOP-HARRISON, J.; SHIVANNA, K. R. The receptive surface of the angiosperm stigma. **Annals of Botany**, v. 41, p. 1233-1258, 1977.

- HIGASHIYAMA, T. *et al.* Pollen tube attraction by the synergid cell. **Science**, v. 293, p. 1480-1483, 2001.
- HOLMES, J. O. The cold tolerances of some bromeliads. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 16, n. 3, p. 60, 1966.
- HORRES, R. *et al.* Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: Evidence from *trnL* (UAA) intron sequences of the chloroplast genome. **Plant Biology**, v. 2, n. 3, p. 306-315, 2000.
- JAUH, G. Y.; LORD, E. M. Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longitorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. **Planta**, v. 199, p. 251-261, 1996.
- JOHRI, B. M. **Embryology of the Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984.
- KIM, S. *et al.* Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. **PNAS**, v. 100, n. 26, p. 16125-16130, 2003.
- KLEIN, R. M. **Espécies raras ou ameaçadas de extinção do estado de Santa Catarina**. Rio de Janeiro: IBGE, 1990.
- KNOX, J. P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 308-313, 2008.
- KNOX, J. P. The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. **International Review of Cytology**, v. 171, p. 79-120, 1997.
- KULKARNI, R. A.; PAI, R. M. The floral anatomy of *Puya spathacea* Mez. (Bromeliaceae) with special reference to nectaries. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**, v. 91, n. 6, p. 473-478, 1982.
- LAKSHMANAN, K. K. Embryological studies in the Bromeliaceae. I. *Lindmania penduliflora* (C. H. Wright) Stapf. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**, v. 65, p. 49-55, 1967.
- LAROCCA, J.; SOBRAL, M. *Dyckia delicata* (Bromeliaceae), a new species from Rio Grande do Sul, Brazil. **Novon**, v. 12, n. 2, p. 234-236, 2002.
- LEME, E. M. C. **Bromeliads in the Brazilian wilderness**. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual, 1993.
- LI, Y. Q. *et al.* Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. **Sexual Plant Reproduction**, v. 7, p. 145-152, 1994.
- LI, Y. Q. *et al.* Immunogold localization of arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. **Protoplasma**, v. 189, p. 26-36, 1995.

- LINDER, H. P.; RUDALL, P. J. Evolutionary history of Poales. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 36, p. 107-124, 2005.
- LORD, E. M. Adhesion and guidance in compatible pollination. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 47-54, 2003.
- LUSH, W. M. Whither chemotropism and pollen tube guidance? **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 10, p. 413-418, 1999.
- LUSH, W. M.; SPURCK, T.; JOOSTEN, R. Pollen tube guidance by the pistil of a solanaceous plant. **Annals of Botany**, v. 85, p. 39-47, 2000.
- LUTHER, H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 11th ed. Sarasota: The Bromeliad Society International, 2008.
- MAGALHÃES, R. I.; MARIATH, J. E. A. Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, n. 10, p. 1881-1895, 2012.
- MAJEWSKA-SAWKA, A.; NOTHNAGEL, E. A. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. **Plant Physiology**, v. 122, p. 3-9, 2000.
- MANTOVANI, A.; IGLESIAS, R. R. 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, n. 87, p. 73-84, 2005.
- MARIATH, J. E. A.; COCUCCI, A. E. The ovules of *Relbunium hypocarpium* in the context of the Rubiaceae. **Kurtziana**, v. 25, p. 141-150, 1997.
- MARTINELLI, G. The bromeliads of the Atlantic Forest. **Scientific American**, v. 282, n. 3, p. 86-93, 2000.
- MARTINELLI, G. *et al.* Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2008.
- MARTÓN, M. L. *et al.* Micropylar pollen tube guidance by Egg Apparatus 1 of maize. **Science**, v. 30, p. 573-576, 2005.
- MENDES, S. P. **Estudos embriológicos em *Pitcairnia encholirioides* L.B.Sm. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae)**. 2012. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- MENDES, S. P.; COSTA, C. G.; DE TONI, K. L. G. Embryo development of *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered Brazilian species. **Australian Journal of Botany**, v. 58, p. 485-492, 2010.
- MENDES, S. P.; COSTA, C. G.; DE TONI, K. L. G. Androecium development in the bromeliad *Dyckia pseudococcinea* L.B.Sm. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an

- endangered species endemic to Brazil: implications for conservation. **Flora**, v. 207, p. 622-627, 2012.
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 266-277, 2008.
- MOLLET, J.-C. *et al.* Cell wall composition, biosynthesis and remodeling during pollen tube growth. **Plants**, v. 2, p. 107-147, 2013.
- MOREIRA, B. A. **Palinotaxonomia da família Bromeliaceae do Estado de São Paulo**. 2007. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.
- MOREIRA, B. A.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; WANDERLEY, M. G. L. Morfologia polínica de algumas espécies dos gêneros *Neoregelia* L. B. Sm. e *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v. 19, n. 1, p. 61-70, 2005.
- MORRA, L.; DOTTORI, N.; COSA, M. T. Ontogenia y anatomia de semilla y fruto en *Tillandsia tricholepis* (Bromeliaceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 37, n. 3-4, p. 193-201, 2002.
- MOZA, M. K.; BHATNAGAR, A. K. Plant reproductive biology studies crucial for conservation. **Current Science**, v. 92, n. 9, p. 1207, 2007.
- NEGRELLE, R. R. B.; MITCHELL, D.; ANACLETO, A. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. **Acta Scientiarum**, v. 34, n. 1, p. 91-100, 2012.
- NGUEMA-ONA, E. *et al.* Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. **Annals of Botany**, v. 110, p. 383-404, 2012.
- OKIMOTO, M. C. Anatomy and histology of the pineapple inflorescence and fruit. **Botanical Gazette**, v. 110, n. 2, p. 217-231, 1948.
- OKUDA, S. *et al.* Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. **Nature**, v. 458, p. 357-361, 2009.
- OLIVEIRA, R. R. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. **Acta botanica brasílica**, v. 18, n. 4, p. 793-799, 2004.
- PALACÍ, C. A.; BROWN, G. K.; TUTHILL, D. E. The seeds of *Catopsis* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). **Systematic Botany**, v. 29, p. 518-527, 2004.
- PALANIVELU, R. *et al.* Pollen tube growth and guidance is regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. **Cell**, v. 114, p. 47-59, 2003.

- PAPINI, A. *et al.* Megasporogenesis and programmed cell death in *Tillandsia* (Bromeliaceae). **Protoplasma**, v. 248, n. 4, p. 651-662, 2011.
- PENNELL, R. Cell walls: structures and signals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 504-510, 1998.
- PENNELL, R. I. *et al.* Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1317-1326, 1991.
- PEREIRA, A. R. *et al.* Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. **Acta botanica brasílica**, v. 22, n. 4, p. 1150-1162, 2008.
- PEREIRA, L. G. *et al.* Expression of arabinogalactan protein genes in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 223, p. 374-380, 2006.
- 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, n. 1, p. 25-34, 2002.
- PLACHNO, B. J.; SWIATEK, P. Functional anatomy of the ovule in *Genlisea* with remarks on ovule evolution in Lentibulariaceae. **Protoplasma**, v. 236, p. 39-48, 2009.
- POPPER, Z. A. Evolution and diversity of green plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 286-292, 2008.
- POREMBSKY, S.; BARTHLOTT, W. *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. **Harvard Papers in Botany**, v. 4, n. 1, p. 175-184, 1999.
- PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v. 18, n. 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 botanica brasílica**, v. 21, n. 3, p. 657-673, 2007.
- PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 113-128, 2008.
- RAO, A. N.; WEE, Y. C. Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. **New Phytologist**, v. 83, n. 2, p. 485-497, 1979.
- REITZ, R. Bromeliáceas e a Malária - Bromélia endêmica. *In: Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 1, fascículo Bromeliaceae, 1983. p. 1-559.
- RICHARDSON, B. The bromeliad microcosm and the assessment of faunal diversity in a neotropical forest. **Biotropica**, v. 31, n. 2, p. 321-336, 1999.

- RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.
- RIO GRANDE DO SUL. Decreto Estadual n° 42.099, de 31 de dezembro de 2002, publicado em 01 de Janeiro de 2003. Disponível em: <http://www.fzb.rs.gov.br/downloads/flora_ameacada.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2013.
- ROBINSON, H. A monograph on foliar anatomy of the genera *Connelia*, *Cottendorfia*, and *Navia* (Bromeliaceae). **Smithsonian Contributions to Botany**, n. 2, p. 1-41, 1969.
- SAJO, M. G. *et al.* Microsporogenesis and anther development in Bromeliaceae. **Grana**, v. 44, p. 65–74, 2005.
- SAJO, M. G.; PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Structure and development of the ovule in Bromeliaceae. **Kew Bulletin**, v. 59, p. 261-267, 2004b.
- 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, 2004a.
- SANCHEZ, A. M. *et al.* Pistil factors controlling pollination. **The Plant Cell**, v. 16, p. S98-S106, 2004.
- SARTORI, J. S. **Desenvolvimento floral em *Vriesea carinata* Wawra (Tillandsioideae-Bromeliaceae)**. 2008. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.
- SASS, C.; SPECHT, C. D. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 559-571, 2010.
- SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, 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, n. 6, p. 945-951, 2006.
- SCHULTE, K.; BARFUSS, M. H. J.; ZIZKA, G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 327-339, 2009.

- SEGECIN, S.; SCATENA, V. L. Morfoanatomia de rizomas e raízes de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, PR, Brasil. **Acta botânica brasilica**, v. 18, n. 2, p. 253-260, 2004.
- SEIFERT, G. J.; ROBERTS, K. The biology of arabinogalactan proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 137-161, 2007.
- SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**, v. 5, p. 9-23, 1993.
- SHOWALTER, A. M. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 1399-1417, 2001.
- SILVA, F. S. **Estudos ontogenéticos e histoquímicos de frutos em espécies de Bromeliaceae Juss.** 2011. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.
- SILVA, I. V.; SCATENA, V. L. Morfologia de sementes e de estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. **Rodriguésia**, v. 62, n. 2, p. 263-272, 2011.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *In: Flora Neotropica Monograph*. New York: Hafner Press, v. 14, n. 1, 1974. p. 1-662.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *In: Flora Neotropica Monograph*. New York: Hafner Press, v. 14, n. 2, 1977. p. 663-1492.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). *In: Flora Neotropica Monograph*. New York: New York Botanical Garden, v. 14, n. 3, 1979. p. 1493-2142.
- 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. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 603-613, 2005.
- SOUSA, G. M.; WANDERLEY, M. G. L.; CRUZ-BARROS, M. A. V. Morfologia polínica de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) de Pernambuco, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 16, p. 21-30, 1997.
- SOUZA, F. C.; MENDONÇA, C. B. F.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V. Estudo polínico de espécies de Pitcairnioideae e Tillandsioideae (Bromeliaceae Juss.) ocorrentes na restinga de Carapebus, Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 62, n. 1, p. 15-23, 2004.
- SPAT, C. **Embriologia de *Tillandsia aeranthos* (Lois.) L. B. Sm. (Tillandsioideae-Bromeliaceae)**. 2012. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2012.

- SPECHT, C. D.; BARTLETT, M. E. Flower evolution: The origin and subsequent diversification of the Angiosperm flower. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, p. 217-243, 2009.
- STILES, F. G.; FREEMAN, C. E. Patterns in floral nectar characteristics of some bird-visited plant species from Costa Rica. **Biotropica**, v. 25, n. 2, p. 191-205, 1993.
- STÖSSER, R. Über die Anziehung der Pollenschläuche durch die Samenanlagen bei Fruchten. **Angewandte Botanik**, v. 60, p. 421-426, 1986.
- STREHL, T. Forma, distribuição e flexibilidade dos tricomas foliares usados na filogenia de bromeliáceas. **Iheringia**, v. 31, p. 105-119, 1983.
- STREHL, T.; BEHEREGARAY, R. C. P. Morfologia de sementes do gênero *Dyckia*, subfamília Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Pesquisas, Botânica**, v. 57, p. 103-120, 2006.
- SZIDAT, L. Die Samen der Bromeliaceen in ihrer Anpassung na den Epiphytismus. **Botanisches Archives**, v. 1, p. 29–46, 1922.
- TARDIVO, R. C.; RODRIGUES, W. A. Pólen e estigma das espécies de *Nidularium Leme* e *Cansitrum E. Morren* (Bromeliaceae) ocorrentes no Estado do Paraná. **Biotemas**, v. 11, n. 1, p. 7-16, 1998.
- TERRY, R. G.; BROWN, G. K. A study of evolutionary relationships in Bromeliaceae based on comparison of DNA sequences from the chloroplast gene *ndhF*. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 46, n. 3, p. 107-123, 1996.
- 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, n. 5, p. 664-670, 1997.
- TILTON, V. R.; HORNER Jr., H. T. Stigma, style and obturator of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in the reproductive process. **American Journal of Botany**, v. 67, p. 1113-1131, 1980.
- TOBE, H. The embryology of Angiosperms: Its broad application to the systematic and evolutionary study. **The Botanical Magazine, Tokyo**, v. 102, p. 351-367, 1989.
- TOMLINSON, P. B. Commelinales – Zingiberales. In: METCALFE, C. R. (Ed.). **Anatomy of the Monocotyledons**. Oxford: Claredon Press, 1969.
- VALLÉS, D.; FURTADO, S.; CANTERA, A. M. B. Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 409–413, 2007.

- VAN AELST, A. C.; VAN WENT, J. L. Ultrastructural immuno-localization of pectins and glycoproteins in *Arabidopsis thaliana* pollen grains. **Protoplasma**, v. 168, p. 14-19, 1992.
- VARADARAJAN, G. S.; BROWN, G. K. Morphological variation of some floral features of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and their significance in pollination biology. **Botanical Gazette**, v. 149, n. 1, p. 82-91, 1988.
- VARADARAJAN, G. S.; GILMARTIN, A. J. Foliar scales of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematic Botany**, v. 12, n. 4, p. 562-571, 1987.
- VARADARAJAN, G. S.; GILMARTIN, A. J. Taxonomic realignments within the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematic Botany**, v. 13, n. 2, p. 294-299, 1988.
- VERSIEUX, L. M. *et al.* Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 98-110, 2008.
- VERVAEKE, I. *et al.* Flower biology of six cultivars of the Bromeliaceae. I. Pollen, pistil, and petal appendages. **Selbyana**, v. 24, n. 1, p. 78-86, 2003.
- VIEIRA-DE-ABREU, A. *et al.* Anti-allergic properties of the Bromeliaceae *Nidularium procerum*: Inhibition of eosinophil activation and inf lux. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 1966–1974, 2005.
- WAECHTER, J. L. Distribuição de bromeliáceas epifíticas em florestas do Rio Grande do Sul. *In*: 58º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 2007, São Paulo. BARBOSA, L. M.; SANTOS Jr., N. A. (Org.). **A botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais**. São Paulo: Sociedade Botânica do Brasil, 2007. p. 450-454.
- WANDERLEY, M. G. L.; MELHEM, T. S. Flora polínica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga - Família 178- Bromeliaceae. **Hoehnea**, v. 18, n. 1, p. 5-42, 1991.
- WANG, Z.; REN, Y. Ovule morphogenesis in Ranunculaceae and its systematic significance. **Annals of Botany**, v. 101, n. 3, p. 447-462, 2007.
- WEE, Y. C.; RAO, A. N. Gametophytes and seed development in pineapple. **Current Science**, v. 43, p. 171-173, 1974.
- WILLATS, W. G. T. *et al.* Making and using antibody probes to study plant cell walls. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 27-36, 2000.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.

- WINKLER, S. Die Bromeliaceae von Rio Grande do Sul. **Documenta naturae**, v. 3, p. 1-80, 1982.
- WU, H.-M.; WANG, H.; CHEUNG, A. Y. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. **Cell**, v. 82, p. 395–403, 1995.

CAPÍTULO II

**Desenvolvimento do estigma, estilete e obturador em *Billbergia nutans* (Bromeliaceae),
com destaque para as modificações histológicas antes e durante a fase progâmica**

Resumo

O gineceu é especializado para os eventos que ocorrem durante a fase progâmica. Em Bromeliaceae, os verticilos florais são raramente detalhados em nível histológico, sendo desconhecida a estrutura anatômica do estigma e do estilete. Este estudo visa descrever o gineceu em desenvolvimento de *B. nutans*, a fim de conhecer sua anatomia em Bromeliaceae e agregar informações sobre as modificações do gineceu durante a fase progâmica em angiospermas. A arquitetura do estigma espiral-conduplicado resulta da ausência de fusão entre os carpelos, do alongamento e torção dos lobos estigmáticos, e da formação de tricomas nas margens dos lobos. Detectou-se a existência de um meristema marginal na porção estigmática dos carpelos. A superfície do estigma e estilete possui células epidérmicas alongadas, com quatro projeções alinhadas em cada célula e estrias dispostas radialmente sobre cada projeção. Os tricomas estigmáticos são multicelulares, unisseriados e ramificados e produzem secreção abundante, armazenada no interior da parede periclinal externa na porção apical do tricoma. O estilete é trilobado, oco e unilocular, com canal estilar trirradiado. O tecido transmissor e o obturador apresentam características em comum, como a origem dérmica e a formação de paredes celulares labirínticas na face periclinal externa das células. Essas paredes labirínticas caracterizam tais tecidos como constituídos por células de transferência. Com base em testes histoquímicos, os tecidos secretores mencionados produzem secreção polissacarídica. Observou-se uma dinâmica de amido associada à produção de secreção no gineceu, regulada pelo desenvolvimento. Esse amido é provavelmente utilizado para a produção de secreção, com o auxílio dos campos primários de pontoação para o transporte de moléculas. São registrados dados inéditos para Bromeliaceae. Comparativamente, são mostradas diferenças e semelhanças no contexto de Poales, monocotiledôneas e angiospermas.

Palavras-chave: anatomia, desenvolvimento, gineceu, obturador, tecido transmissor.

Introdução

Na reprodução sexuada das plantas com flores, o gineceu é uma estrutura especializada para os eventos que ocorrem durante a fase progâmica, da polinização à fecundação, de modo que qualquer falha no processo reprodutivo induz o colapso da cadeia de eventos, resultando na ausência de produção de sementes (Herrero & Hormaza, 1996). As modificações no desenvolvimento das diferentes estruturas do gineceu parecem desempenhar um papel fundamental no condicionamento dos tubos polínicos, quanto ao seu comportamento e orientação (Herrero, 2000). O tecido transmissor auxilia na nutrição e orientação dos tubos polínicos, através de uma matriz extracelular rica em açúcares livres, polissacarídeos, glicoproteínas e lipídios (Cheung, 1996; Erbar, 2003). Em *Nicotiana tabacum*, constatou-se que uma glicoproteína específica do tecido transmissor (TTS) atrai os tubos polínicos e estimula o seu crescimento, com uma função nutricional observada pela incorporação dessa glicoproteína pelos tubos polínicos e sua posterior deglicosilação (Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995). As particularidades do gineceu em preparação aos eventos de polinização e fecundação são importantes para a compreensão do modo de reprodução da espécie, bem como para a ampliação do conhecimento das estratégias reprodutivas em angiospermas.

Bromeliaceae é uma família com distribuição tipicamente neotropical (Smith & Downs, 1974), que inclui cerca de 3172 espécies distribuídas em 58 gêneros (Luther, 2008). Atualmente, as relações infrafamiliares de Bromeliaceae apresentam-se mais claras, com o estabelecimento de oito subfamílias monofiléticas (Givnish *et al.*, 2007, 2011). Essa família está inserida na ordem Poales, como grupo-irmão das demais famílias, e juntamente com Typhaceae e Rapateaceae forma o grado basal da ordem (Givnish *et al.*, 2010).

Bromelioideae é a subfamília que divergiu mais tarde no contexto evolutivo da família (Givnish *et al.*, 2007, 2011), e agrega caracteres distintos das outras subfamílias, como a presença de flores epíginas, frutos carnosos múltiplos ou simples do tipo baga e sementes nuas ou com apêndices gelatinosos (Smith & Downs, 1979). *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel (Bromelioideae) é uma espécie ornamental, comercializada no Brasil e no exterior, que está distribuída geograficamente nas regiões sul e sudeste do Brasil, Uruguai, Paraguai e norte da Argentina (Smith & Downs, 1979; Martinelli *et al.*, 2008; Versieux *et al.*, 2008). Seu florescimento ocorre no inverno (Mastalerz, 1957; Reitz, 1983) e constitui uma fonte importante de alimento para beija-flores polinizadores durante o período de baixas temperaturas (Favretto *et al.*, 2010).

Estudos de anatomia floral são raros em Bromeliaceae e estão centrados em temáticas como a vascularização floral e a morfologia dos nectários septais (Kulkarni & Pai, 1982; Sajo *et al.*, 2004), de modo que não detalham as estruturas florais em nível histológico. A anatomia do ovário, em continuidade ao desenvolvimento do fruto, foi detalhada para seis representantes da família, inclusive *B. nutans*, por Fagundes & Mariath (2010). Entretanto, a estrutura anatômica dos tecidos do estigma e do estilete é ainda desconhecida para Bromeliaceae, com a existência de apenas dados morfológicos da superfície estigmática (Brown & Gilmartin, 1984, 1988, 1989; Heslop-Harrison & Shivanna, 1977; Varadarajan & Brown, 1988; Tardivo & Rodrigues, 1998; Vervaeke *et al.*, 2003). Segundo Brown & Gilmartin (1984), a caracterização morfológica dos verticilos florais, incluindo os estigmas, é um dos requisitos para a compreensão da biologia de polinização dentro da família. Nesse sentido, a descrição anatômica pode indicar alguma correspondência com as categorias morfológicas do estigma e proporcionar fundamentos para a compreensão da evolução dessas estruturas em relação aos processos de polinização e fecundação.

Esse estudo tem como objetivo caracterizar a morfologia, anatomia e histoquímica do gineceu – estigma, estilete e obturador – em desenvolvimento de *Billbergia nutans*, antes e durante a fase progâmica, a fim de conhecer a estrutura e composição química dos tecidos do gineceu em Bromeliaceae e agregar informações sobre as modificações estruturais e químicas do gineceu em preparação aos eventos de polinização e fecundação, em busca de uma melhor compreensão das estratégias reprodutivas em angiospermas.

Material e métodos

Material botânico

O material botânico é proveniente de sete indivíduos de diferentes populações de *Billbergia nutans*. Esse material foi obtido na coleção viva de Bromeliaceae do Jardim Botânico de Porto Alegre, sob a numeração de registro BROM 00073, BROM 00106, BROM 00596, BROM 00720, BROM 00739, e em municípios do Rio Grande do Sul, Brasil, sendo mantido em coleção viva do Laboratório de Anatomia Vegetal, com as exsiccatas depositadas no Herbário ICN sob a numeração de registro ICN 190645 e ICN 190646, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Flores em diversos estádios de desenvolvimento, desde botões florais jovens até flores em pós-antese, foram coletadas e dissecadas. Para evitar que as interações entre o gametófito masculino e o gineceu fossem afetadas por restrições decorrentes do sistema reprodutivo, as análises do desenvolvimento durante a fase progâmica foram realizadas com base na polinização cruzada manual das flores. Desse modo, foi realizada emasculação e ensacamento de algumas flores, com posterior polinização manual ou ausência da mesma. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976).

Preparação para Microscopia de Luz

Para a preparação das seções histológicas, as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Gabriel, 1982), desidratadas em série etílica ascendente (10%-100%), com etapas de etanol:clorofórmio ao final (3:1, 1:1, 1:3, 1:1, 3:1), e incluídas em resina hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid, 1983). As seções, com 4µm de espessura, foram confeccionadas em micrótomo de rotação Zeiss, Microm HM 340 E, e coradas com Azul de Toluidina O 0,05%, pH 4,4 (Feder & O'Brien, 1968), como corante de rotina para o estudo. Para as seções transversais, utilizou-se a porção mediana do ovário, as porções basal, mediana e apical do estilete e o estigma inteiro. O material fresco também foi utilizado para as análises.

Testes histoquímicos e respectivos controles foram realizados ao longo do desenvolvimento, listados a seguir: Lugol para amido (Johansen, 1940), Ácido Periódico/ Reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos (Feder & O'Brien, 1968), Vermelho de Rutênio para pectinas (Johansen, 1940), Azul de Alciano 8GX para mucopolissacarídeos ácidos (Lillie, 1965), Sudan III para lipídios (Sass, 1951), Sudan Black B para lipídios (Jensen, 1962), Xilidine Ponceau para proteínas totais (O'Brien & McCully, 1981), Ácido Clorídrico 10% para oxalato de cálcio (Chamberlain, 1932), em campo claro; e Calcofluor White para celulose (Hughes & McCully, 1975), sob fluorescência. Para o controle de detecção de pectinas, utilizou-se a enzima pectinase 20% (Guerra & Souza, 2002), com posterior coloração com Vermelho de Rutênio e Azul de Alciano 8GX.

As análises e fotomicrografias foram realizadas sob microscopia óptica de campo claro ou de epifluorescência com filtro de excitação de 340-380nm. Para isso, utilizou-se um microscópio Leica DMR, com câmera fotográfica digital Leica DFC 500 acoplada e programa de captura de imagens Leica Application Suite – LAS, versão 3.8 e 4.1, com a aplicação do módulo Montage em alguns casos.

Preparação para Microscopia Eletrônica de Varredura

O material fixado foi desidratado em série ascendente de acetona (10%-100%) e submetido à secagem pelo método do ponto crítico (Gersterberger & Leins, 1978) com o uso do equipamento Balzers, CPD 030. Após, as amostras foram montadas em suportes de alumínio e recobertas com ouro no aparelho metalizador Balzers, SCD 050. As observações e o registro eletromicrográfico foram realizados em microscópio JEOL 6060, sob 10kV.

Resultados

Estigma

O gineceu de *B. nutans* é tricarpelar. Ao longo do desenvolvimento do estigma, não ocorre fusão nas margens de cada um dos carpelos, nem entre os carpelos, os quais se desenvolvem separados, constituindo lobos (Fig. 1a-d). Em botões florais com 0,16cm de comprimento, quando o ovário está em fase de fechamento dos carpelos e as anteras indiferenciadas com relação à sua porção fértil, os lobos estigmáticos apresentam um processo inicial de torção (Fig. 1a, b). Além disso, são observadas divisões celulares periclinais na camada subdérmica das margens carpelares (Fig. 1b). Em botões florais com 0,45cm de comprimento, em estágio de formação da placenta no ovário e de tecido esporogênico na antera, observa-se uma maior diferenciação dos tecidos no estigma e um grau mais avançado de torção dos lobos estigmáticos (Fig. 1c, d). As margens carpelares possuem características celulares distintas das demais regiões do carpelo, pois incluem células subdérmicas diminutas com citoplasma mais denso, que apresentam multiplicação celular por meio de divisões periclinais (Fig. 1d-e), acompanhada pela camada dérmica. As células derivadas dessas iniciais subdérmicas dividem-se em planos variados. Na camada dérmica da margem carpelar, são identificadas algumas divisões periclinais, as quais caracterizam o início do

desenvolvimento de tricomas. Em estádios posteriores, as células derivadas da multiplicação celular no mesofilo das margens carpelares se alongam perpendicularmente em relação ao eixo longitudinal carpelar, expandindo as porções laterais dos carpelos e, assim, ocasionando o alongamento dos lobos estigmáticos (Fig. 1f). Em botões florais com 1,14cm de comprimento, que estão em estágio de inicial arquesporial no primórdio de rudimento seminal e de célula-mãe de andrósporos na antera, observa-se o desenvolvimento de tricomas nas margens dos lobos estigmáticos (Fig. 1f e detalhe). Nesse estágio, com os tecidos mais diferenciados, percebe-se a clara distinção entre as duas faces epidérmicas, a externa constituindo a epiderme da superfície estigmática e a interna formando o tecido transmissor (Fig. 1f).

O estigma é classificado como do tipo espiral-conduplicado (Fig. 2a), visto que sua morfologia na maturidade mostra os lobos estigmáticos alongados e espiralados entre si. No botão floral próximo de sua abertura, com cerca de 5cm de comprimento, o estigma apresenta seus tricomas totalmente desenvolvidos nas margens carpelares, os quais são longos, multicelulares, unisseriados e ramificados (Fig. 2a-d, h, i). As células epidérmicas, incluindo os tricomas, possuem paredes periclinais externas espessas e conteúdo celular péctico (Fig. 2d). Na superfície estigmática, cada célula epidérmica possui quatro projeções de parede celular alinhadas e estrias dispostas radialmente sobre cada projeção (Fig. 2e, f). Estrias também estão presentes na superfície dos tricomas (Fig. 2h). As células parenquimáticas são alongadas em sentido longitudinal (Fig. 2d), e se tornam menos alongadas em direção às margens carpelares. Na epiderme e no mesofilo, as paredes celulares são repletas de campos primários de pontoação (Fig. 2e, g), tanto no estigma quanto no estilete. O tecido transmissor, que reveste o canal estilar-estigmático, é composto por células relativamente pequenas, retangulares em seção e com conteúdo celular denso (Fig. 2d). Durante o período de abertura da flor, o estigma mostra produção abundante de secreção polissacarídica pelos tricomas (Fig.

2j-p). A secreção, antes de ser exsudada, é armazenada em bolsões pécticos no interior da parede periclinal externa, na porção apical do tricoma, identificado através da delimitação da parede pecto-celulósica, de constituintes protéicos e da cutícula (Fig. 2l-p). Posteriormente, a secreção é exsudada e os tricomas permanecem intactos na superfície estigmática, com citoplasma bastante vacuolado e sem a presença dos compostos pécticos evidenciados no estágio anterior.

