

RINALDO PIRES DOS SANTOS

TESE BOT/202

AAA

TESE BOT/202

ANDROSPOROGÊNESE,  
ANDROGAMETOGÊNESE E  
DESENVOLVIMENTO DO  
ANDROSPORÂNGIO DE  
*Ilex paraguariensis* St.Hil.  
(AQUIFOLIACEAE)

Universidade Federal do R. G. S.  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
Departamento de Botânica  
BIBLIOTECA

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Monografia  
Dissertação apresentada ao Departamento de  
Botânica da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como um dos requisitos para  
a obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas - Ênfase em Botânica.

Porto Alegre, Agosto de 1993.

À Alessandra.

Aos meus Pais.

**AGRADECIMENTOS.**

Desde o meu ingresso no Laboratório de Anatomia Vegetal, no ano de 1989 como bolsista, encontrei em todas as situações, o incentivo e a experiência do meu orientador e amigo, Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araújo Mariath. Agradeço a confiança prestada a mim por ele, na realização e término deste trabalho (e na sua continuidade). A minha formação científica e apreciação do trabalho em equipe está sendo lapidada graças à sua competência como orientador. Espero poder realizar, ainda, muitos trabalhos em conjunto com ele.

Ao amigo Carlos Frederico Widholzer, Mestre em Botânica e técnico do Laboratório de Anatomia Vegetal, agradeço pelo treinamento e qualificação técnica que me foram dadas, desde meu ingresso no Departamento de Botânica, como bolsista.

Agradeço ao Prof. Dr. Alfredo Elio Cocucci, da Universidade de Córdoba, pela inestimável colaboração e informações prestadas. A sua grande experiência no campo da Embriologia Vegetal foi de grande valor para o esclarecimento de dúvidas que surgiram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal agradeço pela amizade, colaboração e prestatividade.

À Prof. Dra. Maria Luiza Lorscheitter, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelas informações gentilmente cedidas sobre medidas de grãos de pólen acetolizados da família Aquifoliaceae.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq) e à Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande dos Sul, pelas Bolsas de Iniciação Científica concedidas.

Universidade Federal do R.G.S.  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
Departamento de Botânica  
BIBLIOTECA

## RESUMO.

O trabalho aqui apresentado descreve, anatomicamente e citologicamente, as transformações ocorridas durante a ontogenia e maturação dos androsporângios, seus estratos parietais, esporogênese, gametogênese de *Ilex paraguariensis* St.Hil. (Aquifoliaceae) e ontogenia da esporoderme.

As flores estaminadas de *Ilex paraguariensis* são tetraestaminadas. Cada estame compõe-se de uma antera alongada longitudinalmente, com deiscência rimosa, suspensa por um filete que se alonga durante a antese. As anteras são tetrasporangiadas. Os esporângios estão agrupados dois a dois em cada teca. Cada teca é composta de dois grupos de células iniciais, separadas por um septo parenquimático permanente. A ontogenia dos estratos parietais é do tipo dicotiledônea e resulta na formação da epiderme, endotécio, camada média e tapete. As células iniciais do esporângio ainda originam as células do tapete interno. A formação do arquespório é muito tardia e dá-se somente após a diferenciação das células do tapete.

A epiderme é formada por células papilosas na deiscência, dotadas de uma parede periclinal externa estriada e de comunicações entre as paredes radiais. O endotécio é geralmente bi ou triestratificado e caracteriza-se pela presença de espessamentos secundários lignificados, em forma de "U" ou ferradura. Estes são importantes na deiscência da antera, que ocorre independentemente em cada esporângio, sem dissolução dos septos. O tapete é poliplóide quando maduro e apresenta mais de um estrato de células no tapete interno. Corpúsculos de Übisch (orbículos) e uma membrana peritapetal recobrem a superfície periclinal interna e a parede periclinal externa, respectivamente, das células do tapete. Na

deiscência, persistem apenas a epiderme e o endotécio.

O tecido arquesporial é formado por uma massa de células que sofre mitoses para aumento do seu número, antes da meiose. A citocinese meiótica é simultânea e os andrósporos envoltos por calose estão dispostos em formação tetraédrica. Após a dissolução da calose, os andrósporos livres no fluido locular sofrem um aumento de volume mediante vacuolização do citoplasma, o que também acarreta a polarização do núcleo haplóide. A mitose do andrósporo dá origem à célula generativa periférica e à célula vegetativa. A célula vegetativa acumula grãos de amido no seu citoplasma. Antes da antese, estes são metabolizados. A célula generativa é englobada pela vegetativa e, já binucleada, forma com o núcleo vegetativo, a unidade germinativa masculina.

Os grãos de pólen são tricolporados, intectados. A estratificação da esporoderme compreende a primexina, a exina, subdividida em ectexina e endexina, a medina e a intina. A primexina péctica permanente é importante para a determinação do padrão da exina. A ectexina é derivada de atividade esporofítica e gametofítica enquanto a endexina apenas da atividade gametofítica. A medina péctica tem grande importância fisiológica durante a germinação do tubo polínico e acomodação das mudanças de volume. A intina, a última camada a ser sintetizada e com constituição provavelmente celulósica, é hialina e extremamente delgada.

## SUMÁRIO.

1. INTRODUÇÃO.	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.	
2.1. Fixação química e inclusão do material botânico.	4
2.2. Preparação do material e observação.	5
2.3. Histoquímica.	6
2.4. Terminologia empregada neste trabalho.	6
3. RESULTADOS.	
3.1. O androsporângio.	7
3.1.2. Ontogenia.	7
3.1.3. Estratos parietais.	9
3.1.3.1. Epiderme.	9
3.1.3.2. Endotécio.	10
3.1.3.3. Camada Média.	12
3.1.3.4. Tapete.	12
3.1.4. Deiscência.	15
3.2. Esporogênese.	16
3.2.1. O tecido arquesporial.	16
3.2.2. Meiose e formação das tétrades.	16
3.2.3. Dissolução da calose e separação dos andrósporos.	18
3.2.4. Vacuolização e maturação dos andrósporos.	18
3.3. Gametogênese.	18
3.3.1. Formação das células vegetativa e generativa.	18
3.3.1.1. A célula vegetativa.	19
3.3.1.2. A célula generativa.	19
3.3.2. Formação dos núcleos espermáticos e a unidade germinativa masculina.	20
3.3.3. O andrófito maduro.	21
3.4. A esporoderme.	22
3.4.1. Ontogenia.	23
3.4.1.1. Primexina.	23
3.4.1.2. Exina.	24
3.4.1.3. Medina.	25
3.4.1.4. Intina.	25

<b>4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.</b>	
4.1. Uso do termo arquespório, células mãe de arquespório e células mãe de andrósporo.	28
4.2. Ontogenia do androsporângio e dos estratos parietais	29
4.3. O tapete.	31
4.4. O processo de deiscência das anteras.	34
4.5. A esporogênese e a gametogênese.	37
4.6. Número de núcleos e células do andrófito.	37
4.7. A Unidade Germinativa Masculina.	39
4.8. O grão de pólen.	40
4.9. Primexina na ontogenia da ectexina e na compatibilidade pólen-estigma.	41
4.10. Ontogenia da ectexina.	44
4.11. A endexina e sua origem.	47
4.12. A medina e sua importância fisiológica.	48
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.</b>	
5.1. Sobre a ontogenia e diferenciação dos androsporângios.	50
5.2. Sobre a ontogenia do tapete.	50
5.3. Sobre a medina.	51
<b>6. FIGURAS.</b>	52
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	100

## 1. INTRODUÇÃO.

*Ilex paraguariensis* St.Hil., a erva-mate, pertence à família Aquifoliaceae, ordem Celastrales. As plantas da espécie, que chegam a atingir mais de doze metros de altura, têm aspecto arborescente e apresentam flores imperfeitas reunidas em inflorescências dicasiais. As suas folhas são utilizadas para a preparação do chá-mate ou chimarrão.

O gênero *Ilex* é formado por cerca de 500 espécies e possui uma distribuição que abrange as Américas (do sul do Canadá ao rio da Prata), a Ásia Oriental e faixa tropical da costa do Pacífico, Europa (mediterrânea) e sul da África (GIBERTI, 1979). Vários pesquisadores dedicaram-se ao estudo de aspectos embriológicos do gênero *Ilex*. HERR (1959, 1961) realizou estudos sobre os padrões de desenvolvimento do óvulo, megagametófito e endosperma, constatando diferenças genéricas entre as espécies analisadas. Informações sobre a embriogênese de *Ilex opaca* foram apresentadas por BARRET (1962) enquanto que HU (1975) analisou o comportamento de embriões rudimentares, sob meios de cultura, em onze espécies de *Ilex*. MARTIN (1977), estudou a morfologia do pólen de 18 espécies do gênero *Ilex*, entre elas *I. paraguariensis*. HEUSER (1990) e HEUSER *et al.* (1992) estudaram o endosperma e o embrião durante a embriogênese tardia de *I. paraguariensis*.

Em geral, estudos sobre a esporogênese, gametogênese e diferenciação dos estratos parietais do esporângio masculino (epiderme, endotécio, camadas médias e tapete) de espécimes pertencentes à família Aquifoliaceae são escassos. Algumas características da ordem Celastrales foram descritas por JOHRI *et alii* (1992). Os caracteres relacionados ao androsporângio e gametófito são: tapete do tipo secretor, citocinese simultânea das células-mãe de pólen e grãos de pólen bicelulados, com

exceção da família Stackhousiaceae. COPELAND (1963) descreve sucintamente o andrófito e os estratos parietais do androsporângio de *Ilex cornuti*, relatando que o endotécio é fibroso, o tapete é binucleado, não restrito a apenas uma camada e os grãos de pólen com três aberturas têm uma superfície papilada. BREWBAKER (1967) estudou seis famílias da ordem Celastrales (incluindo quatro espécies do gênero *Ilex*) quanto ao número de núcleos do andrófito durante a deiscência. Segundo o autor, a ordem Celastrales compreende famílias que apresentam espécies com grãos de pólen binucleados (dentre elas as Aquifoliaceae). SCHOENBERG *et alii* (1989) realizaram um estudo sobre a morfologia interna e externa das flores pistiladas e estaminadas de *Ilex paraguariensis*, com descrições sucintas sobre a epiderme e o endotécio dos esporângios.

A falta de caracterizações mais detalhadas sobre a embriologia de *Ilex paraguariensis* justificou, portanto, um estudo pormenorizado desta espécie de grande importância econômica. Assim sendo, os objetivos desta dissertação são:

- a)descrever as transformações ocorridas na ontogenia dos androsporângios de *Ilex paraguariensis* St. Hil.;
- b)descrever anatomica e citologicamente as características dos estratos parietais, relacionando-as às suas consequências fisiológicas;
- c)caracterizar, detalhadamente, os processos da esporogênese e gametogênese masculina, e
- d)caracterizar a esporoderme e analisar a sua ontogenia dentro dos conhecimentos atuais à respeito da origem e função dos estratos que revestem o gametófito masculino maduro.

Os caracteres embriológicos abordados neste trabalho são de

importância taxonômica (HERR, 1984). Para a espécie *Ilex paraguariensis*, foram estudados e descritos as características do androsporângio, seu número por antera, número de estratos parietais e sua ontogenia, tipo de tapete e ploidia, espessamentos no endotécio, tipo de citocinese dos andrósporos, número de núcleos no andrófito maduro, as células vegetativa e generativa, espoderme (características e ontogenia), entre outros.

Os resultados e conclusões aqui apresentados serão complementados em publicações posteriores sobre a análise ultraestrutural das transformações do andrósporo e andrófito, fazendo parte de uma série de pesquisas que vêm sendo realizadas sobre a embriologia da espécie, com fins taxonômico e conhecimento da sua biologia floral, executadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS.

Inflorescências de *Ilex paraguariensis* St. Hil. contendo flores estaminadas foram coletadas e fixadas na Estação Experimental da Secretaria da Agricultura, Município de Veranópolis (árvores de códigos SA69, SA70 e SA74), e no Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Estado do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, ambas no Estado do Rio Grande do Sul. As coletas, realizadas entre 21 de setembro e 2 de novembro de 1990 e entre 17 de setembro e 15 de outubro de 1992, respectivamente, abrangeram inflorescências em diferentes estágios de desenvolvimento, desde os primórdios florais até as flores em antese.

Material de testemunho das diferentes amostras estão depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob o número ICN 96709.

### 2.1. Fixação química e inclusão do material botânico.

As inflorescências foram fixadas em FPA50 °GL por 24 horas ou Carnoy (3:1) por 1 hora à temperatura ambiente e transferidas para álcool 50°GL e 70°GL, respectivamente (JOHANSEN, 1940). O material (devidamente classificados segundo suas dimensões) foi desidratado em série etílica e embebido em parafina segundo JOHANSEN (1940). Glutaraldeído 2% em solução tampão-fosfato pH 6,8 (GABRIEL, 1982), a uma temperatura entre 0 e 4 °C, foi utilizado como fixador para inclusão de anteras e botões florais em hidroxietilmetacrilato (Technovit 7100). Após lavado em tampão fosfato pH 6,8, o material foi desidratado em série etílica (entre 0 e 4 °C) e incluído em resina plástica.

## 2.2. Preparação do material e observação.

As secções transversais e longitudinais em parafina, com 7 $\mu$ m de espessura, foram feitas em micrótomo rotativo manual com navalha de aço tipo "C", distendidas em platina aquecida a 40°C e aderidas às lâminas de vidro segundo BISSING (1974). Para a coloração foram empregadas a combinação de Azul de Astra e Safranina ou "Kernechtrot" e Azul de Anilina 0,1% em solução aquosa (GERLACH, 1977).

O material incluído em hidroxietilmetacrilato foi seccionado em micrótomo de guias, marca Leitz-módulo 1400, com navalha de aço tipo "D", com espessuras de 1 ou 2  $\mu$ m (secções semifinas). A seguir, as secções foram distendidas em água a uma temperatura de 25 °C e aderidas às lâminas de vidro à sobre placa aquecida à 60 graus centígrados. Para a coloração empregou-se Azul de Toluidina 0,05% em tampão benzoato, pH 4,4 (O'BRIEN & McCULLY, 1981).

As lâminas permanentes encontram-se registradas e depositadas no laminário do Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os desenhos em câmara clara, fotomicrografias e medidas dos grãos de pólen foram realizados em um microscópio Leitz, modelo Dialux 20 EB.

Para a observação e realização das eletromicrografias sob microscopia eletrônica de varredura, anteras fixadas em FPA foram desidratadas em acetona e xilol (1:1) e a seguir, maceradas e aderidas sobre suportes de alumínio, quando foram metalizadas com carbono e liga de ouro-paládio.

### 2.3. Histoquímica.

Para a realização dos testes histoquímicos, as seguintes técnicas foram utilizadas: Coomassie Blue 0,1% em solução alcoólica 30%<sup>1</sup> para proteínas totais; Vermelho de Rutênio 0,02% em solução aquosa (GERLACH, 1977; JENSEN, 1962) para ácidos pécnicos; Ácido Periódico/Reativo de SCHIFF (PAS), segundo O'BRIEN & McCULLY (1980) para polissacarídeos totais; Azul de Anilina 0,03% em solução alcoólica 70 % para esporopolenina (BHANDARI & KISHORI, 1971); reação de FEULGEN (GERLACH, 1977) para ADN; pironina/verde de metila (JENSEN, 1962) para diferenciação de ADN e ARN. Os testes histoquímicos foram feitos em secções semifinas de anteras ou botões incluídos em hidroxietilmetacrilato.

A confirmação da presença de calose envolvendo os meiócitos e a tétrade de andrósporos deu-se pela coloração de secções em parafina com Azul de Anilina 0,1% em pH 8,5 (CURRIER, 1957; MARTIN, 1959) seguida de excitação sob luz ultra-violeta em microscópio de fluorescência, marca Zeiss.

### 2.4. Terminologia empregada neste trabalho.

Este trabalho se baseia no conceito de alternância de gerações segundo HOFMEISTER (1851) e para fins descritivos adotou-se a terminologia proposta por BATTAGLIA (1982).

---

<sup>1</sup>. MARIATH, Jorge Ernesto de Araujo. (Depto. de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil) Comunicação pessoal, 1993.

### 3. RESULTADOS.

#### 3.1. O androsporângio.

Os androsporângios de *Ilex paraguariensis* situam-se em anteras tetrasporangiadas dorsifixas, alongadas longitudinalmente. Cada antera compõem-se de duas tecas, com dois esporângios cada uma, unidas por tecido conectivo. A liberação dos andrófitos (grãos de pólen), durante a deiscência, dá-se simultaneamente através de quatro fendas longitudinais, os estômios, independentes para cada esporângio. Os estômios estendem-se ao longo da antera, entre seu ápice e sua base, não abrangendo nem o seu extremo superior nem o seu extremo inferior (deiscência rimosa).

O crescimento relativo da antera em comprimento, desde o início da esporogênese até a deiscência, é de cerca de 63%, apresentando um comprimento médio máximo de 1,4 milímetros (figura 1.E). Cada antera é suspensa por um filete vascularizado que sofre alongamento celular durante a antese floral. O filete, nos estágios anteriores, é curto e a antera permanece junto ao pistilódio enquanto o botão floral está fechado. O período de desenvolvimento das anteras, desde botões com 1 mm de diâmetro até o início da antese é de cerca de 28 dias (figura 1). A flor estaminada, após a antese, permanece aberta por 7 a 8 dias, aproximadamente, antes da sua senescência (fig. 1.K).

#### 4.1.2. Ontogenia.

Após a diferenciação do cálice e corola, os primórdios estaminais surgem como protuberâncias sobre o receptáculo floral, separando-se centrifugamente durante a sua diferenciação. Inicialmente, a protoderme

cobre o tecido meristemático em crescimento em cada primórdio (fig. 2.A). Em secção transversal, o primórdio estaminal toma a sua forma característica, com a formação de dois lobos em cada teca, onde existe uma continuidade no tecido meristemático hipodérmico (fig. 2.B). Com a vacuolização das células medianas dos meristemas, tem-se a formação do septo que separa duas massas de células em cada teca: as células-iniciais do esporângio (fig. 3.A).

As células-iniciais do esporângio, após divisões periclinais da região hipodérmica, originam a camada parietal primária. Da camada parietal primária, novamente por divisões periclinais, originam-se as camadas parietais secundárias externa e interna, restritas apenas à região hipodérmica (fig. 3.B). As células-iniciais adjacentes ao tecido conectivo tornam-se progressivamente vacuolizadas. Várias células iniciais sofrem este processo de vacuolização, mesmo algumas mais internas e próximas às camadas parietais. Estas células irão se diferenciar em células do tapete interno.

A formação dos estratos parietais é do tipo dicotiledôneo, a partir das camadas parietais secundárias hipodérmicas. A camada secundária externa diferencia-se em endotécio e camada média, por divisões periclinais. A camada secundária interna diferencia-se diretamente nas células do tapete (fig. 4). As células-iniciais, parcialmente vacuolizadas e adjacentes ao conectivo, aumentam em volume por um incremento na vacuolização e funcionam como um tapete interno. Este tecido tem a forma de "U" quando visto em secção transversal da antera jovem (fig. 4 e 5). As células do tapete interno mantêm-se adjacente às do tapete de origem parietal e constituem uma camada que envolve por completo as células iniciais (fig. 5).

As células-iniciais do esporângio são células com núcleos comparativamente com maiores dimensões, citoplasma denso, além de plastídios dispersos e abundantes (fig. 6.A). Após divisões mitóticas, aumentam em número no interior do esporângio (fig. 6.C). Nesta etapa de desenvolvimento, são agora denominadas células-iniciais do arquespório ou células-mãe do arquespório (fig. 6.B). Durante o seu crescimento, podem apresentar as paredes onduladas ou pregueadas (fig. 6.D). Encerrada as divisões mitóticas, as células entram em interfase meiótica constituindo, a partir deste momento, o tecido arquesporial que, mais tarde, entrará em meiose constituindo as células-mãe de andrósporo (fig. 6.E).

### 3.1.3. Estratos parietais.

O androsporângio de *Ilex paraguariensis* apresenta epiderme, endotécio, camada média e tapete como estratos parietais.

#### 3.1.3.1. Epiderme.

A epiderme origina-se diretamente das células protodérmicas do primórdio estaminal e constitui-se sempre de uma única camada de células, ausente de estômatos. Na antera jovem, as células são similares em volume e forma, sendo revestidas por uma fina e lisa cutícula (fig. 5). Durante a maturação da antera, ocorre expansão radial das células epidérmicas, com aumento de volume e mudança de forma, graças a um processo de vacuolização. As células assumem um formato papiloso (fig. 7.A), com exceção daquelas que recobrem o parênquima dos septos entre os esporângios em cada teca. Nestas regiões, a epiderme mantém-se com células achatadas (fig. 10.A).

As células epidérmicas adjacentes ao septo possuem pequenas

dimensões e aumentam progressivamente à medida que dele se distanciam. Cerca de três fileiras de células, entretando, manter-se-ão assim até o período de deiscência. Elas determinarão a faixa longitudinal de abertura dos esporângios (fig. 10 A-B).

Durante a meiose das células-mãe de andrósporo, formam-se estrias na parede periclinal externa. Estas estrias, na sua maioria paralelas com o eixo longitudinal da antera, são ornamentações da parede de natureza predominantemente péctica (fig. 7.D). A delgada cutícula recobre as estrias (fig. 7.B).

Na antera madura, as paredes transversais apresentam campos de pontuação primários. Em muitos casos, entretanto, a lamela média e a parede celulósica estão ausentes, formando uma abertura de grandes dimensões que permite uma fusão direta entre os citoplasmas de duas células epidérmicas adjacentes (fig. 7.C e fig. 17). A epiderme mantém-se até a deiscência da antera quando, então, suas células mostram sinais de plasmólise e dissolução do conteúdo celular. Todas as paredes pectocelulósicas, entretanto, permanecem intactas.

#### 3.1.3.2. Endotécio.

As células do endotécio jovem apresentam-se vacuolizadas e compostas de células regulares e achatadas, inicialmente num único estrato de células (fig. 5). Em algumas regiões, o endotécio apresenta dois ou mais estratos. As células progressivamente aumentam em volume, simultaneamente às mudanças que se ocorrem nas células epidérmicas (fig. 10.A; fig. 13-15).

O endotécio caracteriza-se pela formação de paredes espessadas, celulósicas e descontínuas, em forma de ferradura ou costelas, geralmente

paralelas (fig. 10.A). Algumas vezes, os espessamentos encontram-se fundidos entre si na base. Os espessamentos começam a surgir durante as primeiras etapas da gametogênese, começando nas células parietais mais próximas do tecido conectivo e aparecendo, a seguir, naquelas adjacentes aos septos. Inicialmente de constituição celulósica, progressivamente tornam-se impregnados com lignina. Também foram detectadas a presença de pectinas cobrindo a face interna dos espessamento, junto ao plasmalema (fig. 10.D). Em secção transversal, as faixas espessadas tem a forma de um bulbo, com um estrangulamento mediano (fig.17 (es)).

Cerca de duas ou três células do endotécio, próximas aos septos, mostram uma ausência de espessamentos além de apresentarem menor volume (fig. 10.A-B). As demais, apresentam espessamentos com variações na sua orientação junto às paredes primárias. Há uma predominância de espessamentos nas paredes periclinal interna e transversais, na forma de anéis incompletos e paralelos. As células presentes no encurvamento da parede do esporângio, mais distantes das faixas estomias, apresentam espessamentos incompletos nas paredes periclinal interna e radiais.

Os espessamentos presentes no endotécio estendem-se a algumas camadas do tecido conectivo, adjacentes aos esporângios. Nos septos, os espessamentos ocorrem predominantemente nas paredes anticlinais e transversais, como anéis incompletos e paralelos (fig. 10.B). No tecido conectivo próximo ao feixe vascular, os espessamentos são escassos junto às paredes transversais e muitas vezes, formam anéis fechados sob a parede primária.

Durante a deiscência, as células do endotécio e conectivo morrem, restando intactas apenas as paredes celulares primárias e os espessamentos lignificados.

### 3.1.3.3. Camada Média.

A camada média constitui-se na fase pré-meiótica do tecido esporogênico como células estratificadas, e vacuolizadas. Geralmente possui apenas um camada de células (fig. 7.A; fig. 13-15 e fig. 17). Entretanto, em alguns esporângios, uma camada média biestratificada pode estar presente. Também está presente entre o tecido conectivo e as células do tapete interno, não tendo continuidade, entretanto, com as células derivadas da camada parietal secundária externa (fig. 5).

A vacuolização das células do tapete (parietal e interno) e o seu conseqüente aumento de volume celular faz com que a camada média apresente-se mais achatada. Durante a prófase meiótica, tornam-se mais colapsadas e obliteram-se completamente até a maturidade da antera.

### 3.1.3.4. Tapete.

O tapete de *Ilex paraguariensis* é do tipo secretor ou glandular. Quanto à origem, é subdividido em tapete parietal e tapete interno. O tapete parietal, derivado da camada parietal secundária interna, é geralmente formado por um único estrato celular, mas pode apresentar duas camadas de células. O tapete interno apresenta-se multiseriado e adjacente ao tecido conectivo (fig. 5). É possível diferenciar o tapete parietal do tapete interno somente na antera jovem, em diferenciação. Na antera já totalmente diferenciada, dotada de tecido arquesporial, a distinção entre os dois torna-se difícil, apresentando-se como um tecido contínuo que envolve as células germinativas (fig. 6.E).

O tapete torna-se perfeitamente distinto das células iniciais, as quais envolve, pela presença de grandes vacúolos e núcleos com menores dimensões (fig. 5; fig. 6.A-D). Campos primários de pontuação são

freqüentes, conectando cada célula a sua adjacente (fig. 8.A).

Durante as mitoses do tecido esporogênico, cada célula do tapete apresenta um único núcleo, além de um grande vacúolo (fig. 9.A). Este caráter persiste até o início da esporogênese, quando mediante uma, duas e até três mitoses acitocinéticas, as células tornam-se binucleadas, tetranucleadas ou octanucleadas, respectivamente (fig. 9.B-C). Durante o transcorrer da meiose, são freqüentes as fusões nucleares, caracterizando a poliploidia das células do tapete. Foram observados casos de poliploidia resultantes da fusão de dois, três ou quatro núcleos, que podem ser originalmente distintos pelos seus nucléolos que permanecem conspícuos durante toda a permanência das células do tapete (fig. 8.A e fig. 9.C). As células poliplóides, com núcleos de grandes dimensões e com formatos esféricos, elipsóides ou algumas vezes irregulares, sofrem novas mitoses acitocinéticas, originando células com dois ou mais núcleos poliplóides (fig. 9.D).

