

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

**“ONTOGÊNESE FLORAL, ESPORO E GAMETOGÊNESE EM ANTERAS DE
AESCHYNOMENE FALCATA (POIR.) DC. E *AESCHYNOMENE SENSITIVA* SW.
(PAPILIONOIDEAE - LEGUMINOSAE)”**

DIANA SALLES SAMPAIO

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Porto Alegre, julho de 2005

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

**“ONTOGÊNESE FLORAL, ESPORO E GAMETOGÊNESE EM ANTERAS DE
AESCHYNOMENE FALCATA (POIR.) DC. E *AESCHYNOMENE SENSITIVA* SW.
(PAPILIONOIDEAE - LEGUMINOSAE)”**

DIANA SALLES SAMPAIO

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências-Botânica.

Porto Alegre, julho de 2005

A todos que me estimularam a participar deste desafio que me fez crescer profissional e espiritualmente.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de pesquisa concedida, sem a qual esta dissertação não seria viável.

À PROPESQ, que me concedeu auxílio para participação em evento.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, pela simpatia dos funcionários e acessibilidade aos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath, meu orientador, que ajudou nos momentos difíceis e sempre acreditou em minha capacidade de trabalho.

À Maria Cecília de Chiara Moço, por ser esta pessoa generosa, que me inspirou e ajudou muito em meu trabalho e sem a qual eu não estaria em Porto Alegre.

À Maria de Lourdes Abruzzi Aragão de Oliveira, da Fundação Zoobotânica, pela simpatia, ajuda na escolha e na coleta das espécies estudadas.

À Maria Eugênia Costa e Nelson Sabino Bittencourt Jr. pela amizade, confiança e constante estímulo.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS, que foram sempre acessíveis, pelos ensinamentos e estímulo.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFRGS pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar e trocar experiências.

À Ana Cristina Mazzocato, grande amiga, pelas horas de conversa, por estar sempre por perto e pelos “bolinhos da mãe”.

Ao amigo Adriano Silvério, pela alegria que trouxe ao nosso laboratório e pelos momentos de descontração.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pelo companheirismo durante o curso.

Aos amigos Luiz Guilherme e Aline de Chiara umas das primeiras pessoas que conheci em Porto Alegre e a todos os amigos que fiz nesta cidade.

À Carolina Simon Gutstein, amiga inestimável que conheci aqui e espero conservar pela vida a fora.

Ao motorista, Jorge, que nos acompanhou nas saídas de campo.

Aos amigos de BH que fizeram parte da minha formação para que eu chegasse até aqui.

A minha mãe, que sempre me estimulou a correr atrás de meus sonhos.

Aos meus avós, Pedro Paulo e Adelina, pessoas tão queridas que sempre confiaram em mim e me deram seu amor incondicional.

A minha família –Zezeca, Vicente, Ariane, Pedrinho, Eliene, Helvécio, Daysi, Ian, –
que eu adoro e cujo amor e carinho me dão base para evoluir.

Ao meu namorado, Eros, por estar ao meu lado apesar da distância e se privar da
minha companhia durante o último ano.

Aos dias lindos de Porto Alegre.....

PREFÁCIO

A presente Dissertação de Mestrado é apresentada em forma de Capítulos, opção que facilita o posterior processo de publicação do trabalho. Entretanto, os Capítulos de resultados não seguiram as exigências de formatação de cada periódico científico para os quais pretendemos enviar os artigos, permitindo, assim, que esta obra tenha um corpo único, tanto na sua formatação quanto na língua utilizada. Salientamos ainda, aos leitores, que não esperem encontrar artigos científicos concisos nos Capítulos referentes aos resultados, pois consideramos o trabalho de Pós-Graduação como uma oportunidade de explorar de forma abrangente os dados obtidos, usualmente sintetizados durante o processo de publicação.

O Primeiro Capítulo consiste em uma introdução geral ao tema, onde considerações taxonômicas do grupo, importância econômica das espécies e de trabalhos embriológicos justificam a realização do presente estudo. O Segundo Capítulo apresenta resultados referentes ao estudo comparativo da ontogênese floral de *Aeschynomene falcata* e *Aeschynomene sensitiva*, utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura. O Terceiro Capítulo apresenta resultados referentes à organogênese floral das duas espécies, enfatizando o desenvolvimento posterior dos estames através de análises de Microscopia Óptica. O Quarto Capítulo apresenta a esporo e gametogênese em anteras de *A. falcata* e *A. sensitiva* e sua relação com o “timing” de desenvolvimento dos estratos parietais da antera e de formação da esporoderme. O Quinto Capítulo é um fechamento da Dissertação, onde as conclusões mais relevantes de cada Capítulo são salientadas e relacionadas com a problemática do trabalho sugerida na introdução geral.

RESUMO

O presente trabalho analisou a ontogênese floral, microsporogênese e microgametogênese de *Aeschynomene falcata* (Poir.) DC. e *Aeschynomene sensitiva* Sw. (Papilionoideae - Leguminosae) obtendo evidências morfológicas e anatômicas de importância relevante para a taxonomia do grupo. *A. falcata* apresenta uma inflorescência do tipo racemo de segunda ordem e *A. sensitiva*, racemo de terceira ordem. A iniciação dos órgãos florais de *A. falcata* se dá numa ordem acrópeta e unidirecional abaxial e o cálice apresenta um tubo com 5 dentes; em *A. sensitiva* o cálice tem uma ordem de iniciação unidirecional abaxial tendendo a simultânea, bilobado desde os estádios iniciais, a corola tem iniciação assimétrica e é sobreposta pela iniciação dos estames antesépalos e os dois verticilos de estames possuem iniciação unidirecional abaxial. Para o estudo da organogênese floral admitiu-se a presença de 3 camadas germinativas: CI (dérmica), CII (subdérmica) e CIII (central). As duas espécies apresentam a iniciação dos órgãos florais nas mesmas camadas histogênicas, com contribuição predominante da CII, exceto na iniciação dos estames. A maior parte do microsporângio é formado através de divisões na CII e o desenvolvimento dos estratos parietais da antera é do tipo Dicotiledôneo. As células que compõe o tapete interno, originadas também da CII, vêm de uma linhagem diferente da principal, que origina as células esporogênicas primárias. Na maturidade, as anteras do gênero *Aeschynomene* apresentam cinco estratos parietais, epiderme, endotécio, duas camadas médias e tapete; durante a deiscência, apenas epiderme e endotécio estão presentes. A meiose é sincrônica em um mesmo microsporângio e as tétrades são tetraédricas. A formação da esporoderme é iniciada ainda na tétrade, mas atinge seu máximo desenvolvimento durante a fase de esporos livres, antes da primeira divisão mitótica do microgametófito. A primeira mitose do gametófito é assimétrica, com leve assincronia entre os gametófitos de um mesmo microsporângio originando a célula vegetativa e a célula generativa, esta de posição central e formato alongado na maturidade do grão de pólen. As células tapetais apresentam reação negativa para a presença de celulose até completada a primeira divisão mitótica do pólen e o início da degradação do citoplasma e núcleo tapetais, quando passam a apresentar reação positiva para a presença de celulose, a qual é mantida até a degeneração total do tapete. Os grãos de pólen são dispersos no estádio bicelular com reserva de amido. Em ambas espécies, os grãos de pólen são tricolporados, com sexina reticulada e o eixo polar é maior que o equatorial. Os grãos de *A. falcata* são maiores que os de *A. sensitiva* e o opérculo está presente apenas em *A. sensitiva*.

ABSTRACT

The present work analysed the floral ontogenesis, microsporogenesis and microgametogenesis in *Aeschynomene falcata* (Poir.) DC. and *Aeschynomene sensitiva* Sw. (Papilionoideae - Leguminosae) obtaining morphological and anatomical evidences important for the group taxonomy. *A. falcata* presents a second order raceme while *A. sensitiva* a third order one. The floral organ initiation in *A. falcata* occurs in an acropetal and unidirectional order from the abaxial to adaxial side, and calyx presents a 5 tooth tube; in *A. sensitiva* the calyx have an unidirectional organ initiation order, from the abaxial to adaxial side tending to a simultaneous order, bilobate since initial stages, the corolla have an asymmetrical organ initiation and is superposed by the anti-sepal stamens verticil initiation and the two verticils of stamens have an unidirectional order of initiation. For the floral organogenesis analysis was accepted the presence of 3 germinative layers: LI (dermal), LII (subdermal) and LIII (central). The two species presents each floral organ initiation in the same histogenic layer, with predominance of LII, except on stamens initiation. LII divisions originate the microsporangium and the development of anther parietal layers follows the Dicotyledoneous type. The cells of the inner tapetum originated from the same layer have a different cellular lineage from that gives origin of the primary sporogenous cells. At maturity, the anthers of *Aeschynomene* genus presents five parietal layers: epidermis, endothecium, two middle layers, and tapetum; during the dehiscence stage just epidermis and endothecium are present. The meiosis is synchronous in the same microsporangium due the presence of the cytomic channels and the tetrad is tetrahedral. The sporoderm formation starts at tetrad, reaching its maximal development at free spores stage, before microgametophyte first division. The first mitosis is asymmetrical and occurs with a slight asynchrony between the gametophytes of a same microsporangium, given rise the vegetative and germinative cells, the last one with central position and stretch out at maturity of the pollen grain. The tapetum cells presents a cellulose negative reaction up the end of pollen first mitosis and the beginning of tapetum cytoplasm and nucleus degradation, when undergoes a cellulose positive reaction, that is maintained up the total tapetum degeneration. The pollen grains are released in the bicellular stage with starch reserve. In both species the pollen grains are tricolporate, with a reticulate sexine, and with the polar axis larger than the equatorial axis. *A. falcata* pollen grains are bigger than *A. sensitiva* ones and operculum is present just in *A. sensitiva*.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iii
Prefácio	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Capítulo I: Introdução Geral	1
1) A Tribo Aeschynomeneae na Família Leguminosae	2
2) O gênero <i>Aeschynomene</i>	3
3) As Espécies em Estudo	5
4) Embriologia	9
5) Objetivos	10
6) Referências Bibliográficas	11
Capítulo II: Desenvolvimento Floral Comparativo de <i>Aeschynomene falcata</i> (Poir.) DC. e <i>Aeschynomene sensitiva</i> Sw. (Papilionoideae - Leguminosae)	16
Resumo	17
1) Introdução	18
2) Material e Métodos	19
3) Resultados	20
3.1) <i>Aeschynomene falcata</i>	20
3.2) <i>Aeschynomene sensitiva</i>	24
Estampas	28
4) Discussão	46
5) Referências Bibliográficas	56
Capítulo III: Organogênese Floral de <i>Aeschynomene falcata</i> (Poir.) DC. e <i>Aeschynomene sensitiva</i> Sw. (Papilionoideae - Leguminosae): Ênfase no Desenvolvimento do primórdio estaminal	60
Resumo	61
1) Introdução	62
2) Material e Métodos	63
3) Resultados	63
3.1) <i>Aeschynomene falcata</i>	63
3.2) <i>Aeschynomene sensitiva</i>	66
Estampas	71

4) Discussão	92
5) Referências Bibliográficas	100
Capítulo IV: Microsporogênese e Microgametogênese de <i>Aeschynomene falcata</i> (Poir.) DC. e <i>Aeschynomene sensitiva</i> Sw. (Papilionoideae - Leguminosae)	105
Resumo	106
1) Introdução	107
2) Material e Métodos	108
3) Resultados	109
3.1) Microsporogênese	109
3.2) Microgametogênese	112
3.3) Tabelas: Comprimento dos Estames X Desenvolvimento da Antera	115
Estampas	117
4) Discussão	134
4.1) Microsporogênese	134
4.2) Microgametogênese	136
4.3) Esporoderme	138
4.4) Estratos Parietais	142
4.4.1) Epiderme	143
4.4.2) Endotécio	143
4.4.3) Camadas Médias	144
4.4.4) Tapete	144
4.5) Grão de Pólen Maduro	148
5) Referências Bibliográficas	151
Capítulo V: Discussão Geral e Considerações Finais	160
Referências Bibliográficas	164

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

“A meta da vida
É fazer com que seu ritmo cardíaco
Ajuste-se ao ritmo do universo,
Ajuste sua natureza à Natureza.”

Joseph Campbell (Reflexões Sobre a Arte de Viver)

1 - A Tribo Aeschynomeneae na Família Leguminosae

A família Leguminosae é uma das maiores famílias dentre as plantas com flores, com cerca de 650 gêneros e 18000 espécies (Polhill *et al.*, 1981). A divisão adotada por Polhill *et al.* (1981) nas três subfamílias distintas: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae, não é aceita por análises cladísticas baseadas em aspectos morfológicos, que sugerem que Caesalpinioideae seja um grupo artificial (Chappill, 1995). Em estudos filogenéticos envolvendo o gene plastidial *rbcL* foi confirmada a naturalidade da família Leguminosae e das subfamílias Papilionoideae e Mimosoideae, sendo Caesalpinioideae considerada polifilética (Kass & Wink, 1996; Doyle *et al.*, 1997). Apesar dos dados que demonstram a inconsistência de Caesalpinioideae, optou-se por utilizar a divisão em três subfamílias distintas, devido à confirmada monofilia de Papilionoideae e ao aspecto didático deste tratamento.