Estilete

Durante o desenvolvimento do estilete, ocorre fusão entre carpelos adjacentes, porém as margens de um mesmo carpelo não são fusionadas (Fig. 3a). Na maturidade, o estilete é trilobado, oco e unilocular, sendo o canal estilar trirradiado (Fig. 3b). Em cada carpelo, existe um feixe vascular dorsal (Fig. 3b), no estilete e estigma. Em seção transversal, as células da epiderme são alongadas radialmente (Fig. 3c, d), bem como as células do tecido transmissor, que seguem aproximadamente esse mesmo padrão (Fig. 3e). No mesofilo, as células parenquimáticas são isodiamétricas em seção transversal, e apresentam um gradiente de dimensão, sendo menores na região em torno do tecido transmissor e do feixe vascular (Fig. 3b, e). Assim como no estigma, a superfície epidérmica do estilete possui projeções e estrias. As células epidérmicas possuem conteúdo péctico e paredes periclinais externas espessas, aumentando a quantidade de conteúdo e a espessura dessas paredes em direção ao ápice do estilete (Fig. 3c, d), em continuidade ao estigma. Todas as células são bastante alongadas em sentido longitudinal, principalmente no mesofilo (Fig. 3f). Nesse sentido, as células do tecido transmissor são alongadas nas porções basal e média do estilete (Fig. 3f), tornando-se menos alongadas na porção apical do estilete (Fig. 3g-j) e no estigma (Fig. 2d). Próximo da abertura das flores, o estilete apresenta o tecido transmissor com citoplasma muito denso (Fig. 3e). Nesse estágio, observou-se uma secreção polissacarídica homogênea preenchendo o canal

estilar (Fig. 3e). Na flor aberta, as células do tecido transmissor, no estilete e no estigma, desenvolvem paredes celulares labirínticas de composição pecto-celulósica (Fig. 3g-j) e produzem uma secreção polissacarídica granulosa (Fig. 3f).

Obturador

O ovário é trilobular, ínfero, com placentação axial e muitos rudimentos seminiais por lóculo (Fig. 4a). Estão presentes nectários septais interloculares (Fig. 4a), os quais não serão detalhados neste estudo. Em botões florais jovens, com primórdios de rudimentos seminiais em estágio de inicial arqueosporial e anteras em estágio de célula-mãe de andrósporos, as células epidérmicas da placenta começam a se diferenciar através de um sutil alongamento celular e uma modificação da face periclinal externa para um formato de domo (Fig. 4b), formando um obturador que reveste toda a placenta. Ao longo do desenvolvimento, as células do obturador apresentam-se muito vacuoladas, com vacúolos avantajados contendo pectinas (Fig. 4c). Em botões florais próximo de sua abertura, as células passam a conter vacúolos menores e citoplasma mais denso (Fig. 4d). Além disso, desenvolvem paredes celulares labirínticas conspícuas nas suas faces periclinais externas, de composição pecto-celulósica (Fig. 4e-i). Nas flores ao final do período de abertura, o obturador apresenta-se secretor, com produção abundante de exsudato polissacarídico, que adere à superfície do tubo polínico (Fig. 4e, j).

Dinâmica de componentes químicos no gineceu

Idioblastos contendo ráfides de oxalato de cálcio são freqüentes nos tecidos do gineceu, estando presentes no rudimento seminal e no mesofilo do ovário, estilete e estigma (Fig. 1f). Cristalóides protéicos estão presentes nas células dos tricomas estigmáticos (Fig. 2h, i), do tecido transmissor do estilete e estigma e do obturador. A presença desses componentes

químicos, assim como sua localização, foi detectada em todos os estádios analisados, não havendo diminuição ou desaparecimento.

A presença de amido no gineceu segue uma dinâmica ao longo do seu desenvolvimento, associada à produção de secreção. Ao longo do gineceu, do estigma ao ovário, a quantidade de grãos de amido aumenta nos tecidos até o momento de abertura da flor. Durante o período de abertura da flor, observa-se uma dinâmica em direção à base do gineceu, com a ocorrência de amilólise na porção apical do gineceu e de amilogênese na sua porção basal. A diminuição da quantidade de grãos de amido está associada com a produção de secreção pelo tecido transmissor e coincide com a aproximação dos grãos de pólen ou tubos polínicos. Esse processo de armazenamento de amido, seguido de sua degradação e produção de secreção ocorre em momentos diferentes nos tecidos de cada uma das porções do gineceu, primeiramente no estigma, após no estilete e, por último, no ovário. Assim, botões florais próximo de sua abertura apresentam grande quantidade de grãos de amido no estigma, principalmente nas margens dos lobos estigmáticos (Fig. 5a-c). Flores abertas, após a polinização, com tubos polínicos atravessando o estigma, possuem grãos de amido em abundância próximo do tecido transmissor do estigma e do estilete. Já as flores com tubos polínicos na base do canal estilar, possuem maior quantidade de grãos de amido em determinadas porções do ovário, incluindo a região placentária e rudimentos seminais (Fig. 5d-f). Essa dinâmica está representada na Fig. 6. Foi possível identificar que a produção de secreção pelo tecido transmissor do estilete e estigma e pelo obturador ocorre tanto em flores polinizadas quanto em flores não polinizadas.

Discussão

Estigma

De acordo com o abrangente estudo de Heslop-Harrison & Shivanna (1977) sobre a superfície estigmática em cerca de 1000 espécies de angiospermas, o estigma em *Billbergia* é classificado como úmido do Grupo III, com papilas de comprimento pequeno a médio ou com uma franja marginal composta por papilas longas. A secreção abundante evidenciada na superfície do estigma de *B. nutans* corrobora sua classificação como úmido. Já a caracterização anatômica do estigma no atual estudo revela a presença de tricomas nas margens dos lobos estigmáticos, o que corresponde à segunda parte da referida classificação, todavia não está de acordo com a utilização do termo “papila” (FontQuer, 1975) para a descrição de estruturas longas e multicelulares, as quais constituem tricomas.

O estigma espiral-conduplicado, demonstrado em *B. nutans*, é um tipo de estigma único entre as monocotiledôneas, característico de Bromeliaceae. Em Juncaceae, observou-se um aspecto espiralado distinto no estigma de botões florais, em que as três ramificações do estigma apresentam-se contorcidas e separadas, porém se tornam retilíneas na antese da flor (Oriani *et al.*, 2012). Em Bromeliaceae, o estigma espiral-conduplicado é a morfologia mais comum e ocorre na grande maioria dos representantes da subfamília Bromelioideae, incluindo espécies de *Billbergia*, de acordo com o estudo morfológico de Brown & Gilmartin (1989). Este é o primeiro registro sobre a caracterização anatômica desse tipo de estigma, assim como para qualquer categoria de estigma em Bromeliaceae. A análise anatômica mostra que a arquitetura do estigma espiral-conduplicado é resultado de vários eventos ao longo do desenvolvimento: a ausência de fusão entre os carpelos, então denominados lobos; o alongamento dos lobos, por meio de divisões periclinais nas margens carpelares seguidas de alongamento celular; a torção dos lobos estigmáticos; e a formação de tricomas

multicelulares, unisseriados e ramificados nas margens dos lobos. Como consequência, essa arquitetura propicia uma área mais extensa para a germinação dos grãos de pólen no estigma. Com relação ao desenvolvimento do estigma, o presente estudo demonstra que as modificações iniciais que permitem o alongamento e a espiralização dos lobos estigmáticos ocorrem em botões florais muito jovens, paralelamente ao fechamento dos carpelos no ovário. Essa informação está em acordo com o estudo de Brown & Gilmartin (1988), no qual as características essenciais do estigma espiral-conduplicado manifestam-se logo após a organogênese dos carpelos. Entretanto, tais autores mencionam que as modificações das margens estigmáticas ocorrem durante os estádios finais de desenvolvimento do botão floral, imediatamente antes da abertura da flor, ao contrário do atual estudo que constatou a formação de tricomas nas margens estigmáticas de botões florais bastante jovens, com cerca de 20% do seu comprimento na maturidade.

No ovário, está bem estabelecido que uma região meristemática origina a placenta (Bouman, 1984). Traçando um paralelo entre estigma e ovário em termos de desenvolvimento, percebe-se neste estudo que a região no estigma em que ocorre uma multiplicação celular e o surgimento dos tricomas é a mesma região carpelar no ovário a partir da qual se desenvolvem a placenta, o obturador e os rudimentos seminiais, isto é, as margens carpelares. Considerando a observação de iniciais subdérmicas nas margens carpelares do estigma, que se multiplicam seguindo um mesmo padrão de divisão celular, consideramos que essas margens possuam o que se denomina de meristema marginal, característico de estruturas foliares e composto por iniciais marginais e submarginais (Avery, 1933; Foster, 1936; Maksymowych & Wochok, 1969; Fahn, 1990) e que, portanto, os carpelos apresentam potencial meristemático em toda a extensão de suas margens, do ovário ao estigma. Em *Arabidopsis thaliana*, o gineceu apresenta uma região denominada meristema da margem

carpelar, que origina diversos tecidos, sendo conhecidos pelo menos 86 genes envolvidos em processos relacionados a essa região (Reyes-Olalde *et al.*, 2013).

A morfologia estigmática já revelou ampla variação dentro de Bromeliaceae, com o estabelecimento de categorias e a provável existência de subtipos morfológicos (Brown & Gilmartin, 1988, 1989). O estigma é uma estrutura intimamente associada com os agentes polinizadores, na maioria beija-flores no caso de Bromeliaceae (Benzing *et al.*, 2000), de modo que a arquitetura estigmática é característica de gêneros ou espécies nessa família (Brown & Gilmartin, 1989). Embora não existam estudos que detalhem aspectos micromorfológicos do estigma em Bromeliaceae, o presente estudo revela caracteres bastante estáveis na superfície estigmática de *B. nutans*, como o formato das células epidérmicas, o alinhamento e o número de projeções em cada célula, a disposição das estrias e a morfologia dos tricomas, o que evidencia o potencial desse tópico para a busca de caracteres úteis para a taxonomia da família.

É importante ressaltar que a superfície estigmática é especializada morfologicamente para a interação pólen-estigma durante a reprodução sexuada e, assim, pode apresentar características em consonância com a estrutura polínica, de modo a aumentar a eficiência floral na captação e germinação dos grãos de pólen (Heslop-Harrison, 2000). Tendo em vista a diversidade de formas polínicas que existe em Bromeliaceae, sobretudo em Bromelioideae, com grãos de pólen sulcados, porados e inaperturados, incluindo a presença de subtipos (Erdtman & Praglowski, 1974; Halbritter, 1992; Moreira, 2007), é possível que tenham ocorrido modificações da superfície estigmática em reflexo à morfologia do pólen, ou vice-versa, durante a evolução, e que essas micromorfologias do estigma possam indicar caracteres apropriados para a taxonomia do grupo.

Estilete

O estilete é uma estrutura que, em comparação ao estigma, expressa uma menor variabilidade em sua morfologia externa. Desse modo, a estrutura geral do estilete parece não instigar o estudo de sua anatomia, que é pouco investigada em um enfoque taxonômico. Para a comparação da anatomia do estilete entre espécies de Poales, pertencentes ao grupo basal, cyperídeas e xirídeas *sensu* Givnish *et al.* (2010), que apresentam gineceu tricarpelar, é fornecida uma ilustração (Fig. 7) baseada em dados deste estudo e da literatura. Constatase que o estilete é oco e unilocular nas cinco famílias analisadas. Em seção transversal, essa estrutura apresenta um formato trilobado ou circular, com canal estilar trirradiado a multirradiado ou circular, geralmente três feixes vasculares dorsais e mesofilo com um gradiente de redução das dimensões celulares em direção ao tecido transmissor.

Avaliando-se cada família separadamente, verifica-se que, em Bromeliaceae, o estilete é trilobado com canal estilar trirradiado (Fig. 7a), com base neste estudo, em Kerns *et al.* (1936) e em Kulkarni & Pai (1982). Em Rapateaceae, o estilete apresenta um formato circular, com o canal estilar dotado do mesmo formato (Fig. 7b) (Oriani & Scatena, 2013). Em Juncaceae, o estilete é trilobado com o canal estilar circular (Fig. 7c) (Oriani *et al.*, 2012). Em Xyridaceae, o estilete possui formato trilobado e canal estilar trirradiado e muito estreito (Fig. 7d) (Oriani & Scatena, 2012). Em Mayacaceae, o estilete é circular, com três feixes vasculares dorsais e, às vezes, ramificações dos feixes ventrais, e o canal estilar é trirradiado e muito estreito ou multirradiado (Fig. 7e) (Carvalho *et al.*, 2009; Oriani & Scatena, 2012). Em relação às dimensões dos feixes vasculares, são observados feixes proporcionalmente menores em Rapateaceae (Fig. 7b). Outra característica avaliada é a posição dos feixes vasculares, os quais podem estar imersos na região mais interna do mesofilo, composta por células menores, em Bromeliaceae e Rapateaceae (Fig. 7a, b), ou podem estar dispostos na região mais externa do mesofilo em Juncaceae, Xyridaceae e Mayacaceae (Fig. 7c-e), o que demonstra uma

correspondência com a proposta filogenética atual do grupo (Givnish *et al.*, 2010). Ademais, tendo em vista que Bromeliaceae é o grupo-irmão das demais famílias em Poales (Givnish *et al.*, 2010), e que os estados de caráter observados nessa família ocorrem na maioria das famílias analisadas, isto é, morfologia trilobada do estilete e trirradiada do canal estilar e a presença de três feixes vasculares mais avantajados, é possível que o estilete de Bromeliaceae constitua a morfologia ancestral para a ordem. Com relação à posição dos feixes vasculares, os feixes posicionados em uma região mais interna do mesofilo, em proximidade ao canal estilar, podem representar uma adaptação facilitadora para o transporte de assimilados do tecido vascular ao tecido transmissor. Por fim, as características anatômicas do estilete são distintas entre as famílias que compõem Poales e, juntamente com a estrutura estigmática, devem ser mais investigadas para uma melhor compreensão da taxonomia e história evolutiva do grupo.

Obturador

O obturador é um tecido transmissor ovariano que é classificado de acordo com a sua origem, a partir da placenta, do funículo ou uma combinação de ambos. Essa estrutura ocorre em muitos táxons, com grande variação na anatomia, morfologia e grau de desenvolvimento (Tilton & Horner, 1980). A anatomia do obturador em representantes de Bromeliaceae foi abordada por Fagundes & Mariath (2010), que diferenciaram espécies de Bromelioideae e Pitcairnioideae de espécies de Tillandsioideae. Em Rapateaceae, que é uma família filogeneticamente próxima de Bromeliaceae (Linder & Rudall, 2005; Givnish *et al.*, 2010), um obturador é descrito para várias espécies da família, sem um maior detalhamento. Porém, percebe-se que em alguns táxons de Rapateaceae as células do obturador são mais alongadas (Venturelli & Bouman, 1988; Oriani & Scatena, 2013), assim como constatado em Bromeliaceae por Fagundes & Mariath (2010), o que pode indicar uma tendência em comum

na evolução dessa estrutura nas famílias cedo-divergentes de Poales. Ainda em relação a Poales, a presença de um obturador também foi registrada em Juncaceae (Oriani *et al.*, 2012), Cyperaceae (Coan *et al.*, 2008; Reynders *et al.*, 2012) e Mayacaceae (Oriani & Scatena, 2012), com diferentes morfologias e origens.

O obturador de *B. nutans*, assim como de *Aechmea calyculata*, *Dyckia maritima* e *Pitcairnia flammea* (Fagundes & Mariath, 2010), possui morfologia semelhante à observada em outras espécies de monocotiledôneas, como *Lilium regale* e *Gagea bohemica* (Liliaceae) (Singh & Walles, 1992, 1995; Vardar *et al.*, 2012) e *Ornithogalum caudatum* (Asparagaceae) (Tilton & Horner, 1980), constituído por células com sua face periclinal externa em formato de domo. Assim, entre as monocotiledôneas, o obturador de *B. nutans* e de outras espécies de Bromelioideae e de Pitcairnioideae assemelha-se ao de espécies de Liliaceae e Asparagaceae e difere de outras espécies mais próximas evolutivamente, pertencentes a Poales. Essas informações revelam uma alta diversidade morfológica do obturador entre as angiospermas, o que requer mais investigações que auxiliem no esclarecimento dessa variabilidade e de sua importância funcional.

Assim como a morfologia, o desenvolvimento do obturador em *B. nutans* também é semelhante ao das espécies de Liliaceae citadas, com a mesma seqüência de formação de vacúolos, formação de paredes celulares labirínticas e produção de secreção polissacarídica. Entretanto, o início do desenvolvimento desse tecido em *B. nutans* é precoce em relação a *G. bohemica* (Vardar *et al.*, 2012), *O. caudatum* (Tilton & Horner, 1980) e espécies de *Rhynchospora* e *Hypolytrum* pertencentes a Cyperaceae (Coan *et al.*, 2008), pois ocorre em estágio de inicial arquesporial, enquanto nas outras ocorre em estágio de megasporócito. Esse contraste temporal de formação do obturador foi mostrado por Shamrov (2002) entre diferentes famílias de angiospermas.

As paredes celulares labirínticas são típicas de células de transferência, as quais estão presentes em diversos tecidos vegetais e desempenham um papel fundamental no transporte de solutos, com o seu complexo de invaginações de parede polarizado na direção do fluxo (Offler *et al.*, 2003). Assim como observado em *B. nutans*, essas paredes celulares foram descritas para o tecido transmissor ou obturador de *Lilium longiflorum* (Rosen & Thomas, 1970), *Lilium regale* (Singh & Walles, 1995), *Medicago sativa* (Johnson *et al.*, 1975), *Strelitzia reginae* (Kronstedt & Walles, 1986) e *Alpinia zerumbet* (Shi-Yi & Cheng, 1990). A composição pecto-celulósica dessas paredes em *B. nutans* está de acordo com as poucas informações existentes sobre o assunto, baseadas em estudos histoquímicos (Offler *et al.*, 2003). Em conformidade com função das células de transferência, as paredes celulares labirínticas presentes nesses tecidos reprodutivos aumentam a área de superfície da membrana plasmática, o que certamente facilita o transporte da secreção para o canal estilar-estigmático e lóculo ovariano.

Dinâmica de componentes químicos no gineceu

A presença de idioblastos com compostos fenólicos no interior celular de diferentes verticilos florais é bastante comum dentro de Poales, sendo registrada no cálice, corola, androceu e gineceu de Rapateaceae (Oriani & Scatena, 2013), no perigônio e gineceu de Juncaceae (Oriani *et al.*, 2012), no androceu de Cyperaceae (Coan *et al.*, 2010), na corola de Mayacaceae (Carvalho *et al.*, 2009; Oriani & Scatena, 2012) e no cálice de Xyridaceae (Oriani & Scatena, 2012). Entretanto, não houve detecção desses compostos nos tecidos florais de Bromeliaceae de acordo com este estudo, além de Sajo *et al.* (2004), Sajo *et al.* (2005) e Fagundes & Mariath (2010). Essa característica de Bromeliaceae, a família que supostamente divergiu mais cedo dentro de Poales (Givnish *et al.*, 2010), em oposição às demais Poales basais, cyperídeas e xirídeas, pode indicar uma trajetória evolutiva de

componentes químicos em adaptação aos diferentes ambientes dentro dessa ordem. Nesse sentido, a presença de idioblastos com compostos fenólicos deve ser analisada em relação ao corpo vegetal com um todo, com a unificação dos órgãos reprodutivos e vegetativos.

Considerando que a grande quantidade de grãos de amido presente nos tecidos do gineceu de *B. nutans* desaparece concomitantemente ao surgimento de exsudato na superfície estigmática e ao longo do tecido transmissor, supõe-se que esse polissacarídeo é degradado e utilizado como fonte de moléculas para a produção de secreção. Nesse sentido, a presença de inúmeros campos primários de pontoação observada no estigma e no estilete pode estar relacionada com essa dinâmica de amido, facilitando a translocação das moléculas resultantes da degradação do amido para os tecidos secretores. Uma quantidade abundante de plasmodesmos agrupados e a ocorrência de uma dinâmica de amido também foram relatadas para o estilete de *Ornithogalum caudatum*, porém nenhuma relação foi estabelecida pelos autores (Tilton & Horner, 1980).

Essa dinâmica de amido, que inclui o armazenamento e posterior desaparecimento de amido relacionado à secreção, também foi observada no obturador de *Lilium regale*, no gineceu de *Annona cherimola* e no tecido transmissor e obturador de *Prunus persica* (Arbeloa & Herrero, 1987; Herrero & Arbeloa, 1989; Singh & Walles, 1995; Lora *et al.*, 2010). Ainda com relação às substâncias ergásticas presentes no gineceu, a ocorrência de cristais protéicos, observada nos tecidos secretores ao longo do gineceu de *B. nutans*, já foi registrada no obturador de *Lilium regale* (Singh & Walles, 1995). Isso demonstra, pelos estudos realizados até o momento, algumas semelhanças na composição e dinâmica de reservas dos tecidos esporofíticos do gineceu em angiospermas.

Segundo Herrero (2000), em algumas espécies, as secreções do obturador e do rudimento seminal parecem ser intrínsecas ao desenvolvimento, enquanto em outras espécies são dependentes da interação pólen-pistilo. Em *Annona cherimola*, a produção de secreção no

gineceu, do estigma ao ovário, parece ser regulada pelo desenvolvimento, já que ocorre da mesma forma em flores polinizadas e não polinizadas (Lora *et al.*, 2010). Em *Lilium regale*, a atividade secretora também não é induzida pela polinização, pois é iniciada antes da antese (Singh & Walles, 1995). Em *B. nutans*, a secreção ocorre no gineceu independentemente da polinização. Esse padrão, encontrado em magnoliídeas e monocotiledôneas, contrasta com eudicotiledôneas asterídeas, como *Actinidia deliciosa* e *Petunia hybrida*, cuja produção de secreção é estimulada pelo crescimento dos tubos polínicos (Herrero & Dickinson, 1979; González *et al.*, 1996). Entretanto, em *Prunus persica*, uma eudicotiledônea rosídea, as secreções da superfície estigmática e do tecido transmissor são desencadeadas pela polinização (Herrero & Arbeloa, 1989), enquanto as secreções do obturador e do rudimento seminal não dependem desse processo (Arbeloa & Herrero, 1987; Arbeloa & Herrero, 1991). As variações apresentadas acima demonstram modificações da estratégia reprodutiva durante a evolução das plantas com flores, contudo é preciso aprofundar o conhecimento dos mecanismos de reprodução das espécies e, ainda, esclarecer se esses padrões são espécie-específicos ou se estão relacionados a grandes clados de angiospermas.

Como conclusões, são registrados dados inéditos para a família. A arquitetura do estigma espiral-conduplicado, único entre as monocotiledôneas, é resultado dos seguintes eventos: ausência de fusão entre os carpelos; alongamento e torção dos lobos estigmáticos; e formação de tricomas multicelulares, unisseriados e ramificados nas margens dos lobos. Detectou-se a existência de um meristema marginal na porção estigmática dos carpelos, do mesmo modo como constatado para estruturas foliares. O detalhamento anatômico do estigma evidencia uma potencial fonte de caracteres para a taxonomia de Bromeliaceae. Características como a anatomia do estilete e a presença de idioblastos com compostos fenólicos nos tecidos florais são variáveis dentro de Poales, podendo contribuir para a taxonomia e compreensão da história evolutiva do grupo. As paredes celulares labirínticas

caracterizam as células do tecido transmissor e obturador como células de transferência para o auxílio no transporte da secreção. O obturador de Bromeliaceae se assemelha ao de espécies de Liliaceae e Asparagaceae, contudo há uma enorme variabilidade dessa estrutura entre as angiospermas, sendo necessários mais estudos para a compreensão da sua evolução. A dinâmica química observada no gineceu sugere que os grãos de amido são utilizados como fonte de moléculas para a produção de secreção na superfície estigmática, tecido transmissor e obturador, e que a presença de inúmeros campos primários de pontoação deve facilitar esse transporte. São constatadas semelhanças na dinâmica de reservas do gineceu em angiospermas e, em contraponto, é detectado um antagonismo na regulação da sua atividade secretora, dependente ou não da polinização, entre diferentes clados de angiospermas. Esses aspectos merecem maiores investigações para uma melhor compreensão da interação esporófito-gametófito nas angiospermas e de suas variações sob uma óptica funcional. A caracterização do desenvolvimento regular do gineceu durante a fase progâmica de *B. nutans*, apresentada neste estudo, também serve como base para uma investigação mais profunda do modo de reprodução desta espécie.

Referências bibliográficas

- ARBELOA, A.; HERRERO, M. The significance of the obturator in the control of pollen tube entry into the ovary in peach (*Prunus persica*). **Annals of Botany**, v. 60, p. 681-685, 1987.
- ARBELOA, A.; HERRERO, M. Development of the ovular structures in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **New Phytologist**, v. 118, p. 527-534, 1991.
- EVERY Jr., G. S. Structure and development of the tobacco leaf. **American Journal of Botany**, v. 20, n. 9, p. 565-592, 1933.
- BENZING, D. H.; LUTHER, H.; BENNETT, B. Reproduction and life history. *In*: BENZING, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 245-328.

- BOUMAN, F. The ovule. *In*: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of the Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 123-157.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma structure and variation in Bromeliaceae – neglected taxonomic characters. **Brittonia**, v. 36, n. 4, p. 364-374, 1984.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Comparative ontogeny of bromeliaceous stigmas. *In*: XIV INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS, 1987, Berlin. LEINS, P. *et al.* (Ed.). **Aspects of Floral Development**. Stuttgart: J. Cramer, 1988. pp. 191-204.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma types in Bromeliaceae – a systematic survey. **Systematic Botany**, v. 14, n. 1, p. 110-132, 1989.
- CARVALHO, M. L. S.; NAKAMURA, A. T.; SAJO, M. G. Floral anatomy of Neotropical species of Mayacaceae. **Flora**, v. 204, p. 220–227, 2009.
- CHAMBERLAIN, C. J. **Methods in plant histology**. 5th ed. Chicago: University of Chicago Press, 1932.
- CHEUNG, A. Y. Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 2, p. 45-51, 1996.
- CHEUNG, A. Y.; WANG, H.; WU, H. M. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. **Cell**, v. 82, p. 383-393, 1995.
- COAN, A. I.; ALVES, M. V.; SCATENA, V. L. Comparative study of ovule and fruit development in species of *Hypolytrum* and *Rhynchospora* (Cyperaceae, Poales). **Plant Systematics and Evolution**, v. 272, p. 181–195, 2008.
- COAN, A. I.; ALVES, M. V.; SCATENA, V. L. Evidence of pseudomonad pollen formation in *Hypolytrum* (Mapanioideae, Cyperaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 58, p. 663–672, 2010.
- ERBAR, C. Pollen tube transmitting tissue: place of competition of male gametophytes. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. S5, p. S265–S277, 2003.
- ERDTMAN, G.; PRAGLOWSKI, K. A note on pollen morphology. *In*: Smith, L. B.; Downs, R. J. (Ed.). Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *In*: **Flora Neotropica Monograph**, v. 14, n. 1. New York: Hafner Press, 1974. p. 28-33.
- FAGUNDES, N. F.; MARIATH, J. E. A. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. **Acta botanica brasílica**, v. 24, n. 3, p. 765-779, 2010.
- FAHN, A. **Plant Anatomy**. 4th ed. Oxford: Pergamon Press, 1990.
- FAVRETTO, M. A. *et al.* Beija-flores visitantes de bromélias no Parque Natural Municipal Rio do Peixe, Joaçaba, Santa Catarina, Brasil. **Atualidades Ornitológicas**, v. 158, p. 11-13, 2010.

- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.
- FONT QUER, P. **Diccionario de Botánica**. Barcelona: Ed. Labor, 1975.
- FOSTER, A. S. Leaf differentiation in angiosperms. **The Botanical Review**, v. 2, n. 7, p. 349-372, 1936.
- GABRIEL, B. L. **Biological electron microscopy**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1982.
- 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. Rasterelektronmikroskopische 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. *et al.* Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. **Aliso**, v. 23, p. 3-26, 2007.
- GIVNISH, T. J. *et al.* Assembling the tree of the Monocotyledons: Plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 97, p. 584-616, 2010.
- GIVNISH, T. J. *et al.* Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872-895, 2011.
- GONZÁLEZ, M. V.; COQUE, M.; HERRERO, M. Pollen-pistil interaction in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*; Actinidiaceae). **American Journal of Botany**, v. 83, p. 148-154, 1996.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.
- HALBRITTER, H. Morphologie und Systematische Bedeutung des Pollens der Bromeliaceae. **Grana**, v. 31, p. 197-212, 1992.
- HERRERO, M. Changes in the ovary related to pollen tube guidance. **Annals of Botany**, v. 85, Supplement A, p. 79-85, 2000.
- HERRERO, M.; ARBELOA, A. Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). **American Journal of Botany**, v. 76, n. 10, p. 1441-1447, 1989.