Há um acúmulo de glóbulos de natureza química não-determinada no citoplasma tapetal que é secretado e acumulado entre o plasmalema e a parede celular. Durante a lise das paredes das células do tapete, este conteúdo é descarregado para o fluido locular após a citocinese e formação das tétrades de andrósporos envoltas por calose (fig. 13).

A atividade de dissolução das paredes atinge seu ápice simultaneamente à dissolução enzimática da calose que envolve os andrósporos. Quando estes tornam-se totalmente livres no fluido locular, restam intactas apenas a parede periclinal externa e alguns restos das paredes anticlinalis (fig. 8.B e fig. 14). As células do tapete mantêm agora contato direto, assemelhando-se a um tapete do tipo amebóide. Porém, nunca deixam de apresentar o seu caráter marcadamente parietal (fig. 7.A

e fig. 14).

A partir da vacuolização dos andrósporos, numerosos corpúsculos de Übisch (orbículos) estão presentes sobre as superfícies periclinais interna e anticlinais (fig. 8.D e fig. 15). Ao mesmo tempo, massas de esporopolenina polimerizada com grandes dimensões (7 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro) são formadas dentro do citoplasma, sendo liberados para a cavidade locular após a dissolução do tapete (fig. 8.D). Em microscopia eletrônica de varredura, os corpúsculos de Übisch são esféricos, com dimensões de cerca de 0,5 micrômetros (fig. 22.E). Pequenos corpos em forma de bastão também foram observados sobre a superfície locular do tapete. Suas dimensões atingem cerca de 0,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e diâmetro de menos de 0,2 micrômetros. Uma membrana peritapetal<sup>1</sup> de esporopolenina forma-se nas paredes periclinais externas, junto à camada média (fig. 8.B e fig. 15). Diferentemente do depósito orbicular, a membrana peritapetal é uma capa contínua que isola o tapete dos demais estratos parietais, depositando-se ainda sobre os vestígios das paredes radiais e transversais. Secções semifinas de anteras submetidas a coloração com Verde de Metila-Pironina mostram que os corpúsculos de Übisch e a membrana peritapetal reagem diferentemente quando comparadas com a reação da esporopolelina da esporoderme dos grãos de pólen. Além disso, as massas de esporopolenina presentes no tapete apresentam a periferia com o mesmo resultado de coloração que os corpúsculos de Übisch, enquanto a maior parte da massa, central, resultado idêntico ao da esporoderme em formação.

---

1. A expressão membrana peritapetal não designa uma membrana verdadeira, como são as membranas biológicas, constituídas por uma bicapa lipídica. Trata-se, na verdade, apenas de um filme delgado de um polímero (esporopolenina) e a expressão é meramente descritiva. O mesmo se aplica à expressão membrana tapetal.

O tapete apresenta sinais de dissolução celular durante as fases iniciais do processo de gametogênese. Os núcleos poliplóides perdem cariolinfa e diminuem em tamanho (fig. 9.E-F). Após o seu desaparecimento, uma capa de esporopolenina originada da aglutinação ou fusão dos orbículos da face periclinal interna, a membrana tapetal, encontra-se e fundiona-se com a membrana peritapetal, originada na face periclinal externa do tapete. Ambas formam um saco ou bolsa fechada que reveste o interior do lóculo, envolvendo os andrófitos até a deiscência (fig. 10.A e fig. 17).

#### 3.1.4. Deiscência.

A deiscência das anteras é racimosa. Cada esporângio abre-se independentemente através do estômio. Inicialmente, as células da epiderme e endotécio, localizadas próximo ao septo, despreendem-se umas das outras, numa zona que corresponde a duas ou três fileiras de células, em toda a extensão da antera (fig. 10.C). Esta abertura inicial não ultrapassa dez micrômetros de largura. Ao mesmo tempo, o saco de esporopolenina rompe-se abaixo da abertura estomial, permitindo a liberação dos líquidos que formavam o fluido locular. A massa de grãos de pólen não oferece nenhuma pressão contra as paredes do esporângio.

Após a desidratação das células da epiderme e endotécio, na antese, a parede formada por estes estratos move-se centrifugamente. Isto permite que as paredes de esporângios localizados em tecas diferentes de uma mesma antera possam se tocar, expondo por completo a massa de grãos de pólen ao meio ambiente.

### 3.2. Esporogênese.

#### 3.2.1. O tecido arquesporial.

O tecido arquesporial, originado a partir das divisões mitóticas das células iniciais do arquespório, é constituído de células com citoplasma denso e com plastídios dispersos. São individualizadas por uma camada delgada de calose. A deposição de calose é visualizada, primeiramente, nas paredes adjacentes às células do tapete. O tecido arquesporial mantém-se como tal até o momento em que os seus núcleos entram em prófase meiótica. A partir desta fase, as suas células são chamadas de células mãe de andrósporos (fig. 6.E).

#### 3.2.2. Meiose e formação das tétrades.

As células-mãe de andrósporos (CMAN ou meiócitos) entram em prófase meiótica, durante a qual calose é continuamente depositada entre o plasmalema e a parede pectocelulósica. A parede calósica aumenta em espessura, sobretudo nos ângulos, onde pode alcançar cerca de 8 micrômetros de espessura (fig. 11.C e fig. 12.B). Diversos leucoplastos, contendo pequenos grãos de amido, são encontrados no citoplasma (fig. 12.A). Durante a primeira metáfase, os plastídios estão distribuídos na região equatorial da célula, próximos aos cromossomos metafásicos (fig. 12.B).

As CMAN entram na metáfase I e completam o primeiro ciclo meiótico sem que ocorra citocinese (fig. 11.A-E). Os cromossomos-homólogos separados sofrem descondensação e reorganizam-se em núcleos-filhos dotados de um nucléolo (fig. 11.E). Os plastídios ainda permanecem na

região equatorial. O intervalo de tempo entre o fim da telófase I e início da prófase II é indeterminado. Na anáfase II foi observada a migração das cromátides-irmãs, num mesmo plano (fig. 11.F) ou em planos ortogonais. Durante a telófase II, os quatro núcleos-filhos haplóides sofrem um rearranjo espacial assumindo a configuração tetraédrica (fig. 11.G). Fibras de fuso estão presentes conectando cada núcleo haplóide com os outros.

Existe, durante o transcorrer da meiose nas células no interior de um mesmo androsporângio, um sincronismo que não é verificado quando comparados dois esporângios de uma mesma antera. As células dentro do esporângio mantêm-se na mesma fase da divisão meiótica. Nos outros esporângios, o ciclo pode ser um pouco mais adiantado ou atrasado. Entretanto, as células-mãe de todos os esporângios da antera entram em prófase meiótica ao mesmo tempo.

A meiose finaliza-se com a citocinese simultânea das células tetranucleadas haplóides (fig. 11.G). A citocinese inicia com a constrição periférica centrípeta do citoplasma entre cada núcleo haplóide (fig. 12.D). Simultaneamente, calose é depositada entre os citoplasmas que estão sendo individualizados. Os plastídios distribuem-se igualmente entre cada célula dos andrósporo, distanciadas por menos de um micrômetro. A parede pectocelulósica original das CMAN mantêm-se intacta, envolvendo as tétrades de andrósporo com calose. Após a digestão do cimento péctico originariamente existente entre as CMAN, ocorre a formação da cavidade locular, na qual as tétrades permanecem suspensas no fluido existente (fig. 13). Cada andrósporo apresenta citoplasma livre de vacúolos e plastídios dispersos (fig. 12.D).

Não foram encontrados casos de desenvolvimento anormal da meiose ou formação das tétrades nas amostras analisadas. Também não

foram encontrados casos de esterilidade ocorridas durante a meiose.

### 3.2.3. Dissolução da calose e separação dos andrósporos.

A parede pectocelulósica de origem esporofítica e a calose desaparecem simultaneamente. Durante o processo de dissolução, pequenas floculações são vistas junto à calose. Os andrósporos jovens, livres no fluido locular (rico em granulações resultantes da dissolução das paredes do tapete e daquelas que envolvem as tétrades) têm o eixo equatorial maior que o polar (fig. 14). Amiloplastos de pequenas dimensões também estão presentes, dispersos no citoplasma (fig. 18.A).

### 3.2.4. Vacuolização e maturação dos andrósporos.

Os andrósporos aumentam em volume auxiliados pela vacuolização do seu citoplasma. A polarização do núcleo começa com o aparecimento de pequenos vacúolos que mais tarde se fundem e originam um grande e único vacúolo (fig. 18.B), fazendo com que o núcleo se desloque para junto da esporoderme. Grãos de proteínas estão presentes no interior do vacúolo principal (fig. 20.B). Os plastídios têm forma alongada e se encontram dispersos no citoplasma, comprimido contra a parede do andrósporo (fig. 23.D).

## 3.3. Gametogênese.

### 3.3.1. Formação das células vegetativa e generativa.

A célula do andrósporo entra em mitose assimétrica (fig.16. A-E). Após a citocinese originam-se duas células desiguais, separadas por uma

delgada parede pectocelulósica: a célula vegetativa e a célula generativa, periférica (fig. 16.F; fig. 18.C e fig. 23.F). O vacúolo desaparece progressivamente, por completo.

#### 3.3.1.1. A célula vegetativa.

A célula vegetativa ocupa a maior parte do volume do gametófito jovem e tem um núcleo esférico central com cromatina não-condensada (o que o torna pouco visível e hialino) e com um ou dois nucléolos (fig. 16.G). A vacuolização pré-mitótica desaparece completamente. Os plastos apresentam uma fase de amilogênese intensa, adquirindo grãos de amido com grandes dimensões e que ocupam grande parte do seu volume celular (fig. 18.D; fig. 23.F-G). A amilólise ocorre imediatamente após a incorporação da célula generativa e os grãos de amido são catabolizados pela célula vegetativa (fig. 18.E-F), desaparecendo por completo no andrófito deiscente (fig. 18.G-H; fig. 23.I-J). Durante a amilólise, o núcleo vegetativo parece estar envolvido na origem de novos plastídios, encontrados em grande abundância junto à periferia nuclear (fig. 17; fig. 23.H). A célula vegetativa apresenta ainda, durante a incorporação da célula generativa, maiores concentrações de ácido ribonucleico (ARN) junto à região equatorial da célula, sob os colpos. Estas regiões de maior densidade de ARN mostram-se na forma de faixas descontínuas muito próximas à esporoderme (fig. 20.D-E). Proteína amorfa é encontrada na forma de pequenos grãos dispersos no citoplasma, dentro de pequenos vacúolos (fig. 20.A; fig. 23.E).

#### 3.3.1.2. A célula generativa.

A célula generativa ou célula-mãe dos gametas, imediatamente

após a mitose do andrósporo, encontra-se comprimida pela célula vegetativa contra a esporoderme (fig. 18.C; fig.23.F). Apresenta um núcleo comparativamente menor, com forma esférica, cromatina condensada e com um nucléolo distinto. Plastídios não foram encontrados. Nesta etapa, quando isolada por dissolução química da esporoderme, a célula generativa apresenta uma forma esférica (fig.16.F), persistindo nesta condição até que a célula vegetativa inicie o processo de englobamento celular (fig.23.G). Quando a célula generativa fica envolta por completo por esta e mantém persistente a sua parede péctica (fig.17; fig. 18.E e fig. 20.C). O processo de englobamento começa pelo desligamento da célula generativa junto à parede péctica da esporoderme. Isto é acompanhado pelo "estrangulamento" da sua face citoplasmática parietal. Mediante esta compressão do citoplasma, forma-se um "cordão" algumas vezes espiralado, limitado por parede péctica. Este cordão liga, temporariamente, a célula generativa à esporoderme (fig. 23.H). Esta conexão é dissolvida e a célula passa a assumir, gradativamente, uma forma alongada e falciforme, com a permanência de um segmento do cordão citoplasmático numa das suas extremidades (fig. 18.F).

### 3.3.2. Formação dos núcleos espermáticos e a *unidade germinativa masculina*.

No interior da célula vegetativa, a célula generativa sofre mitose acitocinética, originando dois núcleos espermáticos (núcleos gaméticos). A formação de fuso e a migração de cromossomos não foram encontrados. Os núcleos espermáticos permanecem aderidos e dispostos lado a lado, longitudinalmente ou transversalmente. Apresentam forma alongada e cromatina muito condensada, dificultando a identificação dos nucléolos,

ainda presentes (fig. 17). A ocorrência posterior de citocinese não foi constatada, não sendo comprovada a existência de parede pectocelulósica individualizando os núcleos espermáticos. As observações indicam que, em *Ilex paraguariensis*, os núcleos espermáticos mantêm-se em um citoplasma comum (fig. 17).

O núcleo vegetativo e a célula espermática binucleada sofrem uma gradual aproximação resultando, finalmente, na formação de uma unidade germinativa masculina (fig.19). Esta unidade morfológica persiste até a deiscência da antera, no centro do citoplasma vegetativo (fig. 18.G-H). O núcleo vegetativo muda seu formato, tornando-se ovóide e com uma depressão paralela ao longo do seu eixo maior. A célula espermática migra em sua direção. Após o contato, o núcleo vegetativo envolve parcialmente a célula espermática, que encaixa-se na depressão nuclear vegetativa, em toda a sua extensão longitudinal (fig. 19.B; fig. 23.I-J). A existência de conexões físicas entre o núcleo vegetativo e a célula espermática é, ainda, desconhecida.

### 3.3.3. O andrófito maduro.

O andrófito maduro constitui-se do citoplasma vegetativo isento de vacúolos e com leucoplastos dispersos, no qual encontra-se a unidade germinativa masculina, na região central. As substâncias de reserva, como grãos de amido ou proteína, estão ausentes. O núcleo vegetativo apresenta um nucléolo de pequenas dimensões. Maiores concentrações de ácido ribonucleico (ARN) são encontradas na forma de faixas paralelas à esporoderme e também ao redor da unidade germinativa masculina (20.F).

### 3.4. A esporoderme.

A parede dos grãos de pólen está constituída, durante a deiscência da antera, pela primexina, exina, medina e intina. Os grãos de pólen (fixados e não-acetolizados) de *Ilex paraguariensis*, quando maduros (durante a deiscência) são oblato-esferoidais ( $7/8 < P/E < 8/8$ ), tricolporados, intectados. As medidas médias dos eixos polar(P) e equatorial(E) são 25,4  $\mu\text{m}$  e 27,2  $\mu\text{m}$ , respectivamente (tabela II).

A primexina é um estrato descontínuo, de constituição predominantemente péctica (tabela I), localizado sobre a exina, entre as báculas. Permanece mesmo no grão de pólen maduro, durante a deiscência da antera (fig.17; fig 21.A; fig. 23.J).

A exina, está subdividida em sexina (a subcamada ornamentada) e nexina, a camada basal. A sexina é pilada, compondo-se de báculas terminadas em cabeças arredondadas, de tamanho variável (entre 0,6 e 2,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e raramente fundidas entre si (fig. 22.B-D). A nexina compreende uma camada basal na qual é notada uma subdivisão (fig. 23.C-J), evidenciada por diferenças de coloração (tabela I). O estrato mais externo da nexina, a nexina 1, mantém continuidade física com a sexina. O estrato mais interno, a nexina 2, separa-se da nexina 1 por um linha de descontinuidade. As análises ontogenéticas da exina (fig. 23) permitem agrupar a sexina e a nexina 1 no estrato da denominado ectexina, enquanto a nexina 2 corresponde à endexina, sendo depositados em momento diferentes da formação da exina.

A medina é o estrato localizado imediatamente sob a endexina (nexina 2). Apresenta constituição basicamente péctica (ácidos pécticos), ao contrário da intina, predominantemente celulósica e caracterizada como o

último estrato da esporoderme, em contato com o plasmalema gametofítico.

### 3.4.1. Ontogenia.

#### 3.4.1.1. Primexina.

A primexina é o primeiro estrato da esporoderme. É sintetizada pelos andrósporos ainda envoltos por calose, entre esta e o plasmalema celular (fig. 23.A). Inicialmente, apresenta-se mais delgada nas regiões onde anteriormente estavam presentes as fibras de fuso que orientaram os andrósporos na formação da tétrade. Posteriormente, formam-se três discos lenticulares espessados equidistantes, localizados na linha equatorial, também de constituição péctica. Estes espessamentos pécticos determinam a localização dos colpos e poros do futuro grão de pólen (fig. 18.A e fig. 23.B).

Após a dissolução da calose, nos intercolpos, a primexina apresenta pontos de descontinuidade, na qual estão inseridas as probáculas, espalhadas sobre toda a sua superfície, com um diâmetro de cerca de 0,3 micrômetros. Durante toda a síntese de esporopolenina para a formação da exina, a primexina permanece presente sobre a exina. Em nenhum momento, ocorre deposição ou adição de esporopolenina sobre a primexina.

As regiões de espessamento da primexina, na zona equatorial dos grãos de pólen, são posteriormente encapsuladas pela deposição de esporopolenina, para a formação da endexina (fig. 23.B-D). Os constituintes pécticos da primexina, nestas zonas, desaparecem por completo, como será descrito adiante.

Com o aumento do volume do pólen, a primexina mantém-se inalterada na sua espessura. Apresenta, também, resultado positivo no

teste para localização de proteínas (fig. 20.A).

#### 3.4.1.2. Exina.

A exina pode ser primeiramente visualizada durante a téttrade de andrósporo envoltos por calose (fig. 23.A). A primeira subcamada distinguida é a sexina, sob a forma de pequenos pontos coincidentes com as regiões de descontinuidade da primexina, as probáculas. A seguir, sob a primexina, surge uma fina camada, a nexina 1 (camada basal da ectexina), contínua com as probáculas. A partir da primexina, as probáculas são forçados para junto da calose (fig. 23.A), ao mesmo tempo em que são adicionados novos materiais no interior do esporo. Agora, na forma de bastões radiais curtos, as probáculas transformam-se nas báculos iniciais, unidas pela nexina 1 e em contato com parede calósica. As báculos sofrem pequenas dilatações nas suas extremidades, formando as cabeças. Quando em contato com o fluido externo locular, após a dissolução da calose, as cabeças gradualmente sofrem novos depósitos, provenientes de precursores originados no tapete.

No andrósporo jovem (fig. 23.B e fig. 22.A), recém liberado da calose, a exina compreende uma camada basal, a nexina 1, em contato com o plasmalema (sob a primexina) e as colunas radiais - as báculos - contíguas com a camada basal, cujas extremidades (as cabeças) sofrem contínuo acréscimo de materiais de origem tapetal. A camada basal apresenta-se com uma espessura uniforme nos intercolpos. Nos colpos, a exina é exteriorizada e reveste as zonas espessadas da primexina apenas na sua face externa (fig. 23.B). No interior do colpo, junto ao plasmalema, não ocorrem deposições. No exterior, torna-se menos espessa quanto mais

próxima da região central, na linha equatorial, até torna-se imperceptível.

A nexina 2 (endexina) é o estrato da exina localizado sob a ectexina e sintetizado depois deste. Constitui-se também de esporopolenina, embora com características físicas ou químicas diferentes da ectexina (tabela I). Os andrósporos recém liberados da calose apresentam discos lenticulares espessados, possivelmente de natureza celulósica, nas regiões equatoriais dos colpos, sob os espessamentos da primexina (fig. 23.B). Durante a vacuolização inicial dos andrósporos, os discos espessados são impregnados com esporopolenina, adquirindo continuidade sob toda a ectexina (fig. 23.C). Porém, as colorações empregadas permitem a distinção entre as duas camadas. Nesta etapa, tem pouca espessura. Na região equatorial dos colpos, a endexina termina por envolver a porção mais espessada dos materiais pécticos da primexina, tornando-os isolados entre uma capa interna e uma capa externa (fig. 23.D). Antes disso, canais radiais parecem atravessar a primexina dos colpos, conectando o interior da célula com o exterior (fig. 23.B).

#### 3.4.1.3. Medina.

A medina é o quarto estrato da esporoderme, abaixo da endexina. É visível, primeiramente, na forma de discos lenticulares delgados, de constituição péctica (ácido pécticos - ver tabela I), na região equatorial dos colpos durante os últimos estágios da vacuolização do andrósporo (fig. 23.D). Torna-se espessada e então, forma um estrato contínuo sob a endexina, que se reduz gradualmente em espessura em direção aos intercolpos (fig. 21.A). Pelo menos dois estratos de materiais pécticos são identificados na medina. O mais interno, geralmente apresenta maior intensidade de coloração (fig. 21.A). Entretanto, esta característica pode estar invertida (fig. 21.B).

Simultaneamente ao aumento de espessura da medina na porção mediana dos colpos, os materiais pécticos (originados a partir da primexina) contidos no interior da endexina são comprimidos, culminando com o encontro das camadas interna e externa da endexina dos colpos (fig. 23.E-G). O destino das substâncias pécticas outrora envelopadas pela endexina é desconhecido.

A medina tem uma grande capacidade de absorver água, tornado-se geleificada. Durante o processo de hidratação do pólen em meio de cultura, a medina sofre um considerável aumento de volume, sobretudo nas regiões mais espessas, sob os colpos (fig. 21.E-G). Isto acarreta um aumento do volume total do pólen. A exina plástica acompanha este aumento de volume sem apresentar ruptura. Entretanto, a região equatorial dos colpos, onde a exina é extremamente delgada, ocorre rompimento com exteriorização parcial da medina. Um dos três colpos é preferencialmente rompido com maior facilidade e a medina, juntamente com o citoplasma da célula vegetativa, é forçada para o exterior da exina.

A parede péctica do tubo polínico apresenta continuidade com a medina (fig. 21.D). Além disso, na porção inicial do tubo em crescimento, a medina às vezes oblitera o interior do tubo devido a uma maior hidratação nesta zona.

#### 3.4.1.4. Intina.

A intina é a camada mais interna da esporoderme de *Ilex paraguariensis* e a última a ser formada. É totalmente distinta da medina, tanto em morfologia como em composição. Em grãos macerados, quando a célula gametofítica é liberada da esporoderme, a intina envolve esta (fig.

---

21.D), sendo facilmente separada da medina. Materiais pécticos não estão presentes. Provavelmente tem constituição celulósica. Apresenta regularidade na sua espessura, mesmo nos colpos. Em alguns pontos, sob a medina, a intina apresenta pontos de maior espessamento. Durante o crescimento do tubo polínico, a intina tem continuidade, à semelhança da medina, com a camada celulósica mais interna do tubo, adjacente ao plasmalema.

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.

##### 4.1. Uso do termo *arquespório*, células-mãe de arquespório e células-mãe de andrósporo.

Primeiramente, cabe realizar uma discussão à respeito do uso de alguns termos em virtude dos problemas nomenclaturais que surgiram com o estudo da ontogenia dos esporângios.

Segundo a nomenclatura usual, o arquespório constitui o conjunto de células subepidérmicas a partir do qual diferenciam-se o tecido esporogênico e a camada parietal primária hipodérmica (MAHESHWARI, 1950; DAVIS, 1966; JOHRI et al, 1992). RUTISHAUSER (1969) realizou uma interessante discussão sobre o uso deste termo no estudo da ontogenia dos esporângios masculino e feminino. Segundo este pesquisador, o termo arquespório é erroneamente utilizado pois designa, na maioria das vezes, um tecido que apresenta células que não atuam diretamente como células germinativas. Além disso, em muitas espécies, as células derivadas deste tecido sofrem sucessivas divisões mitóticas com o objetivo de aumentar o seu número. Ainda, uma célula arquespórica verdadeira é somente aquela que se encontra em interfase pré-meiótica e, desta forma, é incapaz de sofrer divisão mitótica.

As capas (ou massas homogêneas de células) subepidérmicas meristemáticas, situadas nos quatro cantos de uma antera tetrasporangiada típica são geralmente designadas de arquespório ou arquespório primário e as células internas que surgem após a diferenciação deste numa camada parietal primária, constituem o arquespório secundário ou tecido esporogênico (MAHESHWARI, 1950; PERIASAMY E SWAMY, 1964). Ainda assim,

não se poderia adotar estes termos, pois as células do arquespório não atuam diretamente como células pré-meióticas, pois ainda originam um estrato somático (camada parietal primária). Também o arquespório secundário (tecido esporogênico) poderia receber tal designação, pois suas células podem não atuar diretamente como células pré-meióicas (ou células-mãe de pólen). RUTISHAUSER sugeriu a adoção do termo **células-mãe do arquespório (CMA)** ou **células-iniciais do arquespório** para o grupo de células meristemáticas subepidérmicas ainda capazes de sofrer divisão mitótica. Neste trabalho, concordo com este ponto de vista. Entretanto, preferi adotar o termo **células-iniciais do esporângio** para o primeiro grupo de células iniciais. Isto se justifica pela característica que estas possuem em originar células somáticas e germinativas mediante processos de diferenciação celular. De acordo com esta nomenclatura, então, as células iniciais do esporângio originam os estratos parietais e as **células-iniciais do arquespório (CIA)** ou **células-mãe do arquespório**.

As células arquesporiais diferenciam-se a partir das CIA que perderam a faculdade de realizar mitose e persistem como tal até o início da prófase meiótica. A partir desta etapa, são designadas **células-mãe de andrósporo (micrósporo)**, no androsporângio ou esporângio masculino.

Estes resultados, portanto, contrariam os aspectos conceituais utilizados na grande maioria dos trabalhos científicos da área da embriologia vegetal.

#### 4.2. Ontogenia do androsporângio e dos estratos parietais.

MAHESWARI (1950) fala da origem de quatro grupos de células meristemáticas em cada lobo da antera jovem. BHANDARI (1984) porém, cita

a origem dos quatro grupos de iniciais a partir da esterilização das células médias de um tecido maciço em cada metade da antera jovem de *Nigela damascena*. Em *I. paraguariensis*, o esporângio jovem é formado por quatro massas de células separadas por tecido parenquimático. Em cada teca, cada grupo de células origina-se após a esterilização das células medianas de um único tecido meristemático. Antes disso, é a diferença na atividade meristemática deste tecido abaixo da protoderme que é responsável pela definição inicial da forma tetralobada da antera. As células medianas, que mais tarde tornam-se vacuolizadas e perdem a atividade meristemática, apresentam um menor crescimento relativo. Nos quatro cantos, o crescimento é mais pronunciado.

Não restam dúvidas que as células-iniciais do esporângio originam os estratos parietais, as células do tapete interno e as células-mãe de andrósporos. Estas células jamais poderiam ser chamadas de arquesporais, pois não originam unicamente as células germinativas. Somente após esta "divisão de função", aquelas que não diferenciam-se em células parietais ou células do tapete interno são, finalmente, denominadas células-iniciais do arquespório.

