

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

LABORATÓRIO DE ANATOMIA VEGETAL

**Ontogenia do Rudimento Seminal em *Vriesea gigantea* Gaudich.
(Tillandsioideae – Bromeliaceae)**

CAROLINA JANSSON BREITSAMETER

Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Ciências Biológicas

Orientador: Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Porto Alegre, junho de 2014.

Corpo do texto, estampas de figuras e referências bibliográficas baseados nas normas da Revista Brasileira de Biociências.

**Ontogenia do rudimento seminal em *Vriesea gigantea* Gaudich. (Tillandsioideae –
Bromeliaceae)**

Carolina Jansson Breitsameter^{1*}

Título resumido: Ontogenia do rudimento seminal em *Vriesea*.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS - Instituto de Biociências –
Departamento de Botânica – Laboratório de Anatomia Vegetal – LAVeg Av. Bento
Gonçalves, 9500 Setor 4 Prédio 43423. CEP 91540-000 Porto Alegre RS.

* Autor para contato. E-mail: ninajb11@hotmail.com

ABSTRACT: (Ovule ontogeny in *Vriesea gigantea* Gaudich. (Tillandsioideae – Bromeliaceae)). Bromeliaceae is divided into eight subfamilies, and *Vriesea gigantea* belongs to subfamily Tillandsioideae. The aim of this study is to describe the ovule ontogeny of *V. gigantea*, to record data that can be used in taxonomy and conservation strategies of the species. The ovule of *V. gigantea* is anatropous, crassinucellate and bitegmic with both integuments originated from the dermal layer. Four distinct pathways were observed in meiosis, with different patterns of cell division and gynospore degeneration, which may be related to an abnormal callose deposition and to a response to high temperature. The female gametophyte is of the *Polygonum*-type. Some morphological features are noteworthy in this species, when compared to other Bromeliaceae species, as the distribution of ovules all over the extension of the ovarian locule, the variation in the polarization of nuclei during gametogenesis, the presence of a very long chalazal appendage with subdermal origin, the variation in the polarization of the nucleus and vacuole in egg cell during maturation of female gametophyte and the larger number of cell layers in integuments. After comparison between *V. gigantea* and *V. carinata*, some similarities at generic level were observed as the fusion of the central cell's nuclei before fertilization and the formation of micropyle by both integuments. Several features analyzed within the context of both family and subfamilies deserve to be further explored due to their existing variability and the absence of more detailed morphological analyzes, which could assist in the taxonomic delimitation of species.

Key words: Development, Embryology, Female gametophyte, Gynogametogenesis, Gynosporogenesis.

RESUMO: (Ontogenia do rudimento seminal em *Vriesea gigantea* Gaudich. (Tillandsioideae – Bromeliaceae)). Bromeliaceae está dividida em oito subfamílias, sendo que *Vriesea gigantea* pertence a subfamília Tillandsioideae. Este estudo tem como objetivo descrever a ontogenia do rudimento seminal de *V. gigantea*, gerando dados que possam ser utilizados tanto para a taxonomia quanto para as iniciativas de conservação dessa espécie. *V. gigantea* apresenta rudimento seminal anátropo, crassinucelado e bitegumentado, com ambos os tegumentos de origem dérmica. Foram observadas quatro rotas distintas de meiose, com diferentes padrões de divisão celular e de degeneração de ginósporos, o que pode estar relacionado com uma deposição anormal de calose e com uma resposta a altas temperaturas. O gametófito feminino é do tipo *Polygonum*. Algumas características morfológicas se destacam nesta espécie, quando comparados às demais espécies de Bromeliaceae, como a distribuição dos rudimentos seminais por toda a extensão do lóculo ovariano, a variação na polarização de núcleos durante a gametogênese, a presença de um apêndice calazal muito longo de origem subdérmica, a variação na polarização do núcleo e do vacúolo na oosfera durante o amadurecimento do gametófito feminino e o maior número de camadas celulares nos tegumentos. Similaridades foram observadas a nível de gênero, após comparação entre *V. gigantea* e *V. carinata*, como a fusão dos núcleos polares da célula média anterior à fecundação e a formação da micrópila por ambos os tegumentos. Diversas características analisadas dentro do contexto da família e das subfamílias merecem maior aprofundamento devido à variabilidade existente e à ausência de análises morfológicas mais detalhadas que auxiliem na delimitação taxonômica de suas espécies.

Palavras-chave: Desenvolvimento, Embriologia, Gametófito feminino, Ginogametogênese, Ginosporogênese.

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae era tradicionalmente dividida, a partir de dados morfológicos, em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Smith & Downs 1974). Givnish *et al.* (2007, 2011), a partir da análise molecular de 46 gêneros de Bromeliaceae, sugeriram um novo arranjo filogenético. Os dados indicaram que Bromelioideae e Tillandsioideae apresentavam-se como grupos monofiléticos enquanto que Pitcairnioideae mostrava-se como um grupo parafilético. Esses mesmos autores propuseram a divisão dos gêneros do grupo parafilético entre Pitcairnioideae e outras cinco novas subfamílias. Dessa forma, Bromeliaceae foi organizada em oito subfamílias monofiléticas: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae.

Vriesea gigantea Gaudich. pertence à subfamília Tillandsioideae e é endêmica da Mata Atlântica, estando presente desde o estado do Pernambuco até o Rio Grande do Sul (Forzza *et al.* 2013). Como tantas outras bromélias, essa espécie apresenta alto valor ornamental e por essemotivo é alvo de extrativismo ilegal. A perda e fragmentação de habitats vêm ameaçando as suas populações naturais (Bered *et al.* 2008) e devido a esses fatores *V. gigantea* faz parte da lista de espécies ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul, na categoria vulnerável (Rio Grande do Sul 2003).

A espécie possui hábitos terrestre e epifítico (Smith & Downs 1977). Suas folhas possuem um padrão de estrias característico e, como a maioria das bromélias, possuem uma filotaxia rosetada, o que forma densas rosetas com a capacidade de acumular água, as quais são chamadas de cisternas (Reitz 1983). As cisternas, que nessa espécie podem reter até 4dm³ de água, formam microhabitats que podem servir de abrigo, moradia, fonte de alimento ou sítio reprodutivo para pequenos animais (Reitz 1983, Benzing 2000). *V. gigantea* é uma espécie de alerta epidemiológico, pois possui alta positividade em número de larvas de

insetos de interesse em saúde humana (Reitz 1983) como, por exemplo, mosquitos dos gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*, que são vetores de doenças.

Um indivíduo adulto de *Vriesea gigantea* em período de floração pode atingir mais de 2,5 metros de altura (Reitz 1983). Essas plantas produzem grande número de flores, frutos e sementes altamente viáveis e, além disso, possuem baixos índices de polinização cruzada (Paggi 2006). Sua polinização dá-se por morcegos (Sazima *et al.* 1999) e a dispersão das sementes ocorre pela ação do vento (Smith & Downs 1977). A reprodução de *V. gigantea* é, principalmente, vegetativa por brotamento, formando até três indivíduos clonais por planta (Reitz 1983).

De acordo com Moza & Bhatnagar (2007), para qualquer abordagem de conservação, é necessário o conhecimento acerca da biologia reprodutiva da espécie alvo. Nesse sentido, o desenvolvimento embriológico, a polinização e o número de sementes são algumas das importantes características que permitem a adaptação da planta a um determinado ambiente e aumentam seu sucesso reprodutivo. A reprodução sexuada é o processo pelo qual a planta adquire variabilidade genética e torna-se capaz de sobreviver e se adaptar a condições adversas (Moza & Bhatnagar 2007). Para a reprodução sexuada, é necessário que ocorra polinização, motivo pelo qual é essencial analisar a morfologia e a biologia floral para avaliarmos a interação entre as flores e seus polinizadores, como também, a interação do pólen com o estigma (Lenzi & Orth 2004). Além disso, para a formação de uma nova geração a partir da reprodução sexuada, é necessário que ocorra a fecundação. Dessa forma, os estudos a cerca do desenvolvimento e estrutura dos rudimentos seminais, que abrigam o gametófito feminino e o futuro embrião esporofítico, são de primária importância para o entendimento do processo reprodutivo das plantas. A análise embriológica e do desenvolvimento do rudimento seminal pode gerar um conhecimento valioso para a preservação de espécies, por agregar informações que podem ser utilizadas na restauração de habitats, através de cultivos, tanto *in vitro* quanto *ex situ* (Moza & Bhatnagar 2007), bem

como gerar dados que podem ser úteis para compreender o modo de reprodução e fornecer subsídios para a conservação de populações desta espécie.

Com base nos alertas e desafios expressos anteriormente estão sendo desenvolvidos estudos com o objetivo de conhecer e de fornecer informações úteis para conservação de populações de bromélias, como é o caso deste trabalho, integrante de outro mais amplo intitulado: “Sistemática e Conservação da família Bromeliaceae” – Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX – FAPERGS - CNPq).

Estudos referentes à embriologia, mais especificamente ao rudimento seminal, têm sido elaborados há muitos anos. Contudo, não abordavam todos os aspectos que, hoje, acredita-se serem de grande importância no auxílio da caracterização de táxons. Atualmente, os estudos não abordam apenas a morfologia do rudimento seminal, como também analisam as estruturas componentes e consideram suas origens. Dos estudos referentes a esse assunto em Bromeliaceae podemos citar Billings (1904), Lakshmanan (1967), Wee & Rao (1974), Rao & Wee (1979), Palací *et al.* (2004), Sajo *et al.* (2004), Conceição *et al.* (2007), Mendes (2008), Sartori (2008), Papini *et al.* (2011), Mendes (2012), Spat (2012) e Fagundes & Mariath (2014). Os estudos que analisaram espécies da subfamília Tillandsioideae foram Billings (1904), Palací *et al.* (2004), Sajo *et al.* (2004), Sartori (2008), Papini *et al.* (2011) e Spat (2012); estudando espécies pertencentes aos gêneros *Catopsis* Griseb., *Guzmania* Ruiz & Pav., *Tillandsia* L. e *Vriesea* Lindl. Desses, apenas Sartori (2008) e Spat (2012) incluem a ontogenia da estrutura, apresentando e caracterizando sua formação a partir do estrato parietal de origem.