A palavra “aeschynomene” (do grego vergonhoso) foi usada inicialmente como denominação geral apropriada às plantas sensitivas, o termo foi aproveitado por Linneaus para designar validamente o gênero *Aeschynomene* da subfamília Papilionoideae, cujas plantas apresentam acentuado grau de respostas por sua natural sensibilidade (Fernandes, 1996). O gênero *Aeschynomene* foi inicialmente inserido na tribo Hedysareae, sub-tribo Euhedysareae ao lado de mais duas sub-tribos, Coronilleae e Alhageae (De Candolle, 1825). A tribo recebeu este nome devido aos característicos “legumes transversalmente articulados” (Linnaeus, 1753). Posteriormente, Bentham (1865) dividiu a tribo em seis sub-tribos: Coronilleae, Euhedysareae, Aeschynomeneae, Adesmieae, Stylosantheae e Desmodieae e mencionou que Hedysareae seria um grupo artificial. Burkart (1939) também mencionou que a tribo seria polifilética, derivada de várias outras, e fez uma nova ordenação das sub-tribos: Patagoninae, Coronilleae, Discolobinae, Aeschynomeninae, Desmodinae, Poiretinae e Stylosanthinae. Hutchinson (1964) substituiu a tribo Hedysareae por sete novas tribos: Coronilleae, Hedysareae, Aeschynomeneae, Adesmieae, Stylosantheae, Desmodieae, Lespedezeae, sendo um grande passo na taxonomia do grupo. Ohashi (1971) aceita a classificação adotada por Hutchinson e contagens de cromossomos corroboram a retirada da subtribo Aeschynomeninae de Hedysareae (Goldblat, 1981; Vanni, 1983). A tribo Aeschynomeneae, apontada como artificial por dados morfológicos (Chappill, 1995) e moleculares (Doyle *et al.*, 1997; Lavin *et al.*, 2001) parece ser um novo desafio para a sistemática de Leguminosae. A atual classificação da tribo foi apresentada por Rudd (1981), quando a dividiu em 5 sub-tribos: Ormocarpinae, Aeschynomeninae, Discolobiinae, Poiretiinae e Stylosanthinae.

A tribo Aeschynomeneae foi considerada próxima de Adesmieae através de análises de caracteres morfológicos e biogeográficos (Polhill, 1981; Polhill *et al.*, 1981; Chappill, 1995). Esta proximidade foi reforçada por Corby (1981) através da análise de nódulos radiculares que passaram a ser considerados de valor taxonômico no nível de tribo. Um estudo filogenético utilizando dados do sequenciamento do gene plastidial *rbcL* evidenciou um grupo de tribos tropicais do novo mundo que agrupa Aeschynomeneae e Adesmieae com alguns gêneros de Dalbergieae (Doyle *et al.*, 1997). Contagens de cromossomos ainda demonstram que elevados números cromossômicos basais (n=10, 11, 12) são característicos dos principais grupos tropicais, onde são incluídas Aeschynomeneae e Dalbergieae, enquanto os grupos temperados têm números basais menores (n=6, 7, 8) (Goldblat, 1981; Vanni, 1983). A tribo Amorphae também é colocada como parte das tribos tropicais do novo mundo, embora não compartilhe alguns caracteres morfológicos com as demais (Polhill, 1981; Polhill *et al.*, 1981; Doyle *et al.*, 1997). Lavin e colaboradores (2001), estimulados pelos trabalhos de Corby (1981), Chappill (1995) e Doyle *et al.* (1997), dentre outros, realizaram um estudo mais detalhado das tribos acima citadas. Eles verificaram, através de análises de dados moleculares combinados a dados não-moleculares, a existência de um clado monofilético bem sustentado denominado “clado Dalbergia”, sendo constituído pelas tribos Aeschynomeneae, Adesmieae, Dalbergieae (exceto alguns gêneros) e Desmodieae (subtribo Bryinae), onde a tribo Amorphae foi utilizada como grupo irmão. O “clado Dalbergia” tem como uma sinapomorfia marcante a presença de nódulos radiculares do tipo aeschynomenóides, os quais têm o processo de infecção através de um pequeno ferimento onde emergem as raízes laterais (Lavin *et al.*, 2001). O reconhecimento formal deste grupo representaria o principal rearranjo dentre as Papilionoideae (Lavin *et al.*, 2001).

2 - O Gênero *Aeschynomene*

A sub-tribo Aeschynomeninae compreende 8 gêneros: *Aeschynomene*, *Soemmeringia*, *Kotschya*, *Smithia*, *Geissaspis*, *Bryaspis*, *Humularia* e *Cyclocarpa* (Rudd, 1981). O gênero *Aeschynomene* L. ocorre, predominantemente, nas regiões tropicais e de um total aproximado de 160 espécies até então descritas para o mundo (América, África e Ásia) (Figura 1), 84 distribuem-se pelos continentes americanos, existindo, aproximadamente, 52 espécies brasileiras (Fernandes, 1996). *Aeschynomene* é o único gênero da sub-tribo ocorrente no Estado do Rio Grande do Sul, onde é representado por 9 espécies: *Aeschynomene histrix* (com duas variedades - var. *histrix* e var. *incana*), *Aeschynomene falcata*, *Aeschynomene elegans*,

Aeschynomene montevidensis, *Aeschynomene denticulata*, *Aeschynomene fructipendula*, *Aeschynomene selloi*, *Aeschynomene sensitiva* e *Aeschynomene indica* (Oliveira, 2002). Dentre elas, aquelas de maior ocorrência no estado são *A. falcata* e *A. elegans*, espécies herbáceas e de ambiente campestre, e *A. denticulata* e *A. sensitiva*, espécies subarborescentes e de ambiente úmido (banhados) (Oliveira, comunicação pessoal).

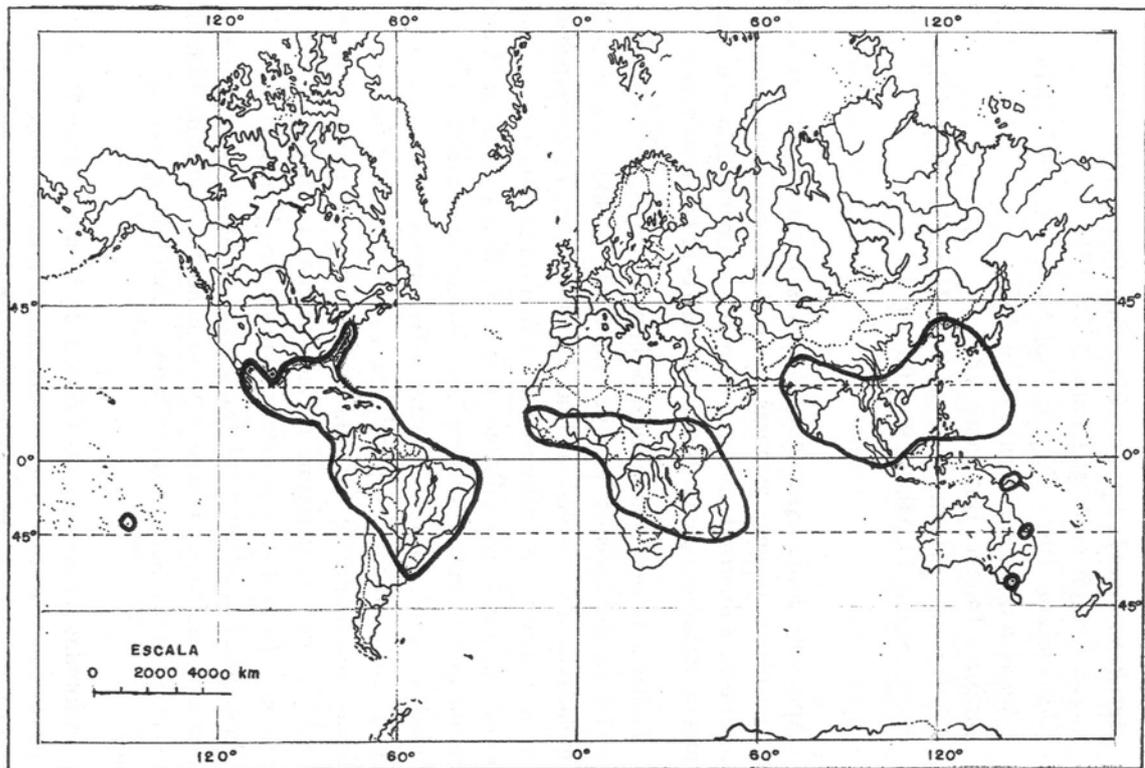


Figura 1: Distribuição do gênero *Aeschynomene* (retirado de Rudd, 1955).

O gênero *Aeschynomene* é constituído por duas secções *Aeschynomene* e *Ochopodium* Rudd (1955). A secção *Aeschynomene* possui cinco séries (*Americanae*, *Fluminensis*, *Montevidensis*, *Sensitivae*, e *Indicae*) com espécies de estípulas peltadas, apendiculadas abaixo do ponto de inserção, cálice bilabiado e frutos com artículos totalmente unidos por septos transversais (Fernandes, 1996). A secção *Ochopodium*, por sua vez, inclui quatro séries (*Viscidulae*, *Pleuronervae*, *Scopariae* e *Sclerosae*), sendo a série *Sclerosae* acrescentada recentemente por Fernandes (1996) para incorporar as espécies brasileiras cujas características vegetativas fogem ao padrão geral do grupo. A secção *Ochopodium* possui espécies cujas estípulas não se prolongam abaixo da inserção, apresentam cálice campanulado com 5 lobos e frutos membranáceos com artículos geralmente separados por istmos (Fernandes, 1996).

Estudos em sistemática molecular indicam que o gênero *Aeschynomene* não é monofilético ocorrendo uma possível separação entre as secções (Lavin *et al.*, 2001). A secção *Ochopodium* encontra-se mais próxima dos gêneros *Dalbergia* e *Machaerium* da tribo Dalbergieae e a secção *Aeschynomene* encontra-se junto aos outros gêneros da subtribo Aeschynomeninae, os quais também possuem estípulas peltadas e cálice bilabiado (Lavin *et al.*, 2001). Esta questão é fundamental para este trabalho, visto que os dados aqui obtidos poderão corroborar ou não os dados moleculares acima mencionados.

Aproximadamente metade das espécies do gênero são hidrófitas e as outras xerófitas (Bishop *et al.*, 1988). Acreditava-se que as espécies de *Aeschynomene* possuíam um pequeno valor agrônomico até surgirem informações sobre seu uso como forrageira (Kretschmer Jr. & Bullock, 1980), no plantio misto com gramíneas e como adubo verde. É interessante ressaltar que as importâncias econômicas do gênero são discutidas no exterior, mas no Brasil não existem estudos na área. A ampla diversidade inter e intraespecífica de *Aeschynomene* pode prover mais cultivares úteis em pastagens adaptadas a altas e baixas taxas de pluviosidade, alagamentos sazonais, sítios pantanosos e a pastoreio intensivo (Bishop *et al.*, 1988). Leguminosas tropicais são comumente introduzidas em pastagens cultivadas no norte da Austrália para aumentar a quantidade de nitrogênio disponível no solo e a estabilidade das mesmas. A maioria das espécies de Leguminosae associa-se a bactérias simbióticas que fixam o nitrogênio atmosférico e, por isso, tem uma alta concentração de proteínas e um alto valor alimentar; podendo ser associadas a pastagens de gramíneas se a taxa de nitrogênio no solo for baixa (Schwenke & Kerridge, 2000). Um componente de Leguminosae em pastagens de gramíneas ainda pode prover uma digestibilidade mais fácil da mistura de forragem e promover um aumento na massa seca ingerida, permitindo assim uma melhor performance do animal (Thro *et al.*, 1987).

3 - As Espécies em Estudo

No presente trabalho optou-se por estudar uma espécie da secção *Aeschynomene*, série *Sensitivae* – *A. sensitiva* (espécie tipo para a série)– e outra da secção *Ochopodium*, série *Viscidulae* – *A. falcata* (espécie tipo para a secção).

A série *Sensitivae* compreende de ervas até arbustos eretos, com tendência a se tornarem nigrescentes, estípulas peltadas caducas, inflorescências com poucas flores, racemosas ou axilares, cálice bilabiado e fruto cinza escuro ou nigrescente, principalmente

quando maduro. Suas quatro espécies ocorrem em terrenos úmidos, pantanosos ou brejosos e é largamente espalhada pela América Central e do Sul (Fernandes, 1996).