A formação das camadas parietais primária e secundárias em *I. paraguariensis* segue o padrão descrito para as Angiospermas (MAHESWARI, 1950). A ontogenia dos estratos parietais (endotécio, camada média e tapete) também está de acordo com as descrições feitas para a maioria das Angiospermas e coloca-se dentro do tipo Dicotiledôneo (DAVIS, 1966). Após o surgimento da camada parietal primária, temos o aparecimento de uma massa homogênea de células. Estas crescem em número, após mitoses, e portanto, não podem ser consideradas células arquesporais. São, ainda, células iniciais. Outro aspecto que reforça este

ponto de vista é que as células iniciais do esporângio ainda derivam-se, após o surgimento dos estratos parietais, em células do tapete interno na região voltada para o tecido conectivo. Somente após isto, as células iniciais originam as células arquesporais, mediante crescimento em número após sucessivas mitoses.

Com o encerramento do crescimento das células iniciais, têm-se o estabelecimento do arquespório verdadeiro. Nesta fase, as células que o compõem apresentam núcleos em interfase meiótica, e devem possuir conteúdo cromático duplicado. Com isso, o "tecido esporogênico clássico" das Angiospermas, corresponde em *I. paraguariensis*, às células iniciais do arquespório e às células arquesporais.

#### 4.3. O tapete.

O tapete de *I. paraguariensis* é do tipo glandular ou secretor e possui núcleos poliplóides. Estas características estão de acordo com as informações até agora relatadas sobre a família Aquifoliaceae (COPELAND, 1963; JOHRI *et alli*, 1992).

Nos trabalhos até agora realizados em diferentes famílias de Angiospermas, este tecido de grande importância fisiológica tem origem parietal, a partir do estrato primário ou estratos secundários, em suas diversas variações (DAVIS, 1966). MAHESHWARI (1950) afirma que a aparência e o comportamento entre as células do tapete e as do tecido esporogênico fez com que os primeiros botânicos tenham proposto a origem do tapete a partir da esterilização das células esporogênicas. Entretanto, JOHRI *et alli* (1992) citam casos da origem esporogênica das células do tapete, que se diferenciam a partir da sua esterilização. O

células do tapete, que se diferenciam a partir da sua esterilização. O tapete que surge inicialmente como uma faixa estreita de origem parietal une-se às células do tapete derivadas do tecido conectivo, sem qualquer participação das células arquesporais e circundam todo o tecido esporogênico (PERIASAMY & SWAMI, 1966).

A origem do tapete de *I. paraguariensis* difere, entretanto, dos padrões até agora descritos. Este tecido tem origem parietal, mas menos significativa que as células do tecido derivado da diferenciação das células iniciais do esporângio. As células iniciais são potencialmente aptas para diferenciarem-se nos estratos parietais e no tapete interno, voltado para o tecido conectivo. Desta forma, a origem do tapete se dá em dois momentos distintos. O primeiro começa com a diferenciação do estrato parietal secundário interno, que funciona diretamente como tapete e constitui a sua porção parietal, restrita somente a uma faixa abaixo da epiderme, endotécio e camada média. A partir das células iniciais do esporângio, sem que ocorram divisões periclinais para a formação de qualquer tipo de estratificação (similar àquela que ocorreu para a formação da camada parietal primária), temos a origem do tapete interno. Não parece haver participação de células do tecido conectivo, que nesta etapa do desenvolvimento da antera, já se encontram diferenciadas e vacuolizadas.

Concluindo, o tapete de *Ilex paraguariensis* tem uma única origem - as células iniciais do esporângio - mas se dá de forma diferenciada. A diferença está na formação das camadas parietais e na origem do tapete parietal a partir de uma destas camadas. Simultaneamente, porém, as células iniciais também diferenciam-se em células do tapete interno. Esta simultaneidade ocorre provavelmente

O máximo grau de poliploidia das células do tapete ocorre até a finalização da meiose das células-mãe de andrósporos. Isto deve implicar num importante papel fisiológico do tapete no desenvolvimento da esporoderme e liberação de outras substâncias que serão incorporadas à parede dos grãos de pólen (proteínas, polenkit, etc). Como a atividade transcricional e de tradução aumenta com a multiplicação do genoma em células poliplóides, as células do tapete podem funcionar como centenas ou milhares de células diplóides, numa economia de tempo e espaço (D'AMATO, 1984).

As vesículas acumuladas entre a parede periclinal interna e o plasmalema das células do tapete podem estar relacionadas com o aumento das cabeças que ornamentam a ectexina da esporoderme. Estas vesículas são liberadas para o fluido locular durante o estágio de tétrede de andrósporos e não são mais visíveis quando a calose se dissolve e os andrósporos se separam. Já foi confirmado, em outra espécie, que as vesículas podem conter precursores de esporopolenina e/ou enzimas, como calase, pectinase e celulasas que atuam na separação dos andrósporos na tétrede. A atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase incrementa rapidamente depois que a segunda etapa da divisão meiótica tenha começado e atinge o seu pico no momento em que os andrósporos são separados da tétrede de calose (MASCARENHAS, 1975).

As massas de esporopolenina presentes no citoplasma das células do tapete provavelmente são o resultado do processo de produção de precursores de esporopolenina pelas suas células. Similarmente ao que ocorre junto à ectexina, quando os precursores de esporopolenina são liberados e polimerizam-se sobre as cabeças da esporoderme, as massas compactas presentes no tapete são homólogas aos corpúsculos de Übisch

(orbículos), em maior escala. A atividade de produção de precursores e sua polimerização também é verificada na formação da membrana peritapetal, junto às paredes periclinais externas do tapete. Como a esporopolenina deposita-se mesmo sobre os restos das paredes radiais e transversais, pode-se concluir que a polimerização se dá ao acaso e na dependência da disponibilidade dos precursores e de um substrato (paredes pectocelulósicas e esporopolenina já polimerizada, por exemplo). Isto está de acordo, também, com o tamanho variável das ornamentações da ectexina e a ocorrência de fusões entre as cabeças de duas báculos adjacentes.

Os fatores que levam às células-iniciais do esporângio à diferenciarem-se em células do tapete permanecem pouco claros. Entretanto, pode-se admitir a influência do feixe vascular do estame neste processo. Verificou-se que não ocorre a origem de células do tapete a partir das iniciais cobertas pelos estratos parietais. Somente naquelas em contato direto com o tecido conectivo ocorre a diferenciação, claramente centrípeta. Substâncias provenientes do feixe vascular podem estar atuando sobre as células iniciais através do tecido conectivo.

#### 4.4. O processo de deiscência das anteras.

A deiscência das anteras de *L.paraguariensis* segue uma série de etapas que compreendem a diferenciação celular, atividade enzimática específica localizada, desidratação dos tecidos e manifestação das forças de tensão parietais. KEYJZER (1987a), estudando *Gasteria verrucosa*, verificou que a expansão das células da epiderme e endotécio é a primeira manifestação citológica relacionada à deiscência das anteras, ao mesmo tempo em que ocorre a formação de paredes espessadas em forma de "U"

nas células do endotécio. Isto gera tensões de parede que serão importantes nos movimentos dos estratos parietais na antese, para a exposição dos grãos de pólen. Em *I. paraguariensis*, a expansão simultânea das células da epiderme e endotécio possivelmente geram as mesmas tensões mecânicas. Estudos mais detalhados envolvendo a desidratação dos tecidos são, entretanto, necessários para esclarecer a importância da epiderme na abertura do esporângio.

A presença de aberturas entre as paredes anticlinais das células da epiderme também podem estar envolvidas na rápida comunicação, transmissão de informações químicas e com o processo de deiscência. Possivelmente, a ausência de estômatos deve evitar, entre outras coisas, a rápida desidratação das anteras, assim como as plantas que possuem uma baixa frequência de estômatos e que são adaptadas a estocar água (METCALFE & CHALK, 1979). SCHOENBERG & DINOUTTI (1989) mencionam a presença de estrias epicuticulares da membrana cuticular da epiderme das pétalas e pistilo de *Ilex paraguariensis*. Ao mesmo tempo, comentam que estas estrias poderiam sofrer distensão com o aumento do volume das células. Como foi relatado nos resultados, a epiderme de *I. paraguariensis* não apresenta estrias epicuticulares, mas estriação predominantemente pécticas da parede celular. Estas estrias são recobertas pela fina e lisa cutícula.

A abertura dos estômios demonstra que, provavelmente, existe ação enzimática localizada nas células epidérmicas e do endotécio próximas ao septo. Por outro lado, não ocorre pressão da massa de grãos de pólen contra a parede do esporângio que resulte na ruptura do estômio. A presença de células da epiderme parcialmente dissociadas sugere um mecanismo enzimático, o que não descarta a contribuição de forças

mecânicas do endotécio facilitando a ruptura da lamela média das células junto ao estômio.

Simultaneamente à abertura do estômio, as membranas tapetal e peritapetal sofrem ruptura junto ao septo. A massa de grãos de pólen não exerce pressão contra as membranas de esporopolenina no interior da antera. A pressão interna dos líquidos loculares, entretanto, é desconhecida.

Os espessamentos presentes no septo e a sua orientação nas suas células que divide os esporângio devem, também, gerar forças centrípetas e que ocasionam um encurtamento das células septais, como numa espécie de sanfona. Isto deve ampliar a abertura do estômio e auxiliar no rompimento do saco que envolve os andrófitos.

A última etapa do processo de deiscência consiste no movimento centrífugo das paredes da antera, graças aos espessamentos em forma de ferradura encontrados no endotécio e conectivo. Os espessamentos lignificados na região mediana do tecido endotécio, em orientação diferente daqueles encontrados na maioria das células próximas ao septo, parecem funcionar como um tipo de "dobradiça". Como os espessamentos predominam nas paredes periclinais internas e radiais, com a desidratação celular, o movimento executado deve ser centrífugo. Nas outras células do endotécio junto aos septos, os espessamentos paralelos e predominantes nas paredes periclinais interna e transversais ocasionariam um movimento de enrugamento de toda a parede da antera. Estes dois movimentos, em conjunto, seriam importantes para a abertura inicial da parede do esporângio, para a exposição dos grãos de pólen. Como as células, neste momento, já se encontram em degeneração (altamente plasmolizadas), este movimento deve ser meramente mecânico. O tecido conectivo espessado,

teria como função, a realização da máxima abertura dos esporângios.

Mesmo anteras fixadas e desidratadas, ainda fechadas (mas com o estômio já aberto), que foram totalmente secas junto a uma fonte de calor, apresentaram o movimento centrífugo das paredes. As paredes de cada esporângio sofrem um movimento que é apenas limitado pelo contato entre as paredes de dois esporângios adjacentes localizados em tecas diferentes.

#### 4.5. A esporogênese e a gametogênese.

A esporogênese e a gametogênese seguem os padrões descritos na literatura embriológica vegetal (MAHESHWARI, 1950; KNOX, 1984; JOHRI, *et al.*, 1992). A citocinese simultânea, com a divisão centrípeta do citoplasma, a disposição dos andrósporos numa configuração tetraédrica e o caráter trinucleado e bicelulado do andrófito deisciente são características que têm importância no estudo comparativo embriológico e são de importância taxonômica (JOHRI *et al.*, 1992).

#### 4.6. Número de núcleos e células do andrófito.

COPELAND (1963), cita o status bicelulado de *Ilex cornuti*, durante a deiscência. BREWBAKER (1967), num estudo taxonômico do número nuclear dos grãos de pólen das Angiospermas, coloca que o pólen de espécies do gênero *Ilex* é binucleado. JOHRI *et alii* (1992) afirmam que, com exceção da família Stackhousiaceae, as famílias da ordem Celastrales são caracterizadas por apresentarem grãos de pólen bicelulados.

Os andrófitos de *I. paraguariensis* são trinucleados durante a deiscência. Os núcleos espermáticos encontram-se extremamente próximos e

compartilham um citoplasma, aparentemente, comum. Esta situação sugere que, sem as técnicas aqui empregadas (sejam aquelas utilizadas na coloração nuclear ou na preparação de cortes semifinos em resina plástica), tornar-se-ia difícil avaliar o número real de núcleos do gametófito maduro. Desta forma, foram estes fatores que determinaram a avaliação incorreta, por parte de outros autores, do real número nuclear do andrófito. Possivelmente, o comportamento dos núcleos espermáticos no interior dos grãos de pólen de *I. paraguariensis* não é um caso raro dentro do contexto da embriologia vegetal.

Outro aspecto a ser discutido é a ocorrência ou não de citocinese da célula generativa. STEFFEN (1963) cita a ocorrência da compartilhamento de dois núcleos espermáticos num citoplasma comum. É, entretanto, uma característica incomum nas Angiospermas. As técnicas empregadas neste trabalho e a não utilização de microscopia eletrônica de transmissão, até este momento, indicam que a citocinese não ocorre. Entretanto, as técnicas de microscopia óptica podem não ter sido suficientes para o poder de resolução necessário para distinguir uma possível individualização dos gametas masculinos.

A presença de uma célula espermática binucleada poderia ser muito útil no que se refere ao transporte dos núcleos espermáticos ao longo do tubo polínico. Os núcleos também poderiam ser descarregados simultaneamente durante a fecundação do saco embrionário. Ao que tudo indica, esta característica da célula espermática foi otimizada pelo surgimento da unidade germinativa masculina.

BREWBAKER (1967) faz comentários a cerca da viabilidade dos grãos de pólen binucleados e trinucleados. Os gametófitos binucleados apresentam uma viabilidade maior que os trinucleados e uma capacidade

de germinação mesmo em água, sem a necessidade de maiores nutrientes. Esta menor viabilidade seria devida à utilização das reservas pelo gametófito na formação dos gametas antes da germinação. Em *I. paraguariensis* ocorre uma utilização das reservas de amido, presentes em grande quantidade no citoplasma vegetativo, durante o englobamento da célula generativa. Após a formação da célula espermática binucleada, estas reservas são totalmente consumidas. O andrófito maduro apresenta, em decorrência disso, uma ausência de substâncias de reserva (polissacarídeos, proteínas ou lipídios ausentes quando a célula é examinada sob as técnicas de coloração em microscopia óptica). Este caráter do andrófito maduro se reflete no seu reduzido tempo de viabilidade, já demonstrável em Laboratório (mas com poucos dados para uma conclusão definitiva).

#### 4.7. A Unidade Germinativa Masculina.

A associação entre o núcleo vegetativo e a célula espermática (unidade germinativa masculina) forma um veículo de transmissão, possibilitando a passagem de todo o ADN da geração masculina ao longo do tubo polínico (KNOX *et alii*, 1991). Muitos autores têm relatado a existência de uma unidade germinativa masculina em grãos de pólen. Em *Plumbago zeylanica* (RUSSELL *et alii*, 1981), as células espermáticas no grão de pólen maduro estão ligadas e uma delas associada intimamente com o núcleo vegetativo. Esta associação é mantida através do tubo polínico e permite que as duas células espermáticas e o núcleo vegetativo atravessem o tubo como uma unidade, possibilitando um transporte simultâneo e mais efetivo dos gametas em direção ao gametófito feminino. PEI-HUA (1988), estudou a interação do núcleo vegetativo e célula

generativa (mais tarde gametas) nos grãos de pólen e tubos polínicos de *Clivia nobilis* e *Amaryllis vittata*, in vitro, concluindo que no tubo polínico existe uma associação estrutural e fisiologicamente ativa. RUSCHE *et alii* (1988) analisando o tubo polínico de *Zea mays* concluíram que pelo menos uma célula espermática tem íntima associação com o núcleo vegetativo.

Em *Ilex paraguariensis*, o núcleo vegetativo envolve parcialmente a célula portadora dos dois núcleos espermáticos até a deiscência da antera. O comportamento dos núcleos após a formação do tubo polínico não foi estudada e, desta forma, dificultando uma conclusão precisa sobre o papel desta interação. Possivelmente, em *I. paraguariensis* (assim como em outras espécies já estudadas) também é uma união funcional importante para a manutenção da saída simultânea dos núcleos do andrófita durante a germinação do tubo polínico a partir do estigma.

#### 4.8. O grão de pólen.

Segundo ERDTMAN (1952) os grãos de pólen das Aquifoliaceae são tricolporados. Quanto ao gênero *Ilex*, o autor afirma que a dimensão do eixo polar varia entre 30 e 40  $\mu\text{m}$ . MARTIN (1977) classifica o pólen do gênero *Ilex* como tricolporado, com uma forma que varia de oblato a prolato, dependendo do seu grau de expansão ou contração. Para *I. paraguariensis*, as dimensões médias dos eixos polar e equatorial são 28,8  $\mu\text{m}$  e 29,0  $\mu\text{m}$ , respectivamente. FÆGRI *et al.* (1989) classificam o pólen do gênero *Ilex* como tricolpado, intectado, com clavias variáveis e livres. Afirmam, também, que algumas vezes os grãos de pólen colporados são confundidos com grãos de pólen colpados que apresentam uma constrição equatorial do colpo.

Os resultados encontrados a cerca das características do pólen de *Ilex paraguariensis* o colocam como grãos nitidamente tricolporados. As dimensões do eixo polar e equatorial (ver tabela II) estão de acordo com os dados fornecidos por ERDTMAN (1952). As diferenças entre os dados publicados por MARTIN (1977) são pequenas e possivelmente resultantes da variabilidade normal da espécie. Quanto a colocação de que o gênero *Ilex* é caracterizado por possuir grãos de pólen tricolporados, conclui-se que isto se deva à análise realizada em grãos acetolizados nos quais a medina é dissolvida por este processo. A sua ausência, principalmente junto à zona equatorial, daria a falsa impressão de compressão interna do colpo. Na verdade, um poro verdadeiro existe e permite a exteriorização, em muitas vezes, da zona equatorial espessada da medina.

#### 4.9. Primexina na ontogenia da ectexina e na compatibilidade pólen-estigma.

As características da primexina, em *I. paraguariensis*, demonstram a sua grande importância na formação da esporoderme. HESLOP-HARRISON (1968) cita que a primexina celulósica forma uma contínua camada envolvendo os andrósporos dentro da calose, com exceção das áreas correspondentes às futuras aberturas. KNOX (1984) evidencia a essencialidade da presença da primexina (composta de material microfibrilar celulósico) para a diferenciação da exina e cita alguns modelos encontrados em diferentes espécies de Angiospermas, embora completamente distintos daqueles apresentados neste trabalho. JOHRI *et alii* (1992) falam da natureza celulósica da primexina. KEIJZER (1987b), estudando *Gasteria verrugosa*, descreve a primexina como possuindo uma constituição também celulósica. MASCARENHAS (1975), igualmente, atribui à

primexina uma composição primariamente celulósica.

Os resultados encontrados para *I.paraguariensis* tornam, entretanto, indiscutível a natureza predominantemente péctica da primexina (ácidos pécticos), embora não sendo descartada a presença de celulose como mais um componente. Mesmo não tendo explorado a primexina com maiores detalhes, KEIJZER (1982b) demonstra que esta tem uma localização, junto à exina, muito semelhante àquela encontrada em *I.paraguariensis*, permanecendo inclusive, restos nas cavidades da exina. É provável que seja encontrado, em outras espécies de Angiospermas, um papel semelhante da primexina na formação da exina, como em *I.paraguariensis*.

A primexina é essencial na formação do padrão da ectexina do pólen de *I.paraguariensis*. A sua formação, ao redor dos andrósporos envoltos na tétrade, garante uma orientação para a localização das probáculas que atuam como um substrato inicial para a esporopolenina que é polimerizada. Não foram estudados os fatores de influenciam e determinam o padrão das probáculas inseridas na primexina de *I.paraguariensis*, a partir da qual a esporopolenina gametofítica é exteriorizada. Além disso, os fatores que levam à ausência das probáculas (visíveis pelas técnicas de microscopia óptica) nos colpos também não estão esclarecidos. As secções semifinas demonstram, entretanto, que podem existir, em menor escala, canais radiais que atravessam os discos espessados equatoriais da primexina. Estes canais parecem conduzir precursores de esporopolenina não-polimerizada do interior do andrósporo para a superfície externa da esporoderme, contribuindo para o isolamento dos materiais pécticos da primexina entre as capas de esporopolenina da endexina, na região equatorial.

A origem das probáculas na primexina pode estar associada à presença de retículo endoplasmático(RE) emergente do citoplasma, atravessando o plasmalema, durante o estágio de tétrade (STANLEY et al., 1974). O RE evitaria a deposição de materiais pécticos e celulósicos provenientes do andrósporo e seu padrão de organização determinaria o padrão topográfico das probáculas na primexina. Outras evidências têm relacionado a localização das báculos na primexina com a posição do retículo endoplasmático nas regiões periféricas do citoplasma, na forma de túbulos membranosos (HESLOP-HARRISON, 1968). Quanto aos canais nos discos pécticos espessados, sua origem pode relacionar-se às fibras de fuso que orientam o arranjo das tétrades após a meiose. Assim como o RE, as fibras de fuso evitariam a deposição de ácidos pécticos e celulose e sua conformação em feixes radiais, ligando os núcleos na tétrade, explicaria os canais radiais equatoriais que atravessam a primexina.

Os ácidos pécticos comprimidos dentro da endexina pelo surgimento da medina têm destino desconhecido. A simultaneidade dos processos de síntese de medina e desaparecimento dos discos lenticulares pécticos da primexina podem estar relacionados ou não.

As proteínas presentes na primexina têm origem, provavelmente, no tapete. Segundo JOHRI et al (1992), o tapete sintetiza proteínas fibrogranulares que são liberadas para o fluido locular durante a maturação do pólen. Estas proteínas penetram a exina do grão de pólen e são estocadas entre as regiões das báculos. Em *I. paraguariensis*, a primexina péctica atua como um substrato para a deposição das proteínas tapetais. Durante o processo de hidratação do grão de pólen sobre a superfície do estigma, as proteínas presentes na exina são liberadas para a superfície do estigma que, então, atuam no reconhecimento do pólen (HESLOP-HARRISON,

1976). A propriedade dos ácidos pécticos da primexina em formar um gel, quando hidratadas, parece ser de grande importância no acúmulo e transporte de proteínas da exina para a superfície das células do estigma. As proteínas encontradas nos colpos, sobretudo sobre a região dos poros, também devem estar envolvidas no processo de germinação e compatibilidade. Além disso, o enriquecimento dos grãos de pólen com substâncias protéicas tornam muito atrativos para os insetos que se alimentam a partir deles. Foram observados, em campo, insetos alimentando-se de anteras inteiras, antes da deiscência. As demais peças florais, entretanto, são desprezadas pelos insetos.

Em *I. paraguariensis*, após a dissolução da calose e aumento de volume dos andrósporos, a primexina não sofre diminuição visível na sua espessura. STANLEY et al (1974) sugere que novos materiais são rapidamente adicionados durante o aumento de volume, mantendo a sua espessura inalterada. Neste caso, o tapete deve estar envolvido na produção e liberação para o fluido locular de ácidos pécticos que são adicionados à primexina. Outra hipótese é a existência de microcanais atravessando a exina e comunicando o citoplasma gametofítico com o exterior do grão de pólen. Através destes microcanais, pectinas ou até mesmo proteínas poderiam ser acrescentados à primexina.

#### 4.10. Ontogenia da ectexina.

A formação inicial da ectexina é, claramente, realizada pelo andrósporo, envolvido pela primexina e pela calose. BHANDARI (1984) afirma que a calose atua como uma barreira seletiva a diferentes compostos químicos. UFFELEN (1991) coloca que o controle esporofítico é o

principal mecanismo governante na formação da parede em tetrásporos na família Polypodiaceae (Filicales). A autora argumenta que, se houvesse uma barreira funcional da calose envolvendo os tetrásporos e isolando-os do controle esporofítico de formação da parede, as diferenças genéticas entre as tétrades deveriam refletir-se em diferenças morfológicas entre as paredes dos esporos de um mesmo esporângio. Não é conhecida, entretanto, a permeabilidade da calose aos precursores de esporopolenina derivados do tapete.

Os resultados indicam que não há contribuição esporofítica nas etapas iniciais de formação da exina, em *I. paraguariensis*. O esporófito, através do tapete, tem participação somente após a dissolução da calose. A localização da camada basal da ectexina, sob a parede péctica de primexina (isolada do contato com o fluido derivado do tapete), indica uma atuação exclusiva do andrósporo na formação e aumento em espessura da camada basal. A calose, ao mesmo tempo, pode ter um papel importante na determinação do padrão inicial da ectexina. A calose pode funcionar como um "molde negativo" para a polimerização da esporopolenina proveniente do andrósporo (BANDHARI, 1884). Em *I. paraguariensis* pode haver uma ação da calose como um determinador dos limites que devem ser alcançados pelos precursores de esporopolenina em polimerização, evitando que ocorram fusões prematuras entre as báculos adjacentes da ectexina.

Os resultados sugerem que a síntese da ectexina começa com a polimerização interna de esporopolenina sob as probáculos incluídas na primexina. Com o incremento da polimerização e o início da formação da camada basal, a pressão dos citoplasma do andrósporo força a saída das probáculos que se dirigem para junto da calose. A sua emergência

determina o aparecimento das báculos. Como as báculos expandem-se nas suas extremidades, mesmo ainda incluídas na calose, ainda não está esclarecido. Com a dissolução da calose e a separação dos andrósporos, as báculos entram em contato com os precursores de esporopolenina presentes no fluido locular, liberados pelo tapete. Neste momento, começa a participação esporofítica. As báculos sofrem um acréscimo de tamanho nas suas extremidades, tornando as cabeças bem evidentes.

O tapete atua, após a dissolução da calose, para o aumento das cabeças nas extremidades das báculos da ectexina. Os precursores de esporopolenina de origem tapetal, presentes no fluido locular, polimerizam-se sobre as cabeças de origem gametofítica da esporoderme. Esta deposição parece ser aleatória, dependente apenas do grau de atividade do tapete. O tamanho variado das ornamentações da ectexina, demonstra uma polimerização apenas dependente da presença de materiais liberados pelo tapete.

A primexina atua como barreira contra a deposição de esporopolenina esporofítica impedindo, de alguma forma, que ocorra polimerização dos precursores livres no fluido locular, sempre em contato com as substâncias pécticas entre as báculos. Este processo deve estar relacionado com uma ausência ou presença de substâncias específicas na primexina (proteínas da primexina?) que impedem uma polimerização uniforme e não localizada de esporopolenina esporofítica. Além disso, a polimerização de esporopolenina pode ser dependente da presença do mesmo composto já polimerizado. Isto, entretanto, não explicaria como ocorre a formação dos primeiros polímeros.