O mais recente estudo, Fagundes & Mariath (2014), elabora uma análise evolutiva em Bromeliaceae, cruzando dados da literatura com a análise de uma espécie pertencente ao gênero *Billbergia* Thunb., que ainda não havia sido estudado. Os autores sugeriram as seguintes características como sendo as de maior potencial para as delimitações entre os táxons de Bromeliaceae: morfologia do gametófito feminino, persistência ou proliferação das

antípodas, formação da micrópila por um ou ambos os tegumentos, número de camadas celulares do tegumento externo, morfologia da epiderme nucelar, número de camadas do tecido parietal, presença de apêndice micropilar, morfologia e origem do apêndice calazal e número de rudimentos seminiais por carpelo.

Os caracteres embriológicos que estão sendo analisados em Bromeliaceae mostram variabilidade dentro da família e das subfamílias, como também, em alguns casos, dentro de gêneros e populações de espécies. Comparações dos caracteres reprodutivos das bromélias são capazes de comprovar possíveis homologias de estruturas, ou ainda, em caráter mais amplo, corroborar com as delimitações estabelecidas por dados moleculares dos grupos taxonômicos no novo arranjo filogenético das subfamílias.

O presente estudo foi realizado com o objetivo geral de contribuir, à luz de uma análise ontogenética, para o conhecimento do desenvolvimento de órgãos reprodutivos de bromélias e para o conhecimento básico a ser utilizado em iniciativas de conservação de *Vriesea gigantea*. Como objetivo específico deste projeto foi proposto analisar a ontogenia do rudimento seminal em *Vriesea gigantea*, agregando dados embriológicos para a espécie e para o gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico inclui 84 botões florais, oriundos de quatro diferentes populações de *Vriesea gigantea*, com ocorrência na cidade de Porto Alegre /Rio Grande do Sul (Tab. 1).

Botões florais, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram coletados, dissecados e seus ovários fixados em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (McDowell & Trump 1976), os quais encontram-se armazenados no Laboratório de Anatomia Vegetal - LAVeg/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para a preparação dos cortes histológicos, o material fixado foi submetido a passagem em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Gabriel 1982), desidratação em série etílica ascendente e passagens em clorofórmio, permanecendo em cada etapa por 30 minutos. A inclusão foi realizada em hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid 1983). Seções histológicas transversais e longitudinais de 3µm de espessura, dos ovários dos botões florais, foram confeccionadas em micrótomo de rotação Zeiss Microm HM 340E e corados com Azul de Toluidina O 0,05%, pH 4,4 (Feder & O'Brien 1968).

As análises foram realizadas nos microscópios Olympus BX41 e Leica DMR e as fotomicrografias foram obtidas em campo claro, utilizando o microscópio Leica DMR, com câmera digital Leica DFC 500 acoplada e programa de captura de imagens Leica Application Suite – LAS, versão 4.2.

RESULTADOS

O ovário de *Vriesea gigantea* é tricarpelar, trilocular, com muitos rudimentos seminais com placentação axial, distribuídos por toda a extensão do lóculo ovariano. Idioblastos com ráfides foram observados no tecido do ovário, contudo, não foi constatada sua presença nos rudimentos seminais. Os rudimentos seminais, no interior do ovário, apresentam um processo ontogenético do tipo basípeto, ou seja, os rudimentos seminais da base do ovário desenvolvem-se posteriormente aos apicais, podendo-se encontrar rudimentos seminais em distintas fases de desenvolvimento no mesmo ovário.

Primórdio seminal e Ginosporogênese

O primórdio da placenta (Fig. 1A) e do rudimento seminal (não mostrado) é constituído por três camadas meristemáticas: L1 (dérmica), L2 (subdérmica) e L3 (central). Com o início da diferenciação do rudimento seminal, uma das células da camada subdérmica, a inicial arquesporial (Fig. 1B), distingue-se das demais, apresentando denso conteúdo citoplasmático e núcleo conspícuo. Enquanto essa célula aumenta suas dimensões, inicia-se a

curvatura do rudimento seminal e a formação do tegumento interno (Fig. 1C). A inicial arqueosporial divide-se periclinalmente, dando origem a célula parietal primária e a célula-mãe de ginósporos (Fig. 1D, E), o que caracteriza o rudimento seminal como crassinucelado. Nesse estágio, observa-se o início do desenvolvimento do tegumento externo. A célula-mãe de ginósporos alonga-se em sentido longitudinal e, paralelamente, nota-se o início do desenvolvimento do apêndice calazal (Fig. 1F). Os tegumentos são ambos de origem dérmica e o apêndice calazal é de origem subdérmica. Essas estruturas tornam-se mais distintas a medida que a célula-mãe de ginósporos se alonga (Fig. 2A-F) e, ao final desse alongamento, o rudimento seminal apresenta a curvatura completa do tipo anátropa.

No rudimento seminal com célula-mãe de ginósporos alongada, o tecido parietal apresenta-se biestratificado (Fig. 2F). Em seguimento, a célula-mãe de ginósporos inicia o processo de meiose, por meio de uma divisão reducional. Foram observadas quatro rotas de divisão meiótica, as quais estão esquematizadas na Fig. 3. A célula-mãe de ginósporos passa por meiose I, resultando em uma díade de ginósporos (Fig. 4A, B, E, F) que pode ser composta por duas células de dimensões semelhantes (Fig. 4A, B) ou pode apresentar a célula micropilar com maior comprimento (Fig. 4E, F). Observou-se também que a díade de ginósporos pode seguir diferentes processos de meiose II e de degeneração de ginósporos, conforme apresentado no esquema da Fig. 3 e nas imagens da Fig. 4: (1) divisão da célula calazal, formando uma tríade (Fig. 4C), com posterior degeneração dos ginósporos central e micropilar, (2) divisão da célula micropilar, formando uma tríade, com posterior degeneração dos ginósporos central e micropilar, (3) degeneração do ginósporo micropilar (Fig. 4A, B), divisão do ginósporo calazal e posterior degeneração do ginósporo central (Fig. 4D), e (4) degeneração do ginósporo calazal (Fig. 4F). Os três primeiros casos observados apresentam o ginósporo calazal como o funcional, o qual sofre vacuolação, enquanto os demais ginósporos degeneram. No último caso, onde o ginósporo calazal degenera, não foi observada a continuidade do desenvolvimento (Fig. 4F).

Mesmo com a constatação de variação no ciclo meiótico, observou-se que apenas uma célula, em prevalência o ginósporo calazal, torna-se funcional e dá continuidade ao desenvolvimento embrionário, caracterizando um desenvolvimento monospórico.

Ginogametogênese

O ginósporo funcional (Fig. 5A, B) origina o ginófito uninucleado (Fig. 5C), que apresenta um vacúolo no polo calazal e outro maior no polo micropilar, delimitando um núcleo posicionado próximo ao polo calazal. Nesse estágio, observou-se o início do desenvolvimento da hipóstase nas células nucelares da região calazal do futuro saco embrionário ou ginófito.

O ginófito uninucleado passa por três ciclos mitóticos sucessivos (demonstrado por fotomicrografias apenas o primeiro ciclo), sendo que, apenas no último ocorre a citocinese. Desse modo, a primeira mitose origina um ginófito binucleado (Fig. 5D, E), onde seus núcleos apresentam-se em polos opostos delimitados por um vacúolo central. Observou-se um caso distinto em relação a polarização desses núcleos, em que eles encontram-se na porção mediana da célula, com cada núcleo ocupando uma posição lateral oposta (Fig. 5F). Após, o ginófito binucleado passa pela segunda mitose, originando um ginófito tetranucleado, com dois núcleos em cada polo. Durante toda a gametogênese, observa-se o crescimento gradual do rudimento seminal e do saco embrionário. Contudo, na etapa de ginófito tetranucleado ocorre um crescimento acentuado do gametófito em volume e comprimento, e a maior porção celular é ocupada por um grande vacúolo. O último ciclo mitótico resulta em um ginófito octonucleado, com quatro núcleos em cada polo. Dois núcleos polares, um pertencente ao polo micropilar e o outro ao calazal, migram para o centro do ginófito onde se encontram, e passam a constituir os núcleos da célula média. Os três núcleos que permanecem na região calazal sofrem celularização, gerando as três antípodas, que possuem organização triangular. Os três núcleos que permanecem no polo micropilar, originam as duas sinérgides e a oosfera. Durante a gametogênese, algumas células nucelares contíguas ao

gametófito degeneram. Além disso, ocorre a formação da micrópila, que se dá primeiramente pelo tegumento interno, o qual mostra um crescimento anterior e acelerado em relação ao tegumento externo. No início da citocinese do gametófito, percebe-se uma aceleração no crescimento do tegumento externo o qual, em estádios mais avançados, ultrapassa o tegumento interno, também constituindo parte da micrópila.

Rudimento seminal maduro

O rudimento seminal maduro é anátropo, bitegmentado e crassinucelado (Fig. 6A, B, C). Apresenta um único feixe vascular que percorre o funículo e a rafe e termina na calaza. O apêndice calazal é muito longo e curvado em direção à rafe e caracteriza-se por possuir células alongadas longitudinalmente com grandes vacúolos ocupando quase todo o volume celular (Fig. 6C).

A micrópila é formada por ambos os tegumentos (Fig. 6A, C). O tegumento externo consiste, geralmente, de três camadas celulares (Fig. 6B). Em seção longitudinal, as células da camada externa do tegumento externo mostram-se alongadas longitudinalmente, enquanto que as células da camada interna apresentam-se alongadas radialmente. Em relação à camada central, há predominância de apenas uma, contudo essa porção central pode atingir até três camadas celulares, suas células mostram-se alongadas longitudinalmente. Dessa forma, existe uma variação de três a cinco camadas celulares no tegumento externo. O tegumento interno consiste de duas camadas celulares por toda sua extensão e, normalmente, uma camada central restrita à região calazal (Fig. 6B). Foram observadas variações na disposição da camada central para esse tegumento, em que essa pode estar presente na região calazal e na região micropilar, e, em alguns casos, essa camada pode tornar-se contínua por toda a extensão do tegumento. As células da camada epidérmica interna do tegumento interno que revestem o canal micropilar tornam-se alongadas radialmente e adquirem formato de domo em suas faces periclinais externas (Fig. 6B). Essas células possuem grandes vacúolos

contendo conteúdo polissacarídico e podem sofrer divisão periclinal, gerando um número de camadas que varia entre duas a três camadas nessa porção.