A. sensitiva é um arbusto de até 4 metros de altura, densamente hispiduloso, glabro nas partes inferiores, com 20 a 40 folíolos oblongos, inflorescência hispidulosa, fruto com 4-12 artículos e estipe de 4-8mm (Fernandes, 1996). Tem distribuição nas Antilhas, Argentina, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Guatemala, Haiti, Honduras, Honduras Britânicas, Guiana Francesa, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Lesser (Antilhas), Suriname, Tobago, Trindad, Venezuela (Fernandes, 1996) e Bolívia (Oliveira, 2002). No Brasil, está presente nos Estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Roraima (Fernandes, 1996), Paraná e Santa Catarina (Oliveira, 2002) (Figura 2) e já foi encontrada em até 1550 metros de altitude (Kretschmer Jr. & Bullock, 1980).

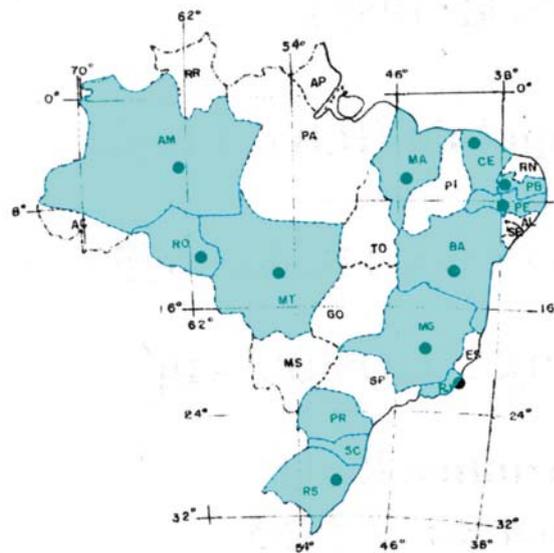


Figura 2: Distribuição de *A. sensitiva* no Brasil (modificado de Fernandes, 1996).

Os nódulos caulinares de *A. sensitiva* possuem bactérias simbiotes fotossintetizantes, o que pode limitar a demanda das bactérias por fotossintatos da planta e promover seu crescimento (Giraud *et al.*, 2000). Esta espécie foi considerada persistente (Kretschmer Jr. & Bullock, 1980), sendo capaz de sobreviver em ambientes alagados o que pode torná-la útil como adubo verde de campos de arroz no Rio Grande do Sul. *Aeschynomene afraspera* e *Aeschynomene nilotica*, que crescem nos solos alagados do Senegal, são consideradas capazes de serem utilizadas como adubo verde, que além de fornecer nitrogênio para as culturas de

arroz, provêm um importante acréscimo de matéria orgânica, o que pode significar uma melhoria significativa para a estrutura dos solos de baixa fertilidade (Alazard & Becker, 1987).

A série *Viscidulae* é composta por ervas prostradas ou sub-eretas, algumas vezes subarbustos, estípulas não-peltadas, com flores relativamente pequenas. Este grupo inclui espécies herbáceas perenes, essencialmente mesófilas, algumas, entretanto, preferem áreas praianas úmidas ou encostas de morros rochosos, outras, por sua vez, vegetam nas formações arbustivas abertas, em terrenos arenosos ou mesmo campos de pastagens (Fernandes, 1996).

A. falcata é descrita como uma erva prostrada segundo Wilson (1980) e como um subarbusto decumbente com cerca de 60cm de comprimento segundo Fernandes (1996), pubescente e, algumas vezes, hispídulo, estípulas lanceoladas, acuminadas, folhas com 5 a 9 folíolos oboval-elípticos, inflorescência com uma a duas flores, maior que a folha de inserção, fruto falcado com 6 a 8 artículos pubescentes e estipe de 6-14mm (Fernandes, 1996). Sua distribuição se dá na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia e Paraguai. No Brasil ocorre nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Fernandes, 1996) (Figura 3). *A. falcata* ocorre até 1800 metros de altitude (Kretschmer Jr. & Bullock, 1980).

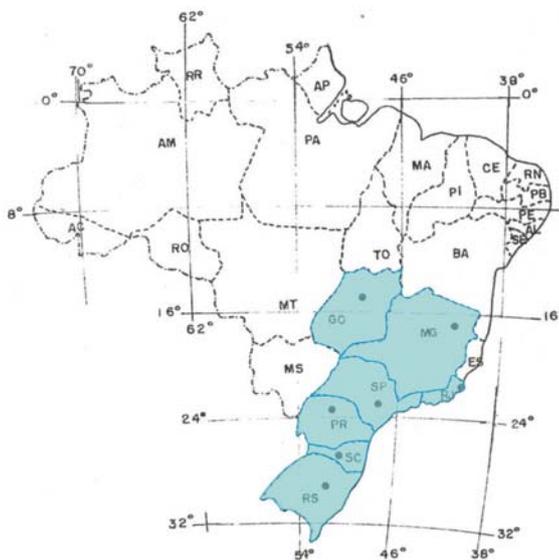


Figura 3: Distribuição de *A. falcata* no Brasil (modificado de Fernandes, 1996).

O potencial forrageiro de *A. falcata* já é conhecido no exterior, mas nenhum estudo foi realizado no Brasil, provavelmente devido a sua pequena quantidade de massa seca. São consideradas características-chave de *A. falcata* sua persistência, resistência a um pastoreio intensivo e tolerância a uma baixa fertilidade do solo (Wilson, 1980). Sua persistência,

atributo chave para leguminosas de pastagens, já foi amplamente estudada (Kretschmer Jr. & Bullock, 1980; Wilson *et al.*, 1982; Jones *et al.*, 2000; Roe & Jones, 2000; Jones, 2001), ela ainda tem sua densidade aumentada com o tempo, além de se dispersar além das regiões onde é cultivada (Wilson *et al.*, 1982; Roe & Jones, 2000). *A. falcata* forma boas reservas de sementes no solo em alguns anos, fazendo-a resistir às épocas mais secas (Jones *et al.*, 2000). Wilson *et al.* (1982) verificaram que 95% das sementes de *A. falcata* recuperadas estavam viáveis e que sua coleção de sementes é menos afetada pelo ambiente e pelo manejo. Quesenberry & Ocumpaugh (1981) consideram a espécie de possível potencial forrageiro, como mostra a utilização de *A. falcata* na dieta de carneiros, onde a energia e o nitrogênio assimilados é similar ao encontrado em alfafa (*Medicago sativa* L.) (Hennessey & Wilson, 1974). Jones e colaboradores (2000) encontraram porcentagens similares de massa seca de *A. falcata* e *Chamaecrista rotundifolia* na dieta do gado, demonstrando que a massa seca de *A. falcata* não é tão baixa quanto parece; e ainda verificaram que as sementes de *A. falcata* estão dentre as mais encontradas em fezes desse animal.

As sementes de *A. falcata* não estão disponíveis em quantidades suficientes para serem comercializadas (Jones *et al.*, 2000), entretanto, Wilson *et al.* (1982), através de seus resultados favoráveis sobre a produção e viabilidade de sementes, acreditam que sua produção comercial deve ser encorajada. Esta espécie de Leguminosae seria interessante para os criadores de gado, uma vez que, não depende inteiramente do manejo para a sua sobrevivência, além de aumentar a fertilidade do solo e a qualidade da pastagem (Wilson, 1980). Como referido por Jones (2001), a avaliação do valor econômico somente poderá ser obtida na prática, entretanto, seus atributos chave como adaptação ao pastoreio intensivo, geadas e estresse por umidade podem desempenhar um papel determinante de como ela será utilizada.

A persistência de espécies do gênero *Aeschynomene* já foi demonstrada em experimentos de controle populacional de plantas consideradas invasoras, através da utilização de herbicidas. Tais produtos falham nesse propósito, pois injúrias severas ou a remoção de tecidos das plântulas, próximos ao nó cotiledonar, estimulam a formação de diversos brotos adventícios no córtex do hipocótilo (Rugenstein *et al.*, 1985). Esse comportamento permite o rápido restabelecimento de populações de *Aeschynomene*, fato que explica a persistência das espécies deste gênero em campos de pastoreio intensivo e pode ser utilizado para uma maior disseminação dessas espécies nesta atividade.

4 - Embriologia

A embriologia, *lato sensu*, trata da histologia e da seqüência de desenvolvimento nas anteras e rudimentos seminiais levando à formação da semente (Prakash, 1987). Este campo de estudo tem se mostrado uma importante ferramenta para a construção de sistemas de classificação natural das plantas, revelando as relações entre táxons em todos os níveis (Maheshwari, 1950; Davis, 1966; Johri, 1984; Johri *et al.*, 1992). Lavin e colaboradores (2001) não consideram os caracteres florais os mais informativos para a família Leguminosae, enfraquecendo o proposto por Tucker & Douglas (1994), porém, detalhamentos ontogenéticos e embriológicos têm demonstrado importância para a taxonomia principalmente devido à sua característica conservadora (Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992). Os indicativos de que as duas secções do gênero *Aeschynomene* não sejam de ancestralidade comum justificam análises mais detalhadas que possibilitem estabelecer relações filogenéticas a fim de revelar a história evolutiva do gênero. Além da importância filogenética e taxonômica de estudos embriológicos, estes são indispensáveis para espécies que possam ser eleitas como cultivares ou ter qualquer significado econômico, seja como forrageira, adubo verde, fornecedora de nitrogênio ou invasora de campos cultivados. O conhecimento do desenvolvimento da antera e dos eventos da esporogênese, por exemplo, tem despertado o interesse dos melhoristas e geneticistas.

Os estudos de ontogênese floral que abrangem desde a iniciação do meristema floral até a antese, baseiam-se na morfologia do primórdio floral e dos primórdios dos órgãos, bem como o momento em que essa morfologia se expressa (Moço, 2002). Diversos estudos abordando caracteres da ontogênese foram aplicados em análises filogenéticas (Tucker & Douglas, 1994) e utilizados na distinção de subfamílias, tribos e níveis infragenéricos (Tucker, 1997). Alguns caracteres do desenvolvimento floral foram apontados como diagnóstico para diferenciar as tribos de Leguminosae: simetria, heterocronia, ordem de iniciação dos órgãos e casos de fusão, proliferação, supressão ou perda de órgãos (Tucker, 1987, 1989, 1992, 1997, 1999). Estudos sobre as tribos tropicais de Papilionoideae são escassos, podendo-se citar os de *Amorpha fruticosa* (dado não-publicado, segundo Tucker & Kantz, 1997), *Dalbergia brasiliensis*, *Machaerium villosum*, *Platymiscium floribundum* e *Pterocarpus rotundifolius* (Klitgaard, 1999), *Adesmia punctata* var. *hilariana* (Moço & Mariath, 2001) e *Adesmia latifolia* (Moço, 2002).

Em Leguminosae alguns caracteres embriológicos foram considerados bastante variáveis, como: parede da antera, grãos de pólen, forma do rudimento seminal,

comportamento das antípodas, investimento na deposição de amido na célula média, mecanismos de polinização, haustório do endosperma, suspensor, tipo de embriogenia, e desenvolvimento dos tegumentos da semente (Prakash, 1987). Quanto ao androceu, as características que se apresentam heterogêneas entre as subfamílias são: citologia do tapete, desenvolvimento da parede da antera e número de camadas médias da antera (Prakash, 1987). Os caracteres palinológicos revelam afinidades naturais entre os táxons em todas as três subfamílias, particularmente no nível genérico (Guinet, 1981; Ferguson & Skvarla, 1981). As subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae são consideradas mais constantes em sua embriologia, mas as Papilionoideae mostram considerável diversidade (Prakash, 1987). Dentre os gêneros da tribo Aeschynomeneae, apenas *Aeschynomene*, *Zornia*, *Stylosanthes* e *Arachis* tiveram alguma análise realizada sobre sua embriologia (Prakash, 1987).

Em vista do exposto, as informações embriológicas existentes podem vir a auxiliar as propostas sistemáticas para a organização da família Leguminosae. Porém, se percebe que os dados embriológicos foram, até o momento, pouco explorados, tendo em vista as grandes dimensões da família e as dificuldades técnicas em analisar as estruturas reprodutoras. O detalhamento embriológico da tribo Aeschynomeneae poderá subsidiar as novas organizações que estão sendo propostas para seus integrantes, bem como reforçar a importância de estudos embriológicos para a sistemática e evolução.

5 - Objetivos

Tendo em vista o escasso conhecimento da embriologia da tribo Aeschynomeneae, as relações imprecisas dentro do gênero *Aeschynomene* e possíveis aplicabilidades de *A. falcata* e *A. sensitiva* na agropecuária, o presente trabalho tem como objetivos:

- ✓ Acrescentar dados sobre a embriologia na tribo Aeschynomeneae.
- ✓ Verificar se caracteres embriológicos corroboram os indícios de que as duas secções do gênero *Aeschynomene* têm origem distinta.
- ✓ Comparar a ontogênese floral, microsporogênese e microgametogênese em duas espécies de habitats diferenciados: *A. falcata*, típica de campos e *A. sensitiva*, de ambientes alagados.