#### 4.11. A endexina e sua origem.

SAAD (1963) afirma que os grãos colporados são, unicamente, grãos colpados modificados onde a medina dos colpos e intercolpos torna-se acetólise-resistente devido a uma impregnação com esporopolenina. A medina, entretanto, retém suas propriedades originais sob os poros. A endexina de *I. paraguariensis* corresponde à camada da medina modificada de SAAD. As colorações empregadas nos cortes semifinos indicam que a endexina é impregnada com esporopolenina, embora com características diferentes daquela encontrada na ectexina. A endexina surge inicialmente a partir da impregnação com esporopolenina de uma capa hialina (celulósica ?) presente sob a ectexina, nos colpos, em andrósporos jovens, recém liberados da calose. Progressivamente, é depositada ao longo de toda a superfície do andrósporo, sempre sob a ectexina, não ultrapassando esta em espessura. O início de deposição da endexina está relacionado com a liberação e individualização dos andrósporos e, talvez, substâncias provenientes do tapete e presentes no fluido locular atuem como sinalizadores ou desencadeadores de um novo ciclo de produção gametofítica de esporopolenina.

Ocorreram diferenças entre as medidas já realizadas sobre a espessura da camada basal da ectexina (nexina), executadas por MARTIN (1977), em grãos acetolizados, e aquelas realizadas neste trabalho, em grãos de pólen fixados em glutaraldeído 2% (não-acetolizados). Os menores valores para os grãos acetolizados parecem indicar que este processo provoca algumas alterações na camada basal. Estas alterações, provavelmente, ocorrem na endexina. As diferenças de coloração e a ontogenia da endexina permitiu concluir que esta apresenta, em contraste com a ectexina, outros elementos em sua constituição, além da

esporopolenina.

#### 4.12. A medina e sua importância fisiológica.

A medina, termo usado pela primeira vez por SAAD (1963), é, claramente, em *I. paraguariensis*, uma camada distinta da intina e, predominantemente, composta por polissacarídeos ácidos (ácidos pécticos). Por apresentar as mesmas características evidenciadas por SAAD, considerou-se adotar esta terminologia para a denominação deste estrato da esporoderme. Para o autor, a medina trata-se de uma camada hialina e de consistência lamelada, distinta e independente da intina e exina, sendo fortemente corada pelo vermelho de rutênio e que tem importância na acomodação das mudanças de volume, proteção das regiões de abertura e formação do tubo polínico. A medina tem correspondência com a camada-Z encontrada em gramíneas (KNOX, 1984).

Os testes histoquímicos revelam que a medina, ao contrário da intina, predominantemente celulósica, é constituída principalmente por ácidos pécticos, depositados através de ciclos de síntese de polissacarídeos, realizados durante a fase de esporo e fase gametofítica. A distinta estratificação da medina é visualizada pela diferente densidade de coloração dos ácidos pécticos presentes, que são mais densos na segunda camada, mais interna, do que na primeira, mais externa.

A natureza péctica higroscópica da medina possibilita a absorção de água com considerável aumento de volume desta camada, demonstrável em secções de grãos de pólen mantidos em meio de cultura. Com a hidratação, os grãos de pólen de *I. paraguariensis* têm um aumento de volume da medina, que rompe a exina somente nas aberturas localizadas

nos colpos, onde é mais delgada e enfraquecida. Como a exina apresenta uma consistência plástica, a medina também amplia o volume externo do grão de pólen, ao mesmo tempo que diminui o volume citoplasmático da célula vegetativa. Isto, conseqüentemente, aumenta a pressão da célula contra a esporoderme, o que contribui para saída inicial do tubo polínico. A medina cumpre, então, importante papel na germinação do gametófito.

A medina também tem função na formação inicial do tubo polínico, pois apresenta-se como uma camada contínua com a parede péctica emergente do tubo em formação.

Ainda não estão esclarecidos o destino e o papel dos ácidos pécticos presentes na forma de discos lenticulares espessados nas regiões equatoriais dos colpos. O início do seu desaparecimento é simultâneo ao início da formação da medina e os dois processos podem estar relacionados de alguma forma.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.

O estudo embriológico do desenvolvimento dos androsporângios, esporogênese, gametogênese e ontogenia da esporoderme permitiu chegar a resultados que até agora não haviam sido relatados dentro do campo da Embriologia Vegetal e que merecem mais alguns comentários finais.

### 5.1. Sobre a ontogenia e diferenciação dos androsporângios.

A ontogenia dos androsporângios de *I. paraguariensis* apresenta alguns aspectos pouco comuns dentro do contexto da Embriologia Vegetal. Estes aspectos ocasionaram a discussão dos termos até então usados: arquespório e tecido esporogênico. Sugere-se que seja realizada uma revisão quanto ao uso destas terminologias.

O surgimento do arquespório dá-se muito tardiamente. As células iniciais do arquespório são derivadas das células iniciais do esporângio que não sofrem diferenciação em células do tapete interno. O tapete interno, em nenhuma hipótese, é derivado das células do tecido conectivo próximas ao tecido meristemático esporangial. Estas características ainda não haviam sido descritas para a família Aquifoliaceae e muito menos para as Angiospermas. Estudos que esclareçam quais os fatores que coordenam a diferenciação das células do tapete interno devem merecer atenção especial e constituem-se num assunto muito atrativo para estudos futuros.

### 5.2. Sobre a ontogenia do tapete.

O tecido tapetal que envolve completamente as células iniciais do arquespório é originário da continuidade do tapete parietal

uniestratificado com as células do tapete interno, originárias da diferenciação direta das células iniciais do esporângio. As características do tecido de nutrição para a formação da geração gametofítica não têm similares dentro dos padrões de formação do tapete até agora descritos. Até aqui, as únicas exceções quanto à origem do tapete interno, predominantemente de origem conectival, eram àquelas que descreviam a sua origem a partir da esterilização do tecido esporogênico. Um estudo mais abrangente, que envolva outras espécies da família Aquifoliaceae e uma comparação com as famílias conhecidas que apresentam tapete de origem esporogênica, é de grande importância e deve ser realizado posteriormente.

### 5.3. Sobre a medina.

A literatura embriológica parece ainda não reconhecer a importância do trabalho executado por SAAD (1963). A medina é um estrato independente da intina e provavelmente está presente em muitos grãos de pólen. Entretanto, sempre foi considerada como pertencente à intina. SAAD soube colocar, em seu trabalho sobre a medina, fortes argumentos para considerá-la como mais um estrato da esporoderme. Este trabalho reforça as suas conclusões e sugere que seja adotado este termo, bem mais adequado comparado à abordagem dada à estratificação da parede do andrófito.

## 6. FIGURAS.

Fig. 1 A-K. Desenvolvimento das anteras e botões florais de *Ilex paraguariensis*. Os números entre parênteses indicam o número de dias passados a partir de um botão floral com 1 mm de diâmetro. A,F. Durante a meiose das células-mãe de andrósporo e formação das tétrades. B,G. Durante o estágio de dissolução da calose, separação e vacuolização dos andrósporos. C,H. Durante a mitose do núcleo do andrósporo com origem das células vegetativa e generativa. D,I. Durante o englobamento da célula generativa. E,J. Durante a formação da unidade germinativa masculina. K. Flor estaminada em antese.

Escala (canto inferior esquerdo): 3 mm.

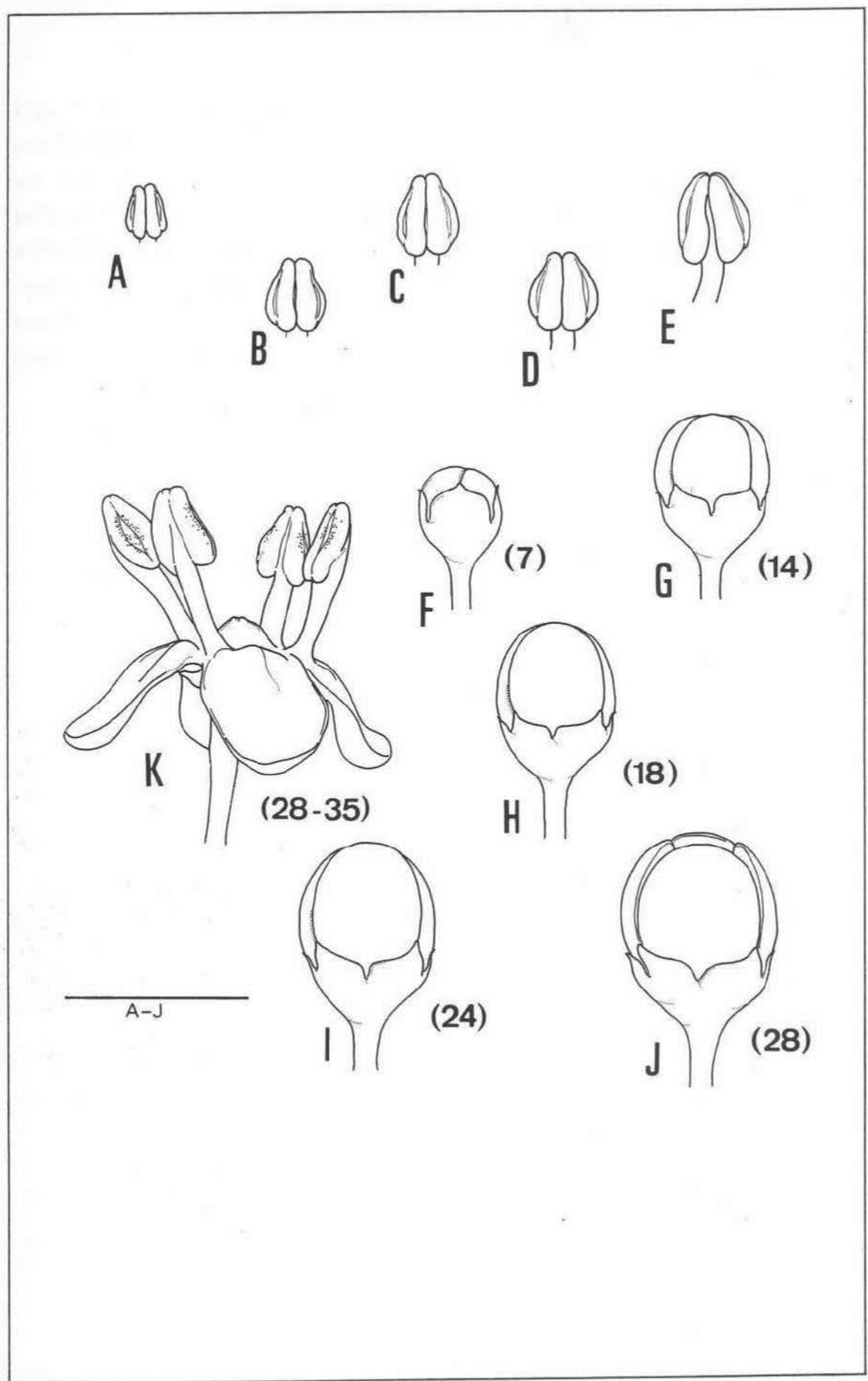
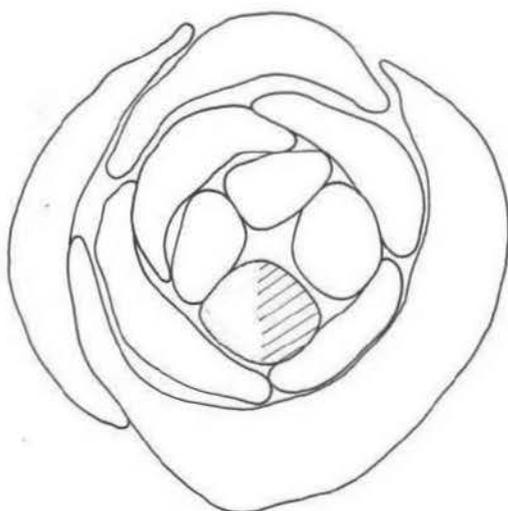
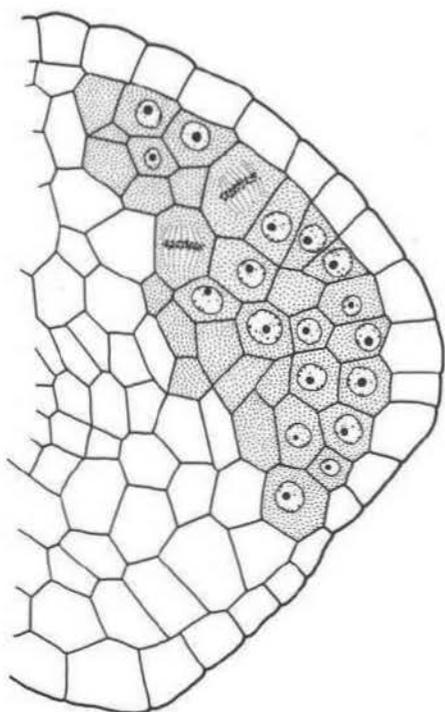
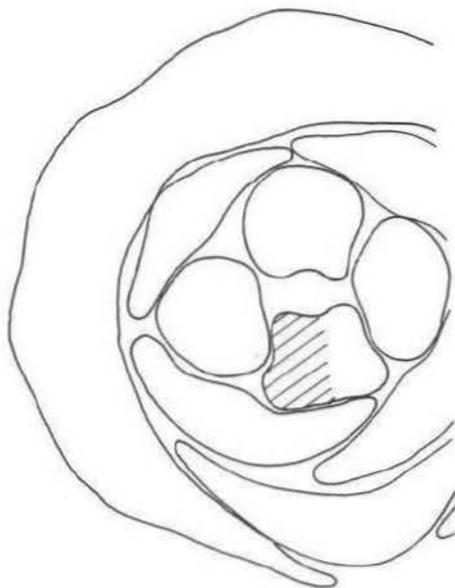
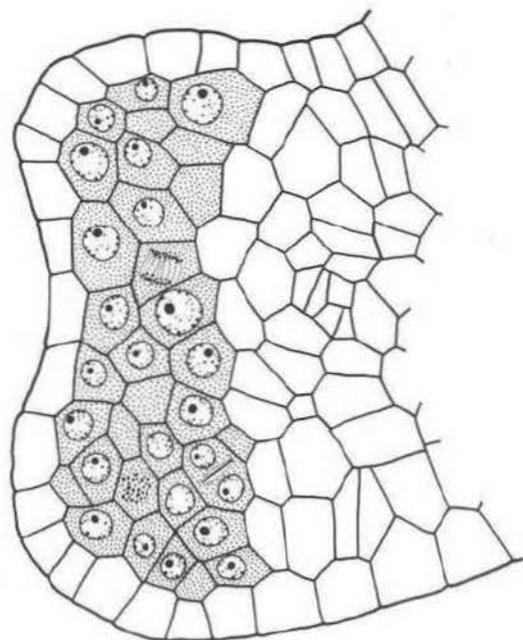


Fig. 2 A-B. Meristemas indiferenciados em primórdios estaminais, sob secção transversal. A. Secção transversal de primórdio estaminal mostrando um dos dois grupos de células meristemáticas do primórdio, recobertas pela protoderme. B. Secção transversal do primórdio estaminal, mostrando meristema (detalhado) e indícios da formação de duas regiões meristemáticas iniciais, assim como os dois lobos da teca. O tecido conectivo adjacente, não detalhado, é composto por células vacuolizadas. Escalas: 50  $\mu\text{m}$  (à esquerda) e 200  $\mu\text{m}$  (à direita).

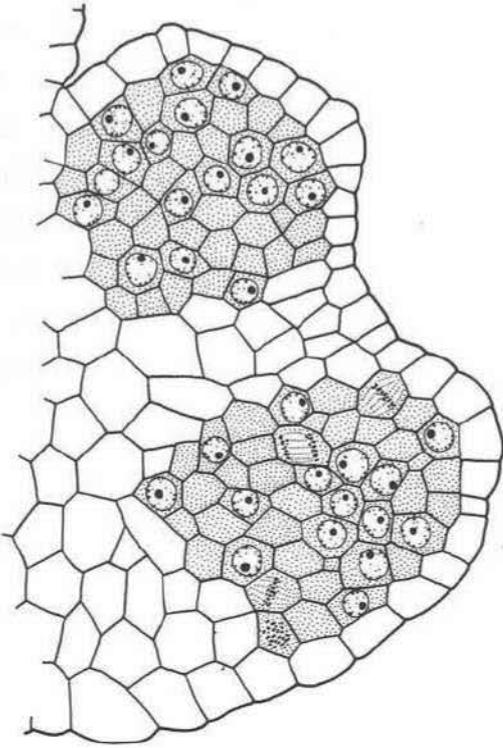


A

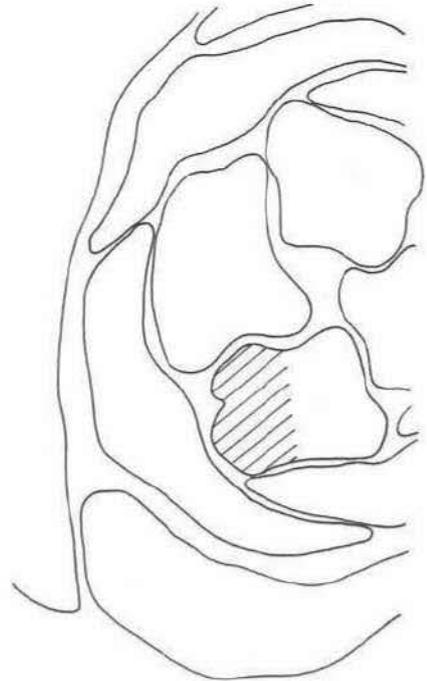
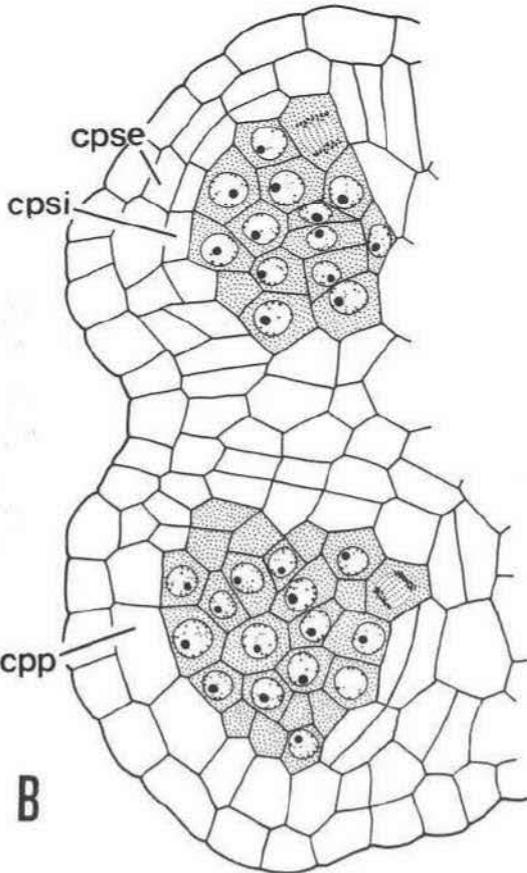


B

Fig. 3 A-B. Células iniciais do esporângio em anteras jovens. seccionadas transversalmente. A.Células iniciais de uma mesma teca separadas por septo parenquimático vacuolizado (não detalhado). B.Células iniciais cobertas pela camada parietal primária (esporângio inferior) e pelas camadas parietais secundárias interna e externa (esporângio superior), numa mesma teca. Escalas: 50  $\mu\text{m}$  (à esquerda) e 200  $\mu\text{m}$  (à direita).



A



B

**Fig. 4.** Secção transversal da antera mostrando as células do tapete interno (indicadas por um ponto negro) derivadas da diferenciação das células iniciais do esporângio (rachuradas). No esporângio superior, o endotécio (en) e a camada média (cm) são derivadas do estrato parietal secundário externo. O estrato interno funciona diretamente como tapete parietal (ta). O esporângio inferior apresenta apenas as camadas parietais secundárias.

Escalas: 50  $\mu\text{m}$  (superior esquerda) e 200  $\mu\text{m}$  (inferior direita).

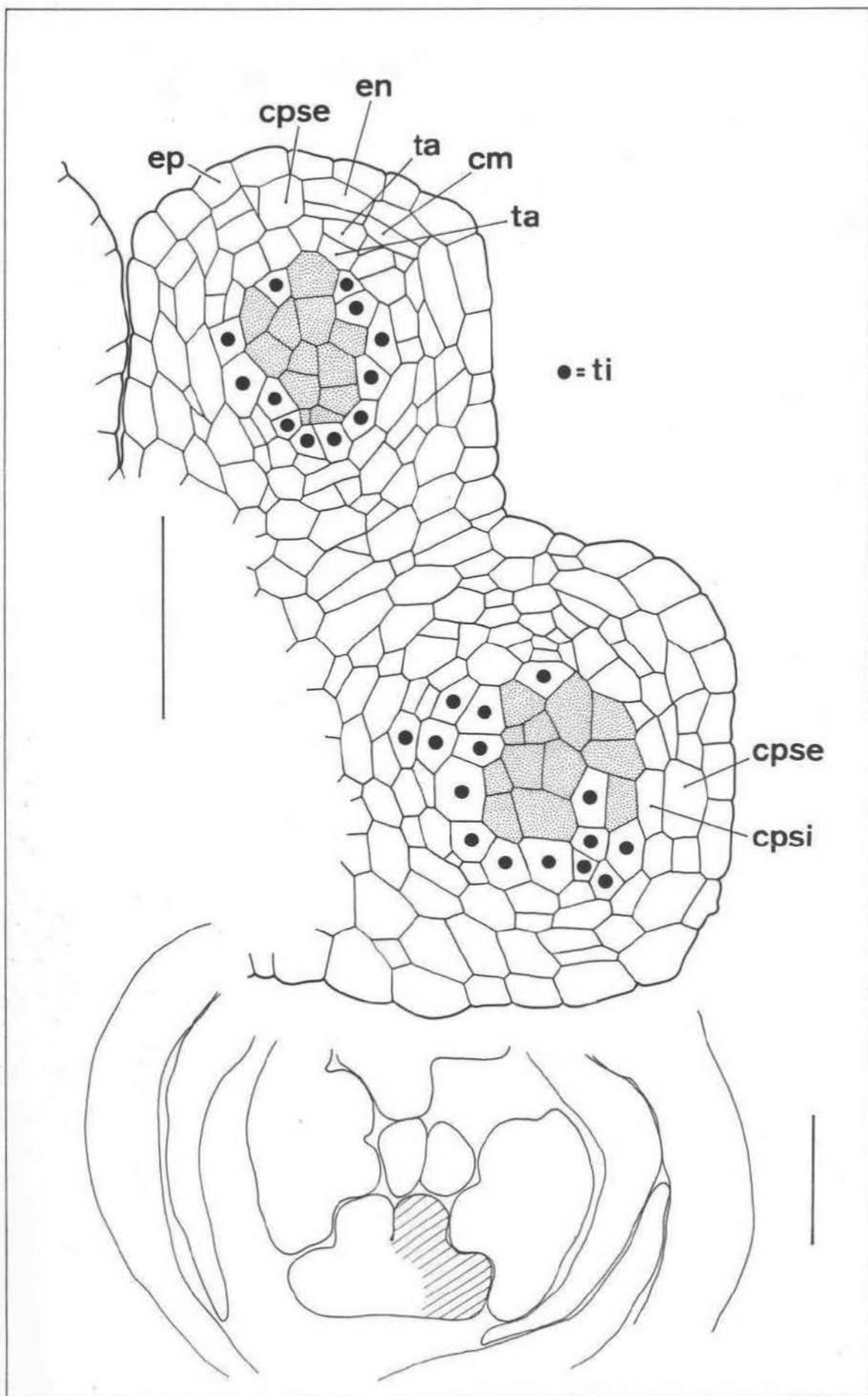


Fig. 5. Esporângio com estratos parietais jovens em antera seccionada transversalmente. O endotécio (en) é predominantemente uniestratificado, mostrando (à direita), duas camadas de células. A camada média parietal (cm) também é uniestratificada. Note a continuidade com as células do tecido conectivo (cn). O tapete parietal (ta), restrito apenas à faixa de origem parietal secundária, pode ser distinto do tapete interno (ti), em forma de "U", pela diferença do número de estratos celulares e pelo volume celular. As células iniciais do arquespório (cia) encontram-se totalmente envolvidas pelas células do tapete parietal e interno.

Escalas: 20  $\mu\text{m}$  (canto superior direito) e 200  $\mu\text{m}$  (metade inferior da página).