O gametófito feminino maduro consiste de oito núcleos e sete células, do tipo *Polygonum* (Fig. 6D-G). Apresenta morfologia elíptica, com estreitamento na região calazal e constrição mediana, na qual se observa espaço intercelular repleto de substância polissacarídica (Fig. 6B). A hipóstase mostra-se bem desenvolvida (Fig. 6D), com presença de compostos fenólicos na parede celular das células nucelares da região calazal que circundam as antípodas. A epiderme nucelar na região micropilar, nessa fase de desenvolvimento, apresenta forma semelhante à descrita para as células tegumentares que constituem o canal micropilar, ou seja, suas faces periclinais externas em formato de domo. Essas células podem sofrer divisão periclinal, resultando em uma epiderme com porções biestratificadas. O tecido parietal nucelar possui uma estratificação que varia entre duas a quatro camadas celulares. As antípodas (Fig. 6D) permanecem uninucleadas e íntegras até o estágio analisado (flor em antese, anterior à fecundação). A célula média, que delimita as demais células do gametófito, apresenta um vacúolo central que ocupa um grande volume celular. Seus núcleos polares sofrem fusão na região central da célula, antes da fecundação, gerando um grande núcleo secundário com nucléolo proeminente (Fig. 6E). Após essa fusão, o núcleo secundário pode migrar em direção a micrópila, aproximando-se do aparelho oosférico.

O aparelho oosférico é composto pelas duas sinérgides e a oosfera. Cada sinérgide apresenta núcleo de posição central, com nucléolo grande, e diversos vacúolos de posição calazal (Fig. 6F). Essas células, da mesma forma que o observado para as antípodas, não sofrem degeneração até o estágio analisado. Na região micropilar das células, encontra-se um espessamento de parede celular de natureza péctica, denominado aparelho fibrilar. A oosfera apresenta um grande vacúolo de posição calazal e núcleo de posição micropilar a lateral, menor do que o núcleo das sinérgides, com pouco citoplasma circundante (Fig. 6G).

Um caso isolado foi constatado em um dos ovários analisados (1:84), em que se observou um rudimento seminal apresentando, logo abaixo da epiderme, uma célula que se assemelhava a uma célula-mãe de ginósporos, separada por duas camadas de tecido nucelar, de um saco embrionário binucleado em desenvolvimento.

DISCUSSÃO

O ovário de Bromeliaceae é tricarpelar e trilocular, com placentação axial (Wee & Rao 1974, Rao & Wee 1979, Vervaeke *et al.* 2003, Palací *et al.* 2004, Conceição *et al.* 2007, Sartori 2008, Spat 2012, Fagundes & Mariath 2014).

Conforme a revisão apresentada por Fagundes & Mariath (2014), o número de rudimentos seminiais por carpelo é uma característica marcante em Bromeliaceae, mostrando variação dentro da família e das subfamílias. Os rudimentos seminiais em *Vriesea gigantea* apresentam-se em grande número. Quanto a esse caráter, os autores indicam que um número reduzido de rudimentos seminiais por carpelo é, provavelmente, o estado de caráter plesiomórfico para a família e para Poales. Tillandsioideae, subfamília a qual *V. gigantea* faz parte, apresenta uma variação em relação ao gênero *Catopsis*, um dos primeiros a divergir na subfamília (Givnish *et al.* 2007, 2011), o qual possui entre seis e dez rudimentos seminiais por lóculo, enquanto que o restante dos gêneros são caracterizados como polispérmicos (Palací *et al.* 2004, Sajo *et al.* 2004, Sartori 2008, Spat 2012).

A distribuição dos rudimentos seminiais por toda a extensão do lóculo ovariano em *Vriesea gigantea* difere do padrão encontrado em *Aechmea calyculata* (E. Morren) Baker (Alves *et al.*, não publicado), pertencente à subfamília Bromelioideae, que apresenta rudimentos seminiais fixados apenas no segundo quarto mais apical do ovário. Essa característica pode ser de alto valor na delimitação taxonômica, contudo, ainda é pouco abordada nos estudos.

A ontogenia dos rudimentos seminais no ovário, que ocorre de forma basípeta, possibilita que se encontrem rudimentos seminais em distintas fases de desenvolvimento no mesmo ovário, podendo um rudimento seminal apical apresentar-se em estágio gametofítico enquanto que outro basal pode encontrar-se em estágio de desenvolvimento esporofítico. Essa característica ontogenética, apresentada para *V. gigantea*, foi anteriormente descrita para *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel, pertencente à subfamília Bromelioideae, que, além de basípeta, o desenvolvimento também ocorre de modo centrífugo (Fagundes & Mariath 2014).

O primórdio seminal trizonado foi observado em diversas espécies da família, como: *Vriesea carinata* Wawra (Sartori 2008), *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L. B. Sm. (Fagundes & Mariath 2014), *Dyckia pseudococcinea* (Conceição *et al.* 2007), *Pitcairnia encholirioides* L. B. Sm. (Mendes 2012), *Billbergia nutans* (Fagundes & Mariath 2014) e a espécie deste estudo. A condição crassinucelada do rudimento seminal foi observada em todas as espécies estudadas da família (Wee & Rao 1974, Rao & Wee 1979, Palací *et al.* 2004, Sajo *et al.* 2004, Conceição *et al.* 2007, Sartori 2008, Papini *et al.* 2010, Mendes 2012, Spat 2012, Fagundes & Mariath 2014) e também foi constatada em *V. gigantea* além de constituir característica predominante em angiospermas (Bouman 1984).

A célula-mãe de ginósporos, em bromélias e na maioria das angiospermas, sofre divisão meiótica gerando uma tétrade linear que, por degeneração de três ginósporos, apresenta apenas um funcional, o ginósporo calazal (Bouman 1984, Johri *et al.* 1992). Segundo Fagundes & Mariath (2014), Bromeliaceae apresenta desenvolvimento monospórico e gametófito do tipo *Polygonum* como características constantes para todas as espécies estudadas da família, sendo predominantes também para angiospermas (Willemse & van Went 1984).

A calose, na maioria das angiospermas, deposita-se entre a membrana plasmática e a parede celular dos esporos, tanto na androsporogênese quanto na ginosporogênese, e é detectada a partir da prófase I da meiose, com desaparecimento pós-meiótico, no estágio de

tétrade de esporos (Rodkiewicz 1970, Bouman 1984). Rodkiewicz (1970) descreve os diversos padrões de deposição de calose durante a ginosporogênese para angiospermas. O aparecimento da calose ocorre apenas em espécies de desenvolvimento do tipo monospórico ou bispórico, não sendo encontrada em espécies tetraspóricas. Além disso, Rodkiewicz (1970) relata que a deposição ocorre primeiramente no polo em que o ginósporo funcional irá se formar, no caso do desenvolvimento do tipo *Polygonum* este polo é o calazal. No fim da prófase I e durante a metáfase I ocorre a diminuição da concentração de calose na parede calazal do meiócito, e aumento na parede do polo oposto. A tétrade de ginósporos apresenta em suas paredes distribuição heterogênea da calose, e a parede mais externa do ginósporo ativo perde quase totalmente o espessamento. Nesse sentido, o ginósporo funcional já não está mais completamente cercado por calose e começa a receber maior suprimento nutricional, permanecendo íntegro, enquanto que os demais ginósporos, ainda cercados por calose, degeneram (Rodkiewicz 1970, Bouman 1984, Papini *et al.* 2010). Sartori (2008), Papini *et al.* (2010), Mendes (2012) e Fagundes & Mariath (2014) relatam a presença de calose nas paredes celulares nos estádios de ginosporogênese de bromélias, em maior quantidade nas paredes transversais que separam os ginósporos na tétrade.

A deposição de calose auxilia diretamente na formação e na seleção dos ginósporos (Rodkiewicz 1970). Contudo, podem existir variações quanto ao padrão de deposição de calose durante a ginosporogênese, sem que essas influenciem no desenvolvimento final do ginósporo funcional e na gametogênese, que são geneticamente programados (Tucker *et al.* 2001). Bouman (1984) já havia citado o papel da calose no destino dos ginósporos depois da meiose, a partir da distribuição desigual do espessamento parietal na tétrade, de forma que tal espessamento forme um filtro molecular que isola essas células gerativas. Papini *et al.* (2010) também relatam que, para *Tillandsia*, a morte celular programada dos ginósporos supranumerários está ligada ao padrão de deposição de calose ao redor da tétrade.

Durante a ginospogênese, observou-se que a meiose não ocorre de modo regular em *Vriesea gigantea*, apresentando quatro rotas distintas, com diferentes padrões de divisão celular e de degeneração de ginósporos. Desse modo, é possível que variações no modelo de deposição de calose influenciem nas rotas observadas na espécie, mais especificamente nos diferentes padrões de degeneração dos ginósporos. Acreditamos que uma análise histoquímica acerca da localização de calose durante a meiose de *V. gigantea* possa corroborar ou esclarecer esse pressuposto.

Na androspogênese de *Medicago sativa* L, Rosellini *et al.* (2003) observam a síntese normal de calose ao redor dos meiócitos tanto em populações férteis quanto em estéreis. Entretanto, os andrósporos das plantas estéreis permanecem embebidos em calose, enquanto que nas plantas férteis eles apresentam-se livres. Porch & Jahn (2001) observam resultado semelhante nos andrósporos de *Phaseolus vulgaris* L. que foram expostos a estresse térmico. As anteras deiscetes dessa espécie apresentam calose, mantendo os andrósporos unidos em tetrade, o que impede a continuação do desenvolvimento gametofítico e torna estéreis os grãos de pólen da planta.

No estudo realizado por Porch & Jahn (2001), mencionado acima, foram observadas várias características em resposta a altas temperaturas em *Phaseolus vulgaris* como, por exemplo, redução na deiscência da antera, achatamento e colapso dos grãos de pólen e presença de tétrades durante a antese. A observação de tétrades durante a antese indica uma falha na ruptura da parede de calose por β -1,3-glucanase e, em consequência, uma inibição do desenvolvimento do pólen após a meiose. Assim, é perceptível a influência da temperatura no processo de degradação da calose, sabe-se também que esse processo e o momento em que ele ocorre podem influenciar na viabilidade do grão de pólen - a ausência de degradação impede o desenvolvimento do andrófito (Porch & Jahn 2001) e a dissolução prematura pode contribuir para a esterilização dos grãos de pólen (Bhandari 1984). Dessa forma, qualquer

interferência na deposição e degradação da calose pode levar à esterilização dos órgãos reprodutivos nas plantas, ou a uma variação no padrão do desenvolvimento de esporos.