- HERRERO, M.; DICKINSON, H. G. Pollen–pistil incompatibility in *Petunia hybrida*: changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. **Journal of Cell Science**, v. 36, p. 1–18, 1979.
- HERRERO, M.; HORMAZA, J. I. Pistil strategies controlling pollen tube growth. **Sexual Plant Reproduction**, v. 9, p. 343-347, 1996.
- HESLOP-HARRISON, Y. Control gates and micro-ecology: The pollen-stigma interaction in perspective. **Annals of Botany**, v. 85, Supplement. A, p. 5-13, 2000.
- HESLOP-HARRISON, J.; SHIVANNA, K. R. The receptive surface of the angiosperm stigma. **Annals of Botany**, v. 41, p. 1233-1258, 1977.
- HUGHES, J.; MCCULLY, M. E. The use of an optical brightener in the study of plant structure. **Stain Technology**, v. 50, n. 5, p. 319-329, 1975.
- JENSEN, W. A. **Botanical Histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman, 1962.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.
- JOHNSON, L. E. B.; WILCOXSON, R. D.; FRO-SHEISER, F. I. Transfer cells in tissues of the reproductive system of alfalfa. **Canadian Journal of Botany**, v. 53, p. 952-956, 1975.
- KERNS, K. R.; COLLINS, J. L.; KIM, H. Developmental studies of the pineapple *Ananas comosus* (L) Merr. I. Origin and growth of leaves and inflorescence. **The New Phytologist**, v. 35, n. 4, p. 305-317, 1936.
- KRONESTEDT, E.; WALLEES, B. Anatomy of the *Strelitzia reginae* flower (Strelitziaceae). **Nordic Journal of Botany**, v. 6, p. 307-320, 1986.
- KULKARNI, R. A.; PAI, R. M. The floral anatomy of *Puya spathacea* Mez. (Bromeliaceae) with special reference to nectaries. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**, v. 91, n. 6, p. 473-478, 1982.
- LILLIE, R. D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Co, 1965.
- LINDER, H. P.; RUDALL, P. J. Evolutionary history of Poales. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 36, p. 107-124, 2005.
- LORA, J.; HORMAZA, J. I.; HERRERO, M. The progamic phase of an early-divergent angiosperm, *Annona cherimola* (Annonaceae). **Annals of Botany**, v. 105, p. 221–231, 2010.
- LUTHER, H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 11th ed. Sarasota: The Bromeliad Society International, 2008.

- MAKSYMOWYCH, R.; WOCHOK, Z. S. Activity of marginal and plate meristems during leaf development of *Xanthium pennsylvanicum*. **American Journal of Botany**, v. 56, n. 1, p. 26-30, 1969.
- MARTINELLI, G. *et al.* Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2008.
- MASTALERZ, J. W. Preliminary report on the effect of daylength on the flowering of *Billbergia nutans*. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 7, n. 3, p. 37-38, 1957.
- MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. R. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 1000, p. 405-414, 1976.
- MOREIRA, B. A. **Palinotaxonomia da família Bromeliaceae do Estado de São Paulo**. 2007. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termacarphi Pty, 1981.
- OFFLER, C. E. *et al.* Transfer cells: cells specialized for a special purpose. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 431-454, 2003.
- ORIANI, A.; SCATENA, V. L. Floral anatomy of Xyrids (Poales): Contributions to their reproductive biology, taxonomy, and phylogeny. **International Journal of Plant Sciences**, v. 173, n. 7, p.767-779, 2012.
- ORIANI, A.; SCATENA, V. L. The taxonomic value of floral characters in Rapateaceae (Poales-Monocotyledons). **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, p. 291-303, 2013.
- ORIANI, A.; STÜTZEL, T.; SCATENA, V. L. Contributions to the floral anatomy of Juncaceae (Poales – Monocotyledons). **Flora**, v. 207, p. 334-340, 2012.
- REITZ, R. Bromeliáceas e a Malária - Bromélia endêmica. *In: Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 1, fascículo Bromeliaceae, 1983. p. 1-559.
- REYES-OLALDE, J. I. *et al.* Inside the gynoecium: at the carpel margin. **Trends in Plant Science**, online first: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.08.002>, 2013.
- REYNDERS, M. *et al.* Gynoecial anatomy and development in Cyperoideae (Cyperaceae, Poales): congenital fusion of carpels facilitates evolutionary modifications in pistil structure. **Plant Ecology and Evolution**, v. 145, n. 1, p. 96–125, 2012.
- ROSEN, W. G.; THOMAS, H. R. Secretory cells of lily pistils. I. Fine structure and function. **American Journal of Botany**, v. 57, p. 1108-1114, 1970.

- SAJO, M. G. *et al.* Microsporogenesis and anther development in Bromeliaceae. **Grana**, v. 44, p. 65–74, 2005.
- 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, 2004.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. Iowa: State University Press, 1951.
- SHAMROV, I. I. Obturator. *In*: BATYGINA, T. B. (Ed.). **Embryology of Flowering Plants, Terminology and Concepts, vol 1: Generative Organs of Flower**. Enfield: Science Publishers Inc, 2002. p. 128-130.
- SHI-YI, H.; CHENG, Z. Ultrastructure and secretory activity of stigmatic and stylar transmitting tissue in *Alpinia zerumbet*. **Chinese Journal of Botany**, v. 2, p. 88-95, 1990.
- SINGH, S.; WALLEES, B. The ovarian transmitting tissue in *Lilium regale*. **International Journal of Plant Sciences**, v. 153, p. 205-211, 1992.
- SINGH, S.; WALLEES, B. Ultrastructural differentiation of the ovarian transmitting tissue in *Lilium regale*. **Annals of Botany**, v. 75, p. 455-462, 1995.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *In*: **Flora Neotropica Monograph**. New York: Hafner Press, v. 14, n. 1, 1974. p. 1-662.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). *In*: **Flora Neotropica Monograph**. New York: New York Botanical Garden, v. 14, n. 3, 1979. p. 1493-2142.
- TARDIVO, R. C.; RODRIGUES, W. A. Pólen e estigma das espécies de *Nidularium Leme* e *Cansitrum E. Morren* (Bromeliaceae) ocorrentes no Estado do Paraná. **Biotemas**, v. 11, n. 1, p. 7-16, 1998.
- TILTON, V. R.; HORNER Jr., H. T. Stigma, style and obturator of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in the reproductive process. **American Journal of Botany**, v. 67, p. 1113-1131, 1980.
- VARADARAJAN, G. S.; BROWN, G. K. Morphological variation of some floral features of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and their significance in pollination biology. **Botanical Gazette**, v. 149, n. 1, p. 82-91, 1988.
- VARDAR, F.; İSMAILOĞLU, I.; ÜNAL, M. Embryological and cytological features of *Gagea bohemica* (Liliaceae). **Turkish Journal of Botany**, v. 36, p. 462-472, 2012.
- VENTURELLI, M.; BOUMAN, F. Development of ovule and seed in Rapateaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 97, p. 267-294, 1988.

- VERSIEUX, L. M. *et al.* Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 98-110, 2008.
- VERVAEKE, I. *et al.* Flower biology of six cultivars of the Bromeliaceae. I. Pollen, pistil, and petal appendages. **Selbyana**, v. 24, n. 1, p. 78-86, 2003.
- WU, H.-M.; WANG, H.; CHEUNG, A. Y. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. **Cell**, v. 82, p. 395–403, 1995.

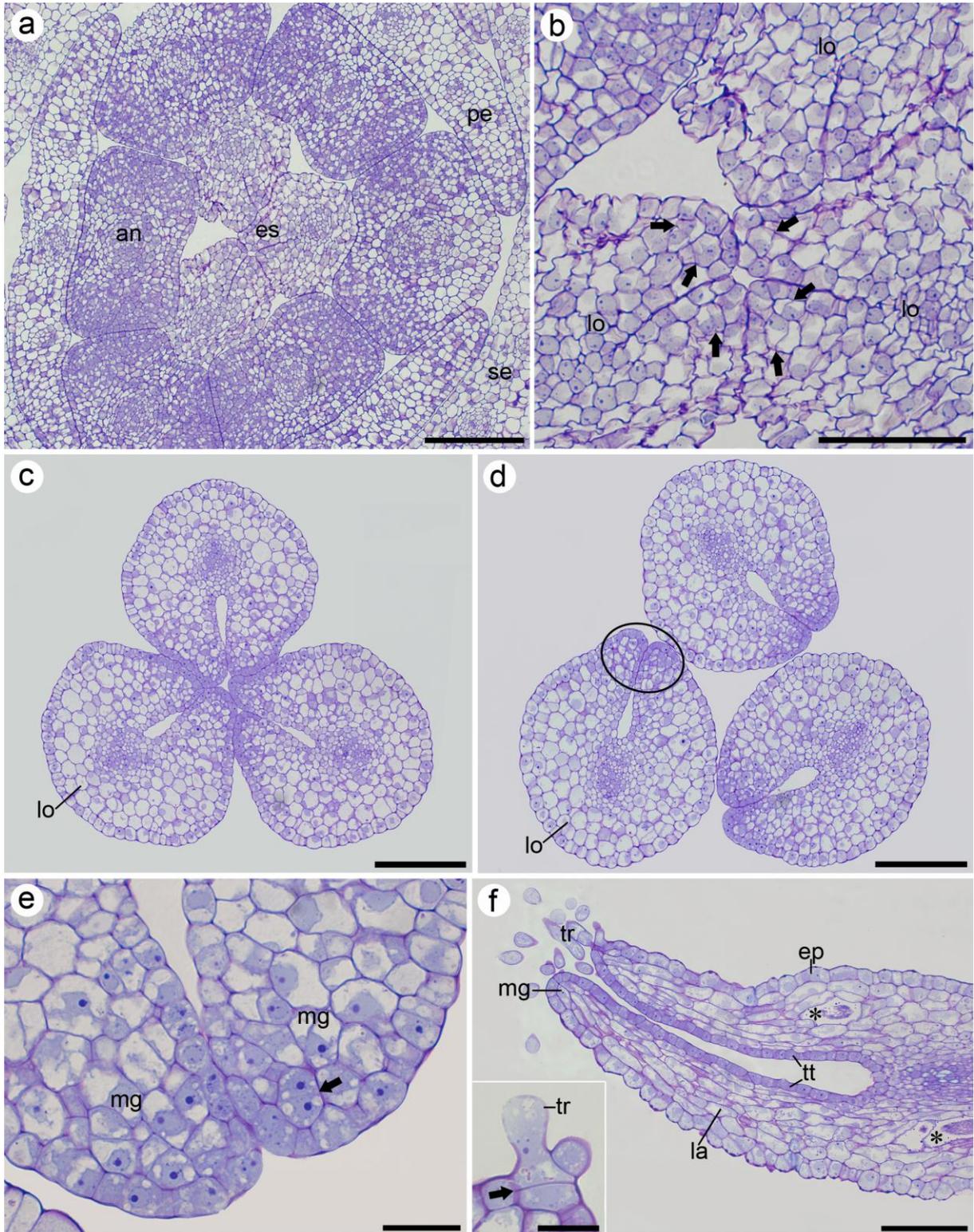


Fig. 1. Estigma em desenvolvimento de *Billbergia nutans*, em seções transversais. **a, b.** Botão floral jovem, mostrando estigma com três lobos em processo inicial de torção, com divisões celulares periclinais na camada subdérmica das margens carpelares (setas: limite entre duas células derivadas de uma inicial). **c, d.** Porção basal e média do estigma, respectivamente, mostrando a diferenciação dos tecidos e um grau mais avançado de torção dos lobos estigmáticos, em botão floral mais desenvolvido (círculo: margens carpelares). **e.** Detalhe das margens carpelares de um lobo estigmático, com células diminutas de citoplasma denso e com multiplicação celular subdérmica (seta: limite entre duas células derivadas de uma inicial). **f.** Lobo estigmático em estágio posterior de desenvolvimento, com as laterais carpelares mais alongadas e com a formação de tricomas de origem dérmica (asteriscos: idioblastos contendo ráfides). Detalhe: tricoma em formação (seta: local da divisão periclinal da epiderme). an: antera; ep: epiderme; es: estigma; la: lateral carpelar; lo: lobo estigmático; mg: margem carpelar; pe: pétala; se: sépala; tr: tricoma; tt: tecido transmissor. Barras= 100 μ m (a, c, d, f); 50 μ m (b); 20 μ m (e; detalhe f).

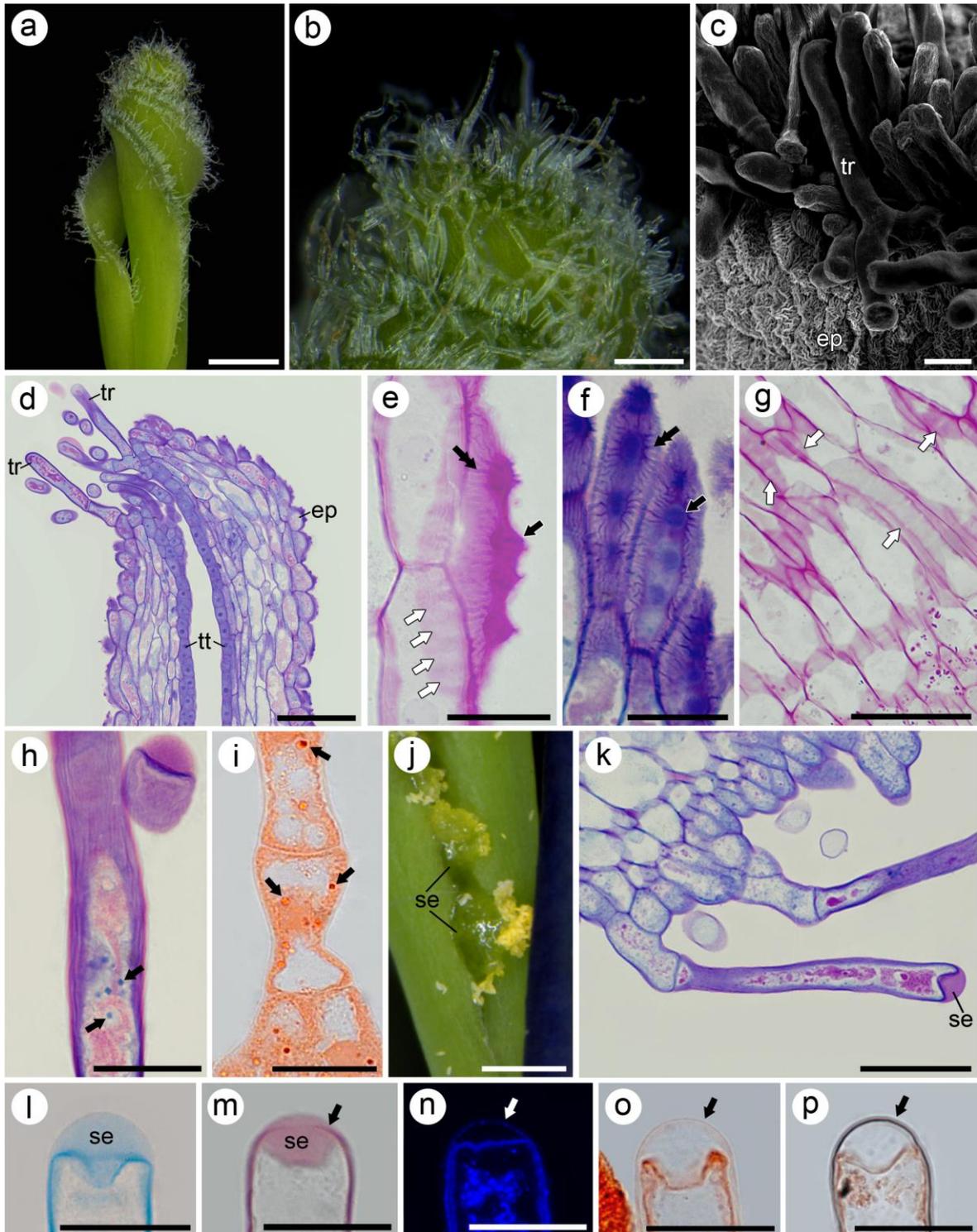


Fig. 2. Estigma de *Billbergia nutans*. **a.** Estigma do tipo espiral-conduplicado, no botão floral próximo de sua abertura. **b.** Detalhe da sua porção apical, com tricomas. **c.** Superfície estigmática, em MEV, mostrando os tricomas nas margens carpelares e epiderme estriada. **d.** Estigma, em seção longitudinal, evidenciando apenas um lobo, com tricomas em suas margens. **e.** Célula da epiderme, com projeções (seta preta) e estrias (seta dupla preta), e campos primários de pontoação (setas brancas), corado com PAS. **f.** Epiderme, em seção paradérmica, mostrando as projeções (seta preta) e estrias (seta dupla preta). **g.** Mesofilo com inúmeros campos primários de pontoação (setas brancas), corado com PAS. **h.** Tricoma, evidenciando cristalóides protéicos (setas pretas) no interior da célula e estrias na superfície celular. **i.** Tricoma com cristalóides protéicos (setas pretas), corado com Xilidine Ponceau. **j-p.** Secreção estigmática, durante o período de abertura da flor. **j.** Secreção no estigma, com grãos de pólen aderidos. **k.** Tricoma, com secreção em seu ápice. **l-p.** Porção apical do tricoma, com secreção polissacarídica armazenada em bolsões pécticos no interior da parede periclinal externa (seta: delimitação de parede celular e cutícula), com coloração de Azul de Alciano, Vermelho de Rutênio, Calcofluor White, Xilidine Ponceau e Sudan Black B + Xilidine Ponceau, respectivamente. ep: epiderme; se: secreção; tr: tricoma; tt: tecido transmissor. Barras= 1mm (a); 0,5mm (j); 200µm (b); 100µm (d); 50µm (g, k); 20µm (c, e, f, h, i, l-p).

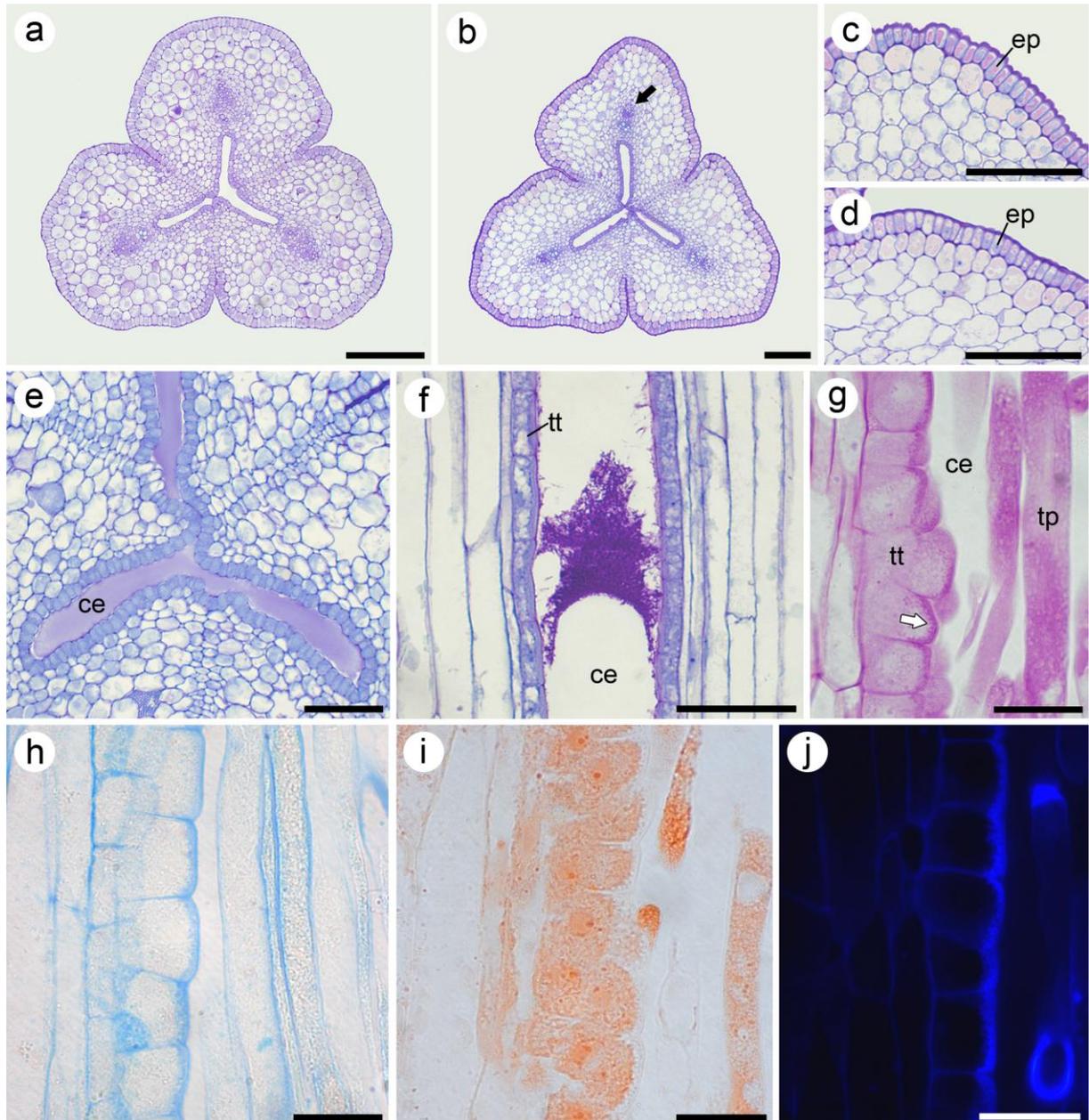


Fig. 3. Estilete de *Billbergia nutans*. **a.** Estilete em seção transversal mediana, em botão floral jovem. **b.** Estilete em seção transversal mediana, em botão floral próximo de sua abertura (seta: feixe vascular dorsal). **c, d.** Detalhe de uma porção carpelar em seção transversal, evidenciando a face externa da epiderme, do ápice e da base do estilete, respectivamente. **e.** Detalhe do canal estilar com secreção. **f.** Estilete em seção longitudinal, com secreção granulosa no canal estilar. **g.** Tecido transmissor na porção apical do estilete, durante o período de abertura da flor, com paredes celulares labirínticas (seta), corado com PAS. **h-j.** Tecido transmissor com paredes celulares labirínticas, evidenciado por diferentes testes histoquímicos. **h.** Coloração com Azul de Alciano. **i.** Coloração com Xilidine Ponceau. **j.** Marcação com Calcofluor White. ce: canal estilar; ep: epiderme; tp: tubo polínico; tt: tecido transmissor. Barras= 100 μ m (a-d); 50 μ m (e, f); 20 μ m (g-j).

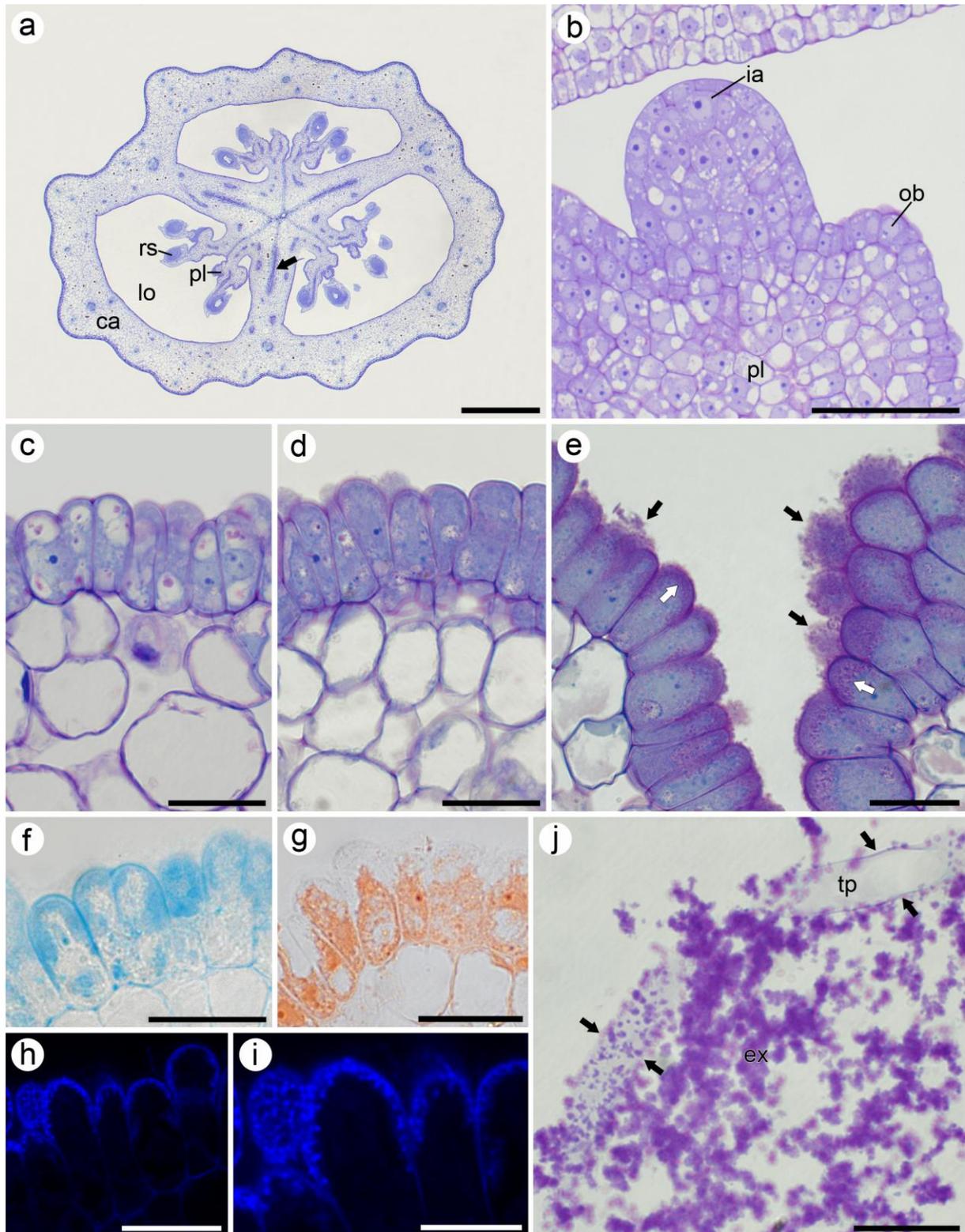


Fig. 4. Ovário de *Billbergia nutans*. **a.** Ovário em seção transversal, mostrando os três carpelos, três lóculos e placentação axial, com muitos rudimentos seminiais (seta: nectário septal). **b.** Início de formação do obturador, em botão floral jovem com estágio de inicial arquesporial no primórdio de rudimento seminal. **c-e.** Obturador em distintos estádios de desenvolvimento. **c.** Botão floral. **d.** Botão floral, próximo de sua abertura. **e.** Flor aberta, em estágio com tubos polínicos na base do canal estilar (setas brancas: paredes celulares labirínticas; setas pretas: exsudato). **f-i.** Obturador evidenciado por diferentes testes histoquímicos, na flor aberta com tubos polínicos no estigma. **f.** Coloração com Azul de Alcianó. **g.** Coloração com Xilidina Ponceau, mostrando ausência de reação nas paredes celulares labirínticas. **h.** Marcação com Calcofluor White. **i.** Detalhe da figura anterior, mostrando as paredes celulares labirínticas. **j.** Exsudato produzido pelo obturador, em estágio logo após a fecundação (setas: tubo polínico). ca: carpelo; ex: exsudato; ia: inicial arquesporial; lo: lóculo; ob: obturador; pl: placenta; rs: rudimento seminal; tp: tubo polínico. Barras= 1mm (a); 50 μ m (b); 20 μ m (c-h, j); 10 μ m (i).

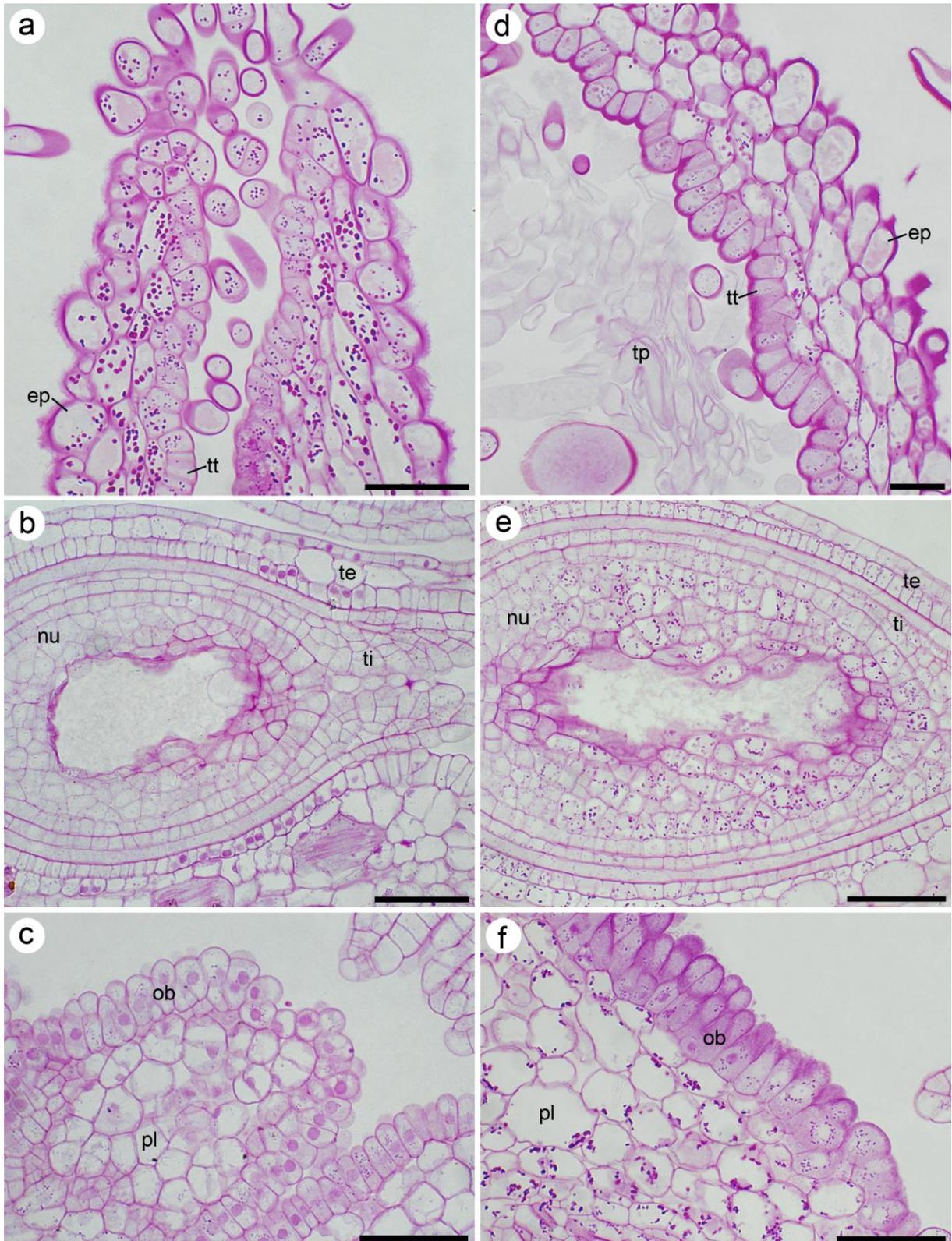


Fig. 5. Quantidade de grãos no amido nas porções do gineceu de *Billbergia nutans* em diferentes estádios, antes e após a polinização, corado com PAS. **a-c.** Botões florais próximo de sua abertura. **a.** Estigma, mostrando as margens de um lobo estigmático com grande quantidade de grãos de amido. **b.** Rudimento seminal. **c.** Placenta e obturador. **d-f.** Flor aberta, após polinização, em estágio com tubos polínicos na base do canal estilar. **d.** Estigma, mostrando parte de um lobo estigmático, com pequena quantidade grãos de amido na porção interna do mesofilo e no tecido transmissor. **e.** Rudimento seminal com grande quantidade de grãos de amido. **f.** Placenta e obturador com grande quantidade de grãos de amido. ep: epiderme; nu: nucelo; ob: obturador; pl: placenta; te: tegumento externo; ti: tegumento interno; tp: tubo polínico; tt: tecido transmissor. Barras= 50 μ m.