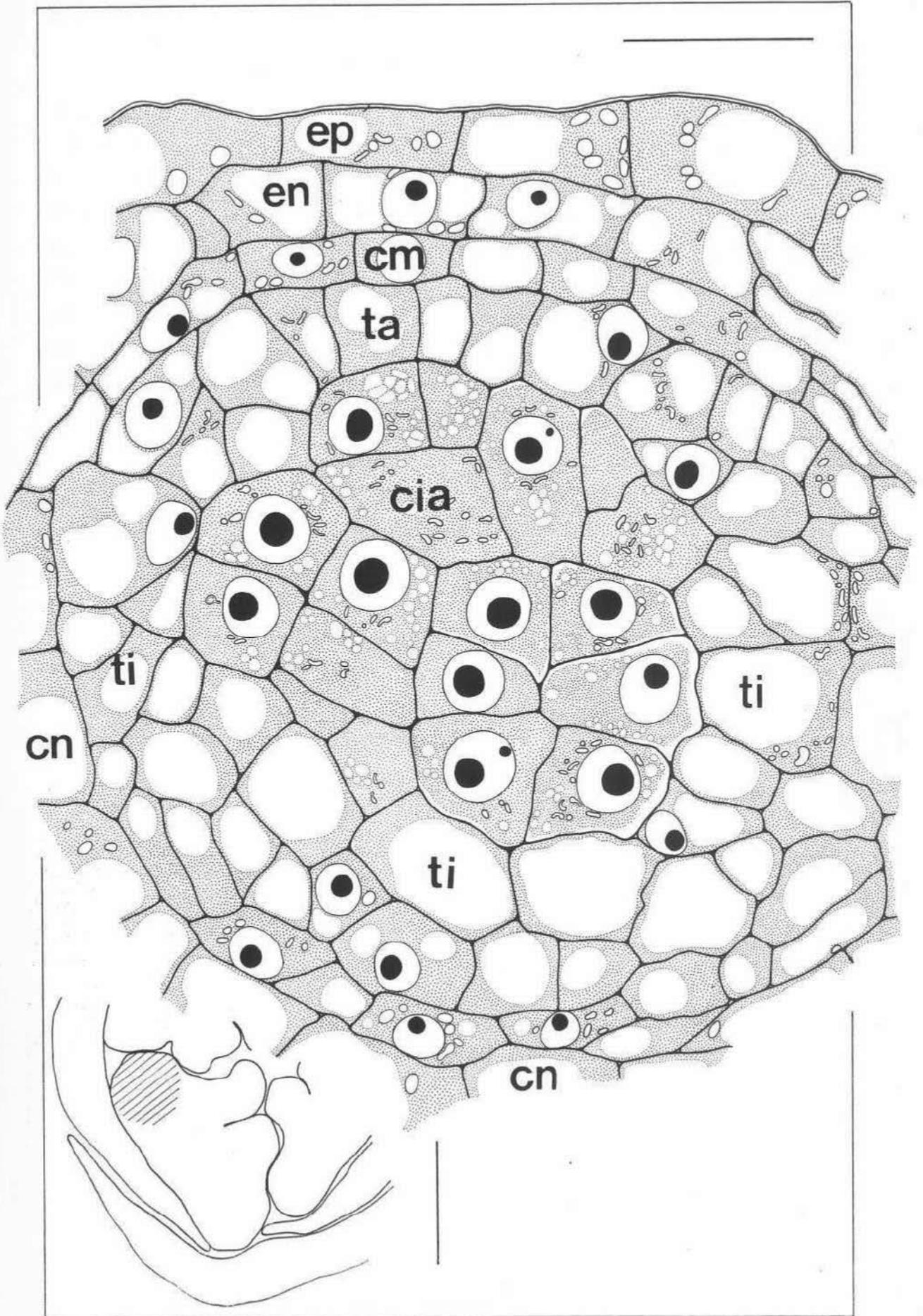


Fig. 6 A-E. O esporângio jovem. A.Esporângios com células iniciais (cia) e tapete interno (ti) com grandes vacúolos. B.Esporângios com células-mãe de arquespório (cma) envolvidas pelo tapete parietal (ta) e tapete interno (ti). C.Mitose da célula-mãe do arquespório em divisão mitótica. D. Células-mãe do arquespório dotadas de paredes onduladas. E.Esporângio com células-mãe de andrósporo em interfase meiótica. As células do tapete parietal (ta) são predominantemente uniestratificadas enquanto as células do tapete interno (ti) são organizadas em vários estratos.  
Escala: 50  $\mu\text{m}$  (A, D, E); 20  $\mu\text{m}$  (C); 100  $\mu\text{m}$  (B).

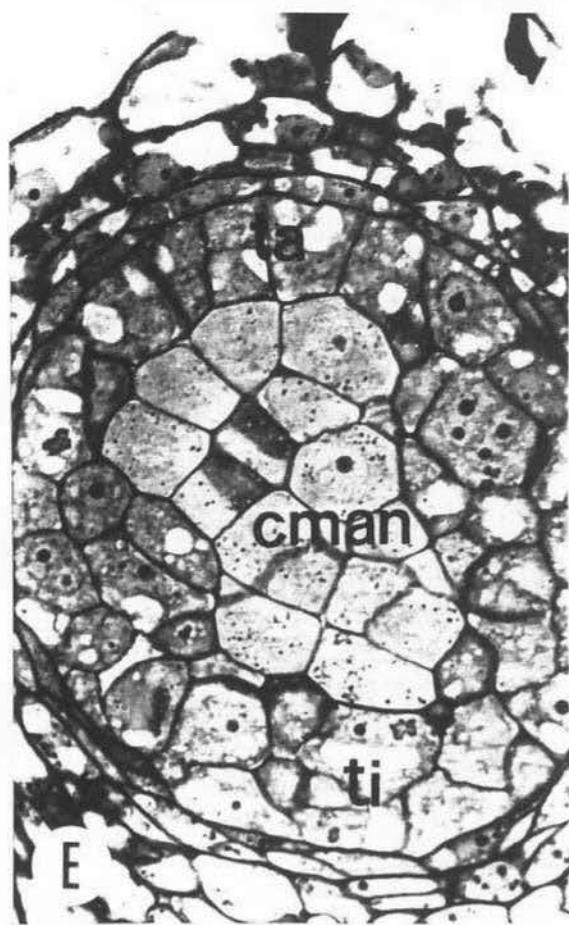
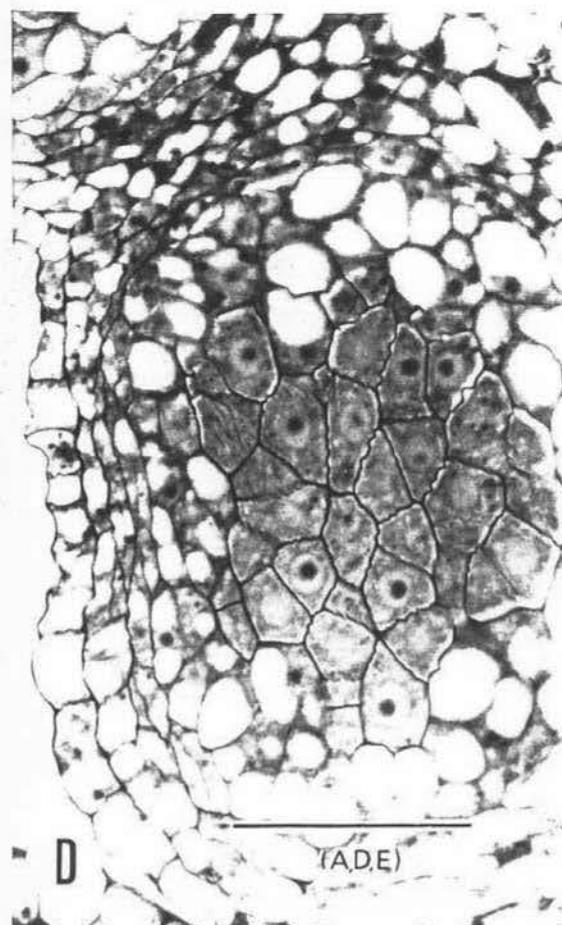
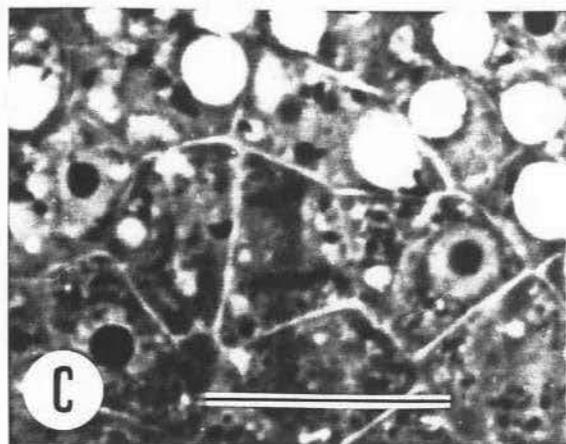
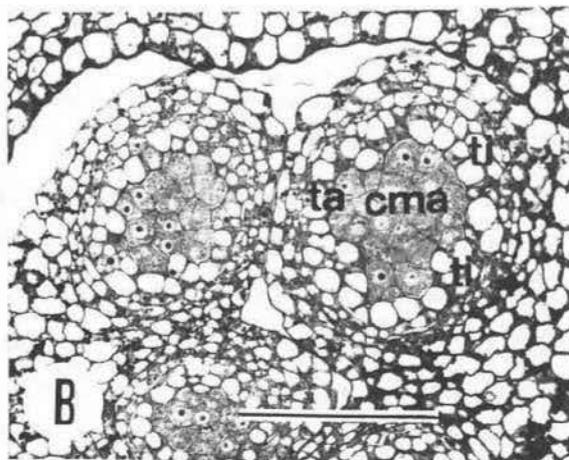
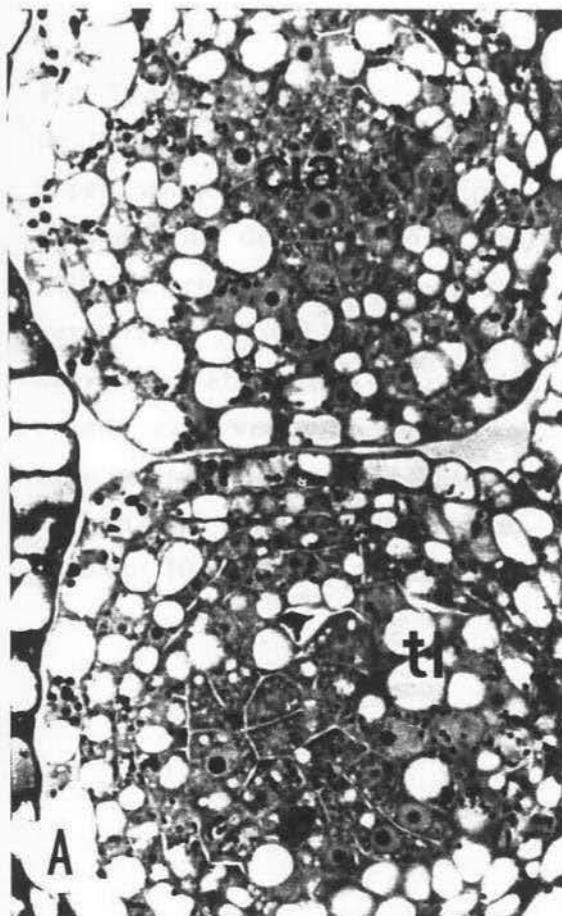


Fig. 7 A-D. A epiderme. A.Célula epidérmica (ep) em antera durante a fase de célula generativa periférica. O endotécio (en) já apresenta espessamentos, a camada média (cm) ainda persiste e tapete (ta) está em processo de degeneração e recobertas pelos orbículos. B.Vista frontal da cutícula recobrindo a epiderme, vista sob microscopia eletrônica de varredura. C.Secção transversal da célula epidérmica mostrando uma abertura (seta) entre as paredes radiais. Note a ausência da lamela média. Corada com vermelho de rutênio. D.Estrias pécticas da parede periclinal externa da epiderme. As estrias são recobertas pela cutícula (não-visível). Corada com vermelho de rutênio.

Escalas: 10  $\mu$ m (B) e 20  $\mu$ m (A, C, D).

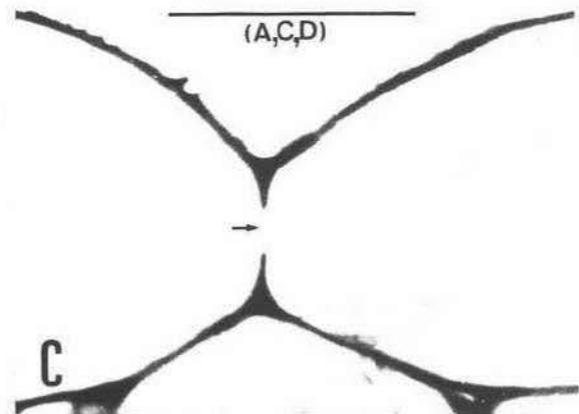
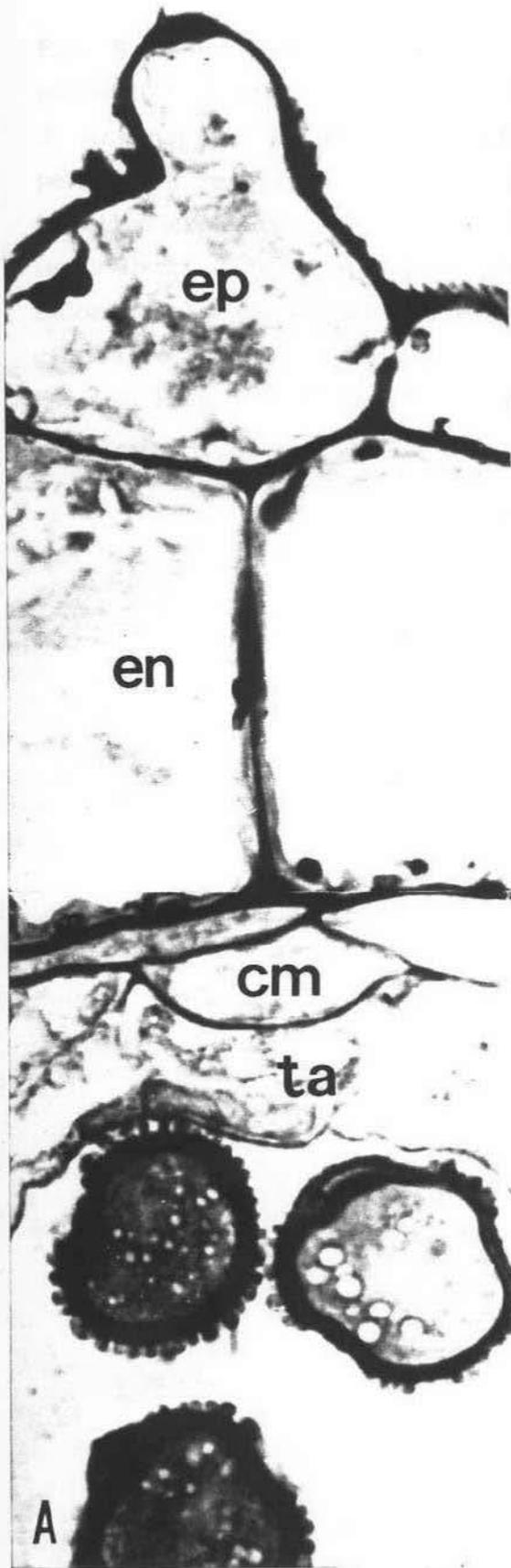


Fig. 8 A-D. O tapete. A. Células do tapete (à direita), com núcleos poliplóides e campos primários de pontuação, adjacentes às células-mãe de andrósporo. B. Eletromicrografia de varredura mostrando a membrana peritapetal recobrida os restos das paredes anticlinais do tapete (setas). C. Eletromicrografia de varredura mostrando corpúsculos de Übisch (orbículos) sobre a superfície periclinal interna de uma célula do tapete. D. Corpúsculos de Übisch (u) e massa de esporopolenina (e) derivados das células do tapete.

Escalas: 1  $\mu\text{m}$  (C); 10  $\mu\text{m}$  (B); 20  $\mu\text{m}$  (A); 50  $\mu\text{m}$  (D).

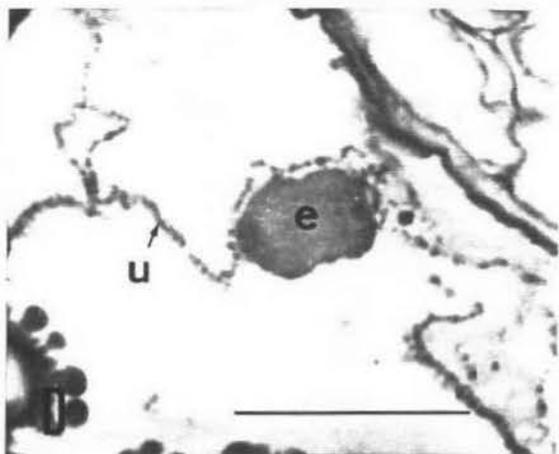
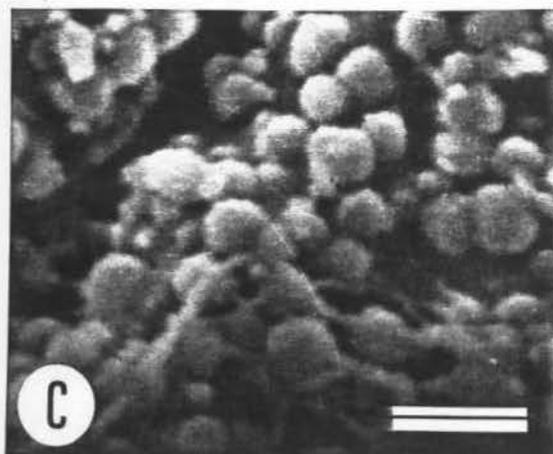
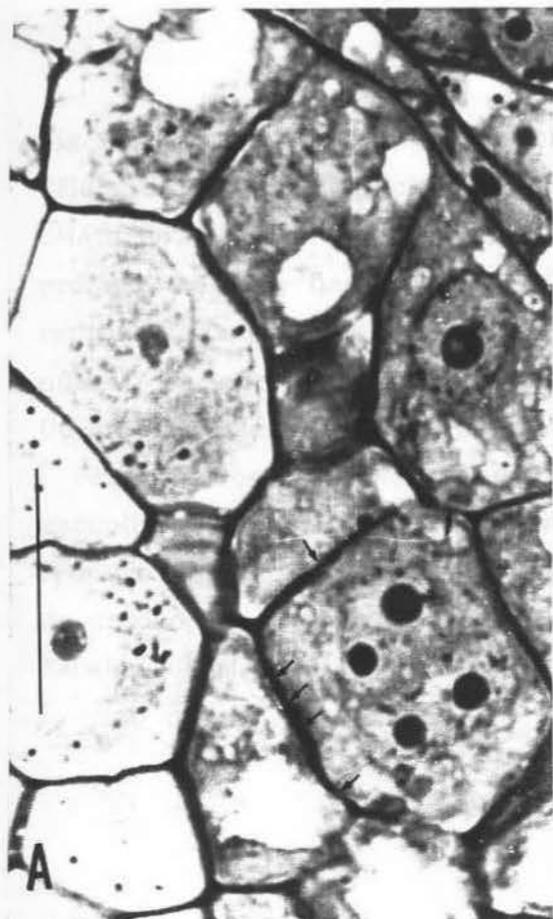


Fig. 9 A-F. Alterações da morfologia nuclear das células do tapete. A. Célula do tapete uninucleada, vacuolizada, antes do início da meiose das CMAn. B. Células binucleadas do tapete durante os estágios iniciais da prófase meiótica das CMAn. C. Durante o transcorrer da meiose. Estão representadas células tetranucleadas e células com núcleos poliplóides. O número de nucléolos dá uma estimativa da número de ploidia nuclear. D. Durante a fase de tétrade de andrósporos. Células poliplóides binucleadas e com núcleos poliplóides fusionados estão representados. E. Durante a vacuolização inicial dos andrósporos. Os núcleos poliplóides mostram uma redução nos conteúdos de cariolinfa. F. Durante o princípio de formação da unidade germinativa masculina.

Escala: 20  $\mu$ m.

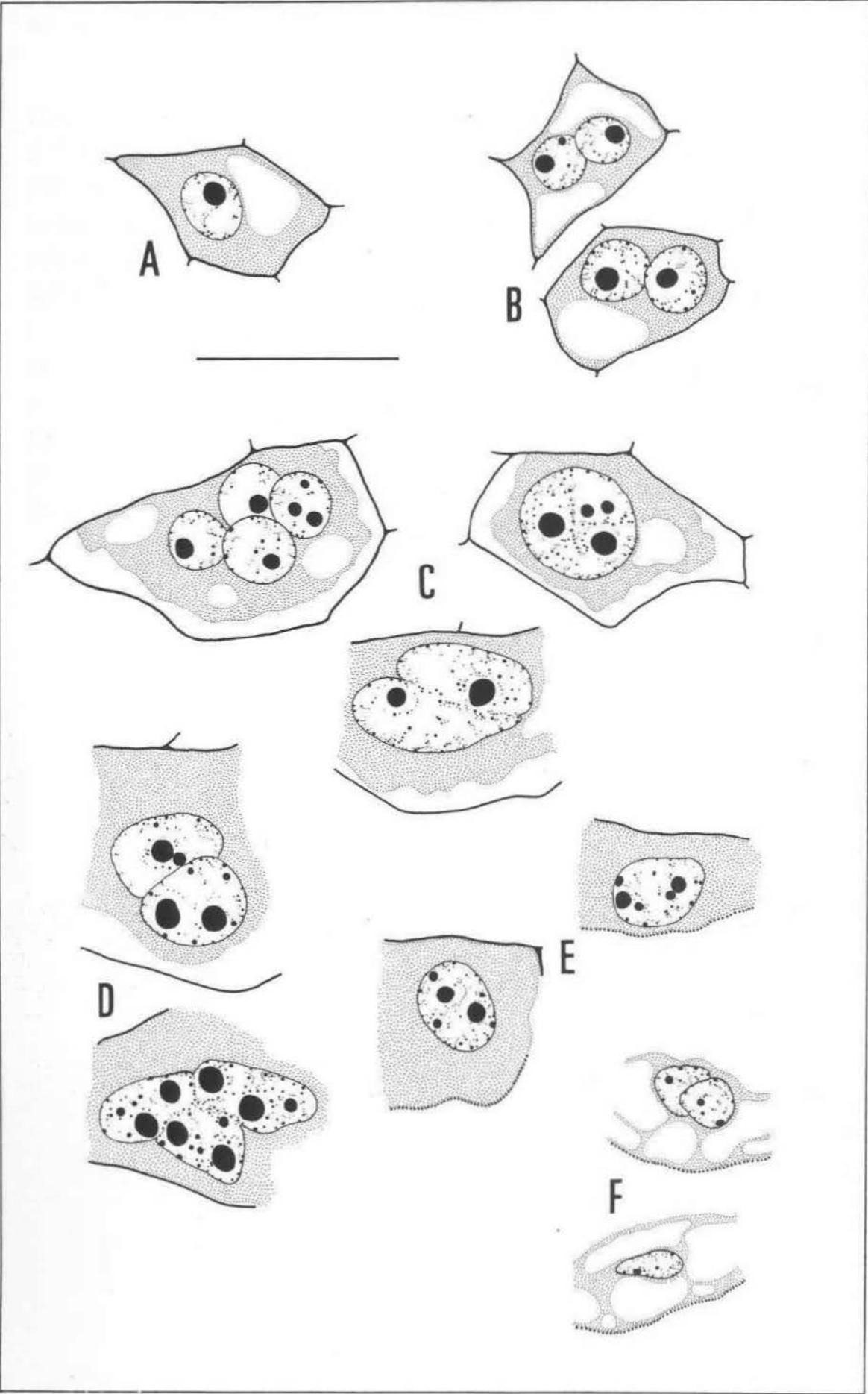


Fig. 10 A-E. O endotécio e a deiscência. Anteras em secção transversal. A.Células do endotécio (en) próximas do septo (se) apresentando, predominantemente espessamentos nas paredes periclinais internas e transversais. A epiderme (ep) que recobre o septo é composta por células achatadas. O saco de esporopolenina (seta) ainda está íntegro. B.Espessamentos presentes no septo, entre dois esporângios. C.Células do endotécio e epiderme com dissolução da lamela média e abertura do estômio. D.Deposição de ácidos pécnicos sobre a face interna dos espessamentos do endotécio (setas). Corado com Vermelho de Rutênio. E.Espessamentos do endotécio e septo sob microscopia óptica de polarização.

Escala: 20  $\mu\text{m}$  (D); 50  $\mu\text{m}$  (A, B, C); 100  $\mu\text{m}$  (E).

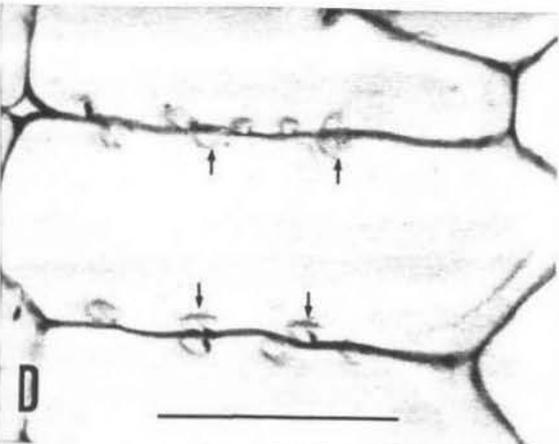
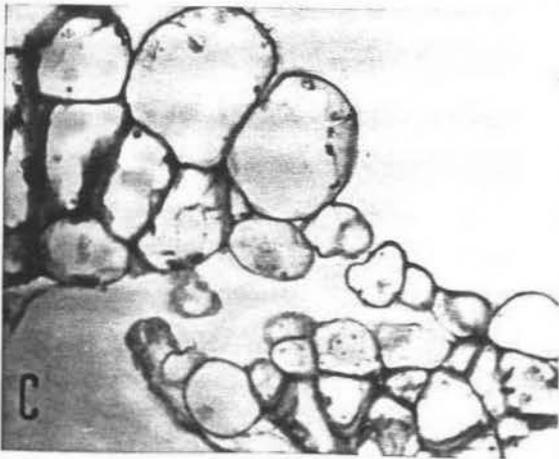
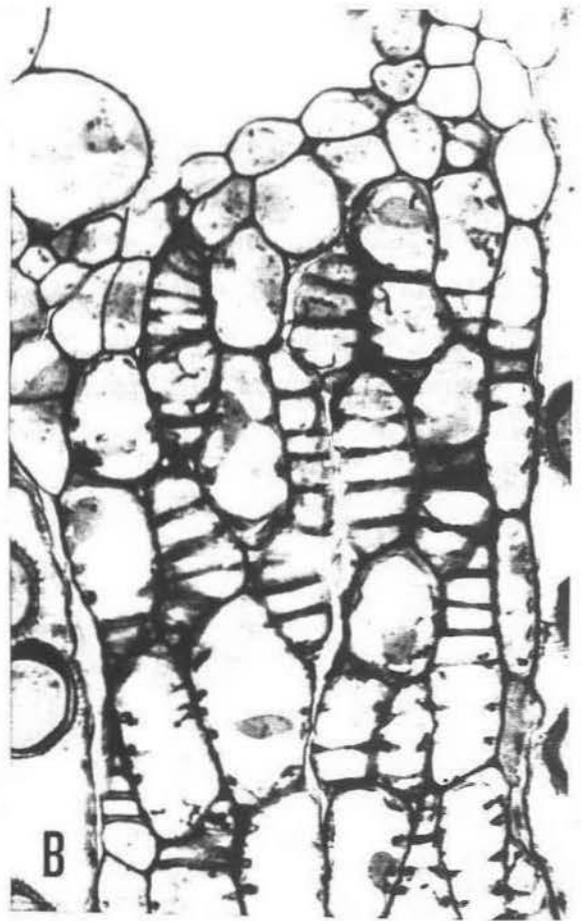
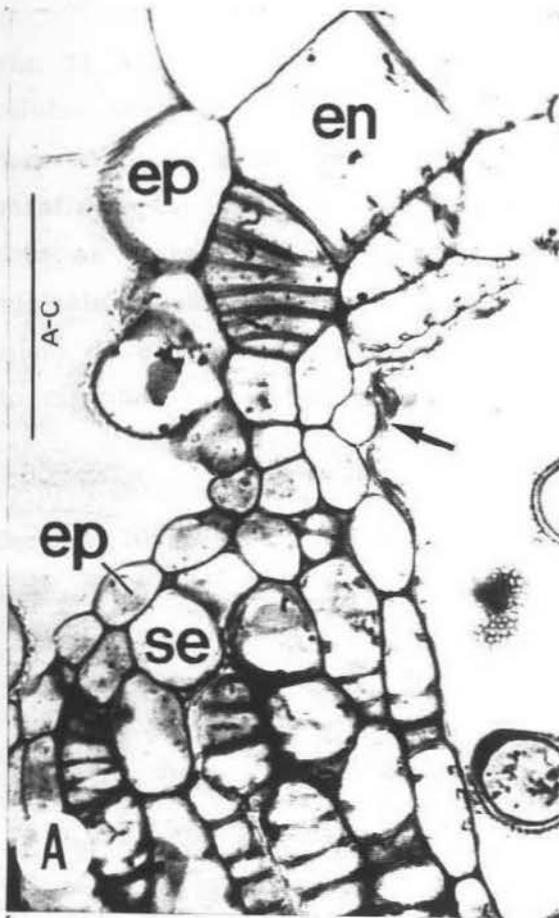


Fig. 11 A-H. Androsporogênese de *I. paraguayensis*. O anel hialino entre as células em meiose e a parede de calose (c) trata-se de um artifício decorrente da fixação. As secções foram realizadas em botões incluídos em parafina. A-C. Células-mãe de andrósporo em prófase meiótica. D. Metáfase I. Note as fibras de fuso. E. Telófase I. Observe a reorganização nuclear e nucleolar (seta) e a ausência de citocinese. F. Metáfase II. G. Telófase II, com início da citocinese simultânea. Observe os primeiros sinais da constrição do citoplasma e a deposição de calose (setas). H. Tétrades envoltas por calose vistas sob microscopia óptica de fluorescência. A calose apresenta-se brilhante

Escala: 20  $\mu\text{m}$  (A-G); 30  $\mu\text{m}$  (H).