6 - Referências Bibliográficas

- ALAZARD, D. & BECKER, M. 1987. *Aeschynomene* as green manure for rice. **Plant and Soil**, v. 101, p. 141-143.
- BENTHAM, G. 1865. In: '**Genera Plantarum**' 1 (eds.) G. Bentham and J. D. Hooker. Reeve, London.
- BISHOP, H. G.; PENGELLY, B. C. & LUDKE, D. H. 1988. Classification and description of a collection of the legume genus *Aeschynomene*. **Tropical Grasslands**, v. 22, n. 4, p.160-175.
- BURKART, A. 1939. Estudios sistemáticos sobre las Leguminosas-Hedisareas de la República Argentina y regiones adyacentes. **Darwiniana**, v. 3, p. 117-302, pls 1-22.
- CHAPPILL, J. A. 1995. Cladistic analysis of the Leguminosae: The development of an explicit phylogenetic hypotheses. In: **Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny** (ed.) M. Crisp & J.J. Doyle. p. 1-9. Royal Botanic Gardens, Kew.
- CORBY, H. D. L. 1981. The systematic value of leguminous root nodules. In: **Advances in Legume Systematics 2** (eds.) R. M. Polhill, & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 657-669.
- DAVIS, O. L. 1966. **Systematic embryology of the Angiosperms**. (eds.) John Wiley & Sons, Inc. New York, London, Sidney.
- DE CANDOLLE, A. P. 1825. '**Prodromus Systematics Naturalis**' 2 (eds.) Treuttel & Wurtz, Paris.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L.; BALLENGER, J. A.; DICKSON, E. E., KAJITA, T. & OHASHI, H. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **American Journal of Botany**, v. 84, n. 4, p. 541-554.
- FERGUSON, I. K. & SKVARLA, J. J. 1981. The pollen morphology of the subfamily Papilionoideae (Leguminosae). In: **Advances in Legume Systematics 2** (eds.) R. M. Polhill, & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 859-896.

- FERNANDES, A. 1996. **O taxon *Aeschynomene* no Brasil**. EUFC: Fortaleza.
- GIRAUD, E.; HANNIBAL, L.; FARDOUX, J.; VERMÉGLIO, A. & DREYFUS, B. 2000. Effect of Bradyrhizobium photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitiva*. **Plant Biology**, v. 97, n. 26, p. 14795-14800.
- GOLDBLAT, P. 1981. Cytology and phylogeny of Leguminosae. In: **Advances in Legume Systematics 2** (eds.) R. M. Polhill, & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 427-463.
- GUINET, Ph. 1981. Comparative account of pollen characters in the Leguminosae. In: **Advances in Legume Systematics 2** (eds.) R. M. Polhill, & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 789-799.
- HENNESSY, D. W. & WILSON, G. P. M. 1974. Nutritive value of 'Bargoo' jointvetch (*Aeschynomene falcata*) and companion grasses when fed to sheep. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, v. 40, p. 82-84.
- HUTCHINSON, J. 1964. **'The Genera of Flowering Plants' 1**, Oxford University Press.
- JOHRI, B. M. 1984. **Embryology of Angiosperms**. Springer-Verlag, Berlin.
- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B. & SRIVASTAVA, P. S. 1992. **Comparative Embryology of Angiosperms 1**. Springer-Verlag, Berlin.
- JONES, R. M. 2001. Evaluation of legumes and grasses in coastal south-east Queensland. **Tropical Grasslands**, v. 35, p. 85-95.
- JONES, R. M.; MCDONALD, C. K.; CLEMENTS, R. J. & BUNCH, G. A. 2000. Sown pastures in subcostal south-eastern Queensland: pasture composition, legume persistence and cattle liveweight gain over 10 years. **Tropical Grasslands**, v. 34, p. 21-37.
- KASS, E. & WINK, M. 1996. Molecular evolution of the Leguminosae: phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 5, p. 365-378.

- KLITGAARD, B. B. 1999. Floral ontogeny for four taxa of Dalbergieae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 219, p. 1-25.
- KRETSCHMER JR., A. E. & BULLOCK, R. C. 1980. *Aeschynomene* spp.: distribution and potential use. **Soil and Crop Science Society of Florida**, v. 39, p. 145-152.
- LINNAEUS, C. 1753. **Species Plantarum**. p.713.
- LAVIN, M.; PENNINGTON, R. T.; KLITGAARD, B. B.; SPRENT, J. I.; LIMA, H. D. & GASSON, P. E. 2001. The dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 503-533.
- MAHESHWARI, P. 1950. **An Introduction to the Embryology of Angiosperms**. (5^a Reprint) McGraw-Hill Company Inc., NY.
- MOÇO, M. C. C. 2002. Desenvolvimento floral em *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae). **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 121p.
- MOÇO, M. C. C. & MARIATH, J. E. A. 2001. A new pattern of sepal initiation order in *Adesmia punctata* (Poir.) DC. var *hilariana* Benth. (Leguminosae – Papilionoideae). **Acta Microscopica**, v. 2, Suppl. B, p. 25-26.
- OHASHI, H. 1971. A taxonomic study of the tribe Coronilleae (Leguminosae) with a special reference to pollen morphology. **J. Fac. Sci. Univ. Tokyo**, v. 11, p. 25-92, pls. 1-10.
- OLIVEIRA, M. L. A. A. 2002. Sinopse taxonômica do gênero *Aeschynomene* L. (Leguminosae-Faboideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, v. 57, n. 2, p. 279-301.
- POLHILL, R. M. 1981. Papilionoideae. In: **Advances in Legume Systematics Part 1** (eds.) R. M. Polhill & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p.191-208.
- POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. & STIRTON, C. H. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: **Advances in Legume Systematics Part 1** (eds.) R. M. Polhill & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p.1-26.

- PRAKASH, N. 1987. Embriology of the Leguminosae. In: **Advances in legume Systematics** (eds.) Charles H. Stirton, Royal Botanic Gardens, Kew.
- QUESENBERRY, K. H. & OCUMPAUGH, W. R. 1981. Forage potential of *Aeschynomene*-species in north central Florida. **Soil and Crop Science Society of Florida**, v. 40, p. 159-162.
- ROE, R. & JONES, R. M. 2000. Research note: relative persistence of a range of lespedeza (*Kummerowia*) accessions, *Aeschynomene falcata* cv. Bargoo, and other legumes in two long-term trials in southern Queensland. **Tropical Grasslands**, v. 34, p. 99-102.
- RUDD, V. E. 1955. **The American species of Aeschynomeneae**. Washington: Smithsonian Institution, USA, 172p.
- RUDD, V. E. 1981. Aeschynomeneae (Benth.) Hutch. (1964). In: **Advances in Legume Systematics Part1** (eds.) Polhill, R.M. & Raven, P.H. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 347-354.
- RUGENSTEIN, S. R.; JOHNSEY, P. & THOMAS, R. H. 1985. Injury-stimulated adventitious bud formation in *Aeschynomene* seedlings. **American Journal of Botany**, v. 72, p. 830.
- SCHWENKE, T. G. & KERRIDGE, P. C. 2000. Relative responsiveness of some tropical pasture legumes to molybdenum. **Tropical Grasslands**, v. 34, p. 91-98.
- THRO, A. M.; SHOCK, C. C.; NELSON, B. D.; PETERSON, F. J.; COCO, A. B.; BROWN, L. P. & WIER, A. T. 1987. *Aeschynomene* and other summer legumes in Louisiana. **Louisiana Agriculture**, v. 30, n. 4, p. 6-8.
- TUCKER, S. C. 1987. Stamen proliferation in *Swartzia macrosema*, a legume considered transitional between subfamilies Caesalpinioideae and Papilionoideae. **American Journal of Botany**, v. 74, p. 627(abst.).
- TUCKER, S. C. 1989. Evolutionary implications of floral ontogeny in legumes. In: **Advances in Legume Biology Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.** (eds.) C. H. Stirton & J. L. Zarucchi, v. 29, p. 59-75.

- TUCKER, S. C. 1992. The role of floral development in studies of legume evolution. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 692-700.
- TUCKER S C 1997. Floral evolution, development, and convergence: the hierarchical-significance hypothesis. **International Journal of Plant Science**, v. 158 (6 suppl.), p. S143-S161.
- TUCKER, S. C. 1999. Evolutionary lability of symmetry in early floral development. **International Journal of Plant Science**, v.160 (6 suppl.), p. S25-S39.
- TUCKER, S. C. & DOUGLAS, A. W. 1994. Ontogenetic evidence and phylogenetic relationships among basal taxa of legumes. In: **Advances in legume systematics Part 6** (eds) I. K. Ferguson & S. Tucker, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 11-32.
- TUCKER, S. C. & KANTZ, K. E. 1997. Comparative floral development and evolution in tribe Caesalpinioideae (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Haematoxylum*. **American Journal of Botany**, v. 84, n. 8, p. 1047-1063.
- VANNI, R. 1983. Recuentos cromosomicos en Hedysareae (Leguminosae-Papilionoideae). **Bonplandia**, v. 5, n. 24, p. 227-233.
- WILSON, G. P. M. 1980. Bargoo jointvetch: tough legume for tough country. **Agricultural Gazette of New South Wales**, v. 91, p. 51-53.
- WILSON, G. P. M.; JONES, R. M. & COOK, B. G. 1982. Persistence of jointvetch (*Aeschynomene falcata*) in experimental sowings in the australian subtropics. **Tropical Grassland**, v. 16, n. 3, p. 155-156.

**CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO FLORAL COMPARATIVO DE
AESCHYNOMENE FALCATA (POIR.) DC. E *AESCHYNOMENE SENSITIVA* SW.
(PAPILIONOIDEAE - LEGUMINOSAE)”**

Diana Salles Sampaio^{1,4}; Maria Cecília de Chiara Moço^{2,4}; Jorge Ernesto de Araujo Mariath^{3,4}. 1 Pós-Graduanda; 2 Pesquisadora; 3 Professor Titular e Pesquisador CNPq; 4 Departamento de Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

“Compartilhe o seu conhecimento. Esta é uma maneira de alcançar a imortalidade.”

Dalai Lama

RESUMO

A ontogênese floral de *Aeschynomene falcata* (secção *Ochopodium*) e *Aeschynomene sensitiva* (secção *Aeschynomene*) foi analisada utilizando-se Microscopia Eletrônica de Varredura. O objetivo deste trabalho foi comparar os três estádios do desenvolvimento floral dessas espécies considerando: desenvolvimento inicial (surgimento dos órgãos), médio (aumento em tamanho dos órgãos e diferenciação de sua forma) e final (crescimento final dos órgãos e tecidos). *A. falcata* apresenta iniciação acrópeta dos verticilos, sendo o aparecimento do carpelo precoce, os demais verticilos apresentam iniciação unidirecional abaxial de todos os órgãos – podendo as pétalas terem iniciação simultânea - como observado na maioria das Papilionoideae. *A. falcata* apresenta um tubo do cálice com 5 dentes, estandarte pubescente, quilhas aderidas acima e abaixo dos estames, anteras dimorfas, uma sutil aderência entre os conjuntos de estames e estipe extenso com longos tricomas. *A. sensitiva* apresenta a iniciação do carpelo precoce, do cálice unidirecional abaxial tendendo a simultânea, das pétalas assimétrico (1° - duas abaxiais, 2° - uma adaxial e 3° - duas laterais) e, de ambos verticilos de estames, unidirecional abaxial. Ocorre uma sobreposição entre a iniciação dos primórdios de estames antesépalos sobre os de pétalas, onde o primórdio abaxial do verticilo de estames surge antes dos laterais de pétalas. Destaca-se, nesta espécie, a polarização do cálice desde o seu surgimento resultando num cálice bipartido, caráter compartilhado, na maturidade, com todas as outras espécies da subtribo Aeschynomeninae, exceto as da secção *Ochopodium* do gênero *Aeschynomene*. *A. sensitiva* apresenta cálice e estandarte glabros, quilhas efetivamente fusionadas acima dos estames e estipe curto e glabro. Essas e outras características da ontogênese floral de *A. falcata* e *A. sensitiva* corroboram a idéia de que este gênero não seja natural, possivelmente existindo uma separação da secção *Ochopodium* de todo o restante da subtribo Aeschynomeninae.