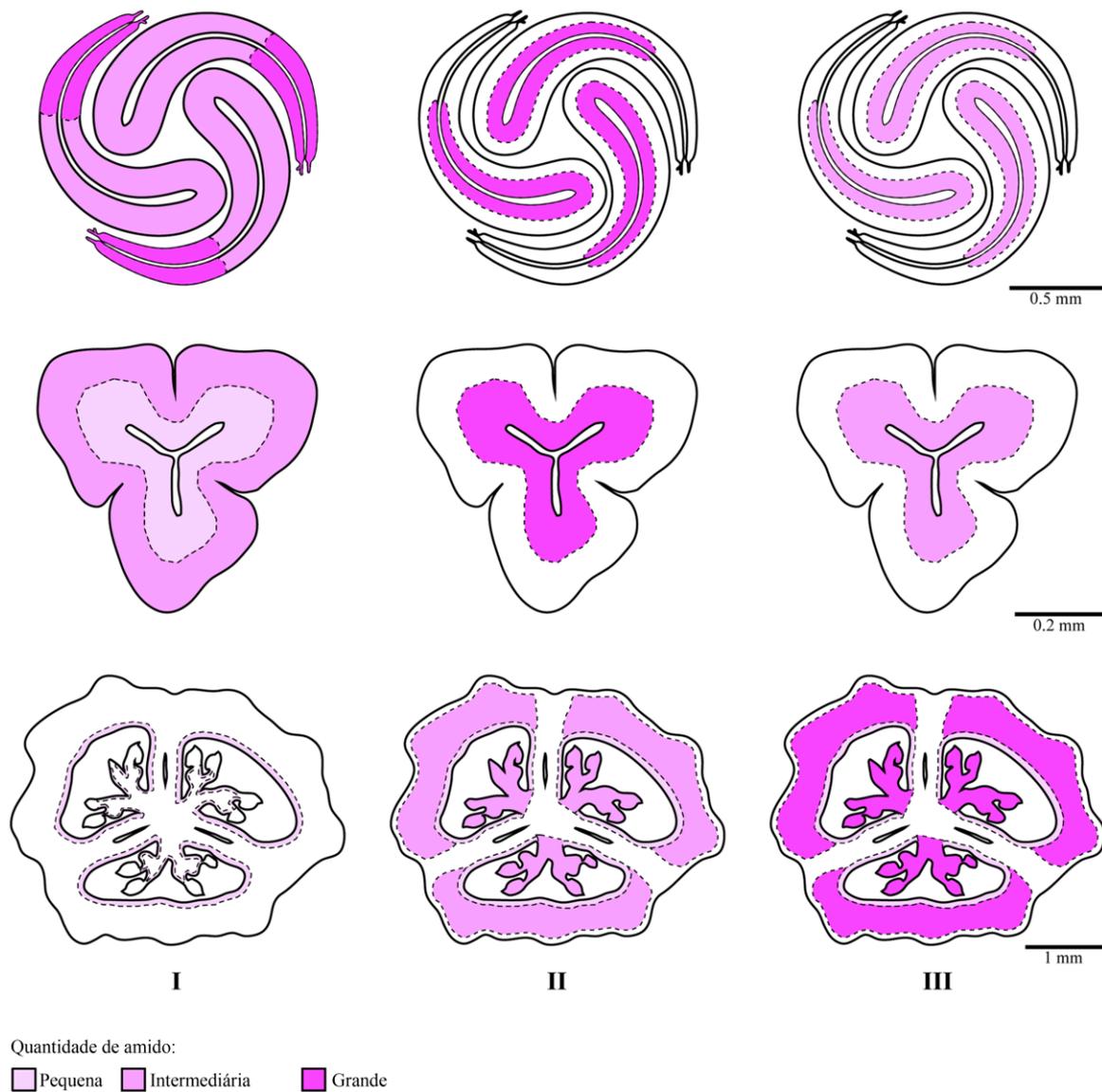


Fig. 6. Representação esquemática da dinâmica de amido no gineceu ao longo de diferentes estádios, antes e após a polinização, com indicação da quantidade de amido através da intensidade da cor. Do ápice para a base: estigma, estilete e ovário, em seções transversais. **I.** Botão floral, próximo de sua abertura. **II.** Flor aberta, após polinização, em estágio com tubos polínicos no estigma. **III.** Flor aberta, após polinização, em estágio com tubos polínicos na base do canal estilar.

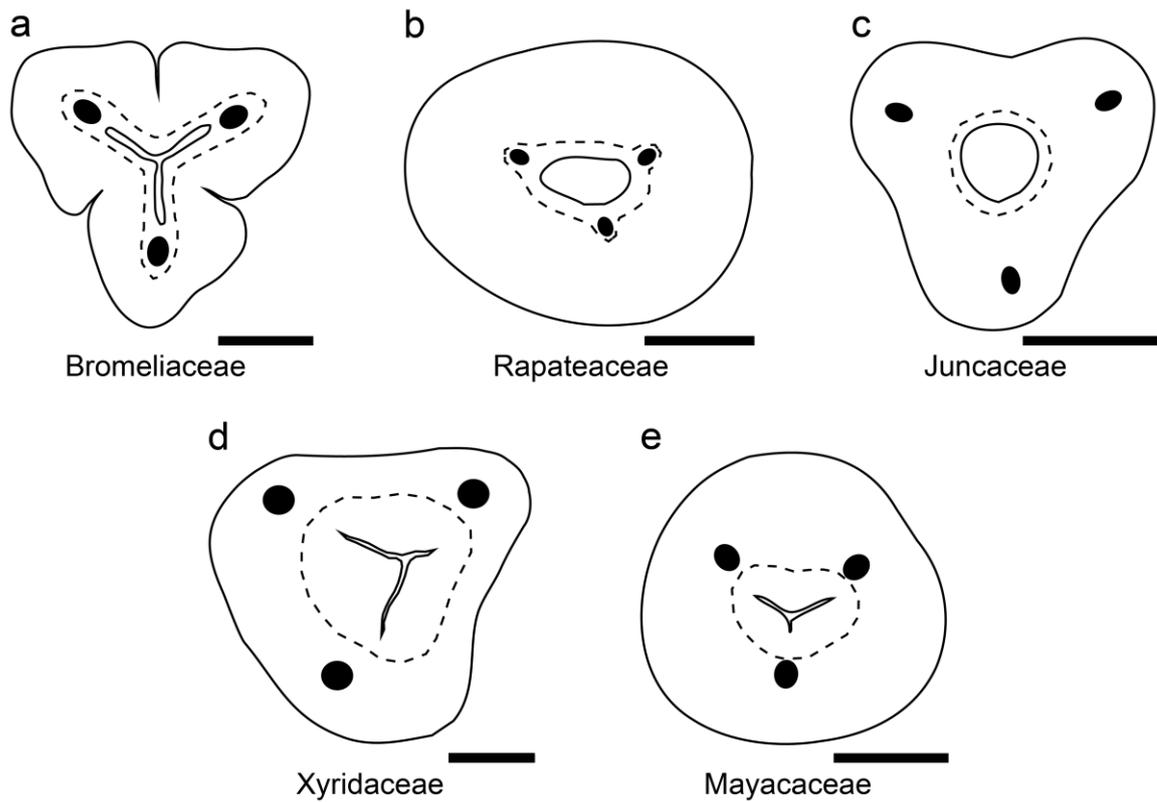


Fig. 7. Representação esquemática do estilete em seção transversal em diferentes famílias da ordem Poales, ordenadas de acordo com sua posição filogenética, de cedo-divergente a tarde-divergente (a-e). **a.** Bromeliaceae, representada por *Billbergia nutans*, baseado neste estudo. **b.** Rapateaceae, representada por *Stegolepis guianensis*, baseado em Oriani & Scatena (2013). **c.** Juncaceae, representada por *Luzula multiflora*, baseado em Oriani *et al.* (2012). **d.** Xyridaceae, representada por *Orectanthe sceptrum*, baseado em Oriani & Scatena (2012). **e.** Mayacaceae, representada por *Mayaca sellowiana*, baseado em Carvalho *et al.* (2009). elipses ou círculos pretos: feixes vasculares; linha tracejada: região do mesofilo com células menores, próximo ao tecido transmissor. Barras= 200 μ m (a, b, d), 100 μ m (e), 50 μ m (c).

CAPÍTULO III

Ontogenia do rudimento seminal em *Billbergia nutans* no contexto evolutivo de

Bromeliaceae (Poales)

Resumo

As relações infrafamiliares de Bromeliaceae ainda não estão bem esclarecidas, principalmente em Bromelioideae. *Billbergia nutans* (Bromelioideae) é uma das bromélias mais amplamente cultivadas. Este estudo visa caracterizar a ontogenia do rudimento seminal em *B. nutans* e revisar a literatura com relação ao rudimento seminal em nível de família, a fim de verificar caracteres úteis para a taxonomia e identificar o cenário evolutivo de caracteres embriológicos na família. Os rudimentos seminais de Bromeliaceae são anátropos, bitegumentados e crassinucelados, com primórdios trizonados, desenvolvimento monospórico, tétrade do tipo linear, paredes celulares calósicas durante a meiose, ginósporo funcional calazal, gametófito do tipo *Polygonum*, presença de hipóstase e origem dérmica dos tegumentos. Em *B. nutans*, a morfologia do apêndice calazal apresenta variabilidade intraespecífica e, portanto, pode ser um caráter inapropriado para aplicação taxonômica. Esse é o primeiro registro de reconstrução tridimensional do gametófito feminino em uma monocotiledônea. Muitos caracteres são sugeridos como úteis para a taxonomia de Bromeliaceae. O cenário evolutivo sobre o desenvolvimento do rudimento seminal na família indica que a subfamília que divergiu mais cedo, Brocchinioideae, possui um estado reduzido de vários caracteres. Ao longo de toda família, alguns caracteres parecem ser homoplásicos e podem ser relevantes se aplicados em níveis taxonômicos inferiores. Em Poales, os tegumentos constituídos por duas camadas celulares e o reduzido número de rudimentos seminais por carpelo são, provavelmente, estados de caráter plesiomórficos.

Palavras-chave: Bromeliaceae, embriologia, gametófito feminino, reconstrução tridimensional, rudimento seminal.

Introdução

Dentro de Poales, Bromeliaceae é considerada o grupo-irmão das demais famílias, seguida pela divergência de Typhaceae e Rapateaceae (Givnish *et al.*, 2010). Bromeliaceae foi tradicionalmente dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, baseado principalmente na morfologia das flores, frutos e sementes (Smith & Downs, 1974). Atualmente, as relações filogenéticas e circunscrições das subfamílias estão mais esclarecidas, com o estabelecimento de oito subfamílias – Brocchinioideae, Lindmanioideae, Hechtioideae, Navioideae, Tillandsioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae (Givnish *et al.*, 2007, 2011). Entretanto, as relações inter- e infragenéricas dentro de cada subfamília ainda são pouco conhecidas, de modo que muitos gêneros parecem ser para- ou polifiléticos, sobretudo em Bromelioideae (Faria *et al.*, 2004; Barfuss *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2009; Schulte *et al.*, 2009; Sass & Specht, 2010; Givnish *et al.*, 2011).

Billbergia Thunb. é um gênero ornamental que abrange cerca de 63 espécies (Luther, 2008), pertencente à subfamília Bromelioideae. *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel é uma das espécies mais amplamente cultivadas desse gênero (McWilliams, 1968), devido ao aspecto atrativo de suas flores, ao médio porte e à facilidade de cultivo.

A utilidade dos caracteres embriológicos para o estudo da taxonomia vegetal é enfatizada por Herr (1984) e Tobe (1989), os quais especificam os caracteres úteis para cada estrutura reprodutiva. Segundo Herr (1984), entre os diferentes tipos de investigação, aquelas direcionadas para o gametófito feminino provavelmente possuem o maior potencial para propósitos taxonômicos. Recentemente, estudos sobre a morfologia e anatomia do rudimento seminal têm sido importantes para o conhecimento da evolução do rudimento seminal em Rubiaceae (De Toni & Mariath, 2008, 2010) e Lentibulariaceae (Plachno & Swiatek, 2009) e para a sistemática de Ranunculaceae (Wang & Ren, 2007).

A literatura existente sobre o desenvolvimento do rudimento seminal em Bromeliaceae inclui poucos estudos detalhados, como os de Rao & Wee (1979), Conceição *et al.* (2007), Sartori (2008), Mendes (2012) e Spat (2012). Devido ao seu aprofundamento descritivo, tais estudos caracterizam geralmente uma única espécie e, portanto, carecem de uma visão comparativa clara da família. Além disso, alguns desses estudos têm sido publicados em línguas não universais (Conceição *et al.*, 2007; Sartori, 2008; Spat, 2012), o que restringe a disseminação e aplicabilidade de seus dados. A única abordagem comparativa (Sajo *et al.*, 2004) não inclui uma discussão à luz da nova filogenia de Bromeliaceae *sensu* Givnish *et al.* (2007, 2011). Além da anatomia de fruto e semente, que têm sido importante para a taxonomia de Bromeliaceae (Fagundes & Mariath, 2010; Magalhães & Mariath, 2012), a embriologia pode também ser relevante nesse contexto, devido ao seu amplo espectro de caracteres. Até o momento atual, não existem referências para a embriologia do gênero *Billbergia*.

Devido à necessidade de estudos que auxiliem na elucidação das relações filogenéticas entre os gêneros e espécies de Bromeliaceae, principalmente dentro de Bromelioideae, à carência de investigações embriológicas detalhadas e comparativas sobre o rudimento seminal em Bromeliaceae, e à ausência desse tipo de estudo em *Billbergia*, o objetivo deste estudo é: i) descrever a ontogenia do rudimento seminal em *B. nutans* (Bromelioideae), incluindo uma representação tridimensional do gametófito feminino, em busca de caracteres distintos dentro de Bromelioideae e Bromeliaceae; ii) revisar a literatura acerca de rudimento seminal no contexto de Bromeliaceae, a fim de verificar dados relevantes para a taxonomia e identificar o cenário evolutivo de caracteres embriológicos na família.

Material e métodos

Material botânico

O material botânico estudado provém de seis indivíduos de *B. nutans*, oriundos de diferentes localidades (Tab. 1). Parte do material foi obtida na coleção viva de Bromeliaceae do Jardim Botânico de Porto Alegre. Outra parte foi obtida a campo em municípios do Rio Grande do Sul, Brasil, sendo mantida em coleção viva sob numeração de registro na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com as exsiccatas depositadas no Herbário ICN da mesma instituição (Tab. 1). Um total de 47 flores em diferentes estádios de desenvolvimento (botões florais e flores abertas) foram coletadas e dissecadas.

Preparação para Microscopia de Luz

Para a preparação das lâminas histológicas, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976) e lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Gabriel, 1982). O material foi desidratado em série etílica ascendente e incluído em hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid, 1983). Seções com 2-4 μ m de espessura foram confeccionadas em micrótomo de rotação Zeiss, Microm HM 340 E, e coradas com Azul de Toluidina O 0,05%, pH 4,4 (Feder & O'Brien, 1968). Para a confecção de seções transversais, utilizou-se a porção mediana do ovário. Foram realizados testes histoquímicos e os respectivos controles, a seguir: Vermelho de Rutênio para pectinas (Johansen, 1940) e Ácido Clorídrico 10% para oxalato de cálcio (Chamberlain, 1932), em campo claro; Calcofluor White para celulose (Hughes & McCully, 1975) e Azul de Anilina para calose (Smith & McCully, 1978), sob fluorescência.

As análises e fotomicrografias foram realizadas sob microscopia de luz, em de campo claro ou epifluorescência, utilizando-se um microscópio Leica DMR e um microscópio

estereoscópico Leica M165 FC, com câmera fotográfica digital Leica DFC 500 acoplada e programa de captura de imagens Leica Application Suite – LAS, versão 3.8. Para a observação em epifluorescência, utilizou-se um filtro de excitação de 340-380 nm.

Preparação para Microscopia Eletrônica de Varredura

A fixação foi realizada do mesmo modo como citado anteriormente. O material foi desidratado em série ascendente de acetona e submetido à secagem pelo método do ponto crítico (Gersterberger & Leins, 1978) com o uso do equipamento Balzers, CPD 030. Após, as amostras foram montadas em suportes de alumínio e recobertas com ouro no aparelho metalizador Balzers, SCD 050. As observações e o registro eletromicrográfico foram realizados em microscópio JEOL 6060, sob 10kV.

Reconstrução tridimensional

Para a reconstrução tridimensional do gametófito feminino, seções seqüenciais de 4µm de espessura coradas com Azul de Toluidina O foram digitalizadas, alinhadas no programa Adobe Photoshop CS5.1 e importadas para o programa Rhinoceros 4.0, com referência de escala. Essas imagens foram aplicadas em planos paralelos para delineamento dos contornos das estruturas (vetorização). Foram geradas as superfícies tridimensionais, com a obtenção de medidas de volume, comprimento, largura e profundidade. Por fim, foram produzidos imagens e vídeo para demonstrar a estrutura reconstruída.

Resultados

Formação do rudimento seminal e ginospogênese

O ovário de *B. nutans* é tricarpelar, trilocular e ínfero, com placentação axial. No ovário jovem, desenvolvem-se duas porções placentárias em cada lóculo, advindas das margens do carpelo. São observadas três camadas meristemáticas – L1, L2 e L3 (Fig. 1a). A partir da placenta, originam-se os primórdios de rudimento seminal, os quais são trizonados (Fig. 1b, c). No ápice do primórdio, há uma célula apical subdérmica, a inicial arquesporial, com conteúdo denso e núcleo de maior dimensão em comparação às demais células (Fig. 1c). Após, ocorre o crescimento do rudimento seminal e o alongamento da inicial arquesporial, com o início da formação do tegumento interno (Fig. 1d).

Com a divisão periclinal da inicial arquesporial, são formadas a célula parietal primária e a célula-mãe de ginósporos (Fig. 1e), o que caracteriza o rudimento como crassinucelado. Enquanto a célula-mãe de ginósporos se alonga em sentido longitudinal, os tegumentos interno e externo se originam a partir da camada dérmica. Em seqüência aos tegumentos, forma-se um apêndice calazal com origem subdérmica (Fig. 1f). No momento de máxima expansão da célula-mãe de ginósporos, ocorre deposição de calose na porção micropilar de sua parede celular (Fig. 1f, g). O tegumento externo atinge o ápice do nucelo. As células da camada interna do tegumento interno apresentam seus ápices em formato de domo e dividem-se periclinamente na região micropilar (Fig. 1f). O rudimento seminal completa sua curvatura (Fig. 1f) e a célula-mãe de ginósporos sofre meiose, resultando em uma tétrade linear de ginósporos, com um ginósporo funcional em posição calazal (Fig. 1g-i). Há deposição de calose nas paredes celulares da díade e da tétrade, nessa apenas nas paredes periclinais (Fig. 1h, i). O ginósporo funcional aumenta suas dimensões e inicia uma

vacuolação micropilar e subsequente vacuolação calazal, enquanto os demais ginósporos degeneram (Fig. 1j).

Ginogametogênese

A partir do ginósporo funcional, forma-se o gametófito feminino uninucleado (Fig. 2a). Por meio de três ciclos mitóticos sucessivos sem citocinese, esse gametófito passa pelos estádios binucleado, tetranucleado e octonucleado (Fig. 2b-j), todos com um vacúolo central contendo polissacarídeos. Durante o segundo ciclo mitótico, as divisões dos núcleos ocorrem de maneira oblíqua entre os pólos (Fig. 2c). No estágio tetranucleado do gametófito, o tegumento externo ultrapassa em comprimento o tegumento interno, mantendo-se o rudimento seminal nessa forma até sua maturidade. Durante o terceiro ciclo mitótico, as divisões mitóticas ocorrem perpendicularmente entre si em cada pólo (Fig. 2e, f). Ao longo da gametogênese, algumas células do nucelo degeneram ao redor do gametófito (Fig. 2b, d).

Após citocinese, o gametófito feminino é composto por oito núcleos e sete células, sendo uma oosfera, duas sinérgides, uma célula-média com dois núcleos polares, e três antípodas (Fig. 2k-n). Inicialmente, os núcleos polares migram e se aproximam, enquanto a oosfera torna-se vacuolada. Posteriormente, as sinérgides diferenciam-se com a formação de um aparelho fibrilar conspícuo, de composição pecto-celulósica (Fig. 2m-p). O gametófito expande em volume e torna-se, estruturalmente, maduro. Os núcleos polares são observados em diferentes posições no gametófito, adjacentes ao aparelho oosférico (Fig. 2m, p), na região central ou no pólo calazal da célula média. Constatou-se uma região distinta da parede celular na região calazal das células do aparelho oosférico e na região contígua da célula-média, com fraca marcação para o Calcofluor White e ausência de coloração com o Vermelho de Rutênio, que pode indicar uma modificação ou ausência de parede celular (Fig. 2o, p). Foi observada a presença de hipóstase durante toda a gametogênese (Fig. 2a-e, g, h, k, l). Até o estágio

analisado, isto é, flor em antese com tubos polínicos na base do estilete, as antípodas apresentam-se persistentes e os núcleos polares não fusionados.

O gametófito feminino, de origem monospórica, é classificado como do tipo *Polygonum*. A partir da reconstrução tridimensional, mostrada nas Fig. 3a-d e no vídeo (Informação Suplementar), foram obtidas medidas do gametófito e de suas células componentes (Tab. 2). A célula-média ocupa aproximadamente 88% do volume total do gametófito (Fig. 3a, b). O aparelho oosférico apresenta um arranjo triangular (Fig. 3c, d), e a oosfera possui um volume celular de cerca de 40% do volume da sinérgide (Fig. 3c, d). A oosfera é vacuolada e seu núcleo ocupa uma posição central a micropilar, próximo a uma face lateral da célula, com escasso citoplasma ao seu redor (Fig. 3b-d, Fig. 2m). As antípodas possuem usualmente um arranjo triangular (Fig. 3a, b), podendo se dispor de forma alinhada. O gametófito feminino possui formato elipsóide, com uma suave constrição na sua região mediana, e porção calazal bastante estreita, onde estão encaixadas as antípodas (Fig. 3a, b, Fig. 2k, l). A reconstrução tridimensional (Fig. 3a-d) também mostra detalhes do arranjo celular não perceptíveis por meio das seções bidimensionais (Fig. 2k-n, 4b, d), como a maior sobreposição entre a célula-média e o aparelho oosférico no lado da oosfera (Fig. 3a, b), o pequeno desvio da oosfera em sua porção micropilar, em relação ao ponto médio das sinérgides (Fig. 3c), e o arranjo peculiar do aparelho oosférico, no qual a região mais estreita das sinérgides é adjacente à região mais ampla da oosfera, em termos de profundidade (Fig. 3d). Dos cerca de 120 gametófitos femininos maduros analisados, apenas um deles apresentou anormalidade estrutural em seu formato, dimensões e disposição das células.

Rudimento seminal maduro

Em cada lóculo do ovário, existem muitos rudimentos seminais (Fig. 4a) – cerca de 100 – os quais estão posicionados com seu plano de simetria (seção longitudinal maior)

perpendicular ao eixo do ovário (Fig. 4a, b). O rudimento seminal maduro é anátropo e bitegumentado, com apêndice calazal (Fig. 4b, c). Idioblastos contendo ráfides de oxalato de cálcio são observados no funículo, rafe (Fig. 4b), tegumento externo e apêndice calazal. O rudimento seminal apresenta um feixe vascular que se estende pelo funículo e rafe até a calaza (Fig. 4d). A micrópila é formada pelo tegumento interno (Fig. 4b). Na região micropilar do nucelo, esse é composto por uma camada epidérmica uniestratificada com células alongadas anticlinalmente e uma a duas camadas de tecido parietal (Fig. 4d). O tegumento interno é formado por duas camadas de células na maior parte de sua extensão, com exceção da região micropilar, que é composta por quatro a cinco camadas celulares, incluindo as células com ápice em formato de domo em contato com o canal micropilar (Fig. 4d). O tegumento externo é constituído por três a quatro camadas celulares (Fig. 4d) e, em um de seus lados, é fusionado ao funículo (Fig. 4b). O apêndice calazal apresentou-se variável entre populações de diferentes localidades, desde vestigial até alongado e curvo (Fig. 4e, f), com formatos intermediários (Fig. 4b, c). Em um mesmo ovário, os rudimentos seminais apresentam-se em diferentes estádios de desenvolvimento, diferenciando-se da porção apical à basal do lóculo e da porção central às laterais do lóculo, em um processo ontogenético basípeto e centrífugo.

Discussão

Ontogenia do rudimento seminal em *Billbergia nutans*

Embora Rodkiewicz (1970) tenha descrito muitas espécies com deposição de calose durante a ginospogênese, essas observações são menos numerosas do que aquelas relacionadas à androspogênese (Lersten, 2004). Em Bromeliaceae, detectou-se a deposição de calose nas paredes celulares da díade e da tétrade de ginósporos em *Vriesea carinata* (Sartori, 2008), *Tillandsia aeranthos*, *T. meridionalis* (Papini *et al.*, 2011) e *Pitcairnia*

encholirioides (Mendes, 2012). Entretanto, essa deposição foi evidenciada ainda antes do estágio de díade em *B. nutans* no atual estudo. Segundo Rodkiewicz (1970), a formação da calose sempre inicia em prófase I, no pólo do megasporócito onde o megásporo funcional irá se formar nas angiospermas, de modo que a calose é depositada antes na porção calazal do meiócito em gametófitos do tipo *Polygonum*. Contudo, em *B. nutans*, a calose é depositada primeiramente no pólo micropilar do meiócito, similar ao observado em *Arundo formosana* pertencente a Poaceae (Jane & Chiang, 1996) e *Gasteria verrucosa* pertencente a Xanthorrhoeaceae (Willemse & Bednara, 1979), que são todas monocotiledôneas.

A oosfera, em plantas com flores, é normalmente maior do que as sinérgides segundo Zhukova (2002), porém faltam dados volumétricos que detalhem essa comparação. O atual estudo mostra um resultado oposto, em que a oosfera é menor do que as sinérgides em *B. nutans*, com dados calibrados por medidas de volume celular. Em relação à polaridade da oosfera, postula-se tradicionalmente que o núcleo e a maior parte do citoplasma estão localizados em posição calazal e o vacúolo em posição micropilar (Maheshwari, 1950). Willemse & van Went (1984) adicionam que a oosfera é altamente vacuolada na maioria das espécies, com os vacúolos ocupando os dois terços micropilares da célula. Em *B. nutans*, a oosfera é muito vacuolada, porém a posição de seu núcleo diverge do que é comumente referido, assim como em algumas espécies de Poaceae e Orchidaceae de acordo com Huang & Russell (1992).

Em relação à reconstrução tridimensional, esse é um recurso que permite uma melhor compreensão das estruturas biológicas e que pode revelar novos caracteres, contudo tem sido pouco utilizada na literatura botânica. Estudos sobre o gametófito feminino que incluam essa abordagem são registrados para *Amborella*, *Aristolochia*, *Piper* e *Peperomia* (Friedman, 2006; Madrid & Friedman, 2008, 2009, 2010), porém não são agregados dados quantitativos. Assim, até o presente momento, não existem dados sobre esse assunto para monocotiledôneas

e eudicotiledôneas, sendo este estudo o primeiro registro. Para o atual estudo, a reconstrução em três dimensões foi fundamental para demonstrar a organização e o formato do gametófito e expor caracteres não perceptíveis em seções bidimensionais, evidenciando as estruturas reais, assim como para fornecer informações de medidas, que podem ser relevantes para o entendimento da funcionalidade celular e também para aplicação taxonômica.