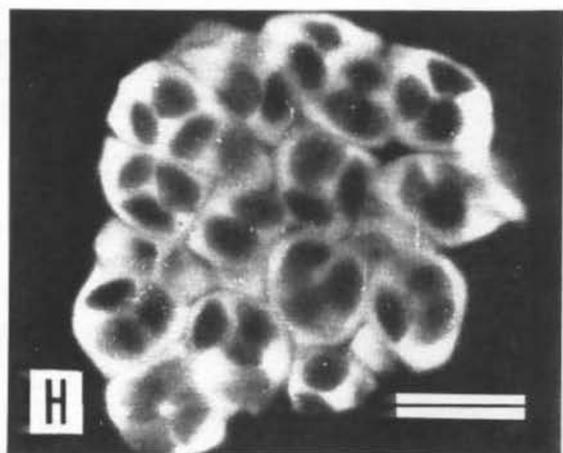
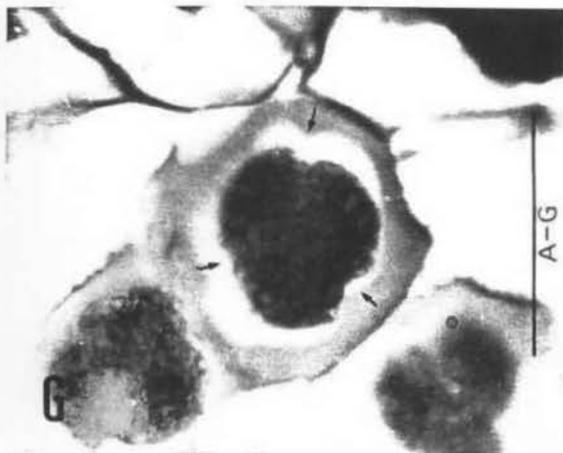
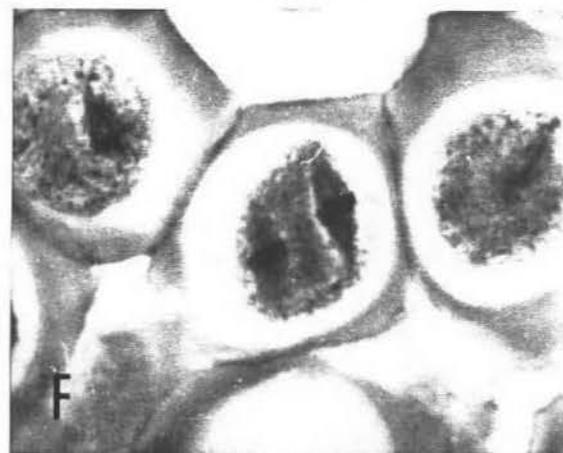
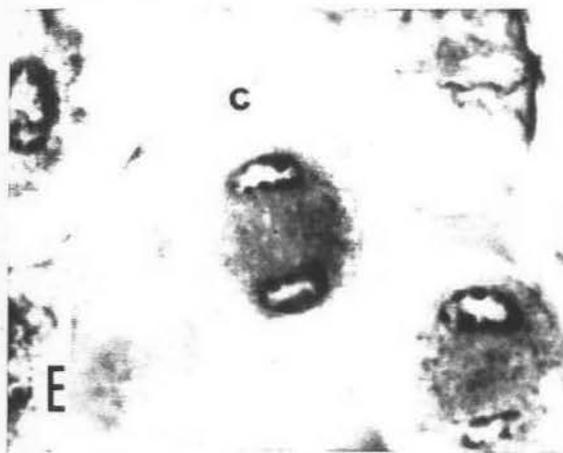
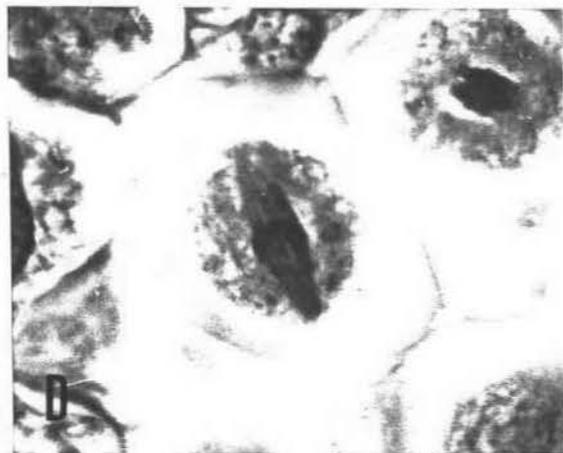
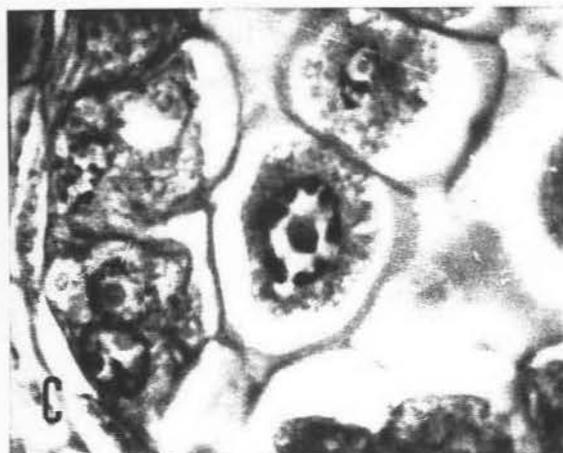
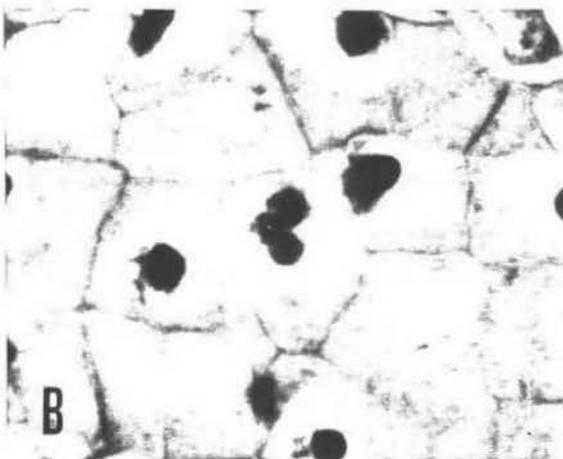
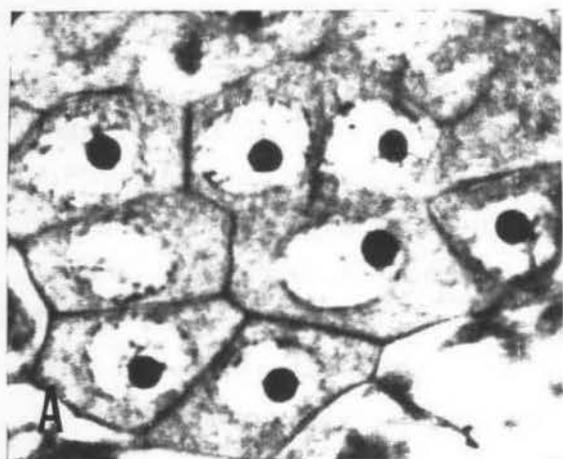


Fig. 12 A-D. Presença e migração de plastídios durante a esporogênese. A. Plastídios nas células iniciais do arquespório (cia). A seta indica um plastídio com um grão de amido. Acima, são visualizadas células do tapete parietal (ta) e camada média (cm). B. Célula-mãe de andrósporo em telófase II. Os plastídios, contendo grãos de amido, estão localizados ao longo da faixa equatorial da célula, entre os núcleos (n). C. Células-mãe em telófase II. Os plastídios estão em distribuição homogênea no citoplasma, no início da constrição durante a citocinese (setas). D. Tétrade de andrósporos. Coloração: Azul de Toluidina (A) e PAS/Azul de Toluidina (B-D). Escala: 20  $\mu$ m.

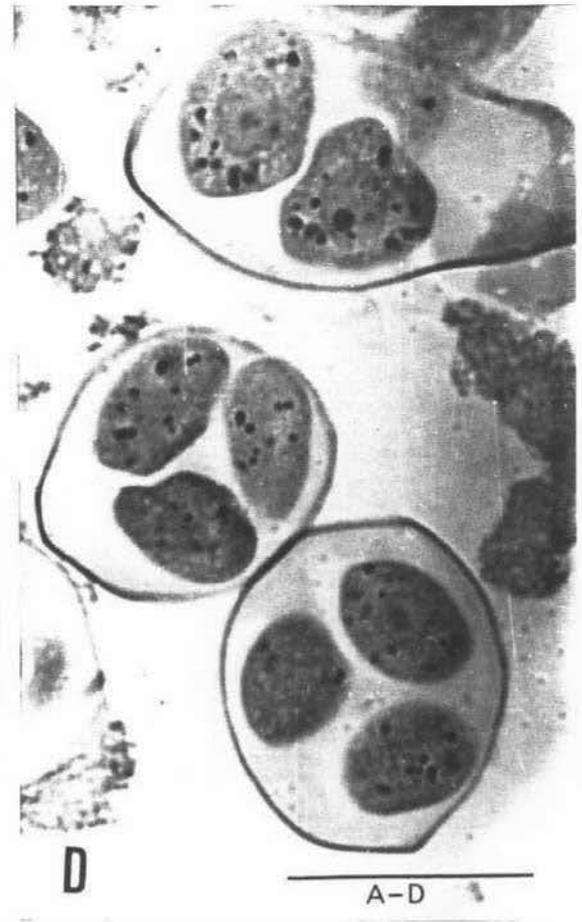
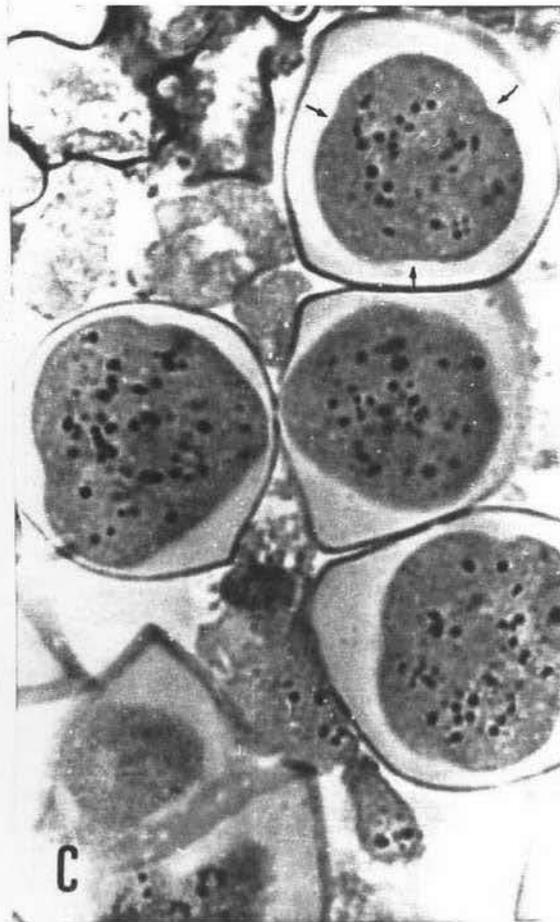
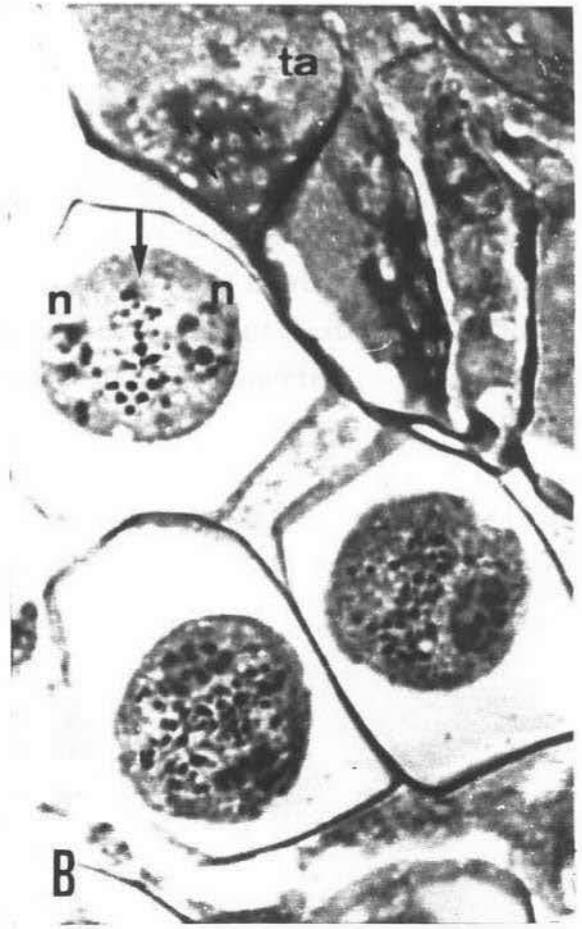
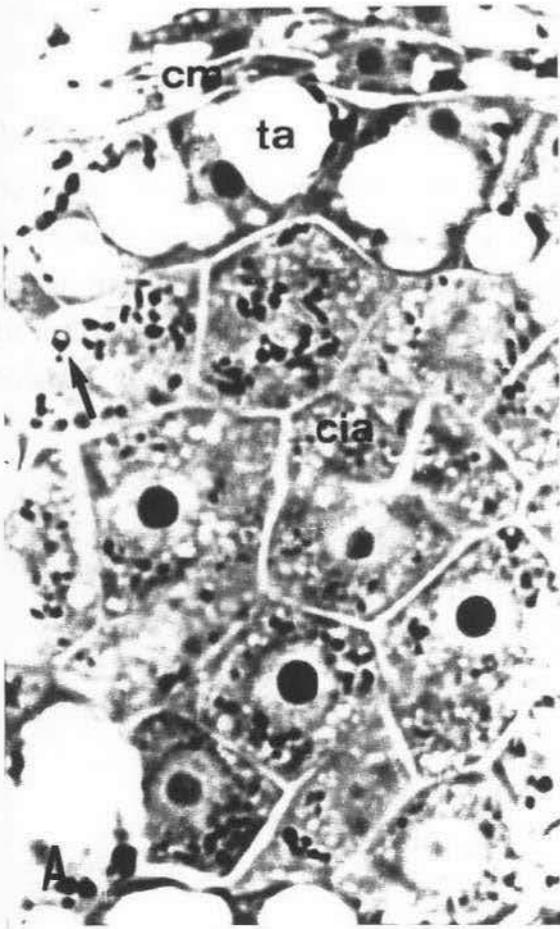


Fig. 13. Secção transversal de antera durante o estágio de tetrade de andrósporos. Os andrósporos (an) estão envolvidos por calose (c) que os isolam das vesículas (v) presentes no fluido locular, liberadas pelo tapete (ta). A epiderme (ep) mostra estrias na parede periclinal externa.

Escalas: 20  $\mu\text{m}$  (canto superior esquerdo) e 200  $\mu\text{m}$  (inserte).

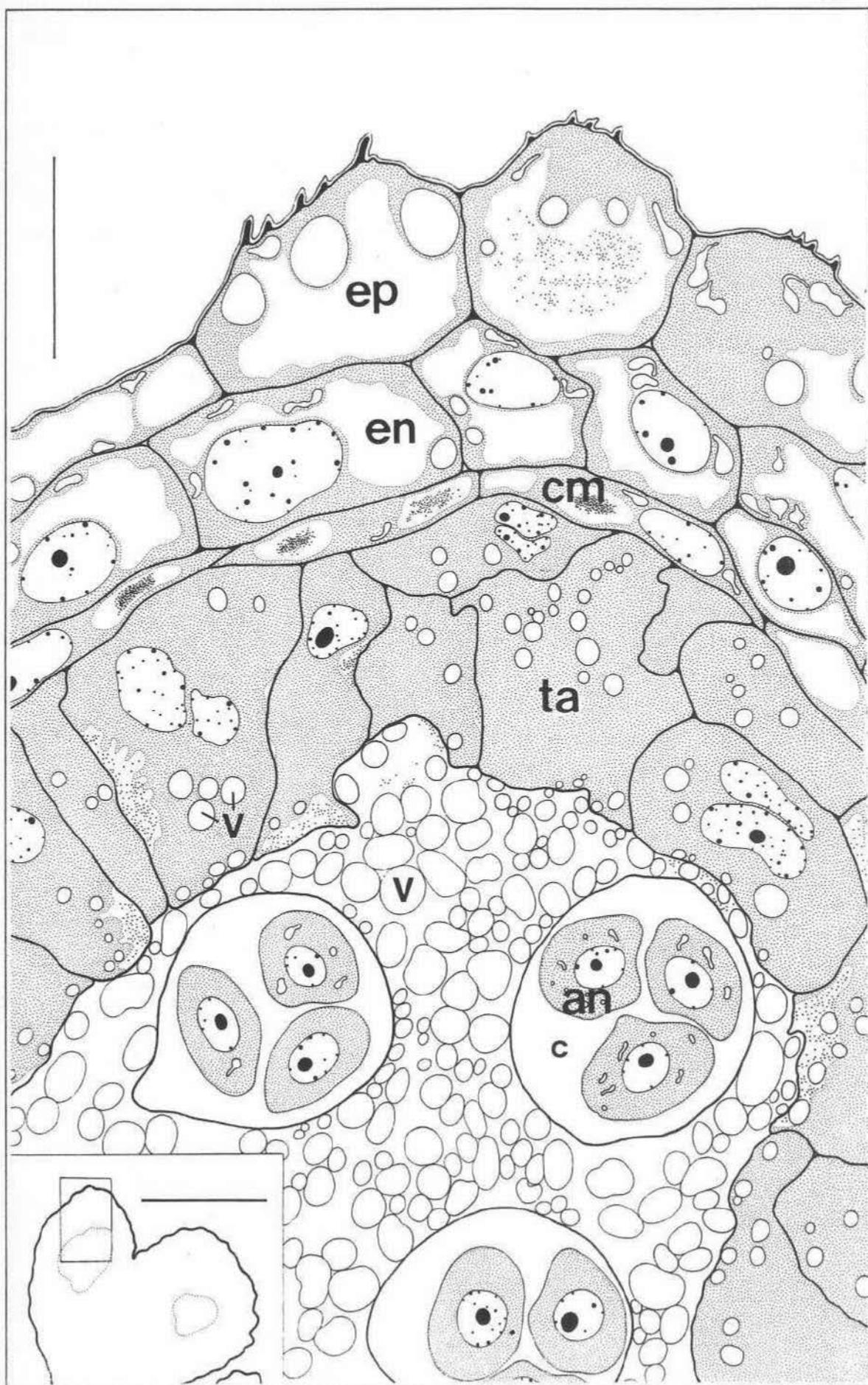


Fig. 14. Secção transversal da antera mostrando andrósporos jovens após a dissolução da calose. Os andrósporos (an) apresentam o citoplasma denso, sem vacúolos, com alguns leucoplastos contendo grãos de amido. A esporoderme jovem é constituída pela primexina (pr) entre as báculas e ectexina (ect). Note a primexina na forma de discos lenticulares espessados com canais radiais na região equatorial dos colpos. O tapete (ta) não possui mais as paredes periclinal interna, transversais e radiais. Restos das paredes radiais são visíveis (seta).

Escala: 20  $\mu\text{m}$  (canto superior esquerdo) e 200  $\mu\text{m}$  (inserte).

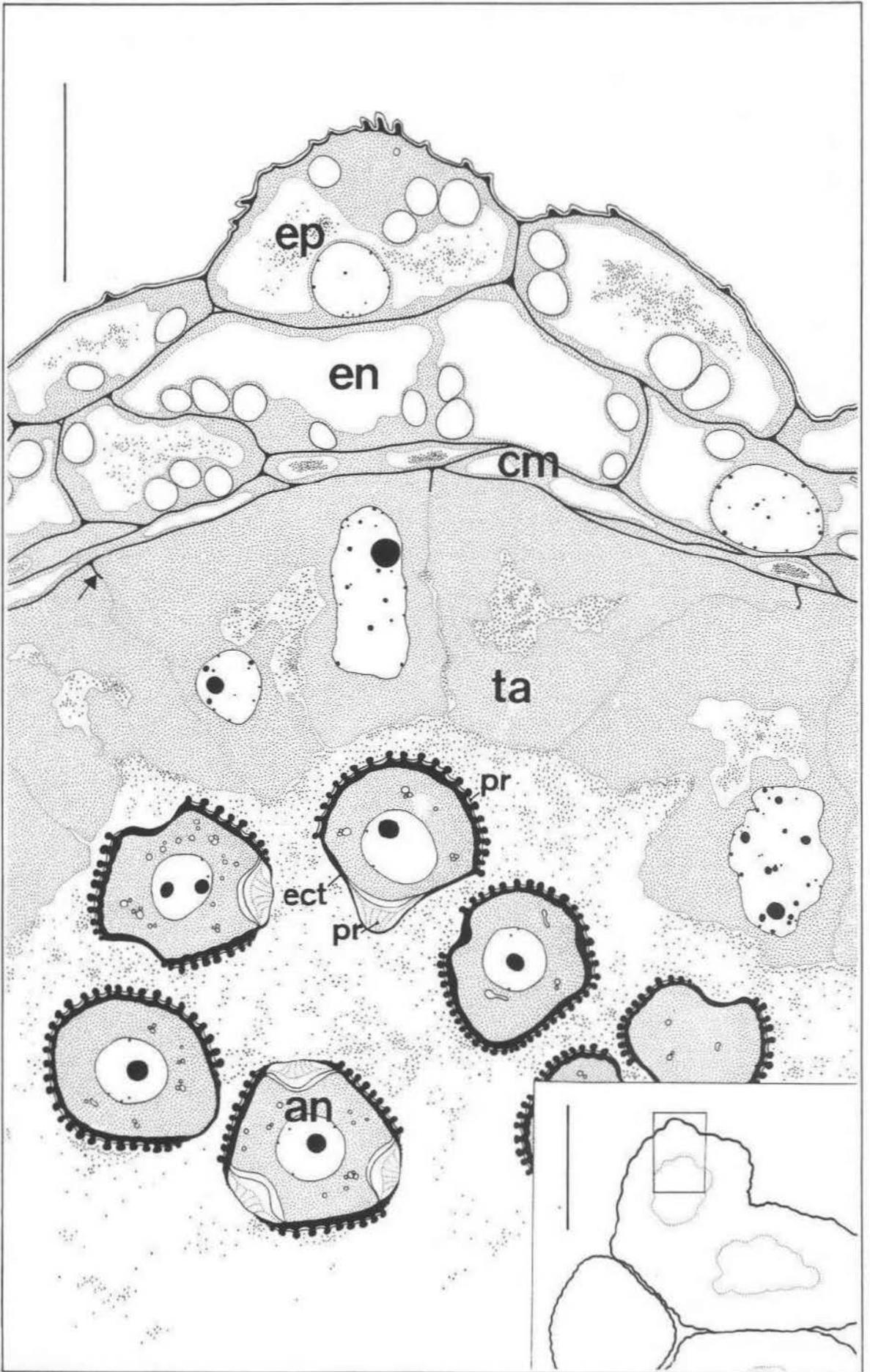


Fig. 15. Secção transversal da antera contendo andrósporos (an) vacuolizados, momentos antes da mitose. Alguns grãos de proteínas estão presentes no interior dos vacúolos, nos andrósporos. A esporoderme já se apresenta estratificada em primexina (pr), ectexina (ect), endexina (end) e medina (me). O tapete (ta) já se encontra em início de degeneração. Orbículos ou corpúsculos de Übisch (u) são visíveis principalmente nas superfícies periclinais internas do tapete. Massas de esporopolenina (e) também estão presentes. Uma membrana peritapetal (mp), de esporopolenina, reveste a parede periclinal externa do tapete e os restos das paredes radiais e transversais. O endotécio (en) começa a apresentar, junto à parede primária, espessamentos lignificados em "U" (es). Escalas: 20  $\mu$ m (canto superior esquerdo) e 200  $\mu$ m (inserte).