1 - Introdução

O processo da ontogênese floral é contínuo, mas Tucker (1997) padronizou estádios sucessionais para facilitar os estudos nesta área, os quais serão empregados neste estudo: 1) organogênese, 2) estágio médio de diferenciação ou, diferenciação da forma, e 3) desenvolvimento floral final, eventos envolvendo diferenciação celular. Alguns caracteres dos estádios iniciais de desenvolvimento podem ser destacados, como a ordem de iniciação dos órgãos dentro e entre os verticilos, ocorrência de equalização dos tamanhos entre membros de um verticilo e sobreposições heterocrônicas na iniciação entre verticilos (Tucker & Douglas, 1994). Para a distinção entre diversos níveis taxonômicos foi feita uma correlação entre o tempo de expressão de um caráter e o nível hierárquico em que ele é considerado significativo. Os caracteres expressados no início do desenvolvimento são usualmente estáveis e caracterizam níveis supragenéricos de hierarquia (subfamílias, tribos), enquanto estados de caráter que surgem tardiamente no desenvolvimento, geralmente caracterizam gêneros ou espécies (Tucker, 1997). O fato de as diferenças entre os grupos surgirem apenas tardiamente no desenvolvimento sugere que estes sejam intimamente relacionados, enquanto que as diferenças que se manifestam em estádios iniciais do desenvolvimento afastam os grupos evolutivamente (Tucker, 1984).

A relevância dos estudos sobre ontogênese floral fica clara quando se verifica que algumas tendências evolutivas só ficam aparentes através deste tipo de análise (Tucker, 1989b; 1992), como na identificação de homologias ou convergências, resolução de questões sobre perda de órgãos ou homeose (órgãos aparecendo em lugares errados) e testando-se distinções entre gêneros, tribos e subfamílias (Tucker, 1992). Muitos trabalhos vêm provando que a aplicação deste método em filogenia é eficiente, como o de Mansano *et al.* (2002), que demonstra a presença de caracteres em alguns gêneros de Swartzieae, que mais se assemelham a Sophoreae corroborando a retirada destes gêneros da tribo Swartzieae; e o de Tucker (2002), onde as características encontradas nas flores de espécies do gênero *Cercis*, que são compartilhadas com as Papilionoideae, surgem apenas no desenvolvimento final da flor, sugerindo que estas características sejam convergências entre os grupos. Na subfamília Papilionoideae, um importante fator a ser salientado é a ordem de iniciação dos órgãos de todos os verticilos florais, predominantemente, do tipo unidirecional abaxial (Tucker 1984; 1997). Entretanto, diversas exceções têm sido verificadas, como a iniciação radial dos primórdios de sépalas e pétalas em *Adesmia latifolia* (Moço & Mariath, 1999; 2002) e unidirecional adaxial (inversa) em sépalas de *Adesmia punctata* var. *hilariana* (Moço &

Mariath, 2001), *Adesmia tristis*, *Adesmia ciliata*, *Adesmia muricata*, *Adesmia riograndensis* e *Adesmia securigerifolia* (Moço, dados não publicados) podendo representar apomorfias destes grupos dentro da subfamília.

Tucker (1984) pontua a importância de se estudar táxons representativos em cada tribo, o que pode elucidar as relações entre as tribos e suas distinções, entretanto, estudos sobre as tribos tropicais de Papilionoideae são escassos, podendo-se citar os de *Amorpha fruticosa* (dado não publicado, segundo Tucker & Kantz, 1997), *Dalbergia brasiliensis*, *Machaerium villosum*, *Platymiscium floribundum* e *Pterocarpus rotundifolius* (Klitgaard, 1999), *A. punctata* var. *hilariana* (Moço & Mariath, 2001) e *A. latifolia* (Moço & Mariath, 1999; Moço, 2002), o que gera a necessidade de novas investigações nestas tribos. Os resultados já obtidos por Klitgaard (1999) com a ontogênese floral de espécies da tribo Dalbergieae reforçam as análises filogenéticas com caracteres moleculares obtidos por Lavin *et al.* (2001), sugerindo que esta tribo não seja monofilética. No caso da subtribo Aeschynomeneinae, que possui oito gêneros, a combinação dos dados moleculares e não-moleculares sugere que este seria um grupo monofilético muito bem sustentados, se não fosse pela exceção das espécies da secção *Ochopodium* do gênero *Aeschynomene* que se mostram mais relacionadas aos gêneros *Dalbergia* e *Machaerium* da tribo Dalbergieae que das outras espécies de *Aeschynomene* e dos outros gêneros da subtribo Aeschynomeneinae (Lavin *et al.*, 2001). Estes autores deixam claro que estudos com o clado “dalbergiíode”, que inclui as tribos tropicais Aeschynomeneae, Adesmieae, Dalbergieae (exceto alguns gêneros) e Desmodieae (subtribo Bryinae), são imprescindíveis, uma vez que as relações entre os membros deste clado estão pouco elucidadas até o momento.

Baseado no aqui exposto, o presente trabalho tem como principal objetivo colaborar com novos dados para a filogenia do gênero *Aeschynomene* e da subtribo Aeschynomeneinae, através de análises comparativas da ontogênese floral de *Aeschynomene falcata* e *Aeschynomene sensitiva*.

2 - Material e Métodos

Inflorescências de *A. falcata* e *A. sensitiva* foram coletadas nos meses de abril e dezembro do ano de 2003. A coleta de *A. falcata* realizou-se em populações no topo do Morro da Polícia (Figuras 1A, B) e do Morro Santana (ICN 127556 e ICN 127557, respectivamente) e, a de *A. sensitiva*, em uma população no Parque Estadual Delta do Jacuí, Ilha das Flores -

Braço Norte (Figuras 2A, B) (ICN 127555), ambas localizadas no município de Porto Alegre no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Os ápices de inflorescências e botões em diferentes estádios de desenvolvimento, foram fixados em FAA 50 (5 partes de formol:5 partes de ácido acético:90 partes de etanol 50%) (Johansen, 1940), desidratados em série etílica ascendente e transferidos ao dimetoximetano (Gersterberger & Leins, 1978), onde permaneceram por 12 horas. O material foi então, seco em aparelho de ponto crítico (Balzers CPD 030), aderido a suportes de alumínio e recoberto com ouro em aparelho metalizador tipo “sputtering” (Balzers SCD 050).

As análises e eletromicrografias foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Jeol JSM 5800, sob 20 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME).

3 - Resultados

3.1 - *Aeschynomene falcata* _ Organografia_ *A. falcata* é uma erva prostrada (Figuras 1C, 4A) e perene. Suas inflorescências são eixos de crescimento indefinido com racemos laterais axilares de segunda ordem (Figura 1D) com poucas flores (aproximadamente 5) de filotaxia dística (Figuras 1D-F, 4B, C). Os racemos possuem raquis alongada, tornando a inflorescência maior do que a folha do mesmo nó (Figura 1D). Os pedicelos florais pubescentes somente se tornam visíveis com seu alongamento próximo ao momento da antese, elevando as flores mais velhas acima do nível do ápice da inflorescência (Figuras 1 E, 4B, C). Foram observadas galhas no pedicelo de algumas flores (Figura 1G).

As folhas apresentam estípulas lanceoladas com ápice acuminado, as brácteas estão localizadas na base dos pedicelos e são mais curtas que as estípulas e bractéolas, o par de bractéolas persiste após a antese na base de cada flor, estípulas, brácteas e bractéolas são pubescentes (Figuras 4C, D). A flor possui cerca de 7mm de comprimento. As sépalas formam um tubo 5-partido quase reto, pubescente e verde claro (Figura 11C), seus dentes são voltados abaxialmente, sendo os laterais ligeiramente menores que os demais (Figuras 4C, E). As pétalas possuem coloração amarela clara (Figuras 1D), o estandarte é pubescente na face abaxial (Figuras 4C, F, 11A, B). As alas foram classificadas segundo Stirton (1981); elas possuem uma pequena bolsa na aurícula, apresentam esculturas na face abaxial que são escondidas pelas pétalas constituintes da quilha; a escultura é superior basal central com 5 fileiras de dobras lunares, cada uma composta por 5-10 luas (Figuras 4C, G). As pétalas que constituem a quilha possuem aurícula com uma pequena bolsa, têm uma curvatura de aproximadamente 90 graus

voltada para o lado adaxial, suas porções distais são levemente aderidas acima dos estames, com a margem da esquerda sobrepondo a da direita (Figuras 4H, 11D-F), abaixo dos estames também ocorre uma leve fusão, parecendo que as margens estão entrelaçadas (Figuras 11G, H). Essas pétalas, que são parcialmente fusionadas, abrigam os estames e o gineceu em seu interior (Figuras 4I, 11D). O androceu é diadelfo, formando dois conjuntos de 5 estames com os conjuntos de filetes levemente aderidos adaxialmente (Figuras 4J, 6A, B). A porção distal dos filetes se curva de modo que os estames fiquem voltados adaxialmente acompanhando o formato da quilha (Figuras 4I, J, 11D). O gineceu apresenta estipe algo alongado com tricomas muito compridos que chegam a atingir a altura do próprio ovário, o ovário é reto e densamente pubescente, o estilete é comprido e curvado adaxialmente (Figuras 4K, 10D), terminando num estigma papiloso (Figura 10C). O fruto é um lomento, com formato de foice, o que dá nome à espécie, com 4 a 8 artículos, geralmente 5, unidos por istmos que deixam uma das margens com invaginações entre os artículos (Figura 4L). O tubo do cálice e os conjuntos de estames permanecem após o início do desenvolvimento do fruto.

Organogênese _ O meristema apical da inflorescência origina brácteas em filotaxia dística. Na axila de cada bráctea, surge um primórdio floral e um par de bractéolas perpendiculares à bráctea (Figuras 7A-C). O primórdio floral, ainda sob forma de domo, aumenta de volume e, quando atinge cerca de 80µm, inicia-se a formação do verticilo de sépalas. (Figura 7C).

O primeiro primórdio de sépalas surge na posição abaxial mediana do primórdio floral e cresce rapidamente, enquanto o primórdio floral atinge aproximadamente 100µm de diâmetro e adquire simetria bilateral (Figuras 7C, D). O surgimento dos primórdios laterais de sépalas precede o surgimento dos primórdios adaxiais, caracterizando uma iniciação unidirecional abaxial desse verticilo (Figuras 7D, E). As sépalas adaxiais atingem o tamanho das laterais (Figuras 7E, F). Os primórdios das sépalas desenvolvem mais rapidamente os dentes do cálice, com o tubo ainda inconspícuo nos estádios iniciais (Figuras 8D, 9A).

O primórdio floral torna-se nitidamente pentagonal, em cujas arestas são iniciados os primórdios de pétalas também no sentido unidirecional abaxial quase simultâneo (Figuras 8A-D). Os primórdios abaxiais de pétalas são iniciados (Figuras 8A, B), logo se tornando bem delimitados, os laterais e adaxiais surgem em seguida, quase concomitantemente, o que é difícil de se afirmar devido à alta velocidade deste processo (Figuras 8C, D). Os primórdios de pétalas abaxiais e adaxial aumentam em volume mais rapidamente que os laterais que futuramente darão origem às alas (Figura 8D). O primórdio de carpelo já pode ser distinto como uma pequena

elevação quando todas as sépalas já estão iniciadas e os primórdios abaxiais de pétala são observados (Figura 8B). Ele surge no centro do primórdio floral, formando um domo de aproximadamente 40µm de altura (Figuras 8C, D).

Logo em seguida ao aparecimento dos últimos primórdios de pétalas, o primórdio abaxial de estame antesépalo já apresenta tamanho semelhante ao dos primórdios abaxiais de pétalas (Figuras 8E, F). Dá-se, então, o surgimento dos primórdios laterais de estames deste verticilo seguidos pelos adaxiais (Figuras 8E, F). Neste estágio, o primórdio de carpelo está mais alto do lado abaxial, parecendo tombado em direção a este, indicando o local do surgimento da fenda carpelar no lado adaxial (Figuras 8E, F). O cálice cobre quase totalmente o primórdio floral em desenvolvimento, principalmente devido ao crescimento acelerado da sépala abaxial que já apresenta iniciação de tricomas em sua face dorsal (Figura 9A). A iniciação do verticilo antepétalo de estames só ocorre após a iniciação de todos os primórdios do verticilo antesépalo; também é unidirecional abaxial e tem o primórdio adaxial bastante atrasado em seu surgimento (Figuras 9B-D). Seus primórdios localizam-se internamente aos de pétalas, motivo pelo qual recebem este nome. Durante o desenvolvimento do verticilo antepétalo de estames, a fenda carpelar torna-se bem visível, quando o carpelo tem cerca de 70µm de altura (Figuras 9B-D).

Estádios médio e final de desenvolvimento _ Quando os primórdios de estame do verticilo antepétalo são iniciados, os primórdios do verticilo antesépalo apresentam-se maiores que os de pétalas e com formato globular (Figuras 9E, F). Quando todos os órgãos já estão formados, os primórdios de pétalas mostram-se nitidamente achatados, sendo o estandarte mais largo com o ápice tornando-se levemente acuminado (Figuras 9D-H, 10H), no verticilo antesépalo de estames, os dois primórdios adaxiais apresentam-se ligeiramente maiores que os demais o que é observado até estádios adiantados do desenvolvimento (Figuras 9E, F). Após o crescimento das margens do carpelo de cerca de 220µm de altura, a fenda carpelar torna-se bem delimitada estando, em geral, perpendicular ao estandarte ou ao eixo (Figuras 9F, G), mas em algumas flores, torna-se oblíqua ao eixo (Figura 9E). Neste momento, todas as sépalas apresentam seu ápice acuminado e tricomas em sua face dorsal, o tubo do cálice começa a ser formado pelo crescimento intercalar na base das sépalas (Figuras 10E, F).

A porção distal dos primórdios de estame do verticilo antesépalo aumenta em diâmetro (Figura 9F). As pétalas crescem apenas tangencialmente e tornam-se levemente côncavas na face dorsal (Figura 9G). Num estágio seguinte, quando os estames antesépalos possuem cerca de 80µm de altura observa-se a iniciação dos microsporângios com a formação de um sulco ventral, que separa as tecas, e de dois laterais, as futuras linhas de deiscência que delimitam cada

esporângio (Figuras 9G-I). Estes estames crescem em volume e altura, enquanto o verticilo antepétalo de estames parece estacionar seu crescimento e as pétalas apenas ampliam-se lateralmente (Figuras 9G-I). As margens do carpelo já estão totalmente fundidas quando este tem aproximadamente 320 μ m de altura (Figura 10A). Os momentos iniciais do surgimento dos microsporângios dos estames do verticilo antepétalo não são bem visualizados, pois estes estão encobertos pelo verticilo antesépalo de estames – quando vistos de cima - e pelas pétalas – dorsalmente (Figuras 9H, I). Os microsporângios destes estames são formados quando eles possuem menos de 120 μ m (Figuras 10G, H). As pétalas adquirem ápice acuminado e são menores que os estames do verticilo antepétalo (Figura 10H). As pétalas, então, retomam seu crescimento, atingindo rapidamente o tamanho dos estames antesépalos e o estandarte se torna conspícuo devido à presença de inúmeros tricomas na face abaxial (Figuras 11A, B). Um sulco dorsal conspícuo passa a ser observado nas anteras dos estames antesépalos (Figura 11B). No carpelo, observa-se o início da formação do estilete (Figuras 10B, 11A, B) e, inicialmente, apresenta tricomas na região do feixe dorsal e da sutura, que depois surgem em toda a sua extensão (Figuras 10B, D, 12A, C-E). Os longos tricomas do estipe surgem na base do ovário antes mesmo do estipe estar aparente (Figura 10B). O ovário curva-se levemente e sua face dorsal se apresenta convexa (Figura 10D).

Através do crescimento diferencial do receptáculo os dois verticilos de estames ficam localizados em uma mesma fileira parecendo fazer parte de um só verticilo (Figura 12A), a base dos filetes se dilatam e se fundem como resultado de crescimento intercalar (Figuras 12B, C). O androceu torna-se diadelfo e, na maioria dos casos, forma um grupo de estames à direita ao qual o estame abaxial do verticilo externo pertence e à esquerda ao qual pertence o estame adaxial do verticilo interno, os demais estames (que possuem número par) dividem-se igualmente para cada lado, resultando em dois conjuntos de cinco estames (Figuras 12B-F). Os estames ímpares ainda podem assumir os lados contrários dos blocos de estames sendo esta uma característica flexível. No verticilo antesépalo de estames as anteras são basifixas e, no antepétalo são levemente dorsifixas (Figuras 12A-E), o que caracteriza um dimorfismo nos estames desta espécie.

O cálice permanece com a simetria bilateral, com lobos livres voltados abaxialmente, sendo os laterais um pouco menores que os demais, formando um tubo reto que cobre toda a corola pelo crescimento intercalar das sépalas (Figuras 4B, 10E, F, 11C). Com a rápida expansão da corola antes da antese, ela se torna bem mais alta que o cálice e com uma aderência entre as quilhas em sua porção distal (Figuras 4C, 11D). Na maturidade, anteras e estigma estão próximos, podendo-se encontrar grãos de pólen em contato com o estigma devido ao estreito

tubo formado pelas quilhas (Figuras 4I, J). Os tricomas do estipe assumem um comprimento ainda maior (Figuras 12C, E, F).

3.2 - *Aeschynomene sensitiva* _ Organografia _ *A. sensitiva* é um arbusto de até 4m de altura, nigrescente e densamente hispiduloso, glabro nas partes inferiores (Figuras 2C, 5A). Suas inflorescências são eixos de crescimento indefinido, com ramificações de segunda ordem também indefinidas que formam racemos laterais axilares de terceira ordem (Figuras 2D-F, 3A, C, D, 5A, B), com 8-12 flores de filotaxia subdística (Figura 13D). Um elevado número de afídios foi encontrado nas inflorescências (Figuras 3C, E).

O ápice do racemo lateral origina uma bráctea (Figura 13A) que protegerá, em sua axila, o primórdio floral, oval e convexo (Figuras 13B, C). Segue o surgimento de bractéolas ortogonais à bráctea, mas ligeiramente inclinadas para o eixo da inflorescência (Figuras 13A, E). A própria iniciação das bractéolas já torna o primórdio floral zigomórfico. O pedúnculo e os pedicelos são curtos e se alongam com o amadurecimento floral e do fruto (Figuras 3A, C, D, 5B, 13D).

As estípulas são peltadas, isto é, apendiculadas abaixo do ponto de inserção, com ápice acuminado e segmento inferior truncado, as brácteas são semelhantes às estípulas e também parecem ser peltadas, estando presentes nas bases dos pedicelos (Figura 5D). Brácteas e bractéolas parecem persistentes pelo menos até o momento da antese (Figuras 3B, 5B, C). A flor possui cerca de 7mm de comprimento (Figuras 3B, 5C). As flores apresentam cálice bipartido (Figuras 3B, F, 5C, E) e glabro (Figuras 3B, 5C, E, 17A, B) tornando-se reflexo pouco antes da antese (Figuras 5B, C, E). O cálice é persistente após o início do desenvolvimento do fruto. A corola é amarelo ouro (Figuras 2D, E), o estandarte é fortemente reflexo e de consistência firme (Figuras 2E, 3A, 5C, F), hispido apenas em suas bordas (Figura 5F), assim como as alas (Figura 5G). As alas possuem uma pequena bolsa na aurícula, apresentam esculturas expostas, a escultura é superior central distal com 8 fileiras de dobras lunares cada uma composta por 5-8 luas (Figuras 5C, G). As pétalas que formam a quilha são fusionadas na porção distal, elas se expandem cobrindo o tubo de estames e o gineceu (Figuras 5H, I, 17H, I), mas não possuem o alongamento conspícuo em direção a face adaxial (Figura 5H) observado em *A. falcata* (Figura 4H), o que não permite a formação de uma câmara que cubra totalmente estames e carpelo, embora os grãos de pólen também sejam armazenados na cavidade interna da quilha (Figuras 5I, 17H, I). O androceu é diadelfo, formando dois conjuntos de 5 estames cada bastante curvados adaxialmente, não existe nenhum tipo de aderência entre os filetes dos dois conjuntos distintos (Figura 5J). O ovário é curvo, em forma de C, voltado adaxialmente, apresenta estipe curto e glabro, o ovário compõe a maior parte do gineceu, é hispido nas regiões da nervura dorsal e

sutura, expandindo-se para as laterais, o estilete é curto terminando num estigma papiloso (Figuras 5K, 16C, E). O fruto é um lomento nigrescente com 4-12 artículos unidos por septos transversais que deixam as margens do fruto paralelas (Figuras 2F, 5L). Cálice e conjuntos de filetes permanecem durante o início do desenvolvimento do fruto (Figura 3A).

Organogênese _ O primórdio floral emite duas bractéolas ortogonais à bráctea (Figura 13E). As bractéolas, primeiro produto do ápice floral, logo adquirem ápices acuminados e o primórdio floral cresce em altura e largura tornando-se mais arredondado (Figuras 13E, F). Uma depressão ao redor do primórdio floral de aproximadamente 130µm de diâmetro, evidencia o surgimento do primórdio abaxial de sépala (Figuras 13E, F). Os dois primórdios laterais de sépalas surgem logo após o abaxial e convergem com este formando uma crista contínua no lado abaxial do primórdio floral (Figuras 13E-I). Posteriormente, evidenciam-se as projeções dos primórdios adaxiais, nos quais a porção mais conspícua é o ponto entre os dois primórdios que na realidade demonstra sua fusão precoce (Figuras 13G-I). O primórdio floral torna-se alongado perpendicularmente ao eixo da inflorescência e polarizado, com cerca de 160µm de comprimento no sentido abaxial-adaxial e, 115µm lateralmente (Figuras 13H, I), tendo um lobo abaxial do cálice com três primórdios de sépalas fusionados e um adaxial, com dois primórdios fusionados. Caracterizando, já nesta fase inicial, um cálice bipartido e zigomórfico (Figura 14). A iniciação do cálice caracteriza-se como unidirecional abaxial, embora se considerado que as sépalas laterais surgem quase concomitantemente à abaxial este padrão poderia ser uma tendência ao tipo simultâneo. É importante notar a conspícua convexidade e maior crescimento do primórdio floral em altura (Figuras 13H, I, 14A-F) quando comparado a *A. falcata*, que neste estágio apresenta o primórdio praticamente plano (Figuras 8A-F).

Antes da completa iniciação dos primórdios de sépalas adaxiais, já são nitidamente visíveis os primórdios de pétalas abaxiais (Figuras 13H, I), apresentando uma pequena sobreposição em relação ao verticilo de sépalas. Surge, a seguir, o primórdio de pétala adaxial, o futuro estandarte (Figuras 14A-C). Após este estágio o carpelo já pode ser distinguido como um pequeno domo de 40µm de altura, diferenciando-se no centro do primórdio floral (Figuras 14A-D). A iniciação do primórdio abaxial de estame do verticilo antesépalo é quase concomitante à dos primórdios laterais que, por sua vez, surgem ao mesmo tempo em que os primórdios laterais de pétalas (Figuras 14D, E), ocorrendo uma sobreposição entre o surgimento das pétalas e do verticilo antesépalo de estames. Posteriormente, observa-se o aparecimento dos primórdios adaxiais desse verticilo de estames (Figura 14F). A iniciação dos primórdios de pétalas é classificada como assimétrica (1° - abaxiais, 2° - adaxial e 3° - laterais) e a do verticilo

antesépalo de estames unidirecional abaxial. O carpelo aumenta em volume, ocupando um maior espaço no centro do primórdio floral e mostra-se mais alto do lado abaxial (Figuras 14E, F).

As sépalas abaxial e adaxiais aparecem com ápice acuminado, o estandarte já se mostra maior que as demais pétalas e o carpelo mostra a delimitação da região de sua fenda (Figuras 14G, H). O próximo evento é o surgimento do verticilo antepétalo de estames, que também é unidirecional abaxial, com o primórdio adaxial bastante atrasado em seu surgimento (Figuras 14H, I). Os primórdios de estames do verticilo antesépalo já apresentam a mesma altura dos de pétalas e a fenda carpelar torna-se aparente quando o carpelo possui entre 60-75 μ m de altura (Figuras 14H, I).

Estádios médio e final de desenvolvimento _ Com a organogênese concluída, todas as pétalas encontram-se achatadas dorsiventralmente sendo ultrapassadas em tamanho pelos estames do verticilo antesépalo (globulares), as alas começam a se voltar para o lado abaxial aproximando-se das pétalas abaxiais que irão compor a quilha (Figuras 15A, B). As margens do carpelo já estão bem próximas umas das outras quando este possui cerca de 130 μ m de altura (Figuras 15A-C). Em algumas flores, o crescimento diferencial entre as margens do carpelo faz com que a fenda seja oblíqua em relação ao eixo da inflorescência (Figura 15G). Num estágio seguinte, o estandarte já se alargou bastante (Figuras 15E, G), os estames do verticilo antesépalo têm cerca de 80 μ m de altura quando se tornam claviformes (Figuras 15A, C), 130 μ m quando fica clara a iniciação dos microsporângios (Figuras 15B, D) e 200 μ m quando as anteras estão completamente formadas (Figura 15E). Os verticilos de pétalas crescem tangencialmente e as alas tornam-se ainda mais voltadas para o lado abaxial (Figuras 15E, H), o estandarte já apresenta ápice acuminado (Figura 15E). Os filetes dos estames do verticilo antesépalo alongam-se e os sulcos ventrais e dorsais que delimitam as tecas de uma antera ficam evidentes, sendo seguidos pelos laterais (Figuras 15F-H). A formação das anteras dos estames do verticilo antepétalo não pode ser bem acompanhada devido à posição protegida deste verticilo atrás das pétalas e das anteras dos estames antesépalos, entretanto parece que a formação dos microsporângios se dá antes mesmo da diferenciação de um filete (Figuras 15E, 16A) e com aproximadamente 170 μ m de altura as anteras deste verticilo estão totalmente formadas (Figura 15F). No verticilo antesépalo, observa-se então, o aparecimento de um sulco dorsal que delimita as tecas (Figuras 15I, 17C). As margens do carpelo crescem ficando adjacentes (Figuras 15G-I, 16A) e, quando ele tem cerca de 500 μ m de altura, está totalmente fechado pela união de suas margens (Figura 16B).

O lobo abaxial do cálice sobrepõe o adaxial e existe uma curta região fusionada na base dos dois lobos (Figuras 15I, 17A), além de três pequenos dentes no lobo abaxial e dois no adaxial, mostrando a disposição das sépalas no tubo do cálice (Figura 17B). As quilhas são fusionadas nos dois terços superiores por crescimento e fusão de células marginais de uma pétala sobre a outra antes mesmo de sua curvatura (Figuras 17E-J), as alas já sobrepõem as quilhas (Figuras 17C-E) e o estandarte é hispido em suas margens (Figura 17C). A formação do estilete é iniciada e o carpelo torna-se convexo em sua face abaxial/dorsal (Figuras 16C, 18A, B). Durante o desenvolvimento do estigma ele parece algo maciço com um pequeno orifício central, as papilas se desenvolvem mais rapidamente na face dorsal (Figuras 16D, E). Devido ao estigma estar coberto por uma massa de pólen no seu estágio maduro não foi possível observar se ele desenvolve papilas em toda sua extensão e se permanece maciço (Figuras 16F, G).

As anteras de ambos verticilos de estames são dorsifixas (Figuras 18A-E). Os dois blocos de estames são formados da mesma maneira que em *A. falcata*, o androceu torna-se diadelfo, o estame abaxial do verticilo externo demora mais a se fusionar aos outros (Figuras 18B, D), bem como as bases fundidas dos filetes demoram mais a se expandir do que em *A. falcata* (Figuras 18A-E). O fusionamento dos estames e o alongamento do carpelo são tardios nessa espécie (Figuras 18A-E). Os estames encurvam-se precocemente em direção ao lado adaxial da flor e toda a sua extensão torna-se curva (Figuras 18A, 5J). Os estames na flor madura localizam-se bastante próximos do estigma (Figuras 5I, J, 17I). Um fusionamento discreto entre as bases do cálice, corola e tubo de estames foi observado (Figura 3F) podendo representar a presença de um hipanto residual.

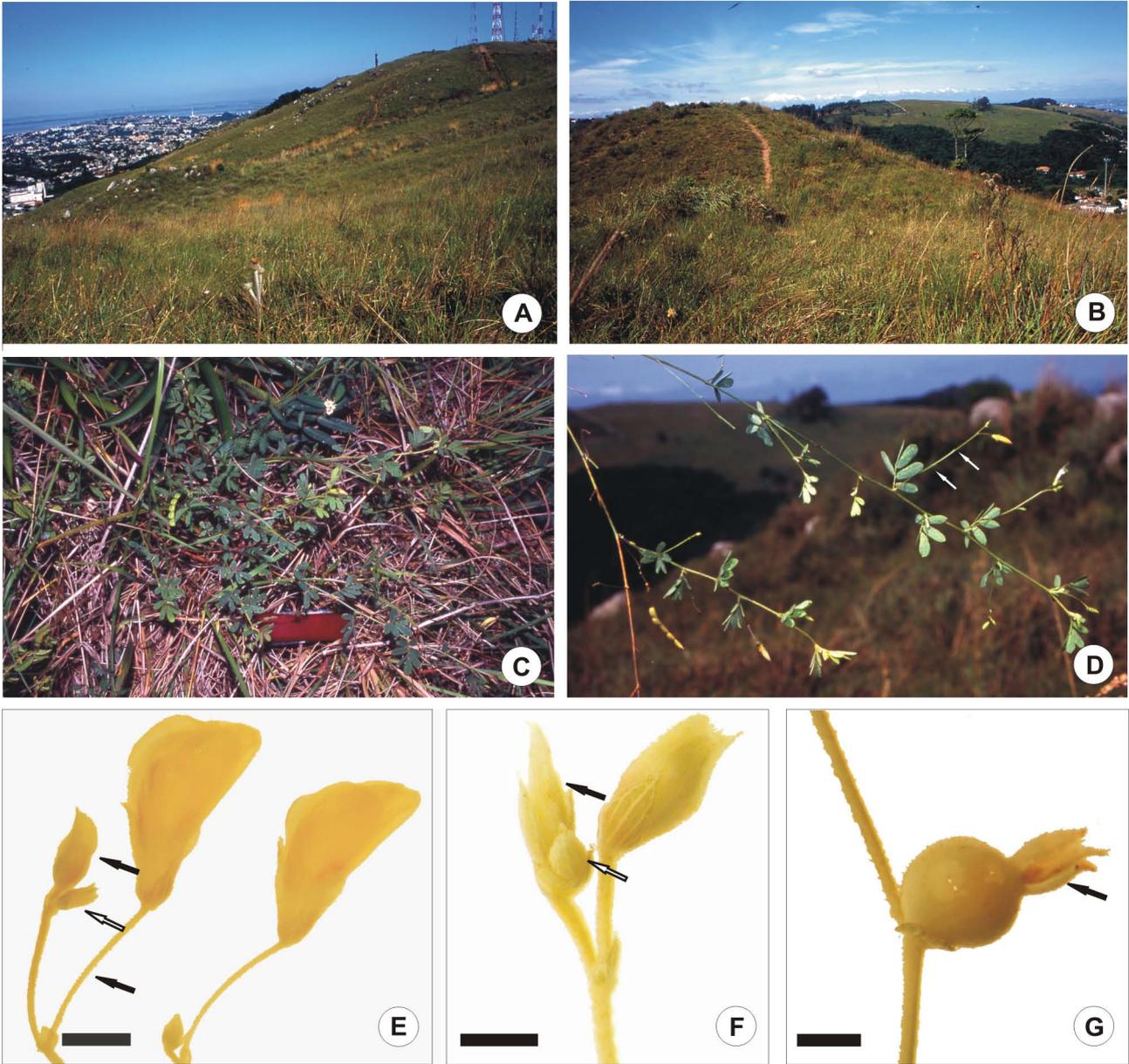


Figura 1: *A. falcata*. A, B: Local de coleta - campo no topo do Morro da Polícia-Porto Alegre. C: Hábito - erva prostrada . D: Aspecto do ramo de *A. falcata* com flores e frutos. As setas apontam a raquis da inflorescência maior que a folha. E, F: Aspecto geral da inflorescência. As setas pretas indicam os botões mais velhos e as brancas os mais jovens com o ápice da inflorescência. G: Galha floral de *A. falcata*. A seta preta indica as bractéolas da flor. E: Barra = 2mm. F, G: Barras = 1mm.

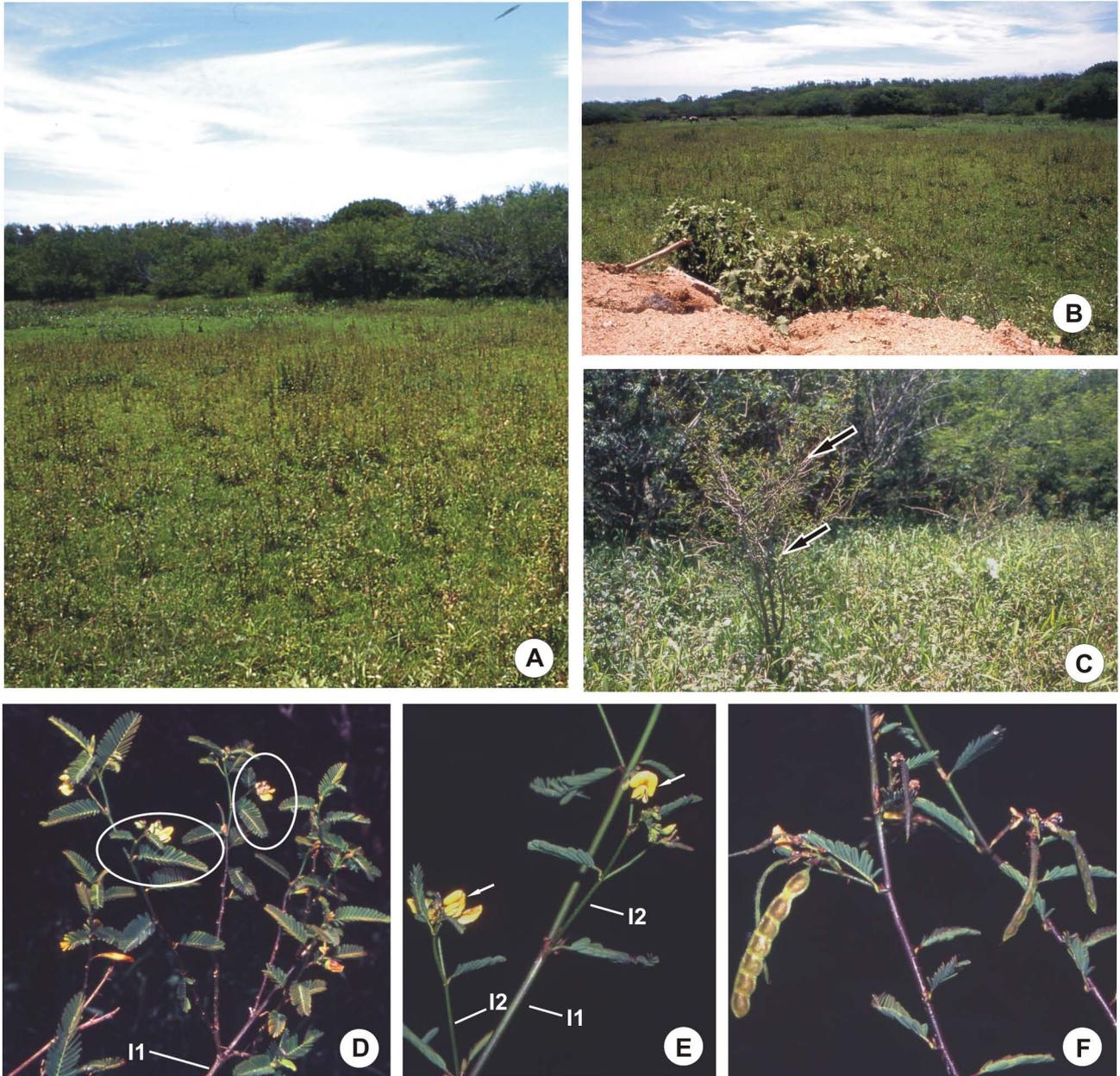


Figura 2: *A. sensitiva*. A, B: Local de coleta - banhado na Ilha das Flores-Porto Alegre. C: Arbusto de *A. sensitiva* apontado pelas setas. D, E: Inflorescências com flores amarelo ouro (setas). D: As elipses circundam inflorescências de segunda ordem. F: Ramo com fruto. I1: eixo da inflorescência de primeira ordem; I2: eixo da inflorescência de segunda ordem.

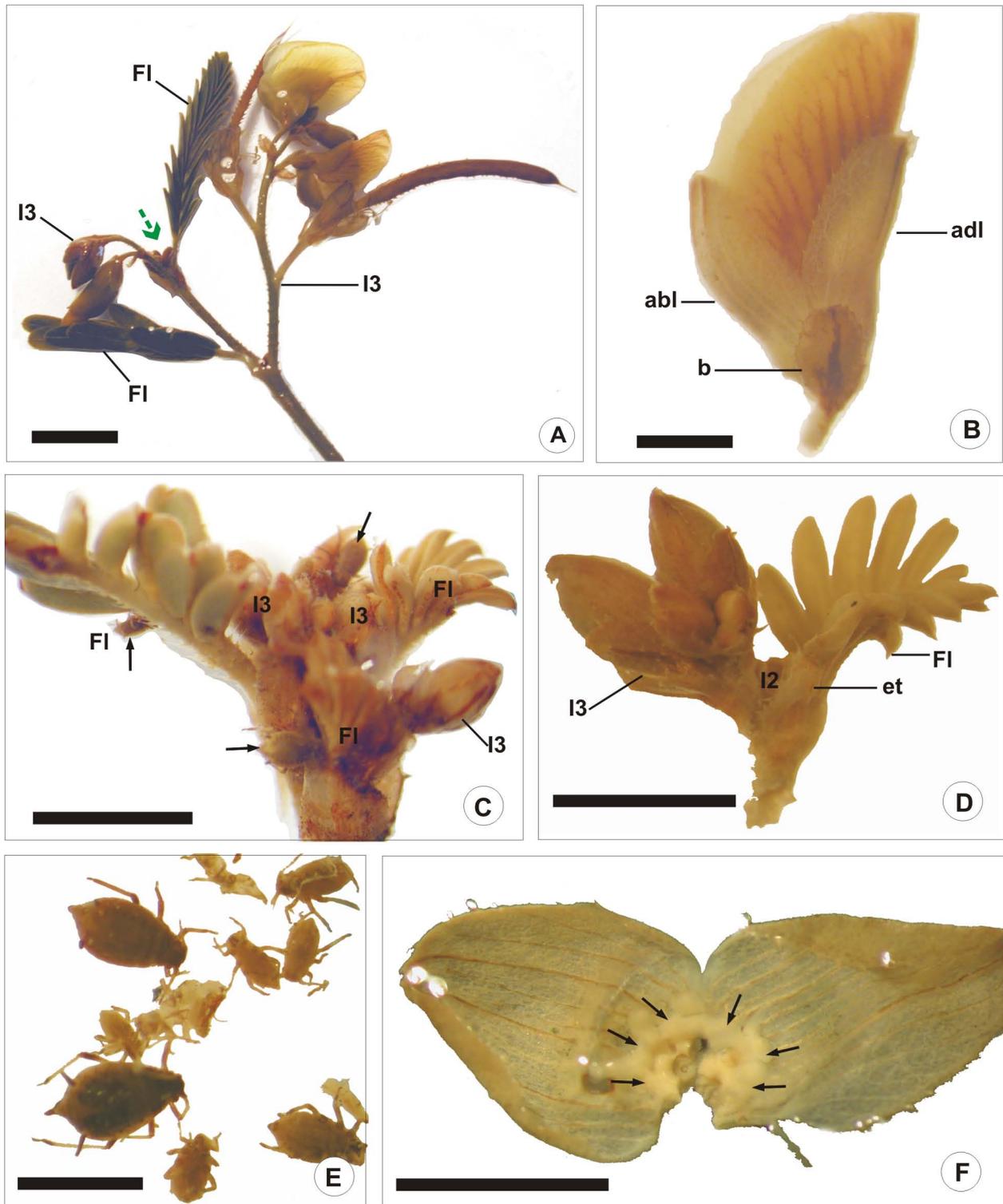


Figura 3: Inflorescências, flores e afídios parasitas de *A. sensitiva*. A: Duas inflorescências de terceira ordem podem ser observadas. A seta verde aponta o ápice da inflorescência de segunda ordem com uma inflorescência de terceira ordem sendo iniciada. B: Botão floral. C, D: Folhas da inflorescência de segunda ordem com inflorescências de terceira ordem recém formadas em suas axilas. Os pedúnculos das inflorescências de terceira ordem ainda são curtos e o meristema apical da inflorescência de segunda ordem não pode ser visualizado. As setas apontam afídeos. E: Afídeos encontrados nas inflorescências. F: Face interna do cálice, com um pequeno hipanto aparente (setas). abl: lobo abaxial do cálice; adl: lobo adaxial do cálice; b: bractéola; et: estípula; FI: folha/primórdio foliar; I2: ápice da inflorescência de segunda ordem; I3: inflorescências de terceira ordem. A: Barra = 6mm. B: Barra = 1,5mm. C, D: Barras = 2mm. E: Barra = 1mm. F: Barra = 2,5mm.



Figura 4: Hábito, flor e fruto de *A. falcata*. A: Hábito-erva prostrada (retirado de Oliveira, 2002). B, C: Inflorescência racemosa, pedicelos mais altos que o eixo da inflorescência. D: Bractéola, bráctea e estípula não peltadas, da esquerda para a direita. E: Tubo do cálice com 5 dentes. F: Face abaxial do estandarte pubescente e tênue. G: Face abaxial da ala com escultura superior basal-central. H: Face abaxial de uma das pétalas que constituem a quilha. I: Tubo de estames dentro da quilha, com pétalas aderidas acima e abaixo dos estames. J: Um dos lados do tubo de estames, com 5 filetes fusionados. K: Gineceu com estipe e ovário pubescentes e estilete comprido. L: Fruto falcado com artículos separados por ístmos. A: Barra = 1,92cm. B: Barra = 1cm. C: Barra = 0,25cm. D: Barras = 0,1cm. E-K: Barras = 0,25cm. L: Barra = 0,5cm.



Figura 5: Hábito, flor e fruto de *A. sensitiva*. A: Parte da planta (retirado de Oliveira, 2002). B: Inflorescências racemosas de terceira ordem na axila das folhas . C: Flor aberta com cálice bilabiado reflexo, estandarte reflexo e esculturas das alas aparentes. D: Bractéola, bráctea e estípula da esquerda para a direita, brácteas e estípulas peltadas. E: Vista dorsal do cálice bilabiado com três dentes muito sutis no lobo abaxial e dois no adaxial. F: Face abaxial do estandarte bastante reflexo e glabro. G: Face abaxial da ala com esculturas superiores-centrais-distais. H: Face abaxial de uma das pétalas que constituem a quilha. I: Tubo de estames aderido ao receptáculo e dentro da quilha, que possui pétalas fusionadas acima deles. J: Um dos lados do tubo de estames com 5 filetes fusionados, separação abaxial e adaxial aparentes. K: Gineceu com ovário híspido e muito curvo, estilete curto. L: Fruto com artigos unidos por septos transversais. A: Barra = 1,8cm. B, C: Barras = 0,25cm. D: Barra = 0,1cm. E-I: Barras = 0,25cm. J: Barra = 0,1cm. K: Barra = 0,2cm. L: Barra = 0,5cm.

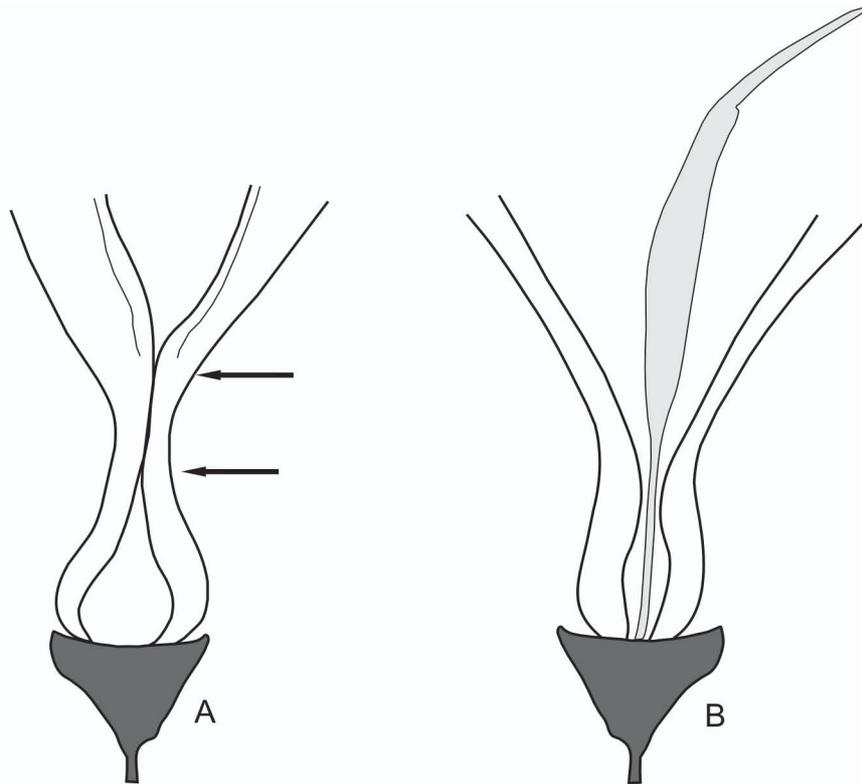


Figura 6: Esquema do tubo estaminal de *A. falcata*. A: Lado ventral/adaxial do tubo. As setas apontam a região de adesão na porção média dos dois conjuntos de estames. Gineceu não representado. B: Lado dorsal/abaxial do tubo, não existe fusão entre os conjuntos de estames.

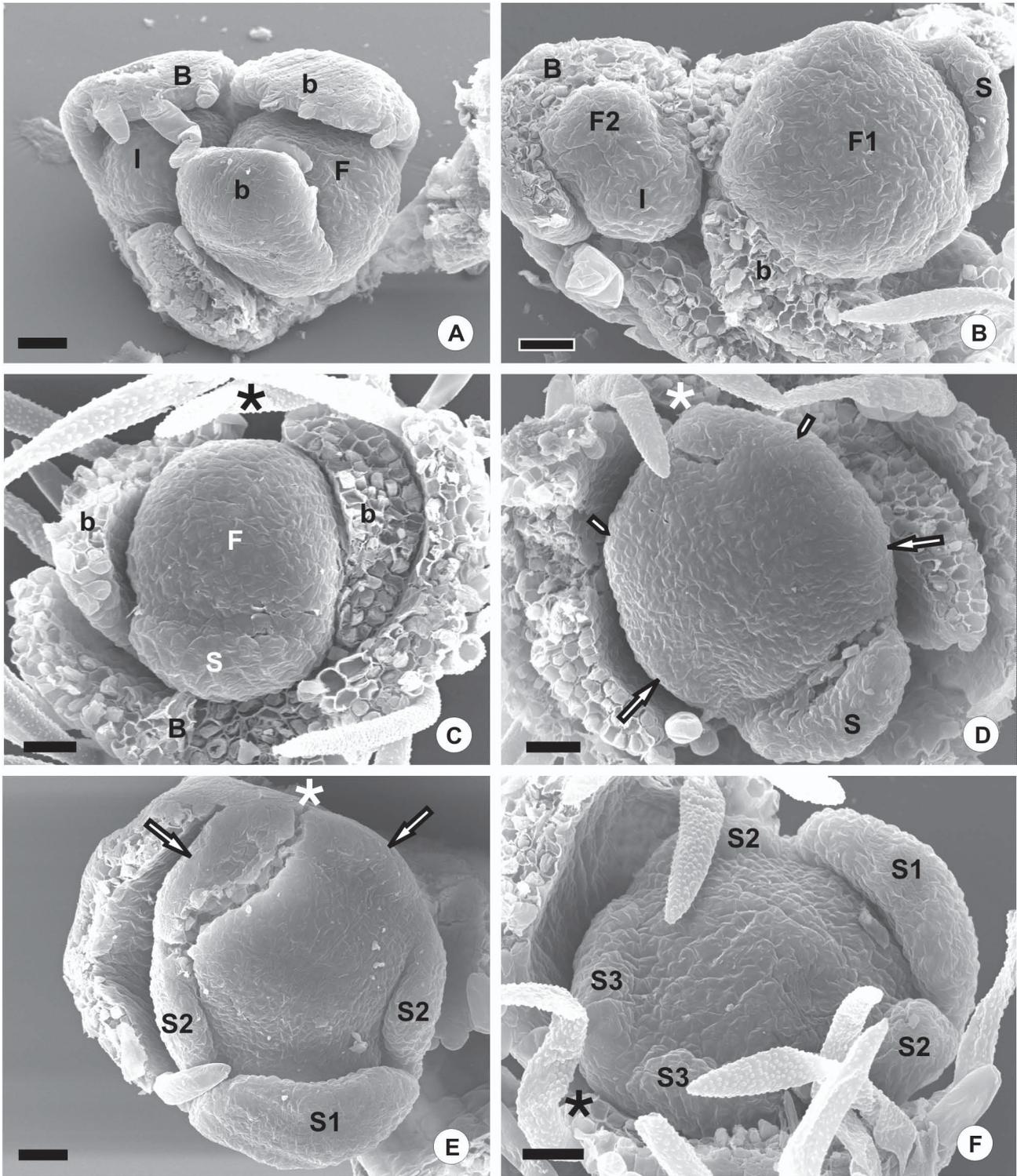


Figura 7: Origem do primórdio floral e sépalas em *A. falcata*. A: Ápice da inflorescência com bráctea e primórdio floral com bractéolas. B: Ápice da inflorescência originando primórdio floral globular na axila de uma bráctea ao lado de um primórdio floral mais desenvolvido. C: Primórdio floral globular iniciando o primórdio de sépala abaxial mediano. D: Primórdio floral achatado com a sépala abaxial mediana presente. As setas indicam a iniciação dos primórdios de sépalas laterais e as pontas de seta indicam arestas adaxiais no meristema, onde surgirão as sépalas adaxiais. E: As setas indicam os primórdios de sépalas adaxiais sendo iniciados, os laterais já estão conspícuos. F: Todas as sépalas já estão presentes e o primórdio floral permanece achatado. b: bractéola; B: bráctea; F: primórdio floral-os números após o F indicam o primórdio mais velho e o mais jovem; I: ápice da inflorescência; S e S1: sépala abaxial mediana; S2: sépalas laterais; S3: sépalas adaxiais. O asterisco indica a o lado ventral/adaxial ou o eixo da inflorescência. Barras = 20µm.