Ontogenia do rudimento seminal no contexto evolutivo de Bromeliaceae

A revisão dos caracteres embriológicos dos rudimentos seminais em Bromeliaceae é apresentada na Tab. 3, que compila informações de 24 espécies pertencentes a 14 gêneros e seis subfamílias, incluindo *B. nutans* deste estudo. Com base nos dados disponíveis, nós descrevemos os rudimentos seminais de Bromeliaceae como anátropos, bitegumentados e crassinucelados. Essas características são consideradas comuns para monocotiledôneas (Endress, 2011). A ontogenia do rudimento seminal em Bromeliaceae, incluindo a ginosporigênese e a ginogametogênese, mostra um padrão comum para a família, com primórdios de rudimento seminal trizonados, desenvolvimento monospórico do gametófito, tétrade do tipo linear, presença de paredes celulares calósicas durante a meiose, ginósporo funcional calazal, gametófito do tipo *Polygonum*, presença de hipóstase e origem dérmica dos tegumentos.

As informações sobre o formato do gametófito feminino são escassas nessa família. Constatou-se uma similaridade entre espécies não relacionadas, pertencentes a *Tillandsia* e *Ananas*, e uma distinção entre espécies de *Ananas* (Tab. 3). Além disso, a presença de uma constrição na região calazal, onde as antípodas estão localizadas, foi relatada para todos os gêneros cujo formato do gametófito feminino foi caracterizado, isto é, *Tillandsia*, *Ananas* e *Billbergia* (Tab. 3), o que parece ser uma característica estável na família. Esses dados mostram que o formato do gametófito feminino é parcialmente estável na família, porém

como um todo é um caráter variável entre espécies do mesmo gênero, podendo ser importante para a taxonomia infragenérica.

De acordo com Tobe (1989), a morfologia e a histogênese dos tegumentos podem fornecer evidências para subsidiar as relações infrafamiliares. Em monocotiledôneas, ambos os tegumentos são compostos, geralmente, por duas camadas celulares (Endress, 2011). Em Bromeliaceae (Tab. 3), a espessura do tegumento interno permanece constante com duas camadas celulares, à exceção de *Tillandsia aeranthos*. Entretanto, o número de camadas celulares do tegumento externo varia entre espécies de Tillandsioideae e entre gêneros de Bromelioideae, com gêneros contendo três ou três a quatro camadas celulares. Portanto, a espessura do tegumento externo mostra variabilidade nos níveis de família e subfamília para Bromeliaceae e merece mais investigações. Considerando as famílias intimamente relacionadas a Bromeliaceae em uma posição basal dentro de Poales (Linder & Rudall, 2005; Givnish *et al.*, 2010), Typhaceae apresenta os dois tegumentos compostos por duas camadas celulares (Asplund, 1972, 1973), enquanto a maioria dos gêneros de Rapateaceae possuem um tegumento externo pluriestratificado (Venturelli & Bouman, 1988). Assim, os tegumentos compostos por duas camadas celulares presentes na maioria das espécies de Bromeliaceae, inclusive na subfamília que divergiu mais cedo, e em Typhaceae, que são famílias que divergiram antes de Rapateaceae segundo Givnish *et al.* (2010), podem representar o estado ancestral de Poales. A formação da micrópila a partir do tegumento interno na maioria dos casos em Bromeliaceae (Tab. 3) contrasta com a afirmação de Endress (2011) de que a micrópila formada somente pelo tegumento interno é uma característica predominante para monocotiledôneas, exceto para Poales.

A presença de um apêndice calazal tem sido registrada para a maioria dos gêneros avaliados, com exceção de *Guzmania*, *Orthophytum* e *Quesnelia* (Tab. 3). Essa estrutura possui um formato que varia bastante dentro da família e das subfamílias, sendo geralmente

alongada com comprimento variável, de curto a muito longo, e com uma leve curvatura em direção ao lado da rafe ou da anti-rafe, porém pode apresentar formatos distintos, como os descritos para *Catopsis* e *Puya*. Dentro de Poales, um apêndice calazal também foi constatado em Rapateaceae (Venturelli & Bouman, 1988), que é uma família muito próxima filogeneticamente de Bromeliaceae, e em Juncaceae, em espécies de *Luzula* (Dahlgren *et al.*, 1985; Oriani *et al.*, 2012) nas quais origina o estrofiolo da semente, como uma provável adaptação à dispersão por insetos (Dahlgren *et al.*, 1985). Essa estrutura também foi observada em monocotiledôneas cedo-divergentes, como Tofieldiaceae e Nartheciaceae (Remizowa *et al.*, 2006). Neste estudo, observou-se que o apêndice calazal é um caráter variável em *B. nutans*, mostrando formas intermediárias entre espécies de *Aechmea* e espécies de *Orthophytum* e *Quesnelia*. De acordo com Downs (1974), esse apêndice varia consideravelmente entre as espécies da família e dificilmente pode ser considerado um caráter distintivo de gênero. Embora sua formação em *B. nutans* inicie no rudimento seminal jovem, em estágio de célula-mãe de ginósporos, o apêndice calazal é a última estrutura externa e multicelular a se desenvolver no rudimento seminal, de modo similar ao constatado por Brown & Terry (1992) para os apêndices petalíneos nas flores de Bromeliaceae. Segundo Takhtajan (1972), as mudanças evolutivas são mais frequentes nas fases finais do desenvolvimento das plantas, o que indica que essas fases são mais suscetíveis a modificações. Portanto, a morfologia do apêndice calazal em Bromeliaceae pode não ser um caráter apropriado para aplicação taxonômica, visto que inclui variação intraespecífica. Assim, sugere-se que sejam realizadas análises acuradas dessa estrutura, abrangendo diferentes populações de cada espécie para o propósito taxonômico.

Com relação à origem do apêndice calazal, a origem subdérmica demonstrada em *B. nutans* também foi observada em *Pitcairnia encholirioides*, o que contrasta com os dados de outro estudo referentes a nove espécies de várias subfamílias, incluindo Bromelioideae e

Pitcairnioideae, em que essa estrutura é considerada originária das camadas dérmica e subdérmica (Tab. 3). Mesmo em *Catopsis*, no qual uma origem dérmica foi constatada por outros autores para o apêndice em formato de tricomas de *C. paniculata*, uma origem dérmica e subdérmica foi descrita para os tricomas de *C. morreniana* no estudo mencionado anteriormente. Desse modo, o apêndice calazal merece mais investigações na família quanto a sua origem, a fim de confirmar os estados de caráter observados e sua aplicabilidade para a taxonomia do grupo.

Uma característica notável é o número de rudimentos seminiais por carpelo (Tab. 3), que distingue a subfamília que divergiu mais cedo, Brocchinioideae, com dois rudimentos seminiais por carpelo, das demais subfamílias, indicando que esse estado de caráter pode ser plesiomórfico na família. Além disso, o número reduzido de rudimentos seminiais por carpelo observado em *Catopsis* e *Ananas*, que são gêneros cedo-divergentes dentro de Tillandsioideae e Bromelioideae, respectivamente (Barfuss *et al.*, 2005; Sass & Specht, 2010; Givnish *et al.*, 2011), fornece suporte a essa hipótese. Um padrão similar é evidenciado em Rapateaceae, uma família próxima de Bromeliaceae dentro de Poales (Linder & Rudall, 2005; Givnish *et al.*, 2010). Os gêneros pertencentes à subfamília que divergiu mais cedo, Rapateoideae, possuem um ou dois rudimentos seminiais por carpelo, enquanto Monotremoideae apresenta um rudimento seminal por carpelo e Saxofridericioideae possui carpelos com muitos rudimentos seminiais (Venturelli & Bouman, 1988; Givnish *et al.*, 2004; Oriani & Scatena, 2013). Embora a presença de rudimentos seminiais únicos nos carpelos caracterize todo o clado restídeas-graminídeas, tarde-divergente em Poales (Givnish *et al.*, 2010), o que poderia parecer um estado derivado nessa ordem, os grupos cedo-divergentes de Bromeliaceae e Rapateaceae são definidos por poucos rudimentos seminiais por carpelo, indicando que esse estado de caráter é provavelmente plesiomórfico em Poales.

Dentro de Bromeliaceae, o número de rudimentos seminais também distingue *Catopsis* de outros gêneros pertencentes a Tillandsioideae. Em Bromelioideae, existem oito rudimentos seminais por carpelo em três espécies de *Aechmea* (Tab. 3), diferenciando-as de espécies de outros gêneros relacionados. De acordo com Vervaeke *et al.* (2003), *A. fasciata* e *A. chantinii* possuem cerca de 304 e 90 rudimentos seminais por ovário, ou seja, cerca de 101 e 30 rudimentos seminais em cada carpelo, respectivamente. Isso demonstra uma discrepância entre essas cinco espécies de *Aechmea* em relação à quantidade de rudimentos seminais. O estudo filogenético de Faria *et al.* (2004) abarca três dessas cinco espécies, de modo que *A. fosteriana* e *A. chantinii* estão posicionadas dentro de um mesmo clado, que é distinto do clado que inclui *A. fasciata*. Nesse contexto, *A. fasciata* é a espécie mais distinta, tanto na análise filogenética quanto no caráter morfológico mencionado. Segundo Sass & Specht (2010), *A. fasciata* está posicionada no clado B, separada de *A. chantinii* no clado A, o que está, mais uma vez, correlacionado com a quantidade de rudimentos seminais. Portanto, o número de rudimentos seminais pode constituir um caráter relevante para a taxonomia de *Aechmea*.

Em um panorama evolutivo, Brocchinioideae, como a subfamília que divergiu mais cedo (Givnish *et al.*, 2007, 2011), apresenta as características supostamente plesiomórficas para Bromeliaceae. Ademais, essa subfamília possui uma forma reduzida de alguns caracteres, isto é, a formação da micrópila somente pelo tegumento interno, os tegumentos compostos por duas camadas celulares, o tecido parietal formado por uma camada celular e dois rudimentos seminais por carpelo. Na família, os distintos estados de caráter parecem ter surgido independentemente dentro das diferentes subfamílias, em relação à ontogenia do rudimento seminal, com a ocorrência de convergência morfológica em caracteres como a formação da micrópila por um ou por ambos os tegumentos, o número de camadas celulares do tegumento externo, o número de camadas celulares do tecido parietal e o número de

rudimentos seminais por carpelo (Tab. 3). Essas características, algumas já discutidas anteriormente, podem contribuir para a compreensão dos táxons que compõem cada subfamília. Em Bromelioideae, alguns caracteres distinguem espécies de *Aechmea* de outros gêneros, como o formato das células epidérmicas do nucelo em sua região micropilar, o número de camadas celulares do tecido parietal e o número de rudimentos seminais por carpelo. Estudos adicionais são necessários para a elucidação das relações dentro de Bromelioideae, tendo em vista que *Aechmea* é um grupo amplo e artificial (Almeida *et al.*, 2009; Schulte *et al.*, 2009; Sass & Specht, 2010; Givnish *et al.*, 2011), e os caracteres morfoanatômicos mencionados podem ser importantes nesse contexto.

Como conclusões, são apresentadas informações inéditas para o gênero *Billbergia*. Este estudo revela a primeira análise tridimensional do gametófito feminino em monocotiledôneas e espera-se que essa abordagem moderna seja mais explorada em investigações futuras, para auxiliar tanto na interpretação das estruturas como na detecção de novos caracteres. Não foram constatadas limitações significativas no processo reprodutivo de *Billbergia nutans*. Muitos caracteres são sugeridos como potencialmente úteis para a taxonomia da família e das subfamílias, incluindo: o formato do gametófito feminino, a persistência ou proliferação das antípodas, a formação da micrópila por um ou por ambos os tegumentos, o número de camadas celulares do tegumento externo, o formato das células epidérmicas do nucelo em sua região micropilar, o número de camadas celulares do tecido parietal, a presença de um apêndice micropilar, a presença, morfologia e origem do apêndice calazal e o número de rudimentos seminais por carpelo. Contudo, a morfologia do apêndice calazal pode ser um caráter inapropriado para utilização na taxonomia, devido à variabilidade intraespecífica observada em *B. nutans*. São necessárias análises detalhadas para cada subfamília, incluindo os caracteres apontados pelo presente estudo, a fim de subsidiar o esclarecimento de suas relações taxonômicas e evolutivas. Este estudo mostra um cenário

evolutivo do rudimento seminal em Bromeliaceae, no qual a subfamília que divergiu mais cedo, Brocchinioideae, mostra um estado reduzido de vários caracteres. Na família, alguns caracteres parecem ser homoplásicos e podem ser relevantes quando aplicados em níveis taxonômicos inferiores. Em Poales, os tegumentos constituídos por duas camadas celulares e o reduzido número de rudimentos seminais por carpelo são, provavelmente, estados de caráter plesiomórficos.

Referências bibliográficas

- ALMEIDA, V. R. *et al.* Morphological phylogenetics of *Quesnelia* (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Systematic Botany**, v. 34, n. 4, p. 660-672, 2009.
- ASPLUND, I. Embryological studies in the genus *Typha*. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v. 66, p. 1-17, 1972.
- ASPLUND, I. Embryological studies in the genus *Sparganium*. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v. 67, p. 177-200, 1973.
- BARFUSS, M. H. J. *et al.* Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 337-351, 2005.
- BILLINGS, F. H. A Study of *Tillandsia usneoides*. **Botanical Gazette**, v. 38, n. 2, p. 99-121, 1904.
- BROWN, G. K.; TERRY, R. G. Petal appendages in Bromeliaceae. **American Journal of Botany**, v. 79, p. 1051-1071, 1992.
- CHAMBERLAIN, C. J. **Methods in plant histology**. 5th ed. Chicago: University of Chicago Press, 1932.
- CONCEIÇÃO, S.; DE TONI, K. L. G.; COSTA, C. G. Particularidades do nucelo de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, Suplemento 1, p. 846-848, 2007.
- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution, and Taxonomy**. Berlin: Springer, 1985.

- DE TONI, K. L. G.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny in Rubiaceae (Juss.): *Chomelia obtusa* (Cinchonoideae– Guettardeae) and *Ixora coccinea* (Ixoroideae–Ixoreae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 272, p. 39-48, 2008.
- DE TONI, K. L. G.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny of *Relbunium* species in the evolutionary context of Rubiaceae. **Australian Journal of Botany**, v. 58, p. 70-79, 2010.
- DOWNS, R. J. Anatomy and physiology. In: Smith, L. B.; Downs, R. J. (Ed.). Pitcairnioideae (Bromeliaceae). In: **Flora Neotropica Monograph**, v. 14, n. 1. New York: Hafner Press, 1974. p. 3-28.
- ENDRESS, P. K. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. **Annals of Botany**, v. 107, n. 9, p. 1465-1489, 2011.
- FAGUNDES, N. F.; MARIATH, J. E. A. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. **Acta botanica brasiliica**, v. 24, n. 3, p. 765-779, 2010.
- FARIA, A. P. G.; WENDT, T.; BROWN, G. K. Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 91, p. 303-319, 2004.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.
- FRIEDMAN, W. E. Embryological evidence for developmental lability during early angiosperm evolution. **Nature**, v. 441, p. 337-340, 2006.
- GABRIEL, B. L. **Biological electron microscopy**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1982.
- 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. Rasterelektronmikroskopische 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. *et al.* Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, p. S35-S54, 2004.

- GIVNISH, T. J. *et al.* Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. **Aliso**, v. 23, p. 3-26, 2007.
- GIVNISH, T. J. *et al.* Assembling the tree of the Monocotyledons: Plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 97, p. 584-616, 2010.
- GIVNISH, T. J. *et al.* Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872-895, 2011.
- HERR, J. M. Embryology and taxonomy. *In*: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 647-696.
- HUANG, B. Q.; RUSSELL, S. D. Female germ unit: Organization, isolation and function. *In*: RUSSELL, S.D.; DUMAS, C. (Ed.). **Sexual Reproduction in Flowering Plants**. San Diego: Academic Press Inc, 1992. p. 233-293.
- HUGHES, J.; MCCULLY, M. E. The use of an optical brightener in the study of plant structure. **Stain Technology**, v. 50, n. 5, p. 319-329, 1975.
- JANE, W. N.; CHIANG, S. H. T. Ultrastructure of megasporogenesis and early megagametogenesis in *Arundo formosana* Hack. (Poaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 157, p. 418-431, 1996.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.
- LAKSHMANAN, K. K. Embryological studies in the Bromeliaceae. I. *Lindmania penduliflora* (C. H. Wright) Stapf. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**, v. 65, p. 49-55, 1967.
- LERSTEN, N. **Flowering plant embryology**. Iowa: Blackwell Publishing, 2004.
- 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**. 11th ed. Sarasota: The Bromeliad Society International, 2008.
- MADRID, E. M.; FRIEDMAN, W. E. Female gametophyte development in *Aristolochia labiata* Willd. (Aristolochiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, p. 19-29, 2008.
- MADRID, E. M.; FRIEDMAN, W. E. The developmental basis of an evolutionary diversification of female gametophyte structure in *Piper* and Piperaceae. **Annals of Botany**, v. 103, p. 869-884, 2009.

- MADRID, E. M.; FRIEDMAN, W. E. Female gametophyte and early seed development in *Peperomia* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 97, p. 1-14, 2010.
- MAGALHÃES, R. I.; MARIATH, J. E. A. Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, n. 10, p. 1881-1895, 2012.
- MAHESHWARI, P. **An introduction to the embryology of angiosperms**. New York: McGraw-Hill, 1950.
- MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. R. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 1000, p. 405-414, 1976.
- MCWILLIAMS, E. L. The subgenus *Billbergia* in cultivation. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 18, p. 7-16, 1968.
- MENDES, S. P. **Endospermogênese e embriogênese de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae)**. 2008. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- MENDES, S. P. **Estudos embriológicos em *Pitcairnia encholirioides* L.B.Sm. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae)**. 2012. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- ORIANI, A.; SCATENA, V. L. The taxonomic value of floral characters in Rapateaceae (Poales-Monocotyledons). **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, p. 291-303, 2013.
- ORIANI, A.; STÜTZEL, T.; SCATENA, V. L. Contributions to the floral anatomy of Juncaceae (Poales – Monocotyledons). **Flora**, v. 207, p. 334-340, 2012.
- PALACÍ, C. A.; BROWN, G. K.; TUTHILL, D. E. The seeds of *Catopsis* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). **Systematic Botany**, v. 29, p. 518-527, 2004.
- PAPINI, A. *et al.* Megasporogenesis and programmed cell death in *Tillandsia* (Bromeliaceae). **Protoplasma**, v. 248, n. 4, p. 651-662, 2011.
- PLACHNO, B. J.; SWIATEK, P. Functional anatomy of the ovule in *Genlisea* with remarks on ovule evolution in Lentibulariaceae. **Protoplasma**, v. 236, p. 39-48, 2009.
- RAO, A. N.; WEE, Y. C. Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. **New Phytologist**, v. 83, n. 2, p. 485-497, 1979.
- REMIZOWA, M.; SOKOLOFF, D.; RUDALL, P. J. Evolution of the monocot gynoecium: evidence from comparative morphology and development in *Tofieldia*, *Japonolirion*,

- Petrosavia*, and *Nartheceium*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 258, p. 183-209, 2006.
- RODKIEWICZ, B. Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. **Planta**, v. 93, p. 39-47, 1970.
- SAJO, M. G.; PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Structure and development of the ovule in Bromeliaceae. **Kew Bulletin**, v. 59, p. 261-267, 2004.
- SARTORI, J. S. **Desenvolvimento floral em *Vriesea carinata* Wawra (Tillandsioideae-Bromeliaceae)**. 2008. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.
- SASS, C.; SPECHT, C. D. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 559-571, 2010.
- SCHULTE, K.; BARFUSS, M. H. J.; ZIZKA, G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 327-339, 2009.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *In: Flora Neotropica Monograph*. New York: Hafner Press, v. 14, n. 1, 1974. p. 1-662.
- SMITH, M. M.; MCCULLY, M. E. A critical evaluation of the specificity of aniline blue induced fluorescence. **Protoplasma**, v. 95, p. 229-254, 1978.
- SPAT, C. **Embriologia de *Tillandsia aeranthos* (Lois.) L. B. Sm. (Tillandsioideae-Bromeliaceae)**. 2012. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2012.
- TAKHTAJAN, A. Patterns of ontogenetic alterations in the evolution of higher plants. **Phytomorphology**, v. 22, p. 164-171, 1972.
- TOBE, H. The embryology of Angiosperms: Its broad application to the systematic and evolutionary study. **The Botanical Magazine, Tokyo**, v. 102, p. 351-367, 1989.
- VENTURELLI, M.; BOUMAN, F. Development of ovule and seed in Rapateaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 97, p. 267-294, 1988.
- VERVAEKE, I. *et al.* Flower biology of six cultivars of the Bromeliaceae. I. Pollen, pistil, and petal appendages. **Selbyana**, v. 24, n. 1, p. 78-86, 2003.
- WANG, Z.; REN, Y. Ovule morphogenesis in Ranunculaceae and its systematic significance. **Annals of Botany**, v. 101, n. 3, p. 447-462, 2007.

- WEE, Y. C.; RAO, A. N. Gametophytes and seed development in pineapple. **Current Science**, v. 43, p. 171-173, 1974.
- WILLEMSE, M. T. M.; VAN WENT, J. L. The female gametophyte. *In*: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of the Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 159-196.
- WILLEMSE, M. T. M.; BEDNARA, J. Polarity during megasporogenesis in *Gasteria verrucosa*. **Phytomorphology**, v. 29, p. 156-165, 1979.
- ZHUKOVA, G. Ya. Egg cell. *In*: BATYGINA, T. B. (Ed.). **Embryology of flowering plants, terminology and concepts, vol.1: Generative organs of flower**. Enfield: Science Publishers Inc, 2002. p. 149-152.

Tabela 1. Indivíduos e respectivos locais de origem.

| Indivíduo * | Local de origem |
|---|-----------------------------|
| Coleção viva – Jardim Botânico de Porto Alegre | |
| BROM 00073 | Dois Irmãos, RS, Brasil |
| BROM 00106 | Santa Maria, RS, Brasil |
| BROM 00720 | Nova Palma, RS, Brasil |
| BROM 00739 | Canela, RS, Brasil |
| Herbário ICN, Coleção viva – UFRGS | |
| ICN 190645, CV0433 | Nova Petrópolis, RS, Brasil |
| ICN 190646, CV0434 | Derrubadas, RS, Brasil |

*número de registro.

Tabela 2. Medidas do gametófito feminino, a partir da sua reconstrução tridimensional.

| Estrutura | Medida | | | |
|----------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | V (μm^3) | C (μm) | L (μm)* | P (μm)* |
| Gametófito feminino | 231012 | 153 | 58 | 45 |
| | V (μm^3) | | | % |
| Oosfera | 4.436 | | | 1,92 |
| Sinérgide 1 | 10.165 | | | 4,40 |
| A.f. 1 | 327 | | | 0,14 |
| Sinérgide 2 | 11.535 | | | 4,99 |
| A.f. 2 | 449 | | | 0,19 |
| Célula-média | 203.400 | | | 88,05 |
| Antípoda 1 | 559 | | | 0,24 |
| Antípoda 2 | 639 | | | 0,28 |
| Antípoda 3 | 278 | | | 0,12 |

*na região mediana; V: volume; C: comprimento; L: largura; P: profundidade; %: porcentagem do volume da estrutura em relação ao volume do gametófito feminino; A.f.: aparelho fibrilar (computado na medida do volume da sinérgide).

Tabela 3. Registros dos caracteres embriológicos do rudimento seminal em Bromeliaceae.

| Espécie/ Caráter | Primórdio do RS | Desenvolvimento do GF | Tipo de tetrade | Calose (meiose) | Ginósporo funcional | Nucelo | Curvatura | Tegumento(s) | Tipo de GF | Formato do GF | Hipóstase | Antípodas |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------|-----------|--------------|------------|------------------------|-----------|----------------|
| Brocchinioideae | | | | | | | | | | | | |
| 1. <i>Brocchinia reducta</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| Lindmanioidae | | | | | | | | | | | | |
| 2. <i>Lindmania penduliflora</i> | -- | Monospórico | Linear | -- | Calazal | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | Persistentes |
| Tillandsioideae | | | | | | | | | | | | |
| 3. <i>Catopsis morreniana</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| 4. <i>C. paniculata</i> | -- | Monospórico | Linear* | -- | Calazal | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | -- | -- | -- | -- |
| 5. <i>Guzmania madisonii</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| 6. <i>Tillandsia aeranthes</i> | Trizonado [#] | Monospórico | Linear | Sim | Calazal | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | Sim | -- |
| 7. <i>T. complanata</i> | -- | -- | Linear* | -- | -- | -- | Anátropo | Bitegmentado | -- | -- | -- | -- |
| 8. <i>T. dura</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| 9. <i>T. meridionalis</i> | -- | Monospórico | Linear* | Sim | Calazal | Crassinucelado | -- | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| 10. <i>T. usneoides</i> | -- | Monospórico | Linear | -- | Calazal | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | Oval ^{2*} | -- | Persistentes |
| 11. <i>Vriesea carinata</i> | Trizonado | Monospórico | Linear | Sim | Calazal | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | Sim | Persistentes |
| Pitcairnioideae | | | | | | | | | | | | |
| 12. <i>Pitcairnia encholirioides</i> | Trizonado | Monospórico | Linear | Sim | Calazal | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | Sim | -- |
| 13. <i>P. paniculata</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| 14. <i>Dyckia hedbingii</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| 15. <i>D. pseudococcinea</i> | Trizonado | Monospórico | Linear | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | -- | -- | -- | Proliferativas |
| Puyoideae | | | | | | | | | | | | |
| 16. <i>Puya floccosa</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| Bromelioideae | | | | | | | | | | | | |
| 17. <i>Ananas bracteatus</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Alongado ^b | -- | -- |
| 18. <i>A. comosus</i> | -- | Monospórico | Linear | -- | Calazal | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | Oval ² | Sim | Efêmeras |
| 19. <i>Aechmea alba</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| 20. <i>A. conglomerata</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| 21. <i>A. fosteriana</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| 22. <i>Billbergia nutans</i> | Trizonado | Monospórico | Linear | Sim | Calazal | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | Elipsóide ^b | Sim | Persistentes |
| 23. <i>Orthophytum vagans</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |
| 24. <i>Quesnelia edmundoi</i> | -- | Monospórico | -- | -- | -- | Crassinucelado | Anátropo | Bitegmentado | Polygonum | -- | -- | -- |

| (contin.) | Micrópila - Tegumento(s) | TI - origem | TI - n° camadas | TE - origem | TE - n° camadas | EN - formato celular na RM | TP - n° camadas | AC | Formato do AC ⁺ | Origem do AC | AM | N° RS/ carpo § | Autores |
|-----------|--------------------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|----------------------------|---------------------|-----|---|----------------------|-----|----------------|---|
| 1. | Interno | -- | 2 | -- | 2 | Alongado | 1 | Sim | Muito longo | Dérmica e subdérmica | Sim | 2 | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 2. | -- | -- | 2 | -- | 2 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Lakshmanan (1967) |
| 3. | -- | -- | -- | -- | -- | Alongado | Várias ^c | Sim | Tricomas | Dérmica e subdérmica | Sim | 8 | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 4. | Interno* | Dérmica | 2 | Dérmica | 3-4 | -- | -- | Sim | Tricomas multicelulares | Dérmica | -- | 6-10 | Palaci <i>et al.</i> (2004) |
| 5. | -- | -- | -- | -- | -- | Alongado | 1 | Não | -- | -- | Sim | Muitos | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 6. | Interno | Dérmica | 2-3 | Dérmica | 3-4 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Muitos | Papini <i>et al.</i> (2011); Spat (2012) |
| 7. | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Sim | Curto e curvo em direção à rafe* | -- | -- | -- | Palaci <i>et al.</i> (2004) |
| 8. | Ambos | -- | 2 | -- | 2 | Alongado | 1 | Sim | Curto | Dérmica e subdérmica | Sim | Muitos | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 9. | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Papini <i>et al.</i> (2011) |
| 10. | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Billings (1904) |
| 11. | Ambos | Dérmica | 2 | Dérmica | 3 | Alongado | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Sartori (2008) |
| 12. | Interno | Dérmica | 2 | Dérmica | 2 | -- | -- | Sim | Curto e curvo em direção à rafe | Subdérmica | -- | -- | Mendes <i>et al.</i> (2013) |
| 13. | Interno | -- | 2 | -- | 2 | Alongado | 1 | Sim | Longo e curvo em direção à rafe* | Dérmica e subdérmica | Sim | Muitos | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 14. | -- | -- | -- | -- | -- | Alongado | Várias ^c | Sim | -- | Dérmica e subdérmica | Não | 10 | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 15. | -- | -- | -- | -- | -- | -- | 1 | Sim | Longo e curvo em direção à rafe* | -- | -- | Muitos | Conceição <i>et al.</i> (2007); Mendes (2008) |
| 16. | Interno | -- | 2 | -- | 2 | Alongado | Várias ^c | Sim | Achatado lateralmente | Dérmica e subdérmica | Não | Muitos | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 17. | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Rao & Wee (1979) |
| 18. | Interno | -- | 2 | -- | 3 | Alongado | 1-3 | -- | -- | -- | -- | 8-28 | Wee & Rao (1974); Rao & Wee (1979) |
| 19. | Interno | -- | -- | -- | -- | Não alongado | 1 | Sim | -- | Dérmica e subdérmica | Não | 8 | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 20. | Interno | -- | 2 | -- | 2 | Não alongado | 1 | Sim | Muito longo | Dérmica e subdérmica | Não | 8 | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 21. | Interno | -- | -- | -- | -- | Não alongado | 1 | Sim | -- | Dérmica e subdérmica | Não | 8 | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 22. | Interno | Dérmica | 2 | Dérmica | 3-4 | Alongado | 1-2 | Sim | Vestigial a curto, curvo em direção à anti-rafe | Subdérmica | Não | Muitos (~100) | Este estudo |
| 23. | Ambos | -- | 2 | -- | 2 | Alongado | 1 | Não | -- | -- | Não | Muitos | Sajo <i>et al.</i> (2004) |
| 24. | Ambos | -- | 2 | -- | 2 | Alongado | Várias ^c | Não | -- | -- | Não | Muitos | Sajo <i>et al.</i> (2004) |

*interpretado pelos autores deste estudo, com base nas figuras dos respectivos estudos. ^areinterpretado. ⁺relativizado (curto: menor do que a metade do comprimento do rudimento seminal; longo: maior do que a metade do comprimento do rudimento seminal; muito longo: igual ou maior do que o comprimento do rudimento seminal). [§]Deve ser considerado que "muitos" é subjetivo e pode variar entre os autores. ^a com constrição na região calazal. ^b com constrição nas regiões média e calazal. ^c Pode variar entre 2 e 4 camadas celulares, mas não houve especificação para cada espécie. AC: apêndice calazal; AM: apêndice micropilar; EN: epiderme mucelar; GF: gametófito feminino; RM: região micropilar; RS: rudimento seminal; TE: tegumento externo; TI: tegumento interno; TP: tecido parietal.