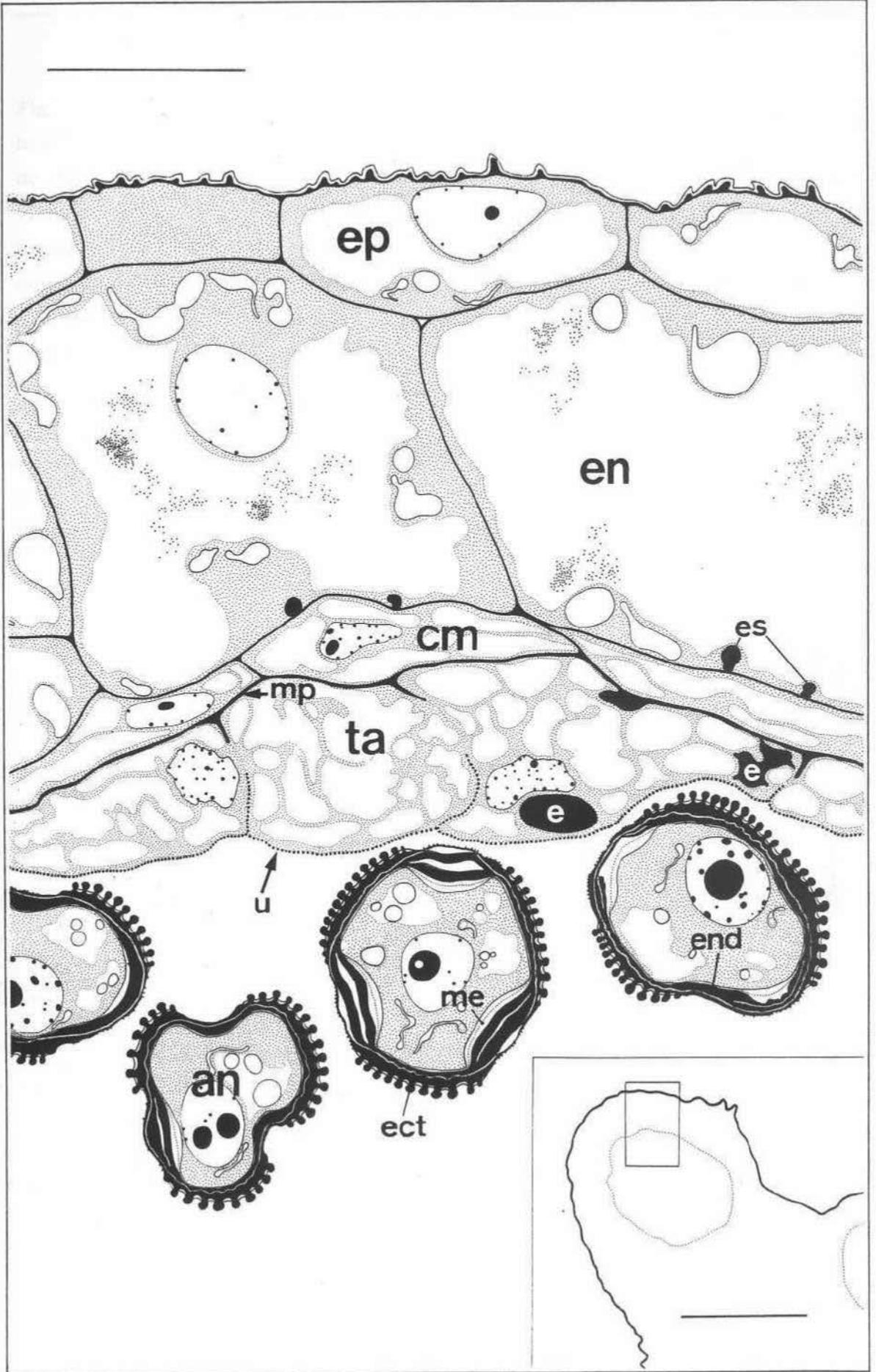
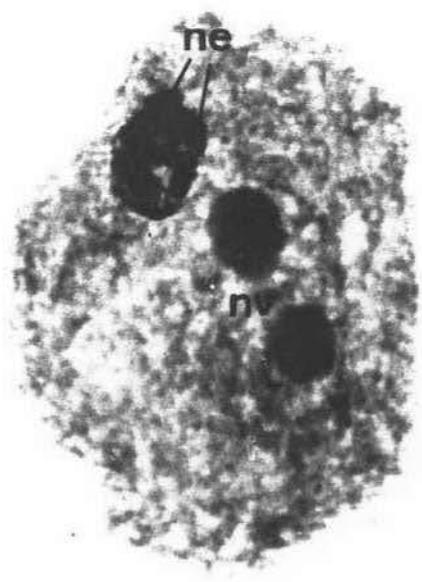
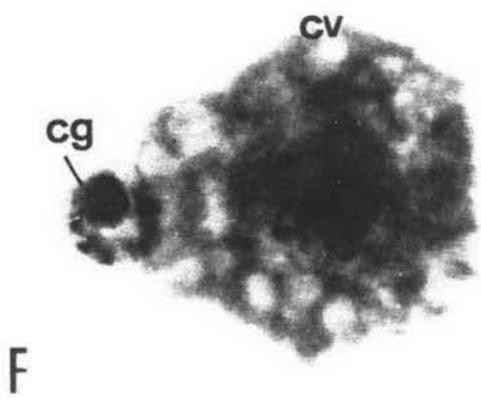
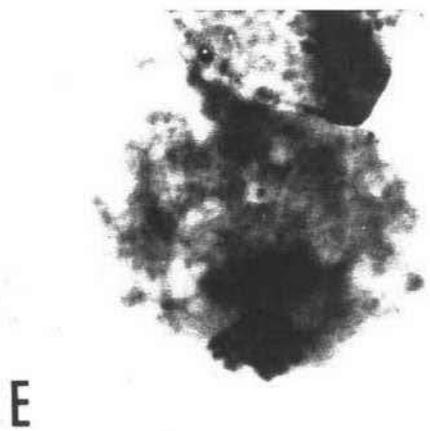
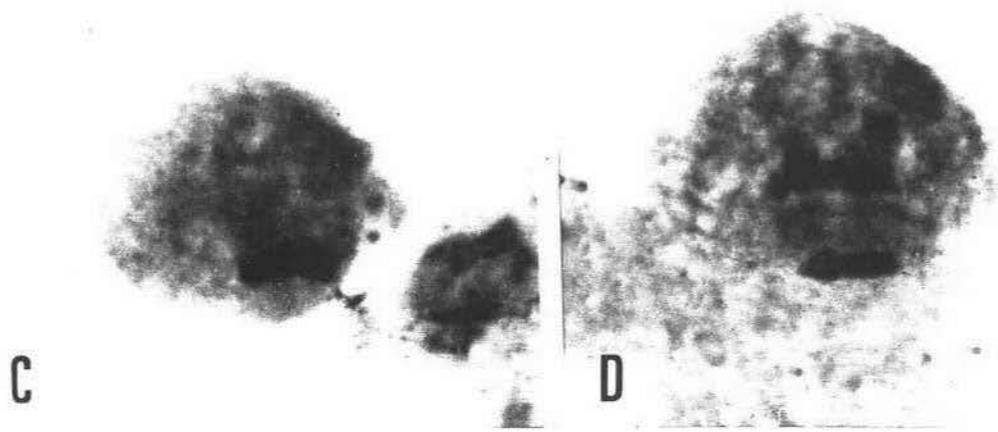
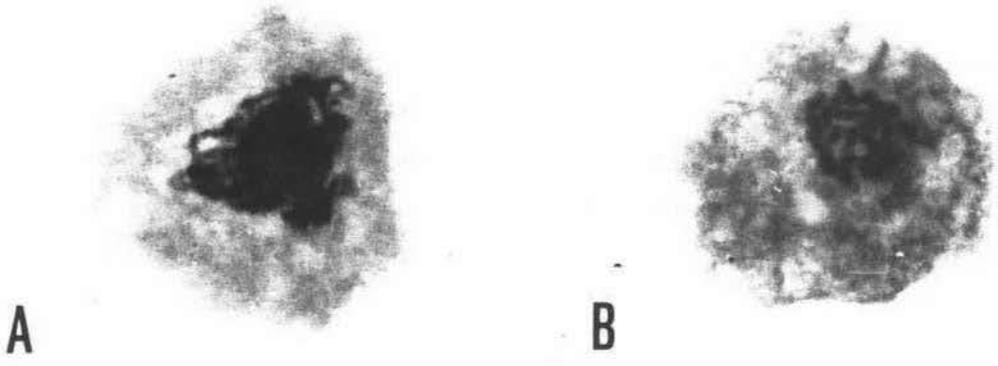


Fig. 16 A-G. Gametogênese. Técnica de esmagamento e coloração com hematoxilina. A técnica não permite a visualização dos vacúolos. A. Núcleo do andrósporo em prófase mitótica. B. Cromossomos na placa equatorial vistos frontalmente, durante a metáfase. C. Metáfase, vista lateralmente. Repare na localização periférica dos cromossomos alinhados na placa equatorial. D. Anáfase, demonstrando formação desigual das fibras de fuso. E. O mesmo que D, vista em outro ângulo. F. Célula generativa (cg) e vegetativa formadas (cv). A célula generativa está periférica, com forma esférica e perfeitamente destacada do citoplasma vegetativo. G. Célula espermática binucleada envolta pela célula vegetativa, com um núcleo (nv) dotado de dois nucléolos. Os núcleos espermáticos estão paralelos e sobrepostos.

Escalas: 20  $\mu$ m (canto inferior direito).



— A-G

**Fig. 17.** Antera sob secção transversal com gametófitos (grãos de pólen) formados pela célula vegetativa com um núcleo hialino (nv) próximo à célula espermática falciforme (ce) binucleada (ce). A célula espermática começa a se aproximar do núcleo vegetativo (nv) para a formação da unidade generativa masculina. As membranas tapetal e peritapetal estão reunidas, formando o saco de esporopolenina (se) que envolve, por completo, os grãos de pólen. A epiderme (ep) apresenta grandes campos primários de pontuação (setas) nas paredes radiais.

Escalas: 20  $\mu$ m (canto superior esquerdo) e 200  $\mu$ m (inserte).

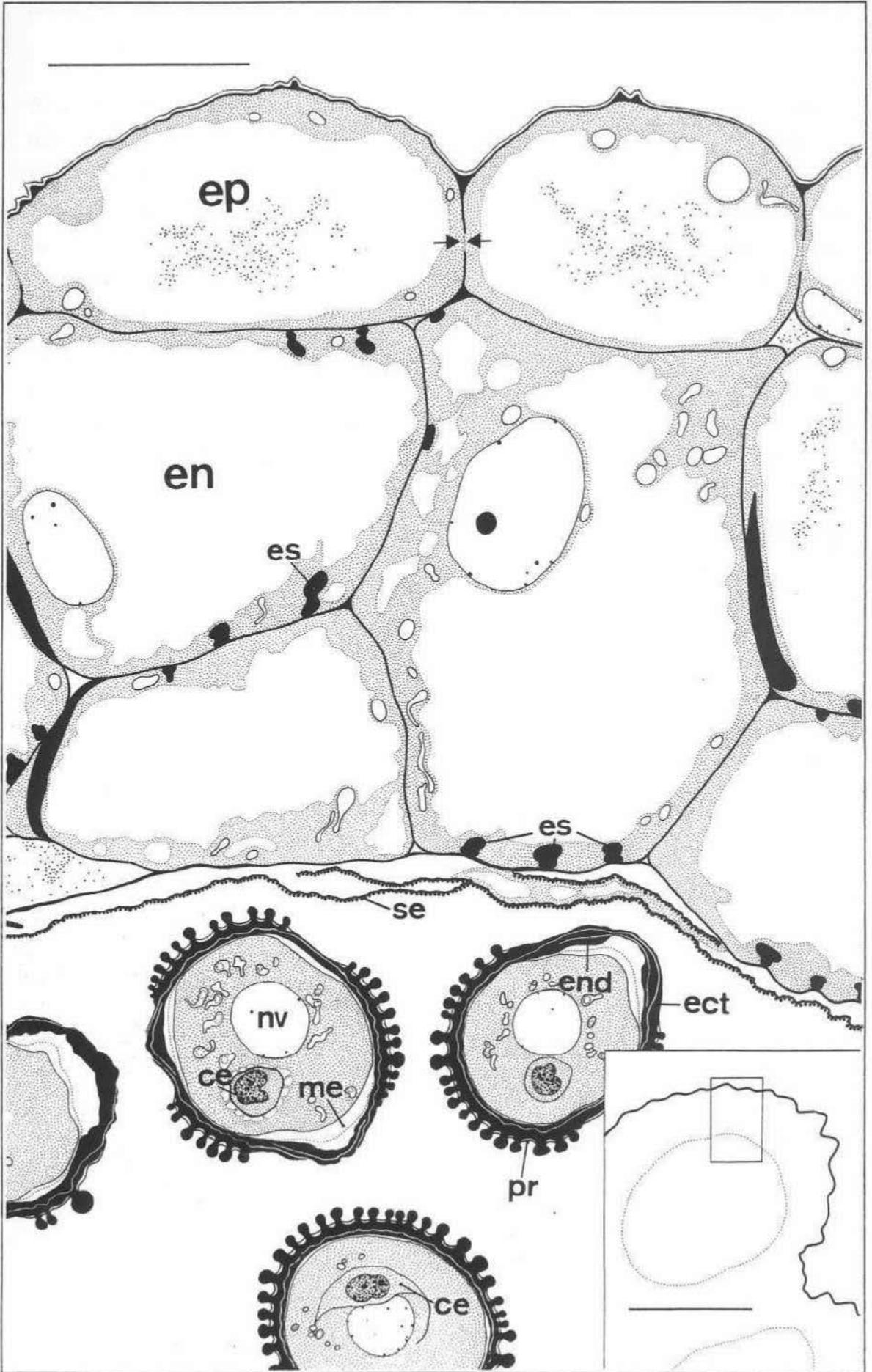
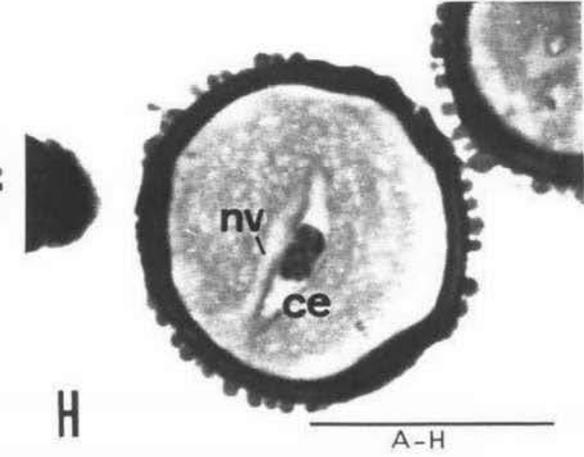
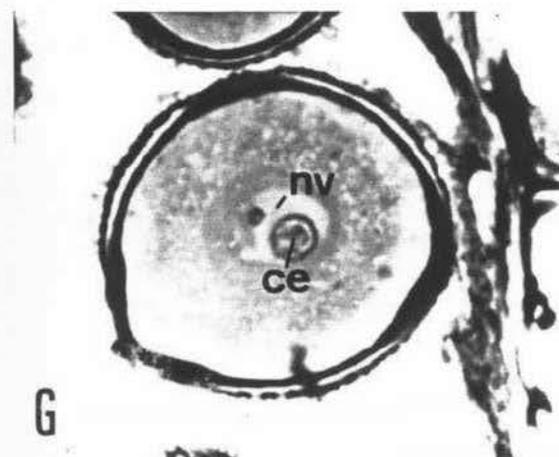
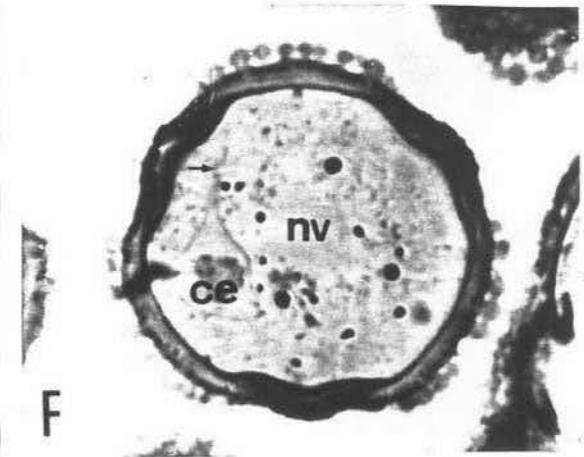
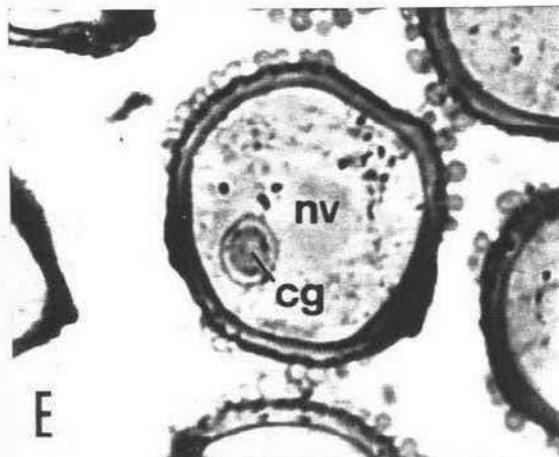
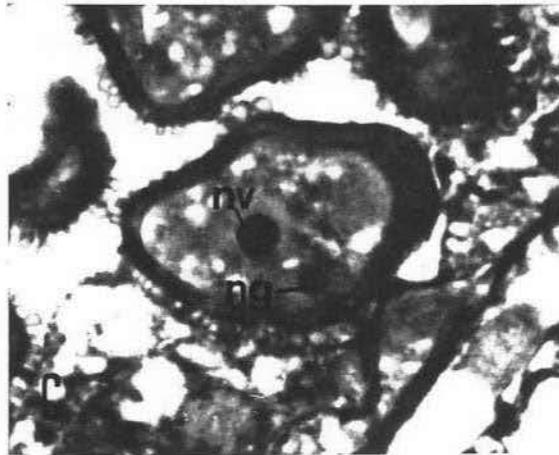
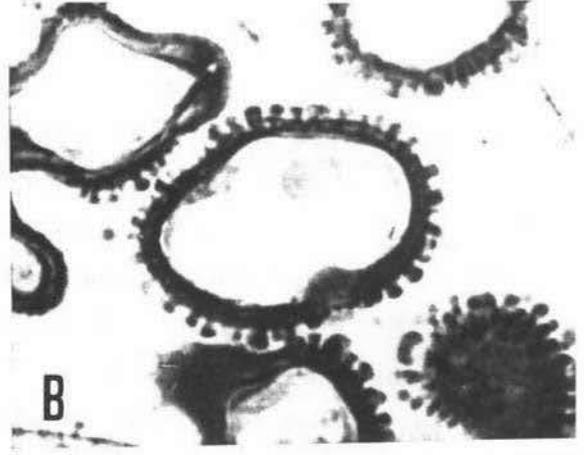
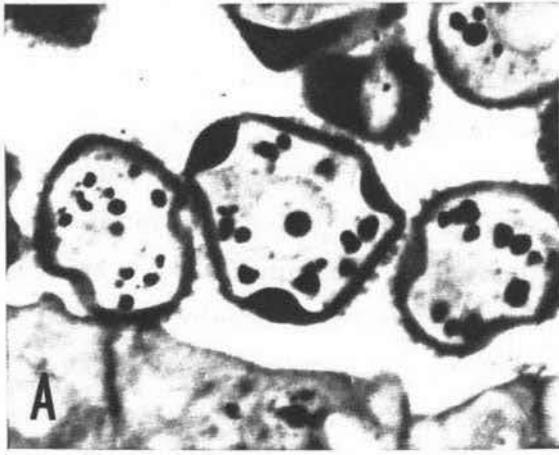


Fig. 18 A-H. Transformações ocorridas no andrósporo a partir da dissolução da calose. A. Andróspero livre, com plastídios contendo grãos de amido. B. Núcleo do andrósporo polarizado. C. Célula generativa periférica com núcleo (ng) com menor diâmetro que o núcleo vegetativo (nv). D. Gametófito rico em grãos de amido (a), durante a mesma fase que em C. E. Célula generativa (cg) envolta pela vegetativa, com núcleo central hialino (nv). Note a redução no tamanho dos grãos de amido e a parede pectocelulósica da célula generativa. F. Célula espermática binucleada (ce) com forma alongada. A seta indica a cauda citoplasmática decorrente do seu envolvimento pela célula vegetativa, sempre com núcleo (nv) central. G. Núcleo vegetativo (nv) envolvendo a célula espermática (ce), na unidade germinativa masculina. Note o pequeno nucléolo presente no núcleo vegetativo. H. Célula espermática (ce) no andrófito maduro, na antera deiscente.

Escala: 20  $\mu$ m (A-H).



A-H

Fig. 19 A-D. A unidade germinativa masculina. A.Unidade germinativa masculina sob secção longitudinal. O núcleo vegetativo (nv) aparece sob a célula espermática binucleada (ce), paralela a ela. B.Sob secção transversal. Note que o nv envolve parcialmente a célula espermática. C.Em secção longitudinal, agora num plano perpendicular à secção em A. D.Representação artística da unidade germinativa masculina de *I.paraguariensis*. A "cauda" fina numa das extremidades da célula espermática corresponde ao estrangulamento citoplasmático resultante do incorporação da célula generativa pela célula vegetativa.

Escalas: 10  $\mu$ m.

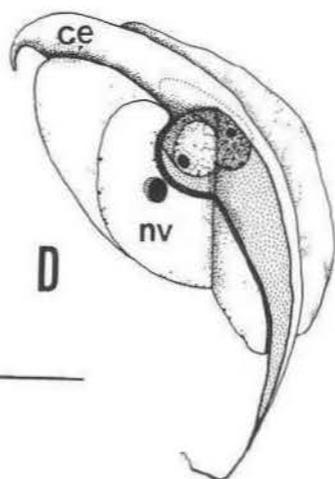
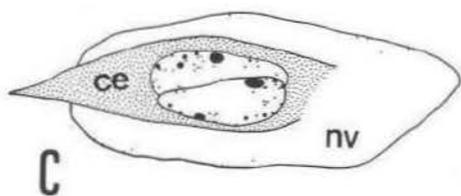
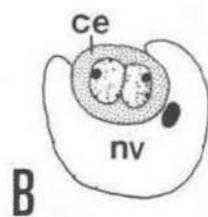
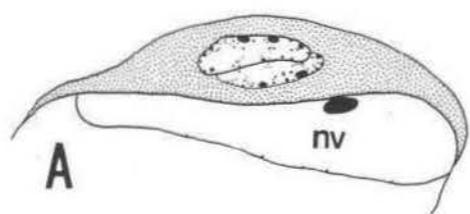


Fig. 20 A-F. Testes histoquímicos no andrófito seccionado. A. Corado com Coomassie Blue. O colpo (seta maior) e a primexina (setas menores) apresentam resultados positivos para o teste. Grânulos proteicos (p) estão presentes no citoplasma vegetativo, quando a célula generativa ainda está periférica. B. Grande massa amorfa de proteína no interior do vacúolo da andrósporo polarizado. Corado com Coomassie Blue. C. Coloração com Vermelho de Rutênio demonstrando a presença de ácidos pécticos na medina (me) e na parede que envolve a célula generativa). D-F. Coloração com Pironina e Verde de Metila. As setas indicam as maiores concentrações de ARN junto aos colpos (em D e E) e envolvendo a unidade germinativa masculina (em F).

Escala: 20  $\mu$ m (A-F).

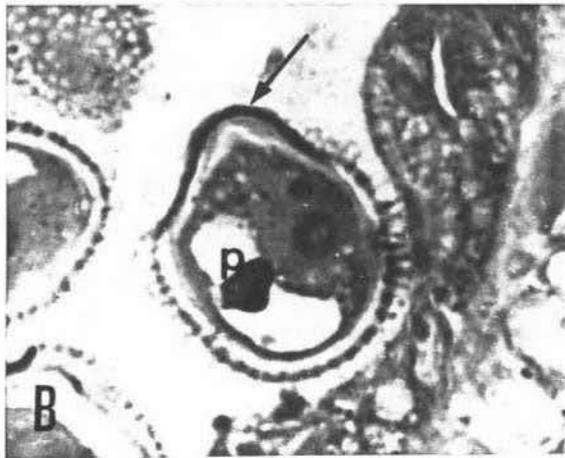
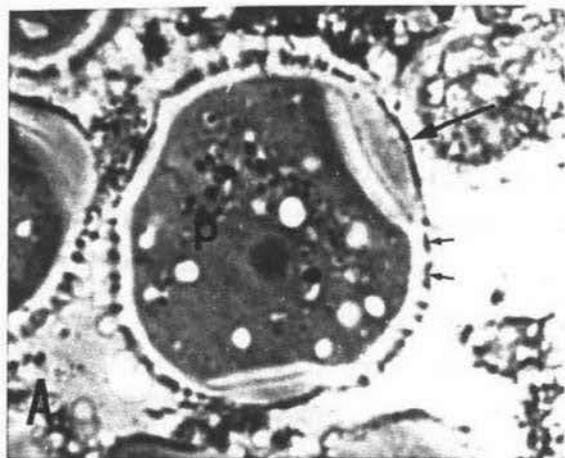
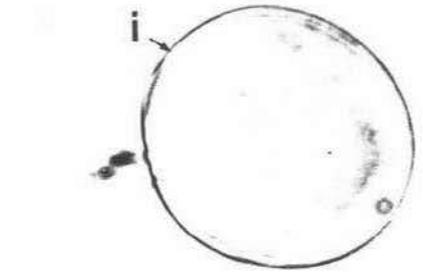
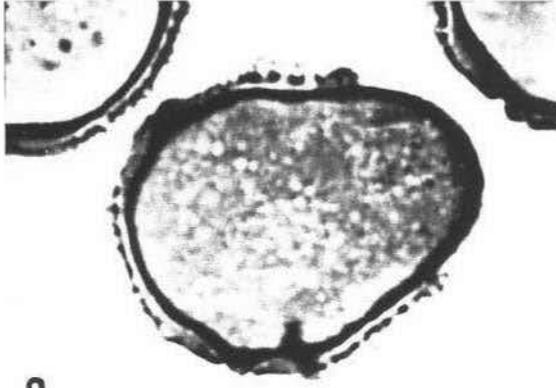
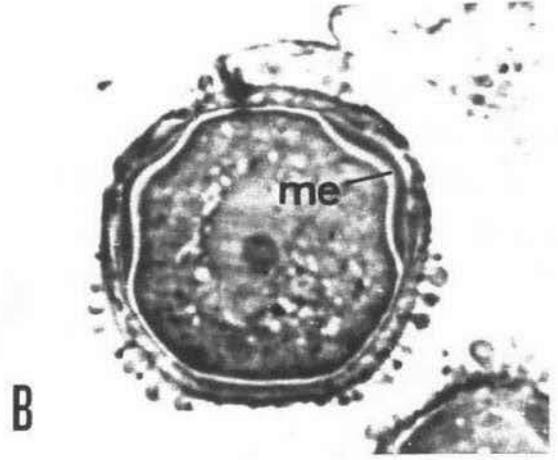
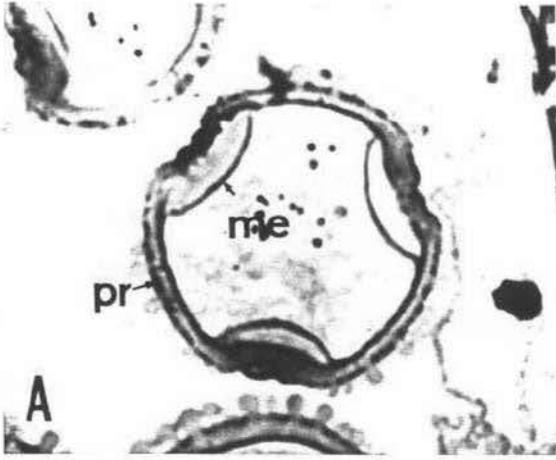
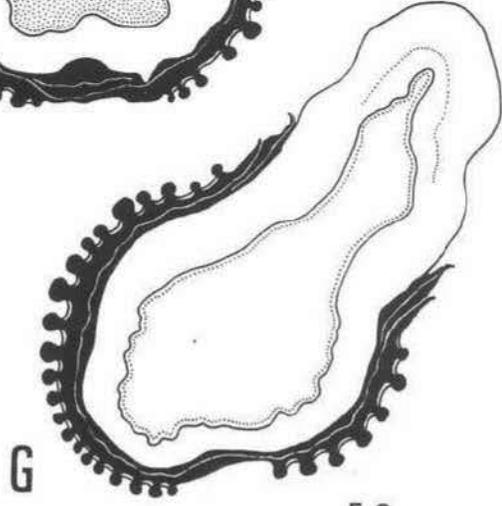
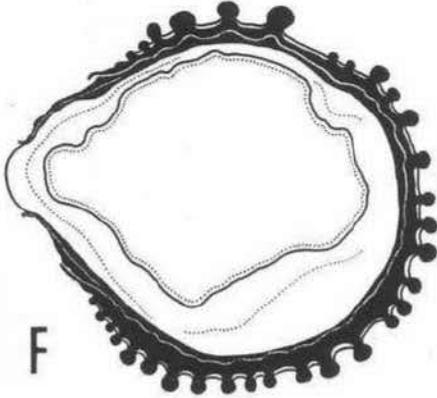
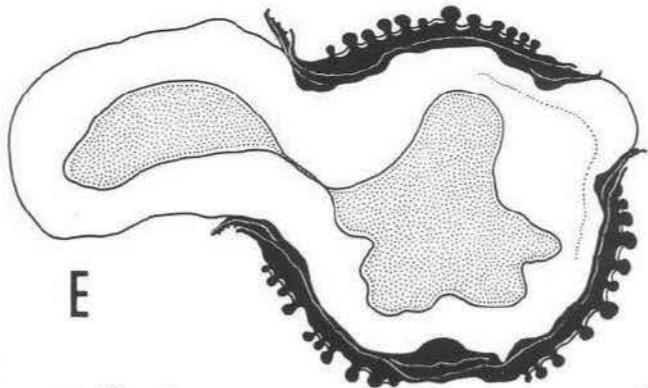


Fig. 21. A-G. A primexina, a medina e a intina. A. Medina (me) espessada sob os colpos, durante o envolvimento da célula generativa pela célula vegetativa. A primexina (pr) está sempre presente. B. Biestratificação da medina (me). C. Colpo rompido pelo aumento de volume do citoplasma vegetativo. D. Intina (i) envolvendo o andrófito desprovido da medina e da exina. E-G. Hidratação da medina em grãos de pólen colocados em meio de cultura (gelatina 2% com sacarose 10%).