Gross & Kigel (1994) também analisam o efeito da temperatura sobre os estádios embriológicos de *Phaseolus vulgaris* e percebem que as altas temperaturas (32 °C durante o dia e 27°C durante a noite) podem influenciar negativamente a androsporogênese, apresentando como principais resultados a indeiscência das anteras e os andrósporos distorcidos. Em relação à ginospogênese, os autores concluem não haver influência direta da temperatura, pois os botões florais que passam por estresse térmico resultam em sacos embrionários aparentemente normais. A metodologia utilizada pelos autores para avaliar o estresse térmico no rudimento seminal foi a análise de rudimentos seminais fecundados de flores tratadas com altas temperaturas que foram polinizadas por grãos de pólen normais, tratados em temperatura média (22 °C durante o dia e 17 °C durante a noite). No entanto, como mencionado por Gross & Kigel (1994), esse recurso de análise pode ser duvidoso, visto que não é uma avaliação direta da viabilidade do rudimento seminal durante a ginospogênese. Dessa forma, não se pode afirmar que esse processo não é influenciado pela temperatura, mas pode-se dizer que, independentemente da planta reagir ou não ao estresse térmico, o ginósporo funcional não será prejudicado a ponto de impedir o desenvolvimento gametofítico. Os autores concluem que a esporogênese é o estágio mais sensível às temperaturas, principalmente às elevadas temperaturas no período da noite, levando à esterilidade dos andrósporos e gerando uma menor produção de sementes e vagens.

Gross & Kigel (1994) e Porch & Jahn (2001) destacam que o estresse térmico por altas temperaturas não inibe o processo de meiose, na androsporogênese e na ginospogênese. Contudo, esse fator pode influenciar na deposição e degradação de calose, o que, por sua vez, interfere no desenvolvimento do gametófito.

A síntese e a deposição de calose, que ocorrem rapidamente quando estimuladas, podem ser influenciadas por diversos fatores, dentre os quais destacam-se o estresse térmico, tanto

de resfriamento quanto de superaquecimento, a calose de injúria e a calose contra ataques de patógenos, como fungos e vírus (Smith & McCully 1977, Radford *et al.* 1998). Smith & McCully (1977) descrevem a deposição de calose nas paredes celulares nos tecidos de mudas de *Zea mays*, expostas a estresse médio de temperatura. Uma variação de apenas 6 °C mostrou diferentes graus de deposição de calose nos diversos tecidos em desenvolvimento das mudas. Os autores concluem que a indução de deposição diferenciada de calose nas paredes celulares, em resposta a uma pequena variação de temperatura, constitui uma mudança significativa em nível de parede e, portanto, pode ser o primeiro sinal de algum grau de estresse na planta.

Os botões florais, aos quais pertenciam os três ovários em que foi observado o processo meiótico de *Vriesea gigantea*, foram coletados do indivíduo 1: Casa de Vegetação- Campus do Vale/ UFRGS (CV0427). A referida casa de vegetação apresenta controle de irrigação, não sendo controlada qualquer outra variável ambiental. As anteras pertencentes a esses três botões florais (Breitsameter *et al.*, não publicado), apresentaram padrão similar ao encontrado por Gross & Kigel (1994) e Porch & Jahn (2001) em *Phaseolus vulgaris*, isto é, contendo grãos de pólen colapsados.

Farias *et al.* (1992) e Costa *et al.* (2004), através da análise das temperaturas dentro e fora de estufas plásticas, relatam que a temperatura média interna tende a ser maior que a temperatura média externa. Eles verificam, ao longo do experimento, que as médias das temperaturas máximas do ar foram maiores no interior da estufa, tendo uma variação de acréscimo para Farias *et al.* (1992) entre 1,2 a 4,4 °C, e para Costa *et al.* (2004) entre 1,6 a 4,6 °C. Além disso, Farias *et al.* (1992) observam que as maiores amplitudes das temperaturas internas ocorrem nos períodos de temperatura externa mais elevada. Dessa forma, considerando todo o intervalo de acréscimo verificado pelos autores acima mencionados e também as temperaturas registradas para o mês de janeiro de 2013 (Tab. 2) em Porto Alegre, RS, foi elaborada uma previsão das temperaturas máximas atingidas na estufa para o referido

mês, que inclui o dia da coleta desses três botões florais (21 de janeiro de 2013) e os dias anteriores, que englobam as primeiras etapas do desenvolvimento do rudimento seminal. A temperatura máxima atingida no dia da coleta foi de 29 °C, podendo-se prever que no interior da estufa possa ter atingido temperaturas entre 30,2 e 33,6 °C. Além disso, a partir dos dados de temperatura compilados na Tab. 2, pode-se prever que, na maioria dos dias, atingiu-se temperaturas superiores a 30 °C dentro da casa de vegetação.

Dessa forma, conclui-se que as altas temperaturas, às quais a planta e sua inflorescência foram submetidas durante os processos de esporogênese e gametogênese, não impediram as divisões celulares, mas podem ter influenciado na deposição e degradação de calose durante a meiose, culminando nos padrões de degeneração observados nas quatro rotas meióticas verificadas em *Vriesea gigantea*. Esses três botões florais, devido ao padrão ontogenético basípeto dos rudimentos seminais dentro do ovário, apresentaram diversas fases de desenvolvimento, a partir das quais foi possível analisar também gametófitos femininos em amadurecimento, com o número característico de núcleos e células do saco embrionário do tipo *Polygonum*. Dessa maneira, pode-se inferir que, da mesma forma que o observado por Gross & Kigel (1994), a interferência causada pela temperatura durante a ginospogênese de *V. gigantea* não prejudica o desenvolvimento embriológico a ponto de comprometer a fertilidade dos rudimentos seminais.

Como já citado, o desenvolvimento do saco embrionário do tipo *Polygonum* apresentou-se similar ao de outras espécies de bromélias estudadas. *Vriesea gigantea* apresentou, no estágio de ginófito binucleado, um rudimento seminal com polarização de núcleos fora do habitual, na porção mediana da célula, cada um ocupando uma posição lateral oposta, sendo esse o primeiro relato na família de variação na polarização de núcleos durante a ginogametogênese.

De acordo com Fagundes & Mariath (2014), a morfologia do gametófito feminino maduro é um caráter com potencial para utilização nas delimitações de táxons dentro de

Bromeliaceae. Com relação a esse caráter, dentro da subfamília Tillandsioideae, observou-se uma variação na qual *Tillandsia usneoides* possui gametófito oval com estreitamento na região calazal (Fagundes & Mariath 2014), enquanto que *Vriesea gigantea* apresenta o gametófito elíptico com constrição mediana e estreitamento calazal. Nenhum outro estudo menciona a presença de material intercelular de reserva ao redor do gametófito, como foi observado no atual estudo para *V. gigantea*. Em Tillandsioideae, essa é uma característica que varia entre gêneros, para Bromeliaceae observou-se variação intergenérica e intragenérica (Fagundes & Mariath 2014), e as espécies das demais subfamílias não foram avaliadas quanto a esse caráter.

Em relação ao gametófito feminino maduro, a oosfera de *Vriesea gigantea* apresenta o seu núcleo em posição micropilar e o vacúolo em posição calazal. Tal polarização varia ao nível de gênero, já que *V. carinata* apresenta oosfera com núcleo de posição calazal e vacúolo de posição micropilar (Sartori 2008). *Billbergia nutans* apresenta oosfera com uma polarização do núcleo e vacúolo similar a de *Vriesea gigantea*, com vacúolo calazal e núcleo próximo da região micropilar (Fagundes & Mariath 2014). Aparentemente, a polarização no interior da oosfera não é apenas uma característica variante em nível taxonômico, mas sim, uma característica que varia de acordo com o grau de desenvolvimento gametofítico, visto que nos primeiros sinais de amadurecimento do gametófito feminino de *V. gigantea* foi possível observar uma oosfera de núcleo calazal e vacúolo micropilar. Sendo assim, é importante uma caracterização mais acurada das diferentes etapas de amadurecimento do gametófito feminino, para melhor elucidar a polarização final no interior da oosfera.

A fusão dos núcleos polares da célula média antes da fecundação foi observada para algumas espécies de bromélias. Dentro da subfamília Tillandsioideae, foi observada em *Tillandsia aeranthos* (Spat 2012) e *Vriesea carinata* (Sartori 2008), como também em *Vriesea gigantea* no presente estudo. Isso demonstra uma estabilidade do caráter dentro dessa subfamília. Em Pitcairnioideae, tal característica foi descrita apenas para *Dyckia*

pseudococcinea (Mendes 2008). Já em *Billbergia nutans*, subfamília Bromelioideae, essa fusão não foi observada anteriormente à fecundação (Fagundes & Mariath 2014). Os demais estudos de Bromeliaceae não mencionam essa característica.

As antípodas são, normalmente, as menores células encontradas no saco embrionário de angiospermas e possuem comportamento variável, como a degeneração e a proliferação (Willemse & van Went 1984). Em *Vriesea gigantea* essas células apresentam arranjo triangular e, até o estágio analisado – flor em antese antes da fecundação, apresentam-se íntegras e uninucleadas, similar ao observado para *Billbergia nutans*, que mostrou a persistência e a não proliferação dessas células até o estágio de rudimento seminal maduro com presença de tubos polínicos no canal estilar (Fagundes & Mariath 2014). Tal persistência também foi descrita para *Lindmania penduliflora* (Lakshmanan 1967), *Tillandsia usneoides* (Billings 1904) e *Vriesea carinata*, sendo que nessa espécie observa-se a degeneração dessas células apenas na formação da semente (Sartori 2008). Em *Ananas comosus* foi observada a sua degeneração depois de transcorridas entre 12 e 24 horas da antese (Wee & Rao 1974, Rao & Wee 1979). Em contraposição, em *Dyckia pseudococcinea* foi observada a proliferação destas células, gerando um conjunto de aproximadamente 15 células antipodais (Mendes 2008).

A hipóstase em angiospermas fica localizada na região calazal do rudimento seminal (Bouman 1984) e, além de presente em *Vriesea gigantea*, ocorre em diversas espécies de Bromeliaceae, englobando os gêneros *Vriesea* (Sartori 2008), *Tillandsia* (Spat 2012), *Dyckia* (Mendes 2008), *Pitcairnia* (Mendes 2012), *Ananas* (Rao & Wee 1979) e *Billbergia* (Fagundes & Mariath 2014). Acredita-se que a hipóstase possua diversas funções, dentre elas podemos citar a função de facilitador no transporte de nutrientes, por ficar próxima ao feixe vascular da região calazal, como também de proteção ou atuação no balanço hídrico de semente dormente (Bouman 1984). O momento referente ao início do desenvolvimento dessa estrutura, nas espécies estudadas de bromélias, pode variar consideravelmente, a exemplo de

Vriesea gigantea, na qual ocorre logo no início da gametogênese, e *Ananas comosus*, onde essa estrutura só se forma cerca de dois dias após a antese (Rao & Wee 1979).

O rudimento seminal de Bromeliaceae é bitegmentado, e ambos os tegumentos são de origem dérmica (Johri *et al.* 1992), contudo, há uma inconstância quanto à estratificação de ambos os tegumentos para as espécies da família e das subfamílias (Fagundes & Mariath 2014). Algumas espécies apresentam a camada interna do tegumento interno, na região da endóstoma, com um acréscimo no número de camadas celulares, que é visível na espécie em estudo (Sajo *et al.* 2004, Sartori 2008, Spat 2012, Fagundes & Mariath 2014). Assim como em *Tillandsia aeranthos*, *Vriesea gigantea* apresenta o tegumento interno com variação entre duas e três camadas celulares. Essa característica é considerada exceção dentro da família, visto que as demais espécies possuem tegumentos internos biestratificados (Fagundes & Mariath 2014). A estratificação do tegumento externo em *Vriesea gigantea* apresenta-se variante, como o observado para as outras espécies da família (Fagundes & Mariath 2014), contudo, a espécie em estudo pode apresentar o tegumento externo com até cinco camadas celulares, sendo esse o primeiro registro na família. A formação do canal micropilar por ambos os tegumentos em *Vriesea gigantea*, mostrou-se similar ao observado para *Vriesea carinata* (Sartori 2008).

O apêndice calazal, embora tenha sido descrito como característico para a família (Johri *et al.* 1992), possui uma variação considerável, observada também dentro das subfamílias e até mesmo dentro de gêneros e entre populações de espécies. De acordo com Fagundes & Mariath (2014) para *Billbergia nutans* existe uma variação entre as populações da espécie, na qual o apêndice calazal pode ser de vestigial a curto, com curvatura em direção à anti-rafe, relatando o primeiro caso onde há variação morfológica dessa estrutura dentro de populações da mesma espécie. Para as espécies já estudadas, o apêndice calazal pode ser ausente, vestigial, curto, longo, muito longo, ser formado por tricomas, ou ainda, ser lateralmente achatado (Fagundes & Mariath 2014). *Vriesea gigantea* apresenta apêndice

calazal muito longo e curvado em direção à rafe. Essa estrutura foi observada anteriormente para o gênero por Vervaeke *et al.* (2003), que não definiu sua origem ou morfologia, enquanto que, no estudo de *Vriesea carinata*, tal estrutura não é mencionada (Sartori 2008). Fagundes & Mariath (2014) afirmam que a morfologia do apêndice calazal pode não ser um caráter apropriado para aplicação taxonômica, já que inclui variações intraespecíficas. Os autores sugerem que análises mais precisas sejam elaboradas compreendendo diversas populações de cada espécie para que, assim, essa característica possa ser utilizada para fins taxonômicos. Em relação à origem do apêndice calazal, *Vriesea gigantea* apresentou origem subdérmica, como o encontrado para *Billbergia nutans* (Fagundes & Mariath 2014) e *Pitcairnia encholirioides* (Mendes 2012), contrastando com as demais espécies analisadas na literatura, que apresentam estrutura de origem dérmica ou dérmica e subdérmica (Palací *et al.* 2004, Sajo *et al.* 2004, Fagundes & Mariath 2014).

A ontogenia do rudimento seminal de *Vriesea gigantea* apresenta características similares ao observado para as espécies de Bromeliaceae (Fagundes & Mariath 2014), como: primórdio seminal trizonado, rudimento seminal anátropo, crassinucelado e bitegmentado, com ambos os tegumentos de origem dérmica. Contudo, a espécie contrasta com as demais pela presença de características como: apêndice calazal muito longo de origem subdérmica, possível variação na polarização dos núcleos durante o desenvolvimento gametofítico, variação da polarização no interior da oosfera durante o amadurecimento do gametófito feminino e estratificação dos tegumentos que tendem a apresentar maior número de camadas celulares quando comparado com as demais espécies de Bromeliaceae. Similaridades foram observadas a nível de gênero entre *V. gigantea* e *V. carinata* como a fusão dos núcleos polares da célula média anterior a fecundação, e a micrópila sendo formada por ambos os tegumentos. Diversas características analisadas dentro da família e das subfamílias merecem maior aprofundamento devido a vasta oscilação entre as espécies, para que se possa elucidar as delimitações taxonômicas. Além das características já citadas por Fagundes & Mariath

(2014) como as de maior potencial para delimitações dos táxons, sugere-se a inclusão da distribuição dos rudimentos seminais dentro dos lóculos ovarianos, visto que é uma característica pouco abordada e de potencial taxonômico. Além disso, acredita-se que as quatro rotas meióticas observadas em *V. gigantea* possam ter sido influenciadas por uma distribuição anormal na deposição de calose devido à exposição da planta a altas temperaturas durante seu florescimento. Entretanto, mais estudos abordando a ginosporigênese de *Vriesea gigantea*, com análise histoquímica acerca da localização da calose durante o processo, em plantas submetidas a diferentes temperaturas, são necessários para esclarecer e caracterizar a sequência de eventos do processo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPERGS pelo apoio e bolsa de iniciação científica concedidas. Ao Laboratório de Anatomia Vegetal – LAVeg/UFRGS.

REFERÊNCIAS

- BERED, F., KALTCHUK-SANTOS, E., PALMA-SILVA, C. & PAGGI, G. M. 2008. Bromélias: Beleza exótica do novo mundo. In: BARBIERI, R. L. & STUMPF, E. R. T. (Eds.). *Origem e Evolução de Plantas Cultivadas*. Brasília: Embrapa. p.235-251.
- BENZING, D. H. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge: Cambridge University Press. 655 p.
- BHANDARI, N. N. 1984. The Microsporangium. In: JOHRI, B. M. (Ed.). *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Spring-Verlag p. 53-121.
- BILLINGS, F. 1904. A Study of *Tillandsia usneoides*. *Botanical Gazette*, 38(2): 99-121.

BOUMAN, F. 1984. The Ovule. In: JOHRI, B. M. (Ed.). *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Spring-Verlag. p. 123- 157.

CONCEIÇÃO, P. S., DE TONI, K. L. G. & COSTA, C. G. 2007. Particularidades do nucelo de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 5(1): 846-848.

COSTA, E., LEAL, P. A. M. & JUNIOR, R. R. C. 2004. Modelo de simulação da temperatura e umidade relativa do ar no interior da estufa plástica. *Jaboticabal*, 24: 56-67.

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

FARIAS, J. R. B., BERGAMASCHI, H., MARTINS, S. R., BERLATO, M. A. & OLIVEIRA, A. C. B. 1992. Alterações na temperatura e umidade relativa do ar provocadas pelo uso de estufa plástica. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 1(1): 51-62.

FEDER, N. & O'BRIEN, T. P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, 55: 123-142.

FORZZA, R.C., COSTA, A., SIQUEIRA FILHO, J.A., MARTINELLI, G., MONTEIRO, R.F., SANTOS-SILVA, F., SARAIVA, D. P., PAIXÃO-SOUZA, B., LOUZADA, R.B., VERSIEUX, L. 2013 Bromeliaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6472>>. Access on: 14 Jul. 2014

GABRIEL, B. L. 1982. *Biological Electron Microscopy*. New York: Van Nostrand Reinhold Company 264 p.

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

GIVNISH, T. J., MILLAM, K. C., BERRY, P. E. & SYSTMA, K. J. 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae from *ndhF* sequence data. *Aliso*, 23: 3-26.

GIVNISH, T. J., BARFUSS, M. H. J., VAN EE, B., RIINA, R., SCHULTE, K., HORRES, R., GONSISKA, P. A., JABAILY, R. S., CRAYN, D. M., SMITH, J. A. C., WINTER, K., BROWN, G. K., EVANS, T. M., HOLST, B. K., LUTHER, H., TILL, W., ZIZKA, G., BERRY, P. E. & SYTSMA, K. J. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98(5): 1-24.

GROSS, Y. & KIGEL, J. 1994. Differential sensitivity to high temperature of stages in the reproductive development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 36: 201-212.

JOHRI, B. M., AMBEGAOKAR, H. B. & SRIVASTAVA, P. S. 1992. *Comparative embryology of Angiosperms*. New York: Springer-Verlag, 1221 p.

LAKSHMANAN, K. K. 1967. Embryological studies in the Bromeliaceae. I. *Lindmania penduliflora* (C. H. Wright) Stapf. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, 65(2):49-55.

LENZI, M. & ORTH, A. I. 2004. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Biotemas*, 17(2): 67-89.

MCDOWELL, E. M. & TRUMP, B. R. 1976. Histological fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 100(8): 405-414.

MENDES, S. P. 2008. *Endospermogênese e embriogênese de Dyckia pseudococcinea L. B. Smith (Bromeliaceae)*. 83 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MENDES, S. P. 2012. *Estudos embriológicos em Pitcairnia encholirioides L. B. SM.* 142 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

MOZA, M. K. & BHATNAGAR, A. K. 2007. Plant reproductive biology studies crucial for conservation. *Current Science*, 92(9): 1207.

PAGGI, G. 2006. *Biologia reprodutiva e estudo da fertilidade de Vriesea gigantea (Gaud, 1846), Bromeliaceae*. 102 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PALACÍ, C. A., BROWN, G. K. & TUTHILL, D. E. 2004. The Seeds of *Catopsis* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). *Systematic Botany*, 29(3): 518-527.

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

PORCH, T. G. & JAHN, M. 2001; Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. *Plant, Cell and Environment*, 24: 723-731.

- RADFORD, J. E., VESK, M. & OVERALL, R. L. 1998. Callose deposition at plasmodesmata. *Protoplasma*, 201: 30-37.
- RAO, A. N. & WEE, Y. C. 1979 Embryology of the Pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. *New Phytologist*, 83(2): 485-497.
- REITZ, R. 1983. Bromeliáceas e a Malária - Bromélia endêmica. In: *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 559 p.
- RODKIEWICZ, B. 1970 Callose in Cell Walls during Megasporogenesis in Angiosperms. *Planta*, 93: 39-47.
- ROSELLINI, D., FERRANTI, F., BARONE, P. & VERONESI, F. 2003. Expression of female sterility in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Sex Plant Reprod*, 15: 271-279.
- SAJO, M. G., PRYCHID, C. J. & RUDALL, P. 2004. Structure and Development of the Ovule in Bromeliaceae. *Kew Bulletin*, 59(2): 261-267.
- SARTORI, J. S. 2008. *Desenvolvimento floral em Vriesea carinata Wawra (Tillandsioideae – Bromeliaceae)*. 111 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- SAZIMA, M., BUZATO, S. & SAZIMA, I. 1999. Bat pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic Forest sites in Brazil. *Annals of Botany*, 83: 705-712.
- SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae) In: SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. (Eds.). *Flora Neotropica Monograph* 14 (1). New York: Hafner Press. p. 1-662

SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae) In: SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. (Eds.). *Flora Neotropica Monograph* 14 (2). New York: Hafner Press. p.663-1492.

SMITH, M. M. & MCCULLY, M. E. 1977. Mild Temperatura “Stress” and Callose Synthesis. *Planta*, 136: 65-70.

SPAT, C. 2012. *Embriologia de Tillandsia aeranthos (Lois.) L. B. SM. (Tillandsioideae – Bromeliaceae)*. 112 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

TUCKER, M. R., PAECH, A., WILLEMSE, M. T. M. & KOULTUNOW, A. M. G. 2001. Dynamics of callose deposition and β -1,3-glucanase expression during reproductive events in sexual and apomitic *Hieracium*. *Planta*, 212: 487-498.

VERVAEKE, I., PARTON, E., DEROOSE, R. & DE PROFT, M. P. 2003. Flower Biology of Six Cultivars of the Bromeliaceae I. Pollen, Pistil and Petal Appendages. *Selbyana*, 24(1): 78-86.

WEE, Y. C. & RAO, A. N. 1974. Gametophytes and Seed Development in Pineapple. *Current Science*, 43(6): 171-173.

WILLEMSE, M. T. M. & VAN WENT, J. L. 1984. The Female Gametophyte. In: JOHRI, B. M. (Ed.). *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag, p. 159-196.

DECRETO ESTADUAL N° 42.099. Lista Final das Espécies da Flora Ameaçadas – RS01 de janeiro de 2003.

FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Local da coleta e número de botões florais coletados por população de *Vriesea gigantea*.

Número do indivíduo	Número de botões florais coletados
1: Casa de Vegetação- Campus do Vale/ UFRGS (CV0427)	10
2: Campus da Agronomia/UFRGS	30
3: Campus da Agronomia/UFRGS	13
4: Condomínio Atmosfera Eco Clube/ Bairro Agronomia	31

Tabela 2: Calendário de temperaturas máximas e mínimas do mês de janeiro de 2013 para Porto Alegre, RS, Brasil (adaptado de www.accuweather.com), com possíveis intervalos de variação nas temperaturas máximas (entre parênteses) dentro da casa de vegetação. O dia referente à coleta dos botões florais em processo de meiose apresenta-se marcado em azul.

Janeiro de 2013						
		1 Mín. 19 °C Máx. 25 °C (26,2–29,6)	2 Mín. 16 °C Máx. 26 °C (27,2–30,6)	3 Mín. 16 °C Máx. 29 °C (30,2–33,6)	4 Mín. 19 °C Máx. 33 °C (34,2–37,6)	5 Mín. 21 °C Máx. 33 °C (34,2–37,6)
6 Mín. 22 °C Máx. 33 °C (34,2–37,6)	7 Mín. 23 °C Máx. 34 °C (35,2–38,6)	8 Mín. 21 °C Máx. 29 °C (30,2–33,6)	9 Mín. 20 °C Máx. 31 °C (32,2–35,6)	10 Mín. 17 °C Máx. 29 °C (30,2–33,6)	11 Mín. 15 °C Máx. 28 °C (29,2–32,6)	12 Mín. 15 °C Máx. 28 °C (29,2–32,6)
13 Mín. 16 °C Máx. 29 °C (30,2–33,6)	14 Mín. 19 °C Máx. 30 °C (31,2–34,6)	15 Mín. 19 °C Máx. 30 °C (31,2–34,6)	16 Mín. 19 °C Máx. 32 °C (33,2–36,6)	17 Mín. 19 °C Máx. 32 °C (33,2–36,6)	18 Mín. 20 °C Máx. 28 °C (29,2–32,6)	19 Mín. 19 °C Máx. 28 °C (29,2–32,6)
20 Mín. 18 °C Máx. 27 °C (28,2–31,6)	21 Mín. 16 °C Máx. 29 °C (30,2–33,6)	22 Mín. 17 °C Máx. 30 °C (31,2–34,6)	23 Mín. 17 °C Máx. 33 °C (34,2–37,6)	24 Mín. 20 °C Máx. 36 °C (37,2–40,6)	25 Mín. 20 °C Máx. 30 °C (31,2–34,6)	26 Mín. 15 °C Máx. 26 °C (27,2–31,6)
27 Mín. 12 °C Máx. 28 °C (29,2–32,6)	28 Mín. 14 °C Máx. 31 °C (32,2–35,6)	29 Mín. 16 °C Máx. 33 °C (34,2–37,6)	30 Mín. 18 °C Máx. 34 °C (35,2–38,6)	31 Mín. 18 °C Máx. 37 °C (38,2–41,6)		

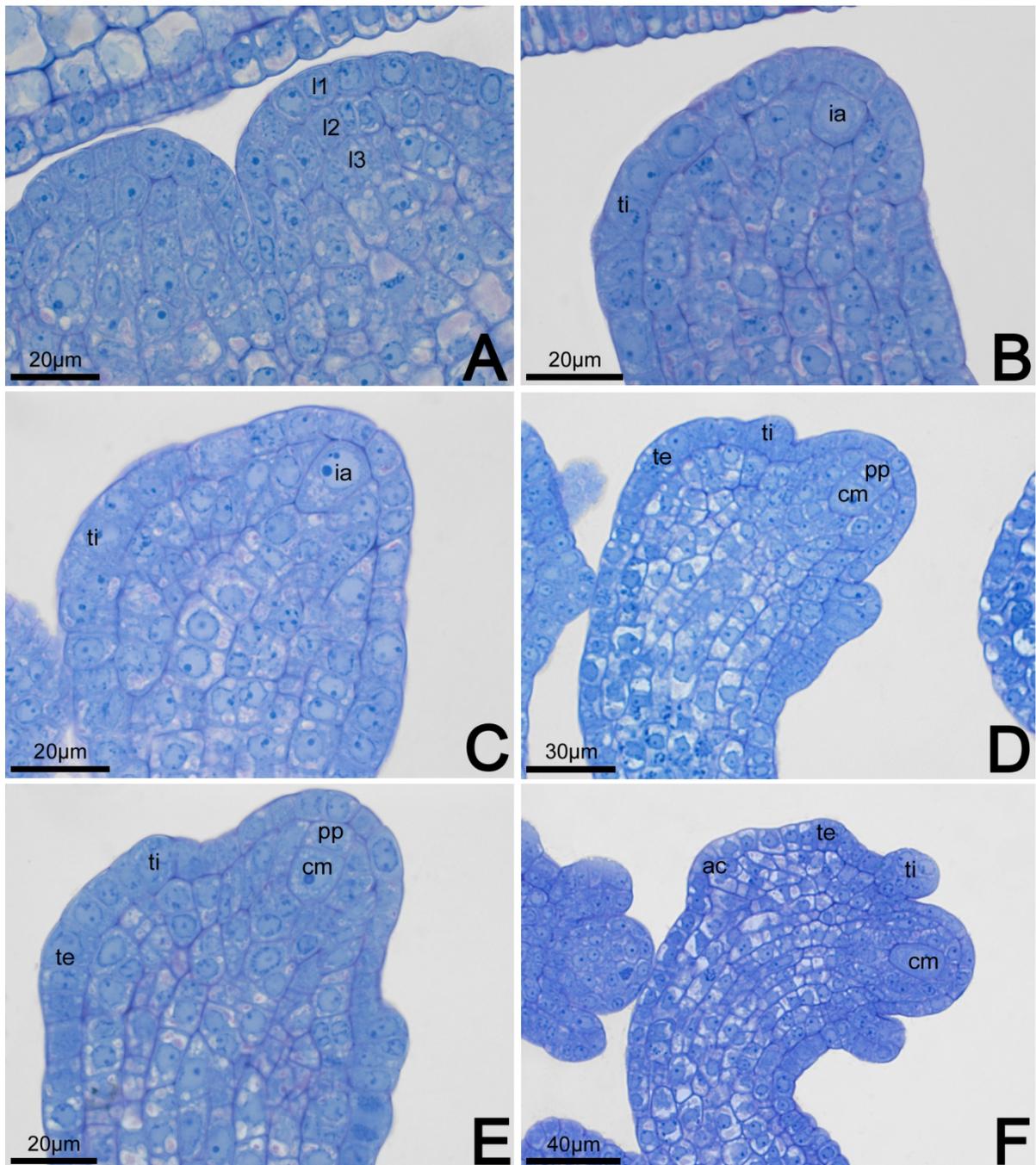


Figura 1: Início do desenvolvimento do rudimento seminal em *V. gigantea*. **A** Primórdio da placenta trizonada. **B, C** Rudimento seminal com inicial arquesporial. **D, E** Rudimento seminal com célula-mãe de ginósporos e formação dos tegumentos. **F** Surgimento do apêndice calazal. 11 camada dérmica, 12 camada subdérmica, 13 camada central, ia inicial arquesporial, ti tegumento interno, te tegumento externo, cm célula-mãe de ginósporos, pp célula parietal primária, ac apêndice calazal.

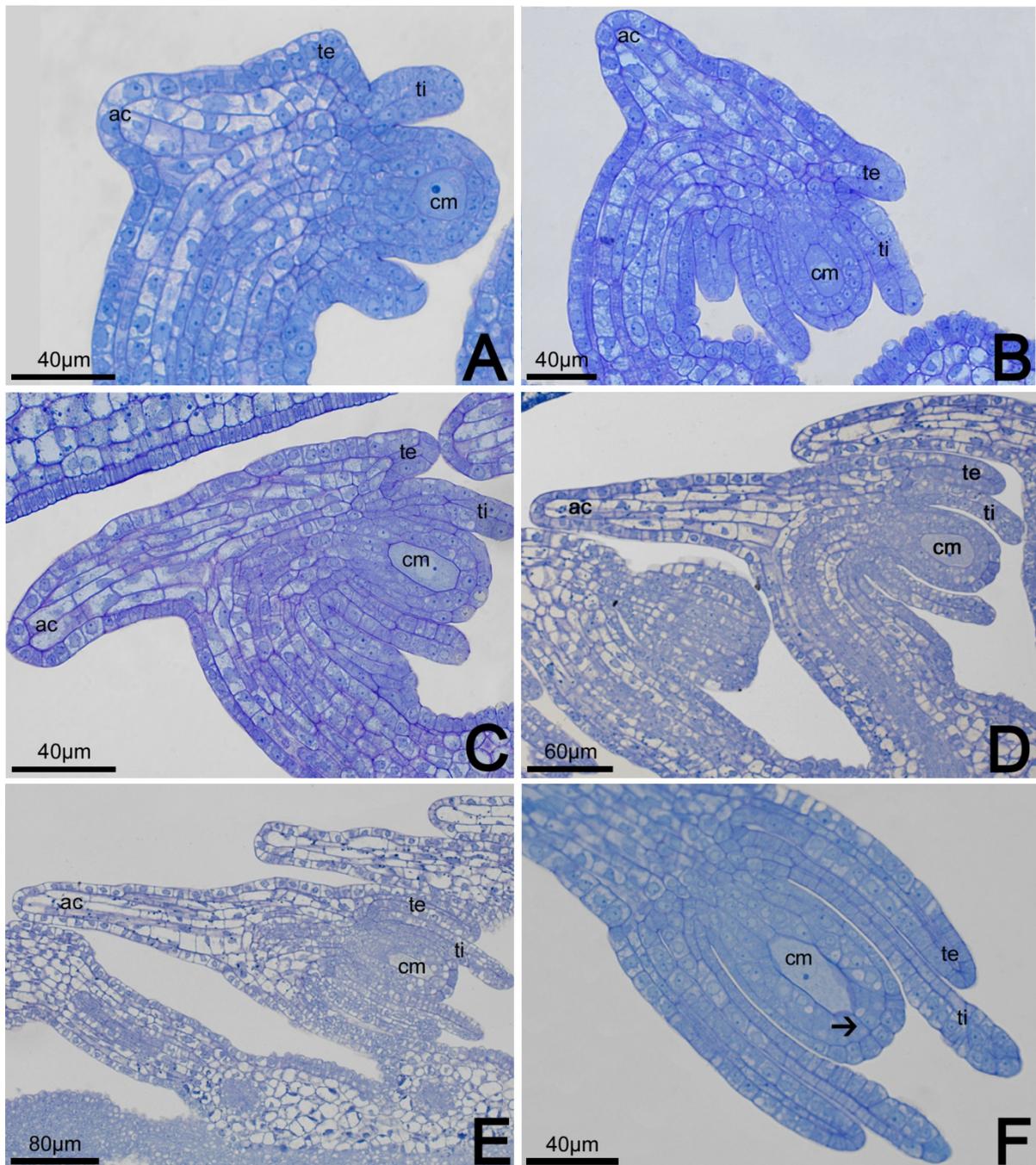


Figura 2: A-F Alongamento da célula-mãe de ginósporos, desenvolvimento dos tegumentos interno e externo e do apêndice calazal em *V. gigantea*. ac apêndice calazal, te tegumento externo, ti tegumento interno, cm célula-mãe de ginósporos, seta tecido parietal biestratificado.

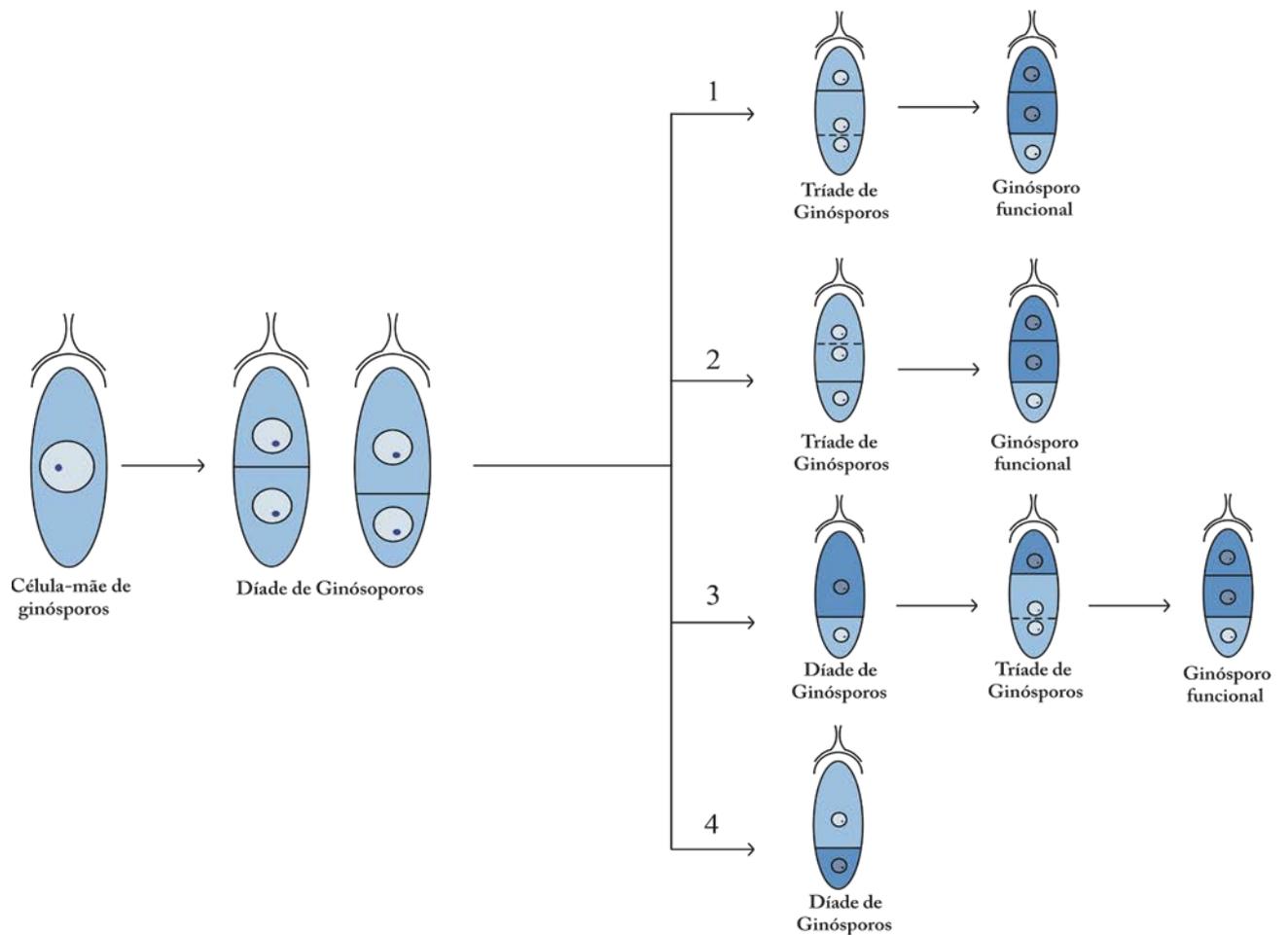


Figura 3: Esquema apresentando as quatro rotas de divisão meiótica (1 a 4) na ginospogênese em *Vriesea gigantea*. Células viáveis: em azul-médio com núcleo em azul-claro, células em degeneração: em azul-escuro com núcleo em cinza.

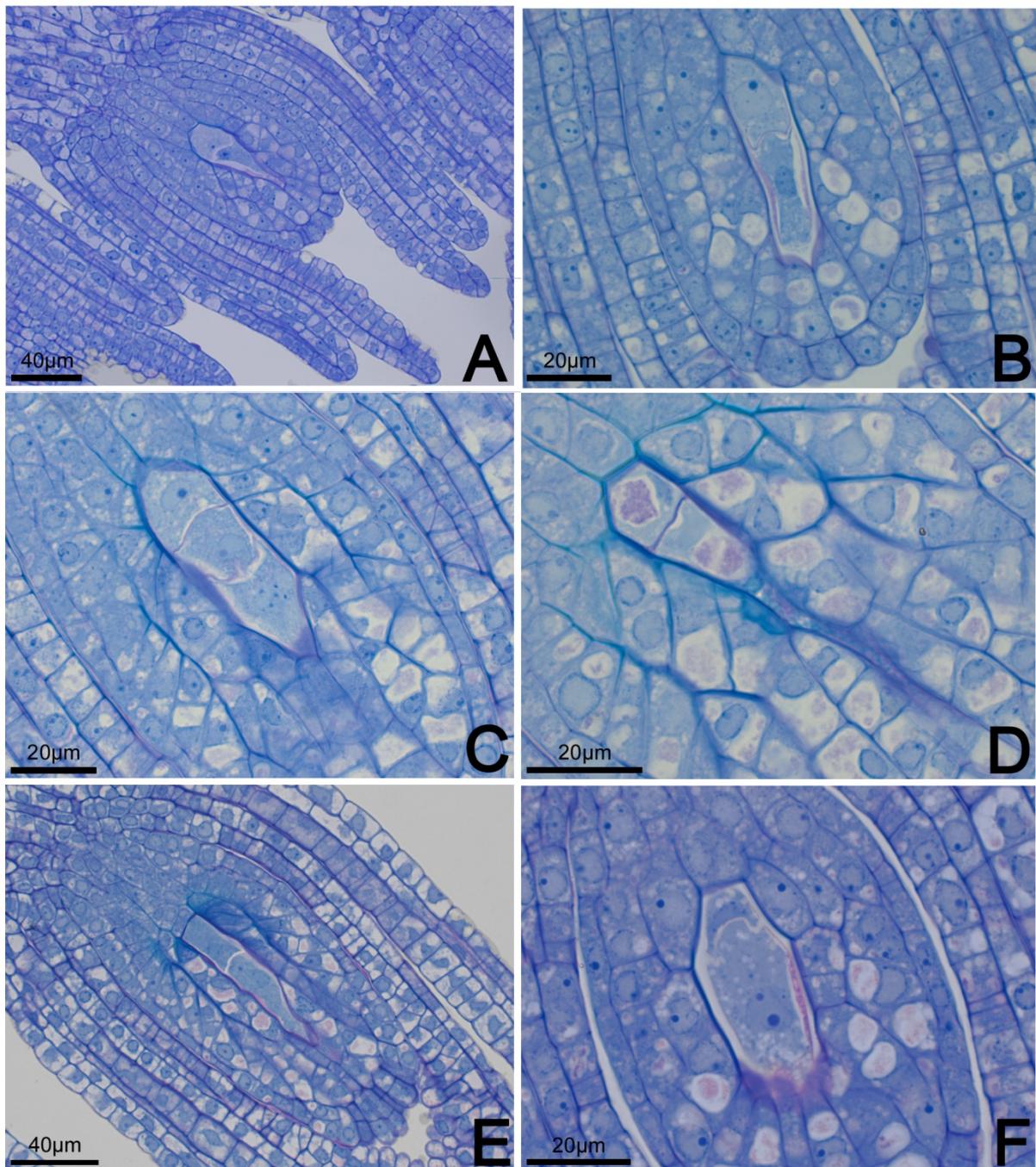


Figura 4: Meiose em *V. gigantea*. **A, B** Díade de ginósporos com ginósporo micropilar em degeneração. **C** Tríade de ginósporos. **D** Dois ginósporos viáveis, com ginósporo micropilar degenerado. **E** Díade de ginósporos, com ginósporo micropilar de maior comprimento. **F** Díade de ginósporos com ginósporo calazal em degeneração.

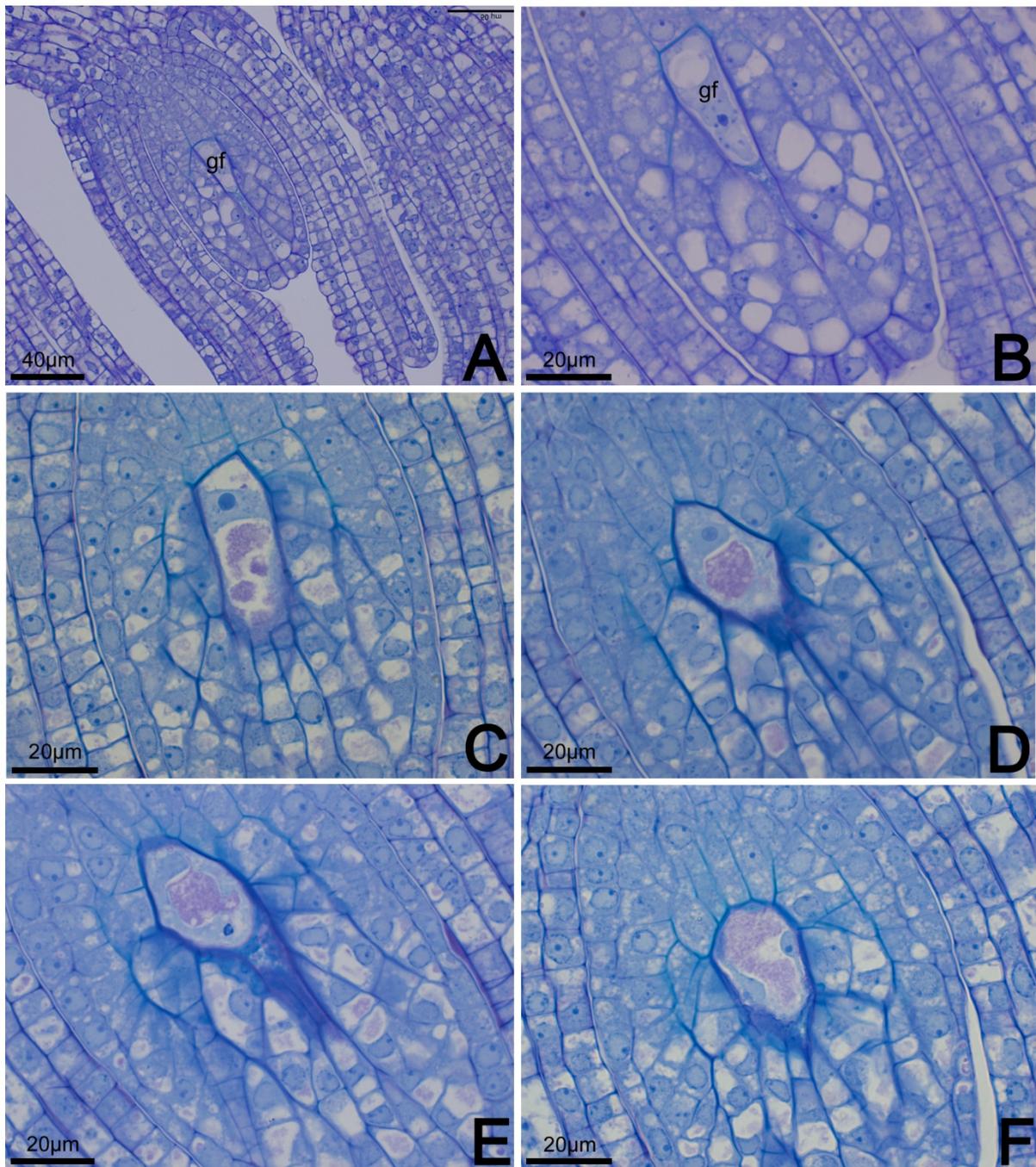


Figura 5: Ginósporo funcional e primeiro ciclo mitótico da ginogametogênese de *V. gigantea*. **A, B** Ginósporo funcional. **C** Ginófito uninucleado. **D, E** Ginófito binucleado, em seções sequenciais. **F** Ginófito binucleado com polarização de núcleos fora do habitual. gf ginósporo funcional.

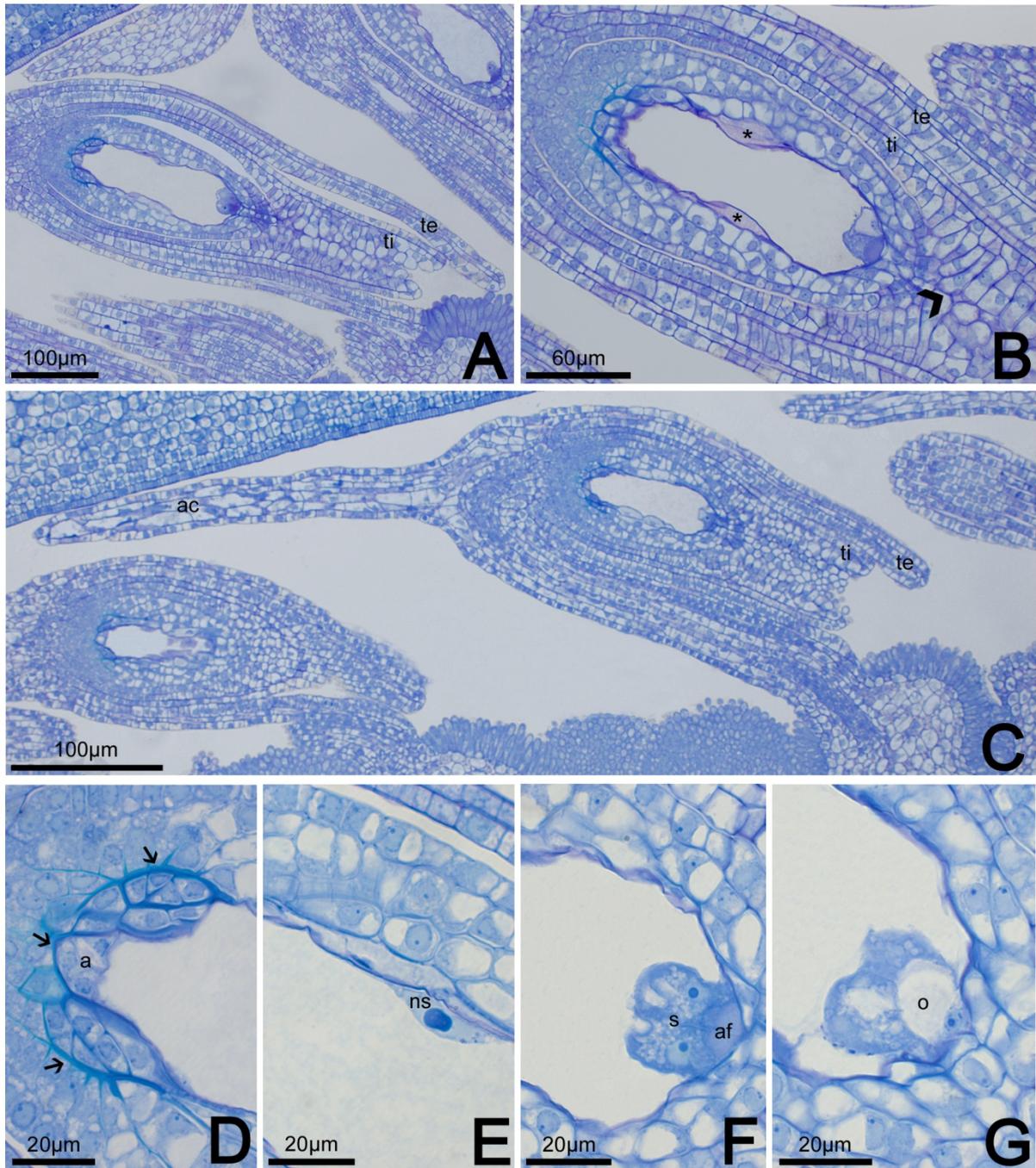


Figura 6: Rudimento seminal maduro em *V. gigantea*. **A, B, C** Diferentes aumentos da estrutura. **D, E, F, G** Detalhes do gametófito feminino. **D** Região calazal com antípodas e hipóstase. **E** Região central com núcleo secundário. **F** Região micropilar com sinérgides e aparelho fibrilar. **G** Região micropilar com oosfera. te tegumento externo, ti tegumento interno, a antípodas, ns núcleo secundário, s sinérgides, af aparelho fibrilar, o oosfera, ac apêndice calazal, asterisco espaço intercelular repleto de substância polissacarídica, seta

hipóstase, cabeça de seta células da camada epidérmica interna do tegumento interno com faces periclinais externas em formato de domo.