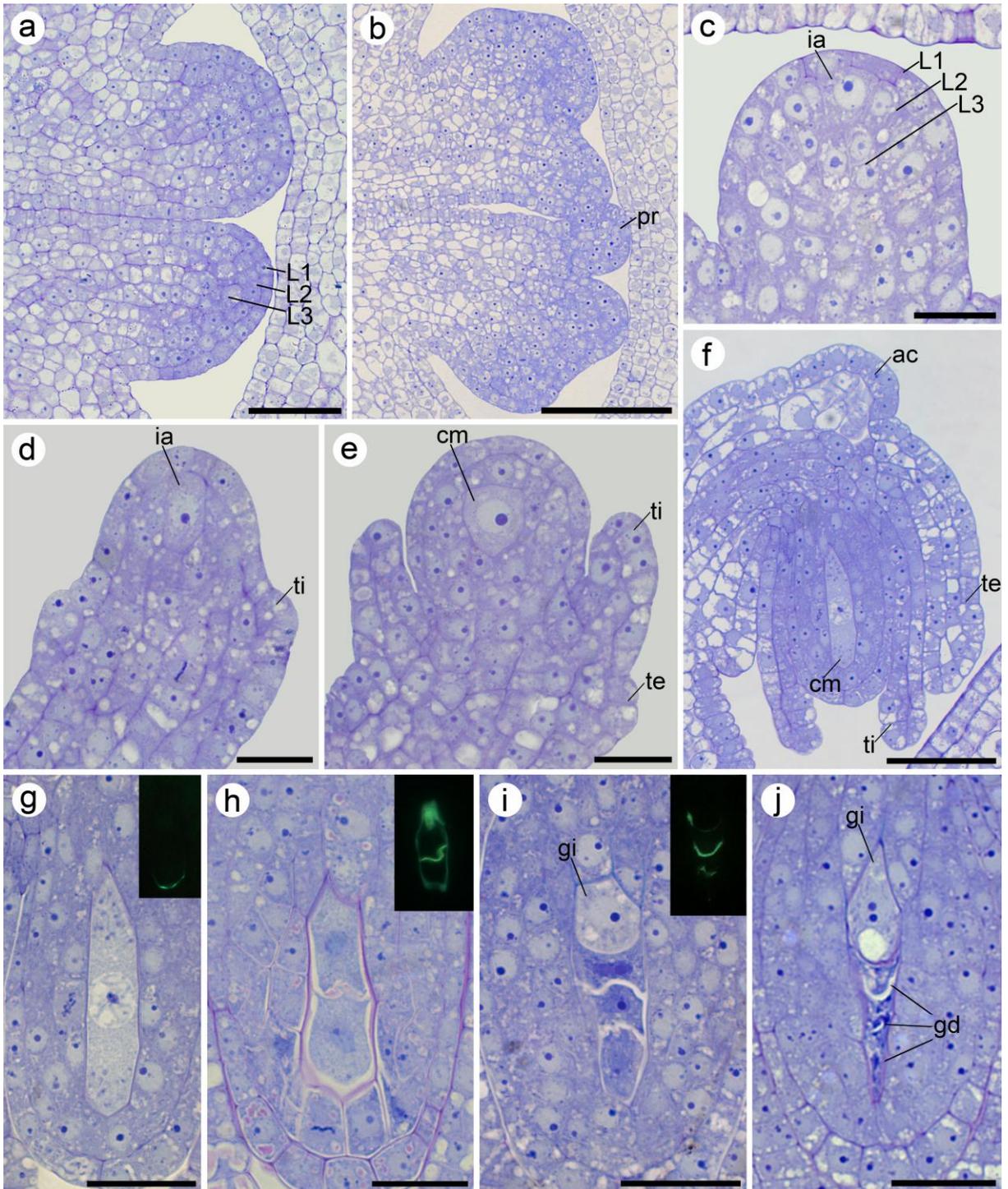


Fig. 1. Formação do rudimento seminal e ginosporogênese em *Billbergia nutans*. **a.** Formação da placenta. **b.** Formação do primórdio de rudimento seminal. **c.** Primórdio trizonado, com inicial arquesporial. **d.** Rudimento seminal com inicial arquesporial mais alongada e início do desenvolvimento do tegumento interno. **e.** Rudimento seminal com célula-mãe de gínosporos e início do desenvolvimento do tegumento externo. **f.** Rudimento seminal com célula-mãe de gínosporos alongada em prófase I, com tegumentos e apêndice calazal. **g.** Célula-mãe de gínosporos alongada em prófase I. **h.** Diáde de gínosporos. **i.** Tétrade de gínosporos com gínosporo funcional calazal. **j.** Gínosporo funcional mais desenvolvido e demais gínosporos em degeneração. **g-i.** Detalhe: deposição de calose. ac: apêndice calazal; cm: célula-mãe de gínosporos; gd: gínosporos degenerados; gi: gínosporo funcional; ia: inicial arquesporial; L1: camada dérmica; L2: camada subdérmica; L3: camada central; pr: primórdio de rudimento seminal; te: tegumento externo; ti: tegumento interno. Barras= 100µm (b); 50µm (a, f); 25µm (g, i, j); 20µm (c-e, h).

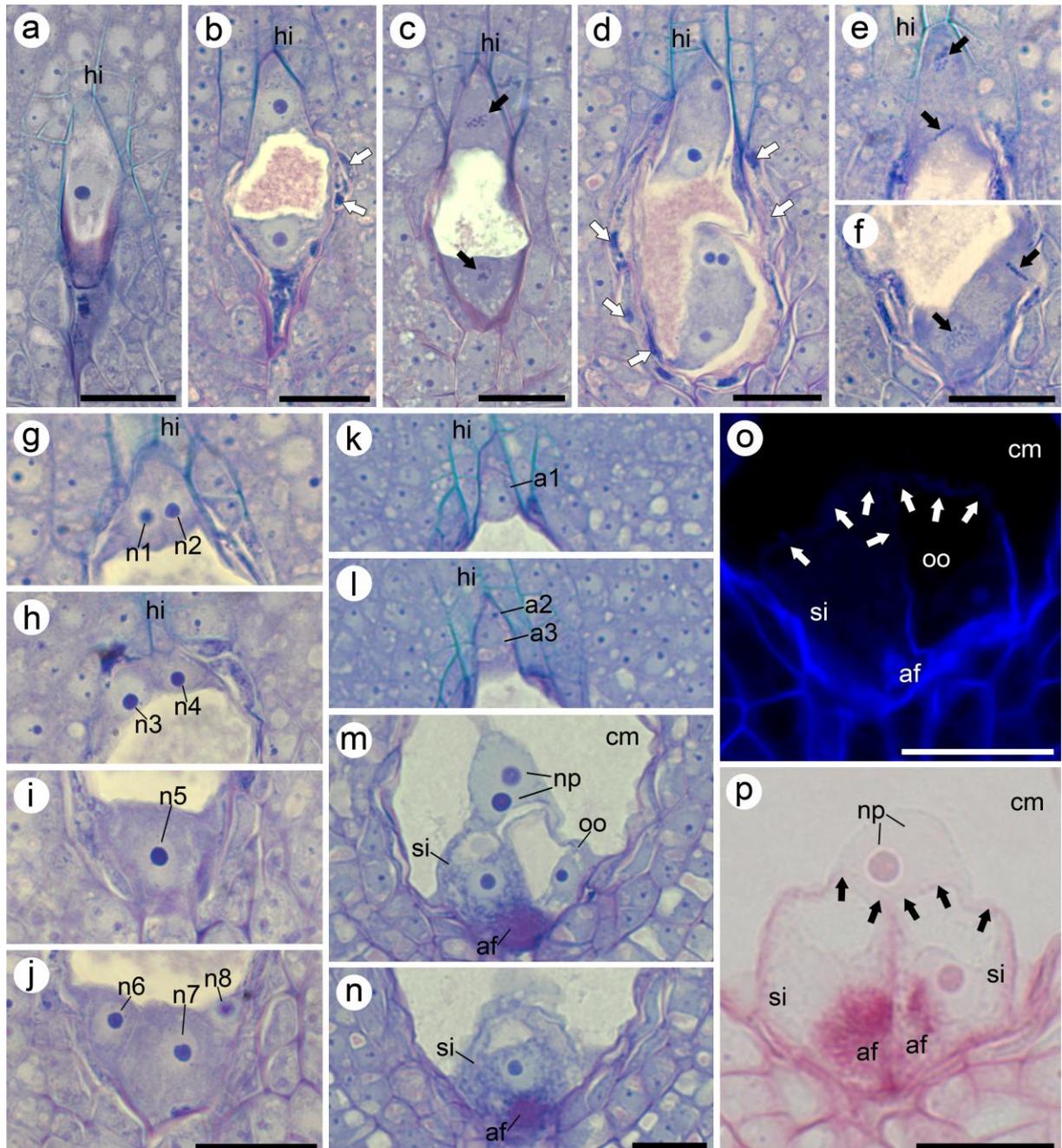


Fig. 2. Ginogametogênese em *Billbergia nutans*. **a.** Gametófito feminino uninucleado. **b.** Gametófito feminino binucleado (setas brancas: células nucleares degeneradas). **c.** Segundo ciclo mitótico em anáfase (setas pretas) **d.** Gametófito feminino tetranucleado (setas brancas: células nucleares degeneradas). **e, f.** Detalhes do terceiro ciclo mitótico com quatro placas de metáfase (setas pretas), em seções seriadas. **g-j.** Detalhes do gametófito feminino octonucleado celularizado, em seções seriadas. **k-n.** Detalhes do gametófito feminino maduro, em seções seriadas. **o, p.** Aparelho oosférico corado com Calcofluor White e Vermelho de Rutênio, respectivamente, indicando porção distinta da parede celular (setas). a1-a3: antípoda; af: aparelho fibrilar; cm: célula-média; hi: hipóstase; n1-n8: núcleo; np: núcleo polar; oo: oosfera; si: sinérgide. Barras= 20µm.

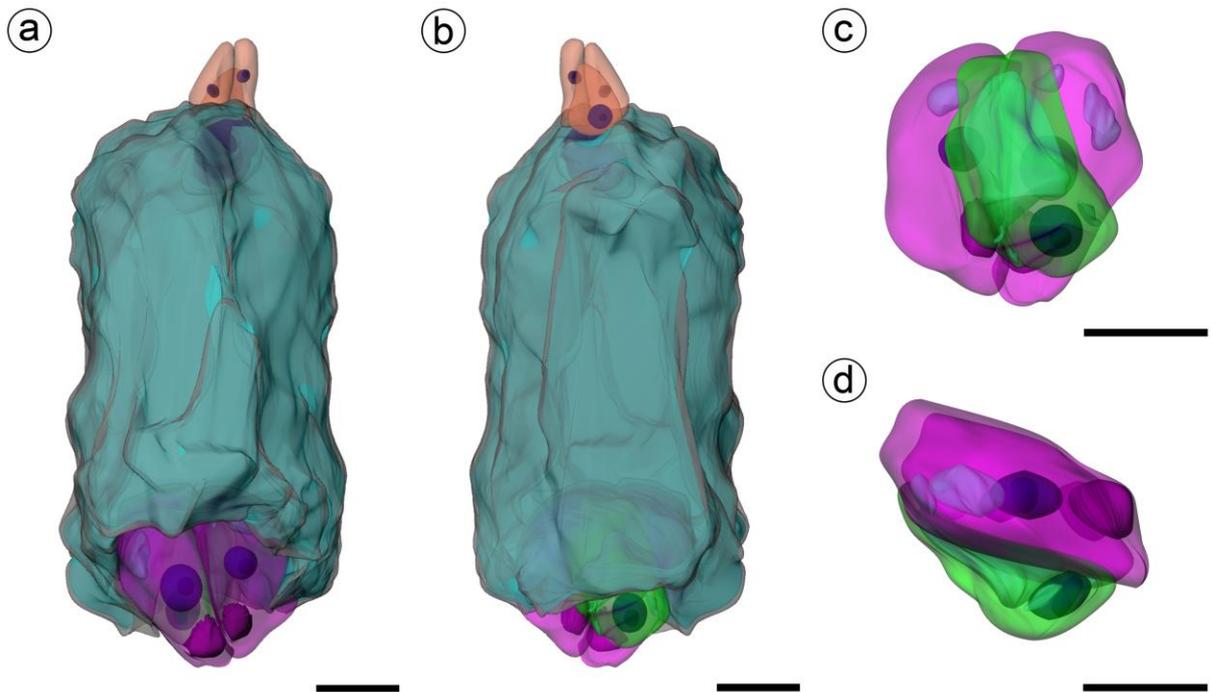


Fig. 3. Reconstrução tridimensional do gametófito feminino maduro em *Billbergia nutans*, com os núcleos polares em uma posição calazal. **a, b.** Gametófito feminino, em vista frontal. **c.** Aparelho oosférico em vista frontal, mostrando a oosfera com o núcleo em posição micropilar. **d.** Aparelho oosférico em vista lateral. Em cada figura, a célula-média é cinza, as sinérgides são rosa, os aparelhos fibrilares são rosa-escuro, a oosfera é verde, as antípodas são laranja-claro, os vacúolos são azul-claro e os núcleos e nucléolos são azul-escuro. Barras= 20 μ m.

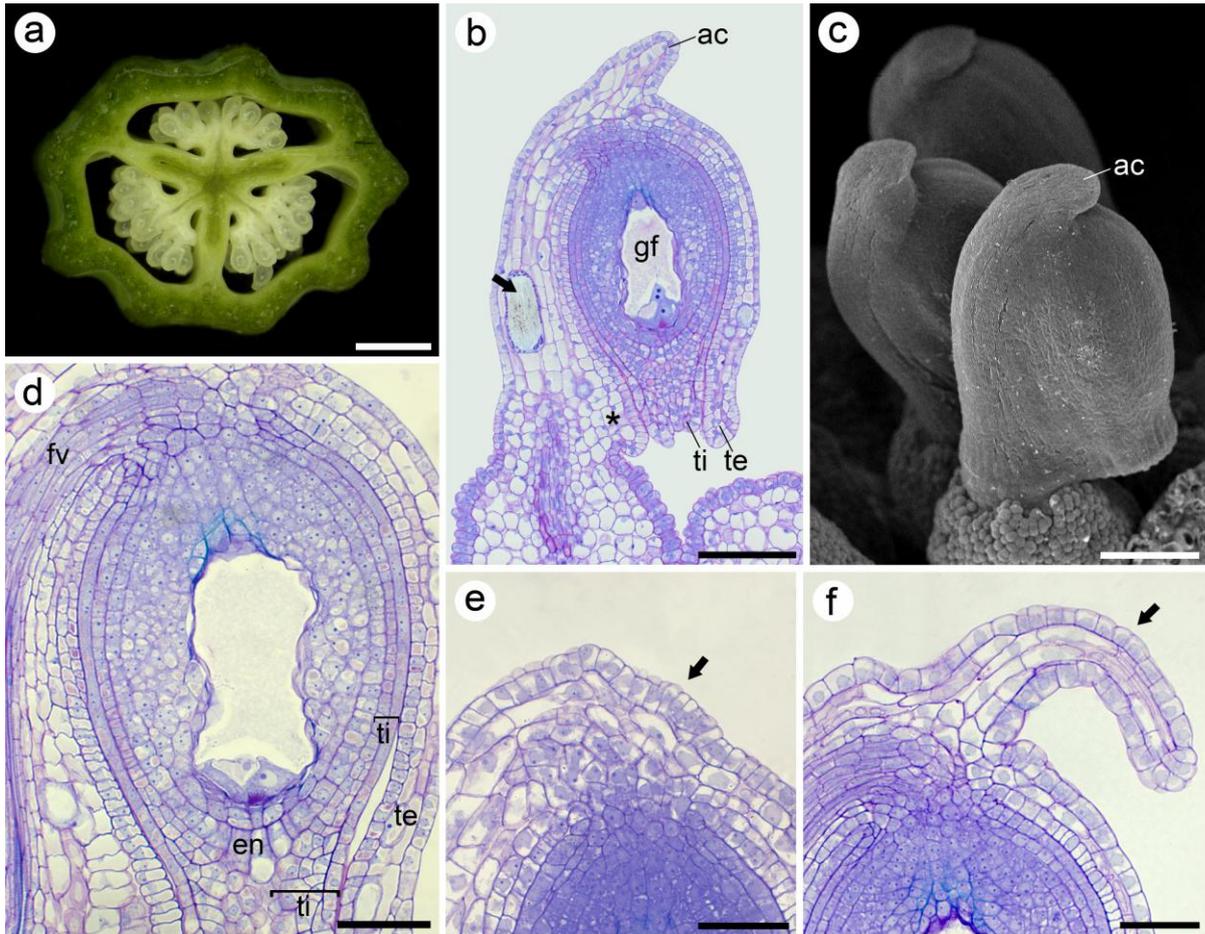


Fig. 4. Ovário de *Billbergia nutans*. **a.** Ovário em seção transversal, mostrando os três carpelos, três lóculos e placentação axial com muitos rudimentos seminiais. **b, c.** Rudimento seminal com apêndice calazal de comprimento intermediário e curvo em direção à anti-rafe (seta: idioblasto contendo ráfides; asterisco: tegumento externo fusionado ao funículo), em seção longitudinal (em seu plano de simetria) e M.E.V., respectivamente. **d.** Parte do rudimento seminal em detalhe. **e, f.** Apêndice calazal vestigial e alongado e curvo (seta), respectivamente. ac: apêndice calazal; en: epiderme nucelar; fv: feixe vascular; gf: gametófito feminino; te: tegumento externo; ti: tegumento interno. Barras= 1mm (a); 100 μ m (b, c); 50 μ m (d-f).

CAPÍTULO IV

Imunolocalização de pectinas e proteínas arabinogalactanos no rudimento seminal e obturador de *Billbergia nutans* (Bromeliaceae, Poales) antes e após a fecundação

Resumo

O gineceu desempenha um papel fundamental na reprodução das angiospermas. Porém, as interações pólen-pistilo no interior do ovário são pouco estudadas. As pectinas e as proteínas arabinogalactanos (AGPs) têm sido identificadas como componentes de parede celular importantes durante os processos reprodutivos. Este estudo visa identificar as pectinas e AGPs no rudimento seminal e obturador de *Billbergia nutans* (Bromeliaceae, Poales) antes e após a fecundação, a fim de acrescentar dados sobre a dinâmica química no ovário e verificar a distribuição dessas moléculas em uma monocotiledônea comelinídea, em uma perspectiva comparativa. Em estágio anterior à polinização, estão presentes homogalacturonanos (HGs) parcialmente metil-esterificados (JIM7), arabinanos (LM6), galactanos (LM5) e AGPs (JIM8, JIM13) nos rudimentos seminais, e HGs parcialmente metil-esterificados (JIM7) e galactanos (LM5) no obturador. Após a fecundação, ocorrem algumas modificações nesses tecidos, especialmente o desaparecimento da marcação com o JIM8. A modulação espacial encontrada entre arabinanos, galactanos e AGPs no ovário de *B. nutans* demarca a trajetória porogâmica do tubo polínico em direção ao gametófito feminino. Possíveis funções para esses compostos são discutidas. A presença dessas moléculas antes da polinização demonstra que sua produção é regulada pelo desenvolvimento. A detecção química dessa trajetória tem sido observada em rudimentos seminais de outras espécies de angiospermas. Entretanto, cada espécie possui um conjunto específico de epitopos, aparentemente não relacionado a sua posição filogenética. A ocorrência de galactanos e a distribuição singular de arabinanos no rudimento seminal, assim como a marcação de pectinas e ausência de AGPs no obturador de *B. nutans*, destacam-se como dados inéditos para a literatura. São mostradas evidências para relações das pectinas e AGPs nas interações pólen-pistilo dentro do ovário, as quais provavelmente envolvem sucessivos sinais direcionais para a atração do tubo polínico.

Palavras-chave: AGPs, Bromeliaceae, imunolocalização, ovário, pectinas

Introdução

O gineceu desempenha um papel fundamental na reprodução sexuada das angiospermas, através de múltiplas funções. As interações pólen-pistilo envolvem sinais de reconhecimento, crescimento heterotrófico do tubo polínico através do tecido transmissor e orientação dos tubos polínicos em direção aos rudimentos seminiais (Herrero & Hormaza, 1996; Sanchez *et al.*, 2004). Diversos estudos indicam que o gineceu fornece sinais químicos para a atração dos tubos polínicos ao longo de sua trajetória (Chao, 1979; Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995; Higashiyama *et al.*, 2001; Lord, 2003; Kim *et al.*, 2003; Palanivelu *et al.*, 2003; Martón *et al.*, 2005). Muitos mecanismos têm sido descritos tanto no estigma quanto no estilete, os quais sustentam o pressuposto dessa estratégia. Entretanto, poucos estudos foram realizados com enfoque na porção ovariana do gineceu, os quais também sugerem uma intensa interação com o gametófito masculino nessa região (Cheung & Wu, 1999; Herrero, 2000; Higashiyama *et al.*, 2001; Martón *et al.*, 2005). Muitos táxons apresentam um tecido transmissor ovariano, denominado obturador (Tilton & Horner, 1980), porém o conhecimento sobre a sua função ainda é bastante restrito (Herrero, 2000).

As paredes celulares vegetais são estruturas altamente complexas e dinâmicas, as quais são essenciais para o desenvolvimento celular e o crescimento dos órgãos (Knox, 2008). Essas estruturas podem controlar o metabolismo e o desenvolvimento celular e determinar as interações célula-célula (Pennell, 1998). Nesse contexto, análises da parede celular em estruturas reprodutivas têm revelado dados importantes com relação ao desenvolvimento embriológico e às interações pólen-pistilo, como os estudos de Pennell *et al.* (1991), Jauh & Lord (1996), Coimbra & Duarte (2003) e Coimbra *et al.* (2007). Assim, a investigação da composição das paredes celulares do gineceu pode aprimorar a compreensão sobre o tópico das interações pólen-pistilo, como os tipos de moléculas associadas com as diferentes células

e tecidos, suas dinâmicas e possíveis funções. Atualmente, as técnicas de imunolocalização constituem um dos melhores métodos para discernir aspectos das microestruturas de parede celular e localizar os polímeros *in situ* no interior dos tecidos (Willats *et al.*, 2000; Knox, 2008).

Entre os componentes de parede celular, as pectinas constituem a família de polissacarídeos mais complexa estruturalmente na natureza, compondo aproximadamente 35% das paredes celulares primárias na maioria das angiospermas, 2-10% das paredes celulares primárias em gramíneas e outras monocotiledôneas comelinídeas e até 5% das paredes celulares em tecidos lignificados (Mohnen, 2008). As pectinas apresentam diferentes domínios de glicanos, sendo os mais conhecidos os homogalacturonanos (HG) e os ramnogalacturonanos I (RGI). Os HG são homopolímeros lineares, nos quais alguns grupos carboxílicos são metil-esterificados. Já os RGI apresentam um esqueleto ligado a diversas cadeias glicanas, principalmente arabinanos e galactanos (Ridley *et al.*, 2001; Willats *et al.*, 2006; Caffall & Mohnen, 2009). A complexidade da estrutura péctica proporciona uma multiplicidade de epitopos que, por sua vez, são responsáveis por funções únicas no crescimento e desenvolvimento vegetal (Ridley *et al.*, 2001; Mohnen, 2008). As pectinas também são fundamentais em processos relacionados aos órgãos reprodutivos, como o crescimento de tubos polínicos, a hidratação de sementes e o desenvolvimento de frutos (Willats *et al.*, 2001; Mohnen, 2008). Ademais, são apontadas como moléculas importantes para a adesão dos tubos polínicos ao tecido transmissor (Jauh & Lord, 1996).

As proteínas arabinogalactanos (AGPs) têm sido tradicionalmente definidas como uma classe de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) que consistem de um esqueleto protéico altamente glicosilado por carboidratos complexos ricos em galactose e arabinose (Showalter, 1993; Du *et al.*, 1996a; Showalter, 2001; Seifert & Roberts, 2007). As AGPs estão localizadas, em geral, nas membranas plasmáticas, paredes celulares e secreções

(Showalter, 2001), e estão possivelmente envolvidas na sinalização célula-célula, interações célula-matriz, adesão célula-célula, reconhecimento célula-célula e identidade celular (Pennell *et al.*, 1991; Showalter, 1993; Du *et al.*, 1996a; Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000). As AGPs são extremamente abundantes nos tecidos reprodutivos, e com relação ao gineceu existe uma série de dados sobre o estigma e o estilete, enquanto são raras as informações sobre o ovário (Cheung & Wu, 1999), o que reflete a escassez generalizada de dados acerca dos tecidos ovarianos no contexto das interações pólen-pistilo, como mencionado anteriormente. De acordo com Costa *et al.* (2013), a maioria das pesquisas que dizem respeito às AGPs estão focadas em organismos modelo como *Arabidopsis*, de modo que estudos comparativos de um amplo espectro filogenético de espécies são necessários para a compreensão da diversidade dessas proteínas e suas funções.

Os estudos de imunolocalização que descrevem a composição química dos rudimentos seminiais em angiospermas estão centrados na detecção de AGPs (Pennell *et al.*, 1991; Coimbra & Salema, 1997; Coimbra & Duarte, 2003; Chudzik *et al.*, 2005; Coimbra *et al.*, 2007; Chudzik *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013), sendo que apenas Costa *et al.* (2013) incorporaram as pectinas como moléculas alvo de sua investigação. Além disso, esses estudos não incluem qualquer representante da ordem Poales, nem mesmo do grupo de monocotiledôneas comelinídeas *sensu* APG (2009). Esses grupos taxonômicos são conhecidos por conter uma composição de parede celular peculiar, em comparação com as demais angiospermas (Smith & Harris, 1999; Popper, 2008; Mohnen, 2008). Considerando a atual posição filogenética de Bromeliaceae, como a família que divergiu mais cedo dentro de Poales (Givnish *et al.*, 2010), torna-se muito interessante a investigação dessa família com o propósito de comparação de determinadas características das plantas com flores.

Billbergia nutans H. Wendl. ex Regel (Bromeliaceae) é umas das bromélias mais amplamente cultivadas. Essa espécie possui ovário tricarpelar, trilocular e ínfero, com um

obturador revestindo a placenta (Fagundes & Mariath, 2010). As investigações sobre a ontogenia do rudimento seminal e o processo de fecundação mostram que essa espécie possui uma trajetória porogâmica dos tubos polínicos, e que o obturador sofre modificações estruturais em função de sua atividade secretora durante o período de abertura da flor (Fagundes & Mariath, resultados não publicados).

O objetivo deste estudo é identificar os epitopos de pectinas e de AGPs no rudimento seminal e obturador de *Billbergia nutans* (Bromeliaceae, Poales) antes e após a fecundação, a fim de aprofundar o conhecimento sobre os compostos químicos envolvidos das interações pólen-pistilo no interior do ovário, bem como sua dinâmica, e verificar o padrão de distribuição dessas moléculas em uma monocotiledônea comelinídea, pertencente a Poales, em comparação às demais angiospermas.

Material e métodos

Material botânico e microscopia de luz

Botões florais próximos de sua abertura e flores em pós-antese foram obtidos a partir da Coleção Viva de Bromeliaceae do Jardim Botânico de Porto Alegre, sob o número de registro BROM 00739, e a partir da coleção viva do Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob o número CV 0434 com exsicata depositada no Herbário ICN da mesma instituição (ICN 190646). De acordo com os estudos realizados com a espécie, mencionados anteriormente, dois estádios bem definidos do ovário foram estabelecidos para este estudo: i) estágio anterior à polinização, com rudimentos seminais maduros, contendo um gametófito do tipo *Polygonum*, e obturador (Fig. 1a-b) e ii) estágio posterior à fecundação, com a presença de rudimentos seminais com zigoto e

endosperma bicelular, tubos polínicos visíveis, e obturador com paredes celulares labirínticas e produção de exsudato (Fig. 1c-d).

Para a preparação das seções histológicas, o material botânico foi fixado em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976), e lavado em tampão fosfato de sódio, 0,1M, pH 7,2 e, após, em água destilada. Foi realizada desidratação em série etílica ascendente e inclusão com resina LR White Hard Grade (London Resin Company) em cápsulas de gelatina. As seções foram confeccionadas com 4µm de espessura, utilizando-se micrótomo de rotação Zeiss, Microm HM 340 E, distendidas em lâminas de vidro e coradas com Azul de Toluidina O 0,05%, pH 4,4, (Feder & O'Brien, 1968) para microscopia de luz. Algumas lâminas foram reservadas para a imunolocalização de pectinas e AGPs com anticorpos monoclonais (MAbs).

Imunolocalização de pectinas e AGPs

Os anticorpos monoclonais utilizados para o reconhecimento de epitopos de pectinas (JIM5, JIM7, LM5, LM6) e de AGPs (JIM8, JIM13) estão descritos na Tab. 1. Esses MAbs foram fornecidos pelo Dr. Paul Knox, do Centre for Plant Sciences, da Universidade de Leeds, Reino Unido.

Para a marcação das seções com os anticorpos monoclonais, as lâminas foram tratadas com solução de proteína de leite (PL) em pó desnatado 3% em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, durante 30 minutos, com posterior lavagem em PBS. Realizou-se a incubação com o anticorpo primário (diluído 1:10 em PL/PBS) por 2 horas. Após lavagem em PBS, foi feita a incubação com o anticorpo secundário anti-rat-IgG conjugado com FITC (Sigma) (diluído 1:100 em PL/PBS) por 1 hora em câmara escura, seguido por outra lavagem em PBS. Posteriormente, as lâminas foram montadas com anti-fade constituído por 0,1% de para-fenilediamina (PPD) (Sigma), 10% de tampão fosfato de sódio 10 mM com 0,15 M de NaCl e

90% de glicerol. As análises foram realizadas em epifluorescência no microscópio Leica DMR HC (filtro de excitação 450-490nm), com câmera fotográfica digital Leica DFC 500 e programa de captura de imagens Leica Application Suite – LAS, versão 3.8.

O controle foi verificado pela omissão da etapa de incubação com o anticorpo primário. Para as seções incubadas com anticorpos monoclonais anti-pectinas, também foi feito um tratamento enzimático para remoção de homogalacturonanos (HG) anterior à incubação com os MAbs, como outra forma de controle. Esse pré-tratamento foi realizado com a incubação das seções em solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 0,1M, pH 11,4, por 2 horas, lavagem em PBS, incubação com pectato liase (de *Aspergillus* sp., Megazyme) em tampão Tris-HCl (diluição de 1:100), pH 8,0, por 2 horas, com posterior lavagem em PBS (Hervé *et al.*, 2011).

Resultados

Estádio anterior à polinização

No ovário em estágio anterior à polinização de *Billbergia nutans*, existem padrões de localização distintos entre os epitopos analisados. HGs parcialmente metil-esterificados (JIM7) estão amplamente distribuídos nas paredes celulares do rudimento seminal (Fig. 2a). No nucelo, essa marcação é intensa na região micropilar e ao redor do gametófito feminino e é fraca ou ausente nas demais regiões (Fig. 2a). Arabinanos (LM6) são evidentes nas paredes das células do gametófito feminino, no tecido nucelar ao redor do gametófito feminino e na região micropilar do nucelo, incluindo a epiderme nucelar (Fig. 2b). Os galactanos (LM5) estão presentes nas mesmas regiões do nucelo em que ocorrem os arabinanos, e também na região micropilar dos tegumentos (Fig. 2c). A localização de galactanos nas paredes da epiderme nucelar ocorre de maneira mais restritiva, em relação aos arabinanos (Fig. 2b-c). As

AGPs mostram diferentes distribuições de acordo com o anticorpo utilizado, de modo que JIM13 marcou as paredes celulares do gametófito feminino e o nucelo ao seu redor (Fig. 2d) e JIM8 detectou AGPs delimitando o canal micropilar (Fig. 2e). O aparelho fibrilar (Fig. 2a-b, d-e, ver detalhes) consiste de HGs parcialmente metil-esterificados (JIM7) e de AGPs (JIM8, JIM13) distribuídos de forma heterogênea, concentrados na sua região apical (Fig. 2a, d-e), e de arabinanos (LM6) distribuídos de forma homogênea (Fig. 2b). Nas paredes celulares do obturador, assim como na placenta, são detectados HGs parcialmente metil-esterificados (JIM7) com ampla distribuição (Fig. 2f). Os galactanos (LM5) também estão amplamente distribuídos nas paredes celulares do obturador e placenta, com marcação intensa no tecido vascular, especificamente no floema (Fig. 2g).

Estádio posterior à fecundação

Após a fecundação, a distribuição dos epitopos de pectinas e AGPs detectados pelos anticorpos monoclonais são muito similares ao estágio anterior, com apenas algumas modificações. No rudimento seminal, os arabinanos (LM6) mantêm uma distribuição semelhante neste estágio, ocorrendo nas células do gametófito feminino, incluindo o zigoto, e na epiderme nucelar, porém desaparecem do tecido nucelar ao redor do gametófito feminino (Fig. 3a). Do mesmo modo, os galactanos (LM5) apresentam uma distribuição similar ao estágio anterior, ocorrendo também nas paredes celulares do zigoto (Fig. 3b). As AGPs reconhecidas pelo JIM13 estão presentes como no estágio anterior, incluindo a marcação no zigoto (Fig. 3c), porém as AGPs reconhecidas pelo JIM8 não são mais detectadas no canal micropilar. No aparelho fibrilar (Fig. 3a, c), a marcação com o LM6 para arabinanos apresenta-se mais intensa (Fig. 3a), e a marcação com o JIM8 para AGPs desaparece. No obturador e placenta, HGs parcialmente metil-esterificados (JIM7) e galactanos (LM5) estão amplamente distribuídos, inclusive nas paredes celulares labirínticas e no exsudato

proveniente das células do obturador (Fig. 3d-e). Arabinanos (LM6) estão presentes no obturador durante este estágio, apesar da fraca marcação (Fig. 3f). As paredes celulares dos tubos polínicos exibem HGs parcialmente metil-esterificados (JIM7), arabinanos (LM6) (Fig. 3a) e AGPs com fraca marcação (JIM13) (Fig. 3c, ver detalhe). A marcação com JIM13 ocorre ao longo da parede do tubo polínico, mas não foi detectada na sua porção apical em contato com o rudimento seminal (Fig. 3c).

Não houve marcação com o JIM5, em nenhum dos dois estádios.

Discussão

Imunolocalização de pectinas e AGPs no rudimento seminal e obturador de *Billbergia nutans*

Neste estudo, a modulação espacial encontrada entre epitopos de pectinas – arabinanos e galactanos – e de AGPs nos tecidos do ovário de *B. nutans* claramente delimita a trajetória porogâmica do tubo polínico em direção ao gametófito feminino. Cada um desses epitopos de pectinas e AGPs mostra uma distribuição particular e, quando analisados de forma conjunta, evidenciam a trajetória do tubo polínico.

Tendo em vista os padrões de localização obtidos neste estudo, determinadas funções são consideradas e discutidas para os epitopos de pectinas e de AGPs. Um declínio na expansibilidade da parede celular e um aumento no enrijecimento da parede têm sido correlacionados com um aumento de complexos HG-cálcio, derivados de HGs não esterificados (Caffall & Mohnen, 2009). Nos frutos de *Phaseolus vulgaris*, os HGs aumentam constantemente durante a expansão celular. Durante a maturação e senescência desses frutos, os HGs continuam a acumular, com demetilação, facilitando a formação dos complexos HG-cálcio (Stolle-Smits *et al.*, 1999). Levando em consideração que o MAb JIM7 liga-se a epitopos de pectinas com relativa alta metil-esterificação (Knox *et al.*, 1990; Clausen *et al.*,

2003), a distribuição de HGs marcados pelo JIM7 nos rudimentos seminiais maduros de *B. nutans* pode ser fundamental para a expansibilidade da parede celular no rudimento seminal como um todo durante o desenvolvimento da semente, com a exceção das regiões nucleares não marcadas ou fracamente marcadas, que estão destinadas à degradação durante esse processo.

Os arabinanos e os galactanos têm sido identificados como polímeros altamente móveis através de interações com a água (Fenwick *et al.*, 1999; Renard & Jarvis, 1999; Ha *et al.*, 2005). Embora as funções específicas desses polímeros nas paredes celulares não estejam claras, várias linhas de evidências implicam RGI, o esqueleto péctico para os arabinanos e galactanos, na regulação das propriedades mecânicas da parede celular (McCartney *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2003, 2005; Moore *et al.*, 2006, 2008; Verhertbruggen *et al.*, 2009, 2013). Jones *et al.* (2003, 2005) demonstraram que os arabinanos pécticos são essenciais para a manutenção da flexibilidade das células-guarda e da abertura e fechamento estomático em uma gama de espécies, incluindo as comelinídeas *Zea mays* e *Commelina communis*. Na planta da ressurreição *Myrothamnus flabellifolia*, Moore *et al.* (2006, 2008) revelaram que as paredes celulares são capazes de extrema flexibilidade em resposta à perda de água, o que se considera estar ligado ao fato de que essas paredes celulares são constitutivamente protegidas e ricas em arabinose, provavelmente arabinanos e/ou arabinogalactanos. No rudimento seminal de *B. nutans*, considerando que o tubo polínico penetra a região micropilar do nucelo através do apoplasto, essas células nucleares necessitam de uma arquitetura de parede celular flexível, a fim de permitir a passagem do tubo polínico. Essa precisa região do nucelo coincide com a distribuição específica de cadeias laterais de RGI, especialmente arabinanos, indicando que esses polímeros podem estar relacionados à elasticidade da parede celular, nesse caso, em estruturas reprodutivas.

As proteínas arabinogalactanos possuem múltiplas funções no crescimento e desenvolvimento vegetativo, reprodutivo e celular (Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000; Showalter, 2001; Seifert & Roberts, 2007). Muitos cenários ou modelos podem ser visualizados onde as AGPs servem como moléculas de sinalização celular e/ou adesão celular envolvidas em variados aspectos do crescimento e desenvolvimento (Showalter, 2001). Com relação à reprodução sexual das plantas, muitas observações levaram a hipóteses de que as AGPs presentes no gineceu atuam no reconhecimento celular, na adesão celular, e na nutrição e orientação do tubo polínico (Cheung & Wu, 1999). Com a utilização do reagente Yariv, foi demonstrado que os tecidos do ovário de duas espécies de *Nicotiana* apresentam quantidade significativa de AGPs (Gane *et al.*, 1995; Cheung & Wu, 1999). Em *Nicotiana alata*, o nível de mRNA do gene *AGPNa3* é máximo nos pistilos maduros e, cinco dias depois, declina para um nível muito baixo (Du *et al.*, 1996b). Outros resultados indicam que *AGP18*, um gene que codifica uma proteína arabinogalactano, é essencial para o estabelecimento da fase gametofítica feminina em *Arabidopsis* (Acosta-García & Vielle-Calzada, 2004). Em *B. nutans*, a distribuição de AGPs delimitando a trajetória do tubo polínico em rudimentos seminiais maduros aponta para possíveis funções no processo de chegada do tubo polínico que leva à fecundação, como suporte bioquímico ou sinalização direcional para o tubo polínico atingir seu alvo, bem como adesão celular, em acordo com as descobertas mais recentes com relação às AGPs.

Numerosas investigações demonstram que a expressão das AGPs é regulada pelo desenvolvimento, tanto no espaço quanto no tempo (Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000). De acordo com Pennell *et al.* (1991), a expressão do epitopo correspondente ao JIM8 é lábil, sendo regulada temporalmente e espacialmente de uma forma complexa durante o curto período que leva à fecundação. A partir dos resultados obtidos neste estudo, nós corroboramos essa informação com respeito à modulação temporal do epitopo identificado por JIM8, já que

esse apresentou a modificação mais marcante no rudimento seminal de *B. nutans*, estando presente no canal micropilar e no aparelho fibrilar antes da polinização e desaparecendo totalmente logo após a fecundação. Esse epitopo pode estar intimamente ligado ao processo de fecundação em *B. nutans*.

Com base na histoquímica, o aparelho fibrilar parece estar composto por celulose, hemiceluloses, pectinas, calose e proteínas (Huang & Russell, 1992). Como o aparelho fibrilar aumenta muito a área de superfície da membrana plasmática no pólo micropilar da sinérgide e o citoplasma próximo contém uma alta concentração de organelas secretoras, acredita-se que essa estrutura facilite o transporte de substâncias para o interior e para o exterior das sinérgides (Punwani & Drews, 2008). A proposta de que as sinérgides são fonte de um atrativo para o tubo polínico foi confirmada recentemente em *Torenia*, visto que os rudimentos seminais cujas sinérgides sofreram ablação falharam em sua função atrativa (Higashiyama *et al.*, 2001). O aparelho fibrilar mostra, com frequência, uma organização bastante complexa e uma estrutura heterogênea, com uma região central densa e uma região translúcida periférica (Willemse & van Went, 1984; Huang & Russell, 1992) as quais consistem, respectivamente, de um conjunto de microfibrilas firmemente arranjadas e uma menor quantidade de microfibrilas organizadas de modo mais frouxo (Schulz & Jensen, 1968). Na bromélia *Pitcairnia encholirioides*, Mendes (2012) descreve duas regiões distintas no aparelho fibrilar antes da entrada do tubo polínico, a matriz densa constituída de HGs parcialmente metil-esterificados e mananos e a matriz translúcida composta de xiloglucanos e AGPs reconhecidas pelo JIM13. *Billbergia nutans* revela uma composição heterogênea, mas não exatamente bifásica, do aparelho fibrilar, com pectinas e AGPs ocorrendo em diferentes regiões da estrutura, de modo que a concentração de AGPs na sua região apical pode indicar um papel na sinalização para o tubo polínico, enquanto a distribuição uniforme de arabinanos pode ser indispensável para a flexibilidade da parede celular, como já discutido anteriormente,

a fim de permitir ou facilitar a entrada do tubo polínico no interior da sinérgide. Ainda neste estudo, a presença de HGs reconhecidos pelo JIM7 pode estar relacionada à expansibilidade da parede celular, em acordo com o que já foi exposto.

Quanto à parede celular do tubo polínico, a distribuição de HGs, arabinanos e AGPs reconhecidas pelo JIM13 em *B. nutans* pode apontar funções discutidas acima, como a sinalização celular na interface gametófito feminino/masculino e a flexibilidade de parede para o crescimento do tubo polínico através da rota apoplástica que compreende o tecido nucelar e o aparelho fibrilar. É interessante assinalar que a composição de parede celular detectada pelo uso de MAbs em *B. nutans* é muito similar entre o tubo polínico e o aparelho fibrilar, o que pode representar um fator essencial para a interação dos gametófitos. Entre os vários anticorpos monoclonais para AGPs, a presença de epitopos reconhecidos pelo JIM13 e pelo LM2 é recorrente na parede celular dos tubos polínicos das famílias analisadas (Nguema-Ona *et al.*, 2012). A ocorrência de epitopos de RGI nas paredes celulares dos tubos polínicos também tem sido detectada em outras angiospermas, em quantidades significativas. Um estudo recente sobre as paredes celulares dos tubos polínicos em *Arabidopsis thaliana* revelou que o total de resíduos galactosil abrange quantidades semelhantes de resíduos arabinogalactanos tipo-I e tipo-II, típicos de RGI e AGPs, respectivamente (Dardelle *et al.*, 2010). Em *A. thaliana*, essas AGPs são reconhecidas pelo MAC207 e LM2, e não o são pelo JIM13 e JIM8, o que difere de *B. nutans* (Pereira *et al.*, 2006). Nos tubos polínicos de *Nicotiana glauca*, o extrato total de parede celular é composto, principalmente, por arabinanos e calose, com pequenas quantidades de celulose e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (Rae *et al.*, 1985), de modo que as AGPs, se existentes, são consideradas como uma parte não significativa das paredes celulares. Assim, os estudos focados na caracterização bioquímica da parede celular do tubo polínico, ao todo, indicam que as AGPs ocorrem nessas paredes

celulares e que existe uma variação na quantidade, estrutura e extensão dessas AGPs (Nguema-Ona *et al.*, 2012).

Em *B. nutans*, os epitopos de AGPs e pectinas que delineiam a trajetória do tubo polínico ocorrem em flores ainda não polinizadas, o que sugere que a produção dessas moléculas não é desencadeada pela polinização, mas regulada pelo desenvolvimento. Essa característica também foi observada para epitopos de AGPs em *Galtonia candicans* (Asparagaceae), *Oenothera hookeri* (Onagraceae), *Sinapis alba* (Brassicaceae) (Chudzik *et al.*, 2005) e *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) (Coimbra & Salema, 1997). Um resultado distinto foi encontrado em *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), na qual a marcação para AGPs ocorreu apenas em flores polinizadas (Chudzik *et al.*, 2005). Esse contraste representa diferentes estratégias reprodutivas entre as angiospermas, o que suscita questões sobre as razões biológicas e as vantagens adaptativas dessas linhas evolutivas. Seriam as espécies com arcabouço químico pronto antes da polinização as que possuem maior garantia na concretização da fecundação, de modo que seu gasto de energia na produção de moléculas não seria em vão?

Panorama sobre a imunolocalização do rudimento seminal e obturador nas plantas com sementes

Pennell *et al.* (1991) demonstraram em *Brassica napus* que o epitopo de AGPs identificado pelo MAb JIM8 é característico de células associadas com o processo de gametogênese e reprodução sexual, como os gametas e outras células sexuais e somáticas nas anteras e rudimentos seminiais, assim como o embrião. Na última década, o conhecimento quase ausente sobre as moléculas específicas presentes nos rudimentos seminiais aumentou largamente. Por meio da imunolocalização, relata-se principalmente a presença de epitopos de AGPs delimitando a trajetória do tubo polínico dentro do ovário em diferentes espécies de

angiospermas (Coimbra & Salema, 1997; Coimbra & Duarte, 2003; Chudzik *et al.*, 2005; Coimbra *et al.*, 2007; Chudzik *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013), que incluem grupos cedo-divergentes, monocotiledôneas e eudicotiledôneas segundo APG (2009). Nos rudimentos seminiais da gimnosperma *Larix decidua* (Pinaceae), também foi observada uma distribuição espacial de epitopos de HGs e AGPs que pode ser essencial para o tubo polínico atingir o seu alvo, como o acúmulo de HGs na porção apical das células do pescoço do arquegônio e a distribuição de AGPs no nucelo do rudimento seminal maduro (Rafinska & Bednarska, 2011).

Entretanto, existem diferenças entre as espécies quanto à distribuição dos vários epitopos nas distintas regiões do ovário, o que resulta em um conjunto específico de epitopos presente em cada espécie (Tab. 2). Nesse contexto, não foi encontrada nenhuma relação entre o conjunto de epitopos e a posição filogenética das espécies. Por exemplo, as espécies pertencentes à mesma ordem, como em Asparagales ou Brassicales, revelam padrões distintos de distribuição de epitopos de AGPs reconhecidos por JIM8 e JIM13. Dessa forma, embora seja evidente a delimitação química da trajetória do tubo polínico como uma característica em comum entre as angiospermas, cada espécie desenvolveu uma estratégia própria, incluindo compostos químicos específicos em diferentes regiões especializadas.

Com relação aos epitopos pécticos, a ocorrência de galactanos (LM5) e a distribuição singular de arabinanos (LM6) na trajetória do tubo polínico apresentados neste estudo destacam-se como novos resultados para a literatura. Até o momento atual, a marcação pelo LM6 em tecidos do rudimento seminal foi demonstrada somente uma vez, na parede celular do gametófito feminino maduro de *Trithuria submersa*, uma angiosperma cedo-divergente (Costa *et al.*, 2013). Todavia, esse resultado não é tão conspícuo quanto ao constatado em *B. nutans* em relação à trajetória do tubo polínico, já que nessa espécie tal marcação evidencia exatamente a entrada nucelar para o interior do rudimento seminal (Tab. 2). Quanto à especificidade do MAb LM6, em que os arabinanos identificados são considerados parte das

cadeias laterais de RGI, é importante ressaltar que o LM6 também pode se ligar a AGPs (Lee *et al.*, 2005). No que se refere aos epitopos de HGs, a marcação principal com JIM5 e JIM7 em *T. submersa* ocorre na parede celular do gametófito feminino (Costa *et al.*, 2013), o que diverge totalmente do observado em *B. nutans*, com distribuição ausente e ampla, respectivamente, para o JIM5 e o JIM7 (Tab. 2).

O obturador é uma estrutura especializada que favorece o crescimento dos tubos polínicos no interior do ovário, sendo registrada em muitos grupos taxonômicos não relacionados (Tilton & Horner, 1980). Há poucas informações disponíveis sobre a estrutura e composição química das células do obturador, especialmente no que se refere à imunolocalização (Tab. 2). Em *Actinidia deliciosa* (Actinidiaceae), os epitopos de AGPs identificados pelo JIM8, JIM13 e MAC207 são evidentes no obturador (Coimbra & Duarte, 2003). No ovário de *Nicotiana glauca* (Solanaceae), observou-se a presença de AGPs associadas, sobretudo, à epiderme da placenta, pela utilização do reagente de Yariv (Gane *et al.*, 1995). Surpreendentemente, a bromélia *B. nutans* apresenta um padrão bastante distinto referente à composição das paredes celulares e exsudato do obturador, com a ocorrência de pectinas, com destaque para os galactanos (LM5), enquanto os epitopos de AGPs (JIM8 and JIM13) estão ausentes.

As paredes celulares labirínticas são estruturas características de células de transferência, as quais são especializadas para o transporte de solutos em diferentes tecidos vegetais (Offler *et al.*, 2003). As informações obtidas neste capítulo sobre a composição dessas paredes labirínticas complementam os dados obtidos no Capítulo II desta tese. Um estudo de imunolocalização em células de transferência em raízes de *Pisum sativum* demonstrou a presença de hemiceluloses, pectinas, calose e AGPs nessas invaginações de parede (Dahiya & Brewin, 2000). Vaughn *et al.* (2007) também constataram a presença de cadeias laterais de RGI em cotilédones de *Vicia faba*, o que foi detectado no presente estudo

para o obturador de *B. nutans*. Entretanto, a aparente ausência de AGPs mostrada neste estudo é um dado singular até o momento atual para células de transferência, que deve ser analisado com maior profundidade em estudos futuros.

Em conclusão, a modulação espacial encontrada entre arabinanos, galactanos e AGPs no ovário de *B. nutans* demarca a trajetória porogâmica do tubo polínico em direção ao gametófito feminino. Algumas funções possíveis das pectinas e AGPs nesses tecidos são discutidas, como a flexibilidade e expansibilidade da parede celular, sinalização celular, adesão celular, nutrição e atração do tubo polínico. A presença dessas moléculas em flores ainda não polinizadas de *B. nutans* demonstra que sua produção não é desencadeada pela polinização, e sim regulada pelo desenvolvimento. Comparando-se os resultados obtidos neste estudo com outras espécies, esse padrão químico que marca a trajetória de crescimento do polínico nos rudimentos seminiais tem sido observado, principalmente com relação às AGPs, em espécies filogeneticamente distantes e em tipos de rudimentos seminiais distintos. Entretanto, existem diferenças entre as espécies quanto às moléculas que compõem essa trajetória, resultando em um conjunto específico de epitopos para cada espécie, o que parece não estar relacionado à sua posição filogenética. A ocorrência de galactanos e a distribuição singular de arabinanos no rudimento seminal, assim como a marcação de HG e RGI no obturador de *B. nutans*, destacam-se como dados inéditos. A aparente ausência de AGPs constatada no obturador é uma informação nova na literatura, tanto para células do obturador quanto para células de transferência em geral. Neste estudo, nós mostramos distribuições específicas para cada um dos epitopos de pectinas e AGPs e evidências para possíveis funções desses epitopos durante as interações pólen-pistilo no interior do ovário. Além disso, tais funções indicam que o tubo polínico aproxima-se do rudimento seminal, possivelmente, por sinais direcionais sucessivos a partir dos diferentes tecidos do gineceu.

Referências bibliográficas

- ACOSTA-GARCÍA, G.; VIELLE-CALZADA, J.-P. A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 16, p. 2614-2628, 2004.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 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, p. 105-121, 2009.
- CAFFALL, K.H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1879-1900, 2009.
- CHAO, C. Y. Histochemical study of a PAS substance in the ovules of *Paspalum orbiculare* and *P. longifolium*. **Phytomorphology**, v. 29, p. 381-387, 1979.
- CHEUNG, A. Y.; WANG, H.; WU, H. M. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. **Cell**, v. 82, p. 383-393, 1995.
- CHEUNG, A. Y.; WU, H. M. Arabinogalactan proteins in plant sexual reproduction. **Protoplasma**, v. 208, p. 87-98, 1999.
- CHUDZIK, B.; ZARZYKA, B.; SNIEZKO, R. Immunodetection of Arabinogalactan Proteins in Different Types of Plant Ovules. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 47, n. 1, p. 139-146, 2005.
- CHUDZIK, B. *et al.* The structure of the ovule of *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby after pollination. **Acta Agrobotanica**, v. 63, n. 2, p. 3-11, 2010.
- CLAUSEN, M. H.; WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P. Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1797-1800, 2003.
- COIMBRA, S. *et al.* Arabinogalactan proteins as molecular markers in *Arabidopsis thaliana* sexual reproduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 15-16, p. 4027-4035, 2007.
- COIMBRA, S.; DUARTE, C. Arabinogalactan proteins may facilitate the movement of pollen tubes from the stigma to the ovules in *Actinidia deliciosa* and *Amaranthus hypochondriacus*. **Euphytica**, v. 133, p. 171-178, 2003.
- COIMBRA, S.; SALEMA, R. Immunolocalization of arabinogalactan proteins in *Amaranthus hypochondriacus* L. ovules. **Protoplasma**, v. 199, p. 75-82, 1997.

- COSTA, M. *et al.* Immunolocalization of arabinogalactan proteins (AGPs) in reproductive structures of an early-divergent angiosperm, *Trithuria* (Hydatellaceae). **Annals of Botany**, v. 111, p. 183-190, 2013.
- DAHIYA, P.; BREWIN, N. J. Immunogold localization of callose and other cell wall components in pea nodule transfer cells. **Protoplasma**, v. 214, p. 210-218, 2000.
- DARDELLE, F. *et al.* Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis* pollen tube cell wall. **Plant Physiology**, v. 153, p. 1563-1576, 2010.
- DU, H.; CLARKE, A. E.; BACIC, A. Arabinogalactan proteins: a class of extracellular matrix proteoglycans involved in plant growth and development. **Trends in Cell Biology**, v. 6, p. 411-414, 1996a.
- DU, H. *et al.* Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *Nicotiana glauca*. **The Plant Journal**, v. 9, n. 3, p. 313-323, 1996b.
- FAGUNDES, N. F.; MARIATH, J. E. A. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. **Acta botanica brasiliensis**, v. 24, n. 3, p. 765-779, 2010.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.
- FENWICK, K. M. *et al.* Polymer mobility in cell walls of cucumber hypocotyls. **Phytochemistry**, v. 51, p. 17-22, 1999.
- GANE, A. M.; CLARKE, A. E.; BACIC, A. Localisation and expression of arabinogalactan-proteins in the ovaries of *Nicotiana glauca* Link and Otto. **Sexual Plant Reproduction**, v. 8, p. 278-282, 1995.
- GIVNISH, T. J. *et al.* Assembling the tree of the Monocotyledons: Plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 97, p. 584-616, 2010.
- HA, M.-A. *et al.* Conformation and mobility of the arabinan and galactan side-chains of pectin. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1817-1824, 2005.
- HERRERO, M. Changes in the ovary related to pollen tube guidance. **Annals of Botany**, v. 85, Supplement A, p. 79-85, 2000.
- HERRERO, M.; HORMAZA, J. I. Pistil strategies controlling pollen tube growth. **Sexual Plant Reproduction**, v. 9, p. 343-347, 1996.
- HERVÉ, C.; MARCUS, S. E.; KNOX, J. P. Monoclonal antibodies, carbohydrate-binding modules, and the detection of polysaccharides in plant cell walls. *In*: POPPER, Z. A.

- (Ed.). **The plant cell wall: Methods and protocols**. London: Humana Press, 2011. p. 103-114.
- HIGASHIYAMA, T. *et al.* Pollen Tube Attraction by the Synergid Cell. **Science**, v. 293, p. 1480-1483, 2001.
- HUANG, B. Q.; RUSSELL, S. D. Female germ unit: Organization, isolation and function. *In*: RUSSELL, S.D.; DUMAS, C. (Ed.). **Sexual Reproduction in Flowering Plants**. San Diego: Academic Press Inc, 1992. p. 233-293.
- JAUH, G. Y.; LORD, E. M. Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longitorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. **Planta**, v. 199, p. 251-261, 1996.
- JONES, L.; SEYMOUR, G. B.; KNOX, J. P. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)-β-D-galactan. **Plant Physiology**, v. 113, p. 1405-1412, 1997.
- JONES, L. *et al.* Cell wall arabinan is essential for guard cell function. **PNAS**, v. 100, n. 20, p. 11783-11788, 2003.
- JONES, L. *et al.* A conserved functional role of pectic polymers in stomatal guard cells from a range of plant species. **Planta**, v. 221, p. 255-264, 2005.
- KIM, S. *et al.* Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. **PNAS**, v. 100, n. 26, p. 16125-16130, 2003.
- KNOX, J. P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 308-313, 2008.
- KNOX, J. P. *et al.* Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. **Planta**, v. 181, p. 512-521, 1990.
- KNOX, J. P. *et al.* Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. **The Plant Journal**, v. 1, n. 3, p. 317-326, 1991.
- LEE, K. J. D. *et al.* Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*. **The Plant Cell**, v. 17, p. 3051-3065, 2005.
- LORD, E. M. Adhesion and guidance in compatible pollination. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 47-54, 2003.
- MAJEWSKA-SAWKA, A.; NOTHNAGEL, E. A. The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development. **Plant Physiology**, v. 122, p. 3-9, 2000.
- MARTÓN, M. L. *et al.* Micropylar pollen tube guidance by Egg Apparatus 1 of maize. **Science**, v. 30, p. 573-576, 2005.

- MCCARTNEY, L. *et al.* Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-β-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. **The Plant Journal**, v. 22, n. 2, p. 105-113, 2000.
- MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. R. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 1000, p. 405-414, 1976.
- MENDES, S. P. **Estudos embriológicos em *Pitcairnia encholirioides* L.B.Sm. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae)**. 2012. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 266-277, 2008.
- MOORE, J. P. *et al.* Response of the leaf cell wall to desiccation in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*. **Plant Physiology**, v. 141, p. 651-662, 2006.
- MOORE, J. P.; FARRANT, J. M.; DRIOUICH, A. A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 2, p. 102-104, 2008.
- NGUEMA-ONA, E. *et al.* Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. **Annals of Botany**, v. 110, p. 383-404, 2012.
- OFFLER, C. E. *et al.* Transfer cells: cells specialized for a special purpose. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 431-454, 2003.
- PALANIVELU, R. *et al.* Pollen tube growth and guidance is regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. **Cell**, v. 114, p. 47-59, 2003.
- PENNELL, R. Cell walls: structures and signals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 504-510, 1998.
- PENNELL, R. I. *et al.* Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1317-1326, 1991.
- PEREIRA, L. G. *et al.* Expression of arabinogalactan protein genes in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 223, p. 374-380, 2006.
- POPPER, Z. A. Evolution and diversity of green plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 286-292, 2008.
- PUNWANI, J. A.; DREWS, G. N. Development and function of the synergid cell. **Sexual Plant Reproduction**, v. 21, p. 7-15, 2008.
- RAE, A. L. *et al.* Composition of the cell walls of *Nicotiana alata* Link et Otto pollen tubes. **Planta**, v. 166, p. 128-133, 1985.

- RAFINSKA, K.; BEDNARSKA, E. Localisation pattern of homogalacturonan and arabinogalactan proteins in developing ovules of the gymnosperm plant *Larix decidua* Mill. **Sexual Plant Reproduction**, v. 24, p. 75-87, 2011.
- RENARD, C. M. G. C.; JARVIS, M. C. A cross-polarization, magic-angle-spinning, ¹³C-nuclear-magnetic-resonance study of polysaccharides in sugar beet cell walls. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1315-1322, 1999.
- RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.
- SANCHEZ, A. M. *et al.* Pistil factors controlling pollination. **The Plant Cell**, v. 16, p. S98-S106, 2004.
- SCHULZ, P.; JENSEN, W. A. *Capsella* embryogenesis: The synergids before and after fertilization. **American Journal of Botany**, v. 55, p. 541-552, 1968.
- SEIFERT, G. J.; ROBERTS, K. The biology of arabinogalactan proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 137-161, 2007.
- SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**, v. 5, p. 9-23, 1993.
- SHOWALTER, A. M. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 1399-1417, 2001.
- SMITH, B. G.; HARRIS, P. J. The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 33-53, 1999.
- STOLLE-SMITS, T. *et al.* Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development. **Plant Physiology**, v. 121, p. 363-372, 1999.
- TILTON, V. R.; HORNER Jr., H. T. Stigma, style and obturator of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in the reproductive process. **American Journal of Botany**, v. 67, p. 1113-1131, 1980.
- VAUGHN, K. C. *et al.* Wall ingrowths in epidermal transfer cells of *Vicia faba* cotyledons are modified primary walls marked by localized accumulations of arabinogalactan proteins. **Plant Cell Physiology**, v. 48, n. 1, p. 159-168, 2007.
- VERHERTBRUGGEN, Y. *et al.* Developmental complexity of arabinan polysaccharides and their processing in plant cell walls. **The Plant Journal**, v. 59, p. 413-425, 2009.
- VERHERTBRUGGEN, Y. *et al.* Cell wall pectic arabinans influence the mechanical properties of *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems and their response to mechanical stress. **Plant & Cell Physiology**, v. 54, n. 8, p. 1278-1288, 2013.

- WILLATS, W. G. T.; MARCUS, S. E.; KNOX, J. P. Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)- α -L-arabinan. **Carbohydrate Research**, v. 308, p. 149-152, 1998.
- WILLATS, W. G. T. *et al.* Making and using antibody probes to study plant cell walls. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 27-36, 2000.
- WILLATS, W. G. T. *et al.* Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 9-27, 2001.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.
- WILLEMSE, M. T. M.; VAN WENT, J. L. The female gametophyte. *In*: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of the Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 159-196.
- WU, H.-M.; WANG, H.; CHEUNG, A. Y. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. **Cell**, v. 82, p. 395-403, 1995.

Tabela 1. Anticorpos monoclonais utilizados para a identificação de epítomos de pectinas e AGPs.

| Anticorpos monoclonais (MAbs) | | | Epítomos | Referências |
|-------------------------------|---|--------------|---|---|
| JIM5 | Anti-pectinas | Anti-HG | HGs parcialmente metil-esterificados/ não esterificados | Knox <i>et al.</i> (1990); Clausen <i>et al.</i> (2003) |
| JIM7 | | | HGs parcialmente metil-esterificados | Knox <i>et al.</i> (1990); Clausen <i>et al.</i> (2003) |
| LM5 | | Anti-RGI | (1→4)-β-D-galactanos | Jones <i>et al.</i> (1997) |
| LM6 | | | (1→5)-α-L-arabinanos* | Willats <i>et al.</i> (1998) |
| JIM8 | Anti-proteínas arabinogalactanos (AGPs) | AGP glicanos | | Pennell <i>et al.</i> (1991) |
| JIM13 | | AGP glicanos | | Knox <i>et al.</i> (1991) |

*Pode se ligar também a AGPs (Lee *et al.*, 2005).

Tabela 2. Imunolocalização comparativa de epitopos de AGPs e pectinas nas principais regiões da trajetória do tubo polínico de diferentes espécies, em ovários em estágio anterior à fecundação. As espécies estão ordenadas conforme sua posição filogenética, de cedo-divergente a tarde-divergente do topo para a base (cinza-claro: Angiospermas cedo-divergentes; cinza-médio: Monocotiledôneas, cinza-escuro: Eudicotiledôneas).

| Espécies / MABs e regiões | JIM8 | | | | | JIM13 | | | | | JIM5 | | | | | JIM7 | | | | | LM5 | | | | | LM6 | | | | | | | | | |
|--|------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|------|----|----|----|----|------|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | OB | CM | NM | AF | GF | OB | CM | NM | AF | GF | OB | CM | NM | AF | GF | OB | CM | NM | AF | GF | OB | CM | NM | AF | GF | OB | CM | NM | AF | GF | | | | | |
| <i>Trithuria submersa</i> - Hydatellaceae, Nymphaeales ¹ | nd | + | + | nd | - | nd | + | + | nd | - | nd | - | - | nd | + | nd | - | - | nd | + | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | - | - | nd | + |
| <i>Galanthus nivalis</i> - Amaryllidaceae, Asparagales ² | nd | + | + | - | + | nd | + | + | - | + | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| <i>Galtonia candicans</i> - Asparagaceae, Asparagales ² | nd | - | - | - | - | nd | + | + | - | - | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| <i>Billbergia nutans</i> - Bromeliaceae, Poales ³ | - | + | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + | | | | | |
| <i>Oenothera hookeri</i> - Onagraceae, Myrtales ² | nd | + | + | - | - | nd | + | + | - | - | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> - Brassicaceae, Brassicales ⁴ | nd | + | * | + | + | nd | + | * | + | + | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| <i>Sinapis alba</i> - Brassicaceae, Brassicales ² | nd | + | * | + | - | nd | + | * | + | + | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| <i>Brassica napus</i> - Brassicaceae, Brassicales ⁵ | nd | - | - | + | - | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| <i>Sida hermaphrodita</i> - Malvaceae, Malvales ⁶ | nd | nd | nd | nd | nd | * | - | - | + | + | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| <i>Amaranthus hypochondriacus</i> - Amaranthaceae, Caryophyllales ⁷ | nd | + | + | + | - | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| <i>Actinidia deliciosa</i> - Actinidiaceae, Ericales ⁸ | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |

OB: obturador; CM: canal micropilar; NM: nucelo micropilar; AF: aparelho fibrilar; GF: ao redor e/ou delimitando o gametófito feminino; -: ausência; +: presença (mostrado em verde); *: estrutura ausente; nd: não há dados. ¹ Costa *et al.* (2013); ² Chudzik *et al.* (2005); ³ Este estudo; ⁴ Coimbra *et al.* (2007); ⁵ Pennel *et al.* (1991); ⁶ Chudzik *et al.* (2010); ⁷ Coimbra & Salema (1997); ⁸ Coimbra & Duarte (2003).

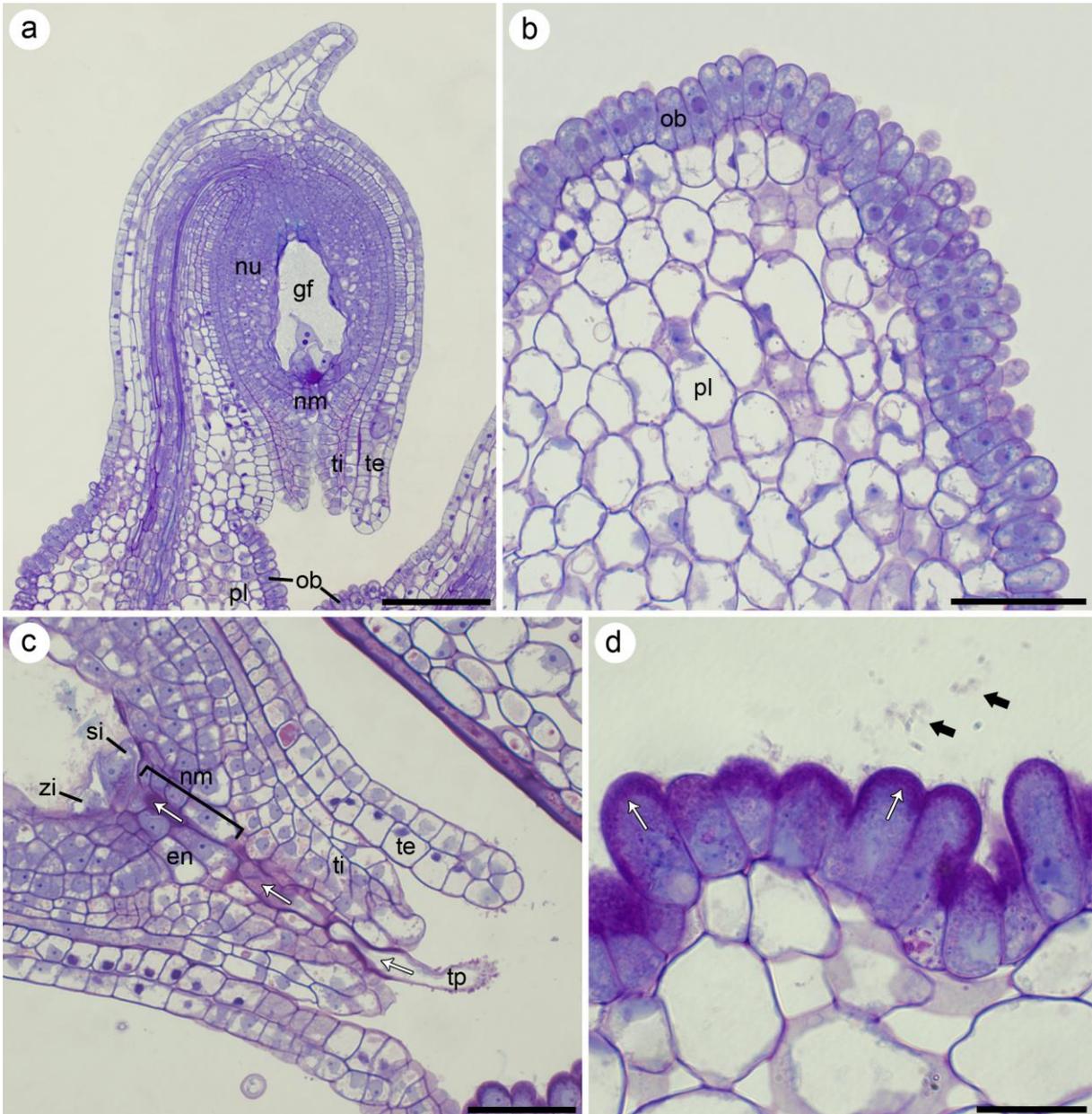


Fig. 1. Rudimento seminal e obturador em *Billbergia nutans* (Bromeliaceae), em dois estádios. **a, b.** Estádio anterior à polinização, mostrando o rudimento seminal (a) e o obturador (b). **c, d.** Estádio posterior à fecundação, mostrando o rudimento seminal (c) com um tubo polínico visível (setas brancas) e o obturador (d) com paredes celulares labirínticas (setas brancas) e produção de exsudato (setas pretas). en: epiderme nucelar; gf: gametófito feminino; nm: nucelo micropilar; nu: nucelo; ob: obturador; pl: placenta; si: sinérgide; te: tegumento externo; ti: tegumento interno; tp: tubo polínico; zi: zigoto. Barras: 100 μm (a); 50 μm (b, c); 20 μm (d).

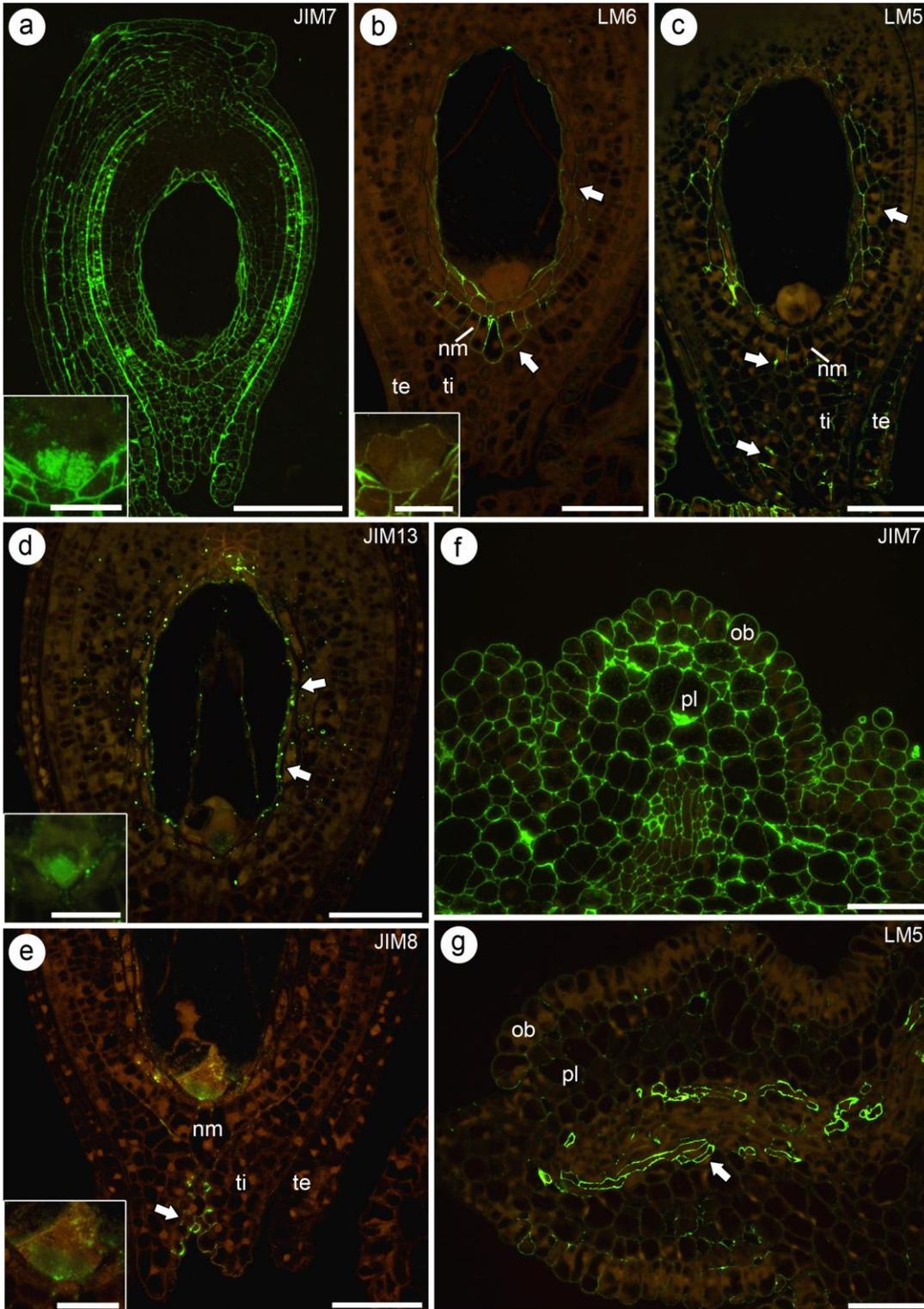


Fig. 2. Rudimento seminal e obturador em estágio anterior à polinização de *Billbergia nutans* (Bromeliaceae) marcados com diferentes MABs, para epitopos de pectinas e AGPs. **a-e.** Rudimento seminal. **a.** Marcação com JIM7, mostrando a ampla distribuição de HGs parcialmente metil-esterificados (detalhe: aparelho fibrilar). **b.** Marcação com LM6 para arabinanos nas células do gametófito feminino, no tecido nucelar circundante, na região micropilar do nucelo (setas), incluindo a epiderme nucelar, e aparelho fibrilar (detalhe). **c.** Marcação com LM5 para galactanos no tecido nucelar ao redor do gametófito feminino, na região micropilar do nucelo, incluindo a epiderme nucelar, e na região micropilar dos tegumentos (setas). **d.** Marcação com JIM13 para AGPs nas células do gametófito feminino, no tecido nucelar circundante (setas) e no aparelho fibrilar (detalhe). **e.** Marcação com JIM8 para AGPs no aparelho fibrilar (detalhe) e na região interna do tegumento interno, delimitando o canal micropilar (seta). **f, g.** Obturador e placenta. **f.** Marcação com JIM7, mostrando a ampla distribuição de HGs parcialmente metil-esterificados. **g.** Marcação com LM5, mostrando a ampla distribuição de galactanos (seta: floema). nm: nucelo micropilar; ob: obturador; pl: placenta; te: tegumento externo; ti: tegumento interno. Barras: 100µm (a); 50µm (b-g); 20µm (a, b, d, e: detalhes).

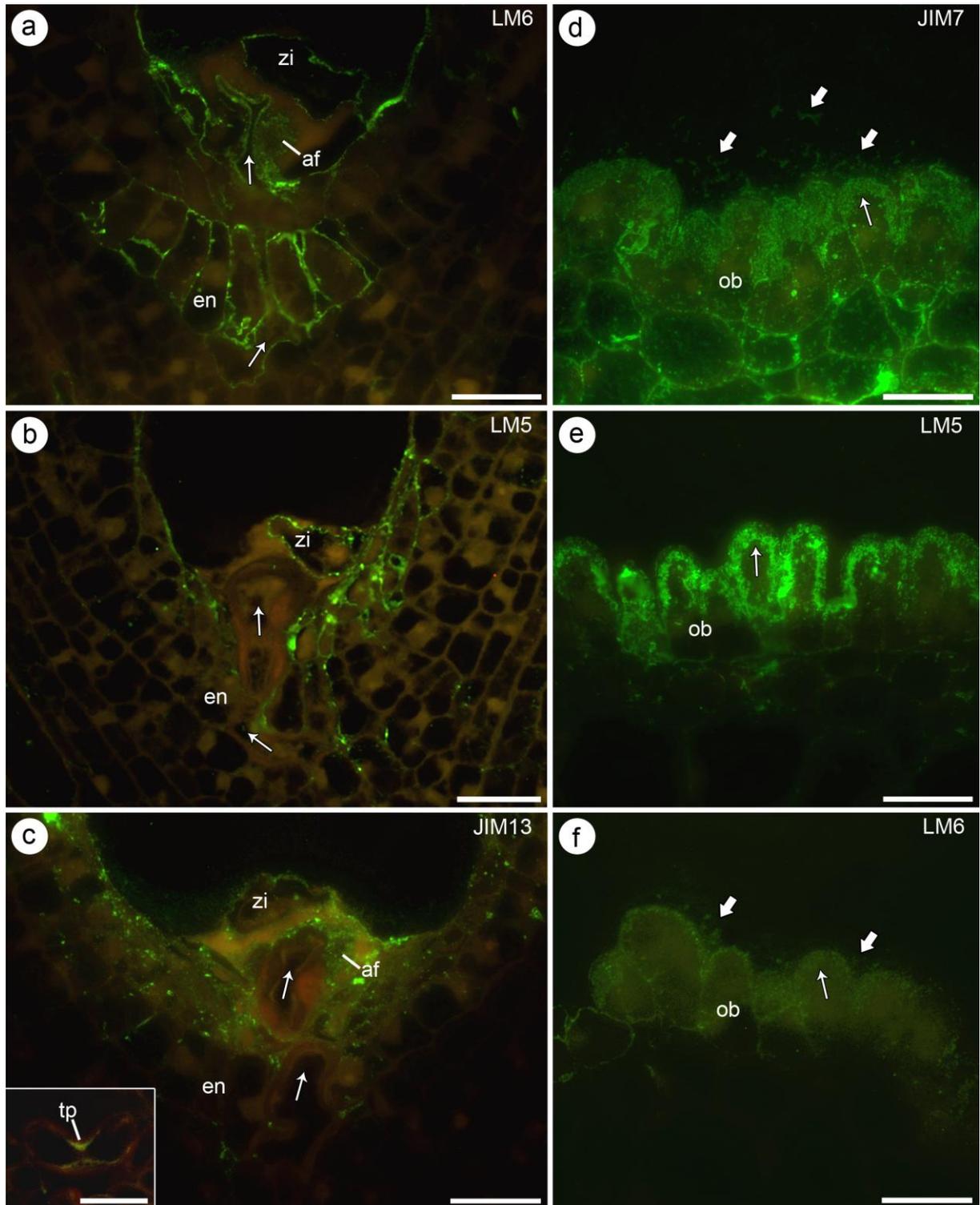


Fig. 3. Rudimento seminal e obturador em estágio posterior à fecundação de *Billbergia nutans* (Bromeliaceae) marcados com diferentes MAbs, para epitopos de pectinas e AGPs. **a-c.** Região apical do gametófito feminino e nucelo com tubo polínico (setas). **a.** Marcação com LM6 para arabinanos nas células do gametófito feminino, aparelho fibrilar, região micropilar do nucelo, incluindo a epiderme nucelar, e tubo polínico. **b.** Marcação com LM5 para galactanos ao redor do gametófito feminino, na região micropilar do nucelo, incluindo a epiderme nucelar, e no zigoto. **c.** Marcação com JIM13 para AGPs nas células do gametófito feminino, nucelo circundante e aparelho fibrilar (detalhe: tubo polínico). **d-f.** Obturador, mostrando as paredes celulares labirínticas (setas estreitas) e exsudato (setas largas), marcados com JIM7 para HGs parcialmente metil-esterificados, LM5 para galactanos e LM6 para arabinanos, respectivamente. af: aparelho fibrilar; en: epiderme nucelar; ob: obturador; tp: tubo polínico; zi: zigoto. Barras: 20 μ m.

CAPÍTULO V

Considerações finais

Ao longo desta tese, foram abordados diferentes aspectos do desenvolvimento do gineceu em *B. nutans*, com enfoque nas modificações estruturais e químicas dessa estrutura em preparação aos eventos de polinização e fecundação. Em resumo dos capítulos, foram estudados o desenvolvimento dos tecidos esporofíticos do gineceu, a ontogenia do rudimento seminal no contexto evolutivo da família e a detecção de compostos químicos de parede celular no ovário. São registrados dados inéditos sobre a embriologia do gênero *Billbergia*, a anatomia do gineceu em Bromeliaceae, a análise tridimensional do gametófito feminino e a imunolocalização de pectinas no rudimento seminal e obturador de angiospermas.

A arquitetura do estigma espiral-conduplicado resulta da ausência de fusão entre os carpelos; do alongamento dos lobos estigmáticos, por meio de multiplicação celular nas margens carpelares, seguida de alongamento celular; da torção dos lobos estigmáticos; e da formação de tricomas nas margens dos lobos.

Este trabalho revelou estados de caracteres estáveis na superfície estigmática de *B. nutans*, o que evidencia o potencial da anatomia e micromorfologia do estigma para futuros estudos em busca de caracteres úteis para a taxonomia da família.

Com relação aos tecidos secretores do gineceu, especializados para a interação pólen-pistilo, a composição da secreção é polissacarídica, com base nas técnicas de histoquímica e imunolocalização. Os tricomas estigmáticos produzem copiosa secreção, que é armazenada em bolsões pécticos no interior da parede periclinal externa. O tecido transmissor e o obturador apresentam algumas características em comum.

Há uma dinâmica de amido associada à produção de secreção no gineceu, regulada pelo desenvolvimento. Supõe-se que os grãos de amido são utilizados como fonte de moléculas para a produção da secreção, e que a presença de inúmeros campos primários de pontoação deve facilitar esse transporte.

O obturador é uma estrutura altamente variável entre as angiospermas, em termos de presença, morfologia, origem e desenvolvimento. O obturador de Bromeliaceae é semelhante ao de espécies de Liliaceae e Asparagaceae. São necessários mais estudos sobre essa estrutura, a fim de compreendermos sua variabilidade morfológica e importância funcional.

São constatadas semelhanças referentes às reservas do gineceu e diferenças na regulação da sua atividade secretora entre diferentes clados de angiospermas. Esses aspectos merecem mais investigações para uma melhor compreensão da diversidade e funcionalidade do gineceu em relação à fase progâmica.

No contexto de Poales, características como a anatomia do estilete e a presença de idioblastos com compostos fenólicos nos tecidos florais são variáveis, podendo contribuir para a taxonomia e compreensão da história evolutiva do grupo.

Os rudimentos seminais de Bromeliaceae são anátropos, bitegmentados e crassinucelados, com primórdios trizonados, desenvolvimento monospórico, tétrade linear, presença de calose nas paredes celulares durante a meiose, ginósporo funcional calazal, gametófito do tipo *Polygonum*, presença de hipóstase e origem dérmica dos tegumentos.

Muitos caracteres do rudimento seminal são sugeridos como úteis para a taxonomia da família, como: formato do gametófito feminino, a persistência ou proliferação das antípodas, a formação da micrópila por um ou ambos os tegumentos, o número de camadas celulares do tegumento externo, o formato das células da epiderme nucelar, o número de camadas do tecido parietal, a presença de apêndice micropilar, a presença, morfologia e origem do apêndice calazal e o número de rudimentos seminais por carpelo. Entretanto, a morfologia do apêndice calazal pode ser um caráter inapropriado para aplicação taxonômica, devido à variabilidade intraespecífica encontrada em *B. nutans*.

Este estudo apresenta um cenário evolutivo do desenvolvimento do rudimento seminal em Bromeliaceae, em que a subfamília que divergiu mais cedo, Brocchinioideae, mostra

estados de caracteres reduzidos. Ao longo da família, alguns caracteres parecem ser homoplásicos e podem ser relevantes quando aplicados em níveis taxonômicos inferiores.

Dentro de Poales, os tegumentos compostos por duas camadas celulares e o reduzido número de rudimentos seminiais são, provavelmente, estados de caráter plesiomórficos.

Não foram observadas limitações reprodutivas significativas durante o desenvolvimento embriológico no rudimento seminal de *B. nutans*.

A modulação espacial encontrada entre arabinanos, galactanos e AGPs no ovário de *B. nutans* demarca a trajetória porogâmica do tubo polínico em direção ao gametófito feminino. Possíveis funções das pectinas e AGPs nesses tecidos são discutidas, como a flexibilidade e expansibilidade da parede celular, sinalização celular, adesão celular, nutrição e atração do tubo polínico. A produção dessas moléculas não é desencadeada pela polinização, e sim regulada pelo desenvolvimento.

A detecção química dessa trajetória tem sido observada em rudimentos seminiais de outras espécies de angiospermas, principalmente com relação às AGPs. Entretanto, cada espécie possui um conjunto específico de moléculas, que parece não estar relacionado com a sua posição filogenética.

A presença de paredes celulares labirínticas no tecido transmissor e obturador de *B. nutans* indica uma função de células de transferência, facilitando o transporte da secreção para o canal estilar-estigmático e para o lóculo ovariano. A composição dessas paredes apresenta, além da celulose, homogalacturonanos e ramnogalacturonanos I e não inclui AGPs.

São evidenciadas possíveis funções das pectinas e AGPs durante as interações pólen-pistilo no interior do ovário. O tubo polínico, possivelmente, aproxima-se do rudimento seminal por sinais direcionais sucessivos a partir dos diferentes tecidos do gineceu.

Futuramente, em continuidade ao trabalho desta tese, pretende-se investigar o processo de fecundação e o sistema de auto-incompatibilidade da espécie em questão.