Escalas: 20  $\mu$ m.



A-D



E-G

Fig.22 A-D. Eletromicrografias de varredura do grão de pólen jovens e maduros, não-acetolizados. A.Andrósporos recém liberados da calose, reunidos ainda em uma tétrade. B-D.Grãos de pólen mostrando a ornamentação da exina e proteínas (granulações) sobre os colpos. E.Corpúsculos de Übisch sobres as células do tapete.  
Escala: 4 µm (B,E); 6 µm (C,D); 10 µm (A).

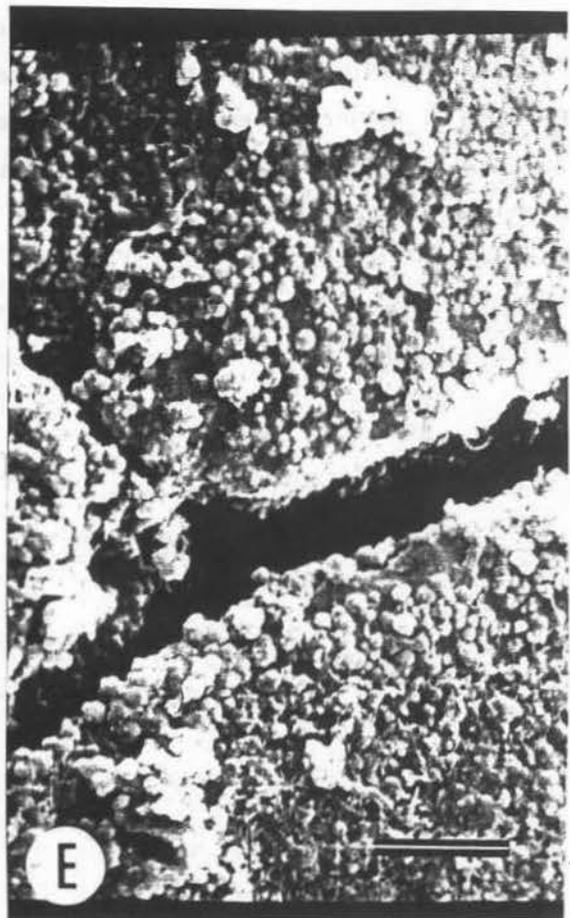
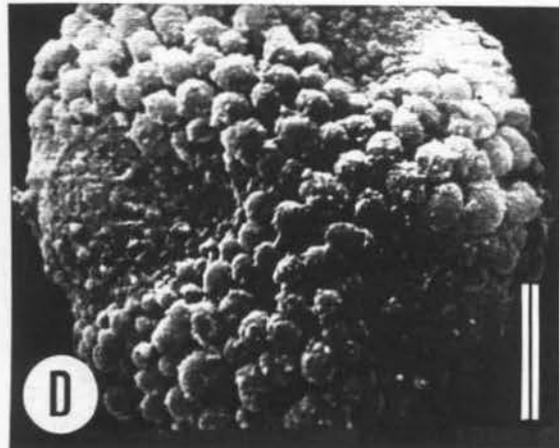
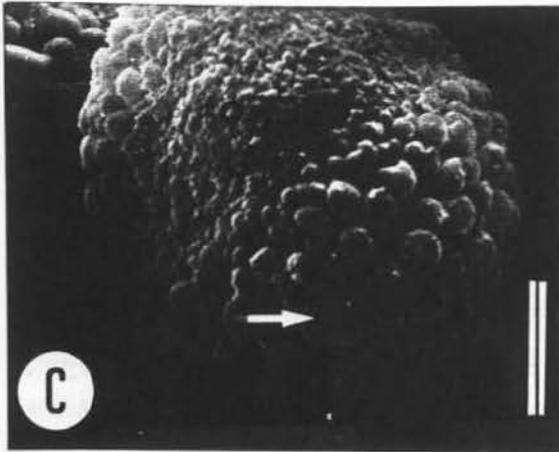
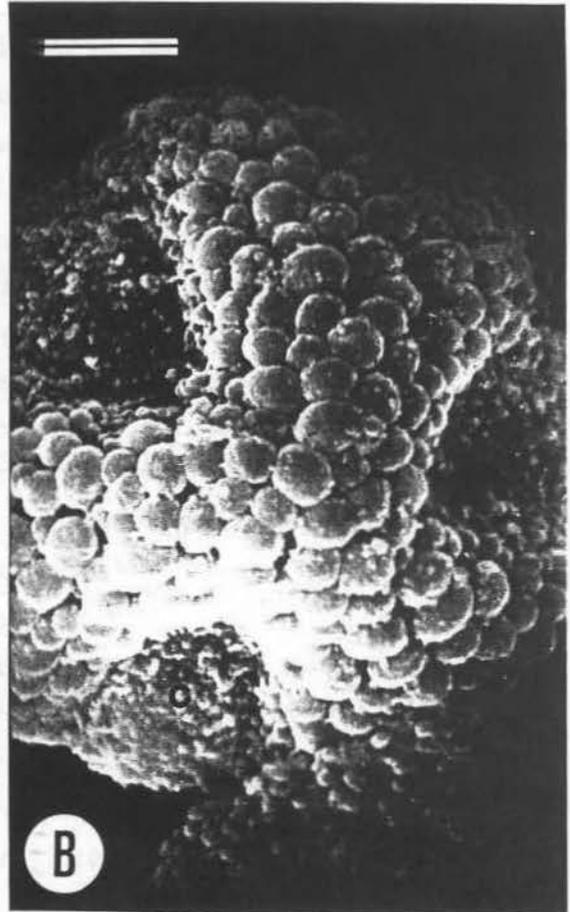
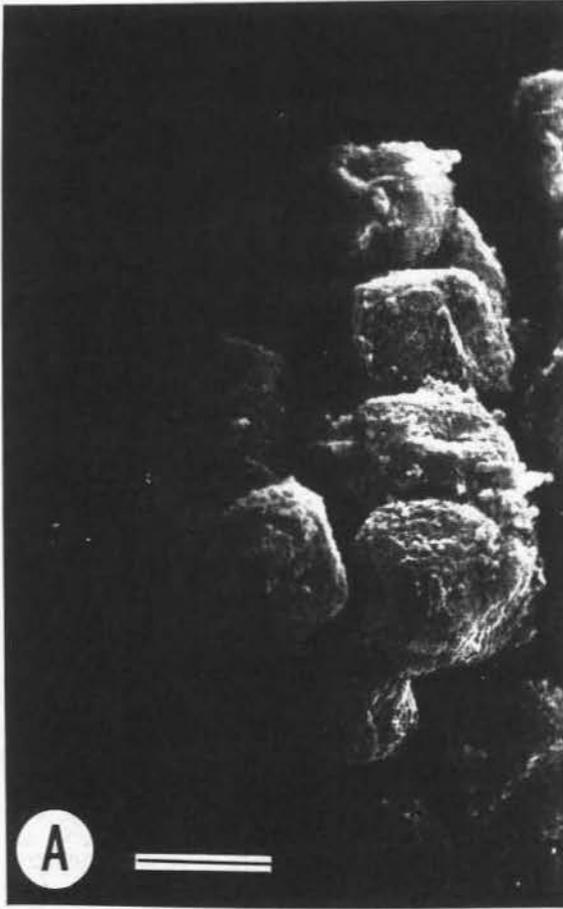


Fig. 23 A-J. Ontogenia da esporoderme e as transformações durante a esporogênese e gametogênese. As circunferências servem para destacar a região equatorial dos poros. A. Tétrade de andrósporos envolta por calose (c), apresentando ectexina jovem (ect). B. Andróspero jovem, recém liberado da calose, com discos espessados pécticos, com canais radiais, nas zonas dos colpos e endexina hialina (end) celulósica (?) sob os mesmos (exclusivamente). Note a primexina (pr) entre as báculas da ectexina (ect). C. Andróspero com endexina (end) depositada sob a ectexina. Nos colpos, a endexina começa a envolver os discos pécticos. D. Andróspero vacuolizado polarizado com discos pécticos isolados pela endexina e medina (me) surgindo sob os colpos. E. Núcleo do andrósporo profásico. O material péctico no envelopado pela ectexina começa a ser comprimido. Repare na compressão central da endexina pela medina. F. Célula generativa (cg) junto à esporoderme. Note o grande número de grãos de amido no citoplasma da célula vegetativa (cv) e o fim da sua vacuolização. G. Início do envolvimento da célula generativa pelo citoplasma da célula vegetativa. O material péctico, anteriormente presente entre a endexina, foi totalmente compactado. H. Célula generativa no interior da célula vegetativa e a formação do "cordão citoplasmático" que une a primeira à esporoderme. Os grãos de amido desapareceram e numerosos plastídios circulam o núcleo vegetativo. I. Gametófito com unidade germinativa masculina central. A esporoderme está completa e estratificada em uma primexina (pr), que permanece entre as báculas, ectexina (ect), endexina (end), medina (me), mais espessa na região equatorial dos colpos e intina (não visualizada neste desenho). J. O mesmo que em I (neste a unidade germinativa masculina está seccionada transversalmente). Repare na diminuição da espessura da ectexina e endexina na região equatorial do colpo.

Escala: 20  $\mu$ m.

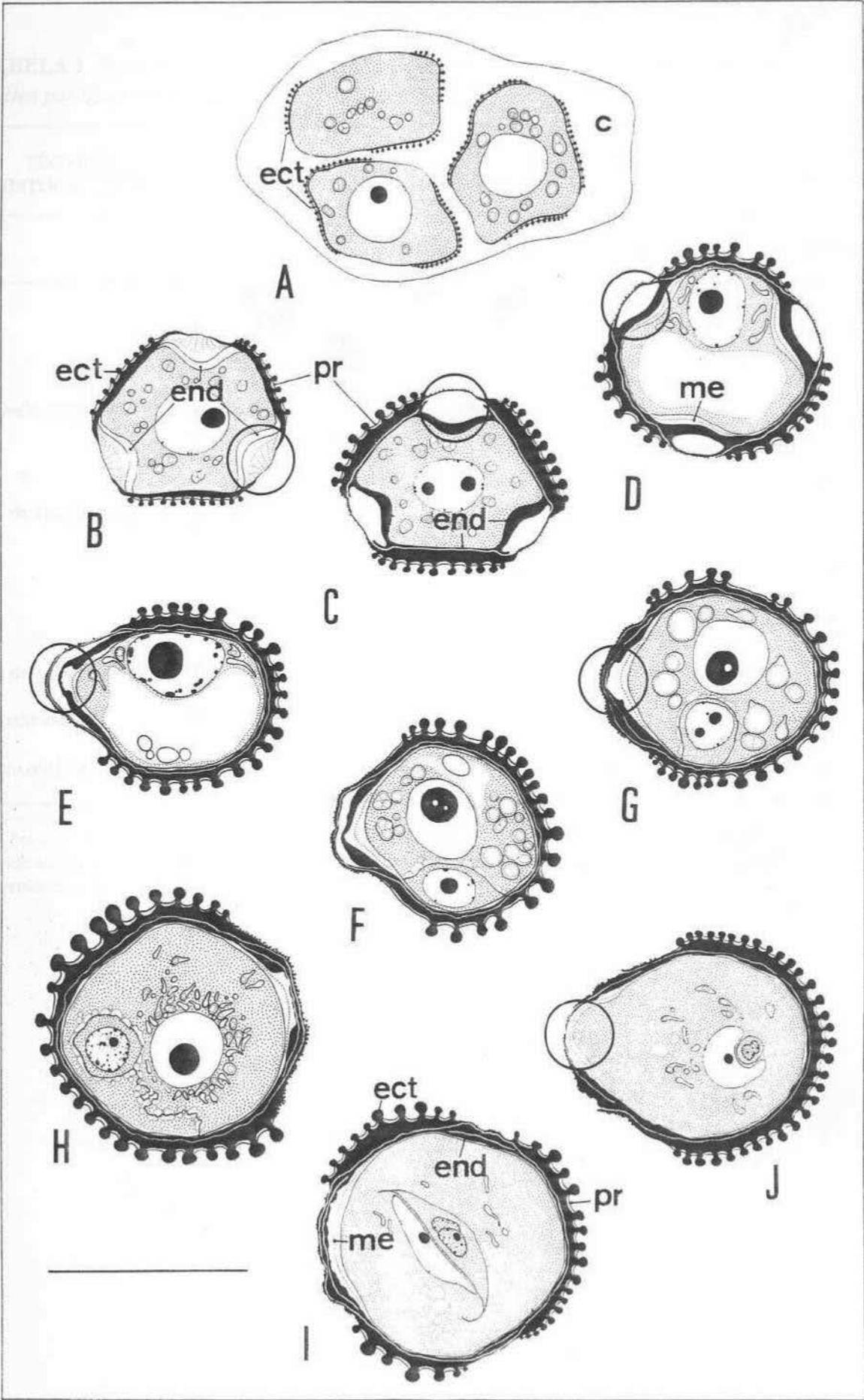


TABELA I. Reação dos estratos da esporoderme (em secção) de grãos de pólen maduros de *Ilex paraguariensis* a diferentes técnicas histoquímicas.

TÉCNICA HISTOQUÍMICA	ESPECIFICIDADE	ESTRATOS DA ESPORODERME				
		Intina	Medina	Endexina	Ectexina	Primexina
PAS	Polissacarídeos insolúveis com grupos hidroxil livres.	-	+	-	-	+
Vermelho de Rutênio.	Polissacarídeos ácidos (ácido péctico).	-	+	-	-	+
Azul de Toluidina pH 4.0.	Grupos ácidos polianiônicos: azul; lignina e compostos fenólicos: verde; ácidos pécticos: vermelho ou púrpura.	-	+ púrpura	+ verde escuro	+ verde claro	+ púrpura
Azul de Anilina 0.005% .	Esporopolenina <sup>1</sup>	-	-	+	+	-
Floroglucinol.	Lignina.	-	-	-	-	-
Coomassie blue.	Proteínas.	-	-	-	-	+

<sup>1</sup> A "especificidade" do Azul de Anilina 0.005% ( BHANDARI *et alii*, 1971 ) trata-se, na verdade, de uma grande afinidade do corante com a esporopolenina, que mantêm-se corada após a lavagem com os diferentes solventes empregados na técnica.

**TABELA II .** Medidas dos eixos polar e equatorial, espessura da nexina e diâmetro das ornamentações (sexina) dos grãos de pólen de *Ilex paraguariensis* (fixados em glutaraldeído 2%) comparados com as realizadas por ERDTMAN (1952), para o gênero *Ilex* e por MARTIN (1977), para *I. paraguariensis*, a partir de grãos de pólen acetolizados. Medidas em  $\mu\text{m}$  e médias entre parênteses (10 medições realizadas).

	EIXO POLAR	EIXO EQUATORIAL	ESPESSURA DA NEXINA (mín - máx)	DIÂMETRO DAS ORNAMENTAÇÕES DA SEXINA (mín - máx)
<b>Fixados em glutaraldeído 2%</b>	24,3 (25,4) 26,9	23,3 (27,2) 29,7	0,86 - 1,26	0,66 - 2,47
<b>Segundo ERDTMAN (1952)</b>	30 - 40	-	-	-
<b>Segundo MARTIN (1977)</b>	25 (28,8) 37	27 (29,0) 31	0,5 - 1	0,5 - 2,5

## 7. BIBLIOGRAFIA

- BARRET, R.E. 1962. *Embryogeny of Ilex opaca Ait.* Ph. D. Dissertation, New Brunswick, Rutgers Univ.
- BATTAGLIA, F. 1982. Embryological questions: 4. Gynogonium versus Archegonium and the generalization of the prefixes andro- and gyno- in plant reproduction. *Ann. Bot. (Roma)*,40:1-7.
- BHANDARI, N.N & KISHORI,R. 1971. Übisch granules on tapetal membranes in anthers; rapid selective staining by spirit blue. *Stain Tech.*,46(1):15-17.
- BHANDARI, N.N.1984. The Microsporangium. In: Johri,B.M. (ed). *Embryology of Angiosperms.* Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, pp 53-121.
- BISSING, D.R.1974. Haupt's gelatin adesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain Tech.*,49(2):116-7.
- BREWBAKER, J.L.1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the Angiosperms. *Am.J.Bot.*,54(9):1069-1083.
- COPELAND, H.F.1963. Strutural notes on hollies (*Ilex aquifolium* and *I. cornuta*, family Aquifoliaceae). *Phytomorphology*, 13:455-464.
- CURRIER, H.B.1957.Callose substance in plant cells. *Am.J.Bot.*,44:478-88.
- D'AMATO, F. 1984. Role of Polyploidy in Reproductive Organs and Tissues. In: JOHRI, B.M (ed). *Embryology of Angiosperms.* Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, pp 519-566.
- DAVIS, G.L. 1966. *Sistematic Embryology of the Angiosperms.* New York, John Wiley & Sons, 528p.

- ERDTMAN, G. 1952. *Pollen Morphology and Plant Taxonomy: Angiosperms*. Waltham, The Chronica Botanica Co., 539p.
- FÆGRI, K; KALAND, P.E. & KRZYWINSKI, K. 1989. *Textbook of Pollen Analysis*. IV edição. Chichester, John Wiley & Sons.
- FERREIRA, A.G. & HU,C.Y. 1984. Influência da luz na embriogênese tardia de *Ilex*-culturas "in vitro". CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 34. Porto Alegre, 1984. *Anais...*; Comunicações. Porto Alegre, Sociedade Botânica do Brasil. p. 441-449.
- GERLACH, D. 1977. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart, Georg-Thienne Verlag. 314p.
- GIBERTI, C. G. 1979. Las espécies argentinas del género *Ilex* L. (Aquifoliaceae). *Darwiniana*, 22(1-3): 217-40.
- HERR, J.M. 1959. The development of the ovule and megagametophyte in the genus *Ilex* L. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* 75.
- HERR, J.M. 1961. The development and associated ovulo modifications in the genus *Ilex* L. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* 75.
- HERR, J.M. 1984. Embryology and Taxonomy. In: Johri, B.M. (ed). 1984. *Embryology of Angiosperms*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, pp 645-96.
- HESLOP-HARRISON, J. 1968. Pollen-wall development. *Science*, 161:230-237.
- HESLOP-HARRISON, J. 1976. A new look at pollination. In: Maidstone, K. (ed). 1975. *Rep. E. Malling Res. Stn for 1975*. pp 141-157.
- HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. 1991. Structural and functional variation in pollen intines. In: BLACKMORE, S. e BARNES, S. H. (Eds.). *Pollen and Spores. Patterns of Diversification*. Oxford, Oxford

University Press, pp.331-43.

- HEUSER, E.D.1990. *Ilex paraguariensis* St.Hil.:Endosperma e Embrião durante a Embriogênese Tardia. Dissertação de Mestrado, Pós Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração Botânica, UFRGS.
- HOFMEISTER, W. 1851 (1862). On the germination, development and fructification of higher Cryptogamia and on the fructification of Coniferae (English translation by F. Curry from the 1851 german edition). London.
- HU,C.Y.1975. "In vitro" culture of rudimentary embryos of eleven *Ilex* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100:221-25.
- JENSEN, W.A.1962. *Botanical Histochemistry - Principles and Practice*. San Francisco, W. H. Freeman and Company. 408p.
- JOHANSEN,D.A.1940. *Plant Microtechnique*. New York, McGraw-Hill. 523p.
- JOHRI,B.M; AMBEGAOKAR,K.B.; SRIVASTAVA,P.S. 1992. *Comparative Embryology of Angiosperms*. Vol. 1. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. 614p.
- KEIJZER,C.J.1987a.The processes of anther dehiscence and pollen dispersal. I. The opening mechanism of longitudinally dehiscing anthers. *New Phytol.*,105:487-98.
- KEIJZER,C.J.1987b. The processes of anther dehiscence and pollen dispersal. II. The formation and the transfer mechanism of pollenkitt, cell-wall development of the loculus tissues and a function of orbicules in pollen dispersal. *New Phytol.*,105:499-507.
- KNOX,R.B. 1984. The Pollen Grain. In: JOHRI, B.M.(ed). *Embryology of*

- Angiosperms. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. pp197-271.
- KNOX, R.B. & DUCKER, S.C. 1991. The evolution of gametes-from motility to double fertilization. In: BLACKMORE, S. e BARNES, S.H. (eds.). *Pollen and Spores: patterns of diversification*. Oxford, Oxford University Press, pp.345 -61.
- MAHESHWARI,P.1950. *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*. New York, McGraw-Hill. 453p.
- MARTIN,F.W.1959.Staining and observing pollen tubes in style by means of fluorescence.*Stain Tech.*,34:12.
- MARTIN, H.A. 1977. The History of *Ilex* (Aquifoliaceae) with Special Reference to Australia: Evidence from Pollen. *Austr.J.Bot.*, 25(6):655-673.
- MASCARENHAS,J.P.1975. The Biochemistry of Angiosperm Pollen Development. *Bot. Rev.*,41(3):259-314.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. *Anatomy of the Dicotyledons. Volume I*. Oxford, Clarendon Press, 276p.
- O'BRIEN,T.P. & McCULLY,M.E.1981. *The Study of Plant Structure.Principles and Selected Methods*. Melbourne, Termarcarphi Pty Ltd.345p.
- PEI-HUA,T. 1988. Interaction of Vegetative Nucleus and Generative Cell (Then Sperms). In: CRESTI,M; GORI,P and PACINI,E. (ed). *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. pp227-232.
- PERIASAMY, K. & SWAMI, G.L. 1964. Is the Microsporangium of Angiosperms Wall-Less ? *Curr. Sci.*,33:735-738.
- PERIASAMY, K. & SWAMI, G.L. 1966. Morphology of the Anther Tapetum of Angiosperms. *Curr. Sci.*, 35:427-430.

- RUSCHE, M.L. & MOGENSEN, H.L. 1988. The Male Germ Unit of Zea Mays: Quantitative Ultrastructure and Three-Dimensional Analysis. In: CRESTI, M.; GORI, P. and PACINI, E. (ed). *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. pp221-226.
- RUSSELL, S.D. & CASS, D.D. 1981. Ultrastructure of the Sperms of *Plumbago zeylanica*. 1. Cytology and Association with the Vegetative Nucleus. *Protoplasma*, 107:85-107.
- RUTISHAUSER, A. 1969. *Introducción a la embriología y biología de la reproducción de las angiospermas*. Buenos Aires, Editora Hemisferio Sur S.A. 185p.
- SAAD, S.I. 1963. Sporoderm Stratification: The "Medine", a distinct third layer in the pollen wall. *Pollen Spores*, 5:17-39.
- SCHOENBERG, M.M & DINOUTTI, L.A. 1989. Ontogênese do fruto de *Ilex paraguariensis* St. Hil. I - Morfologia Externa e Interna da Flor. *Est. Biol.*, 22:5-35.
- SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. *J. Histochem Cytochem*, 21: 73-80.
- STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. 1974. *Pollen: biology, biochemistry and management*. Heidelberg, Springer-Verlag. 307p.
- STEFFEN, K. 1963. Male Gametophyte. In: MAHESHWARI, P. (ed). *Recent advances in the embryology of Angiosperms*. Univ. Delhi, Int. Soc. Plant Morphol. pp 15-40.
- UFFELEN, G.A. 1991. The control of spore wall formation. In: BLACHMORE, S & BARNES, S.H (eds.). *Pollen and Spores: patterns of diversification*. 1991. Oxford, Oxford University Press, pp.89-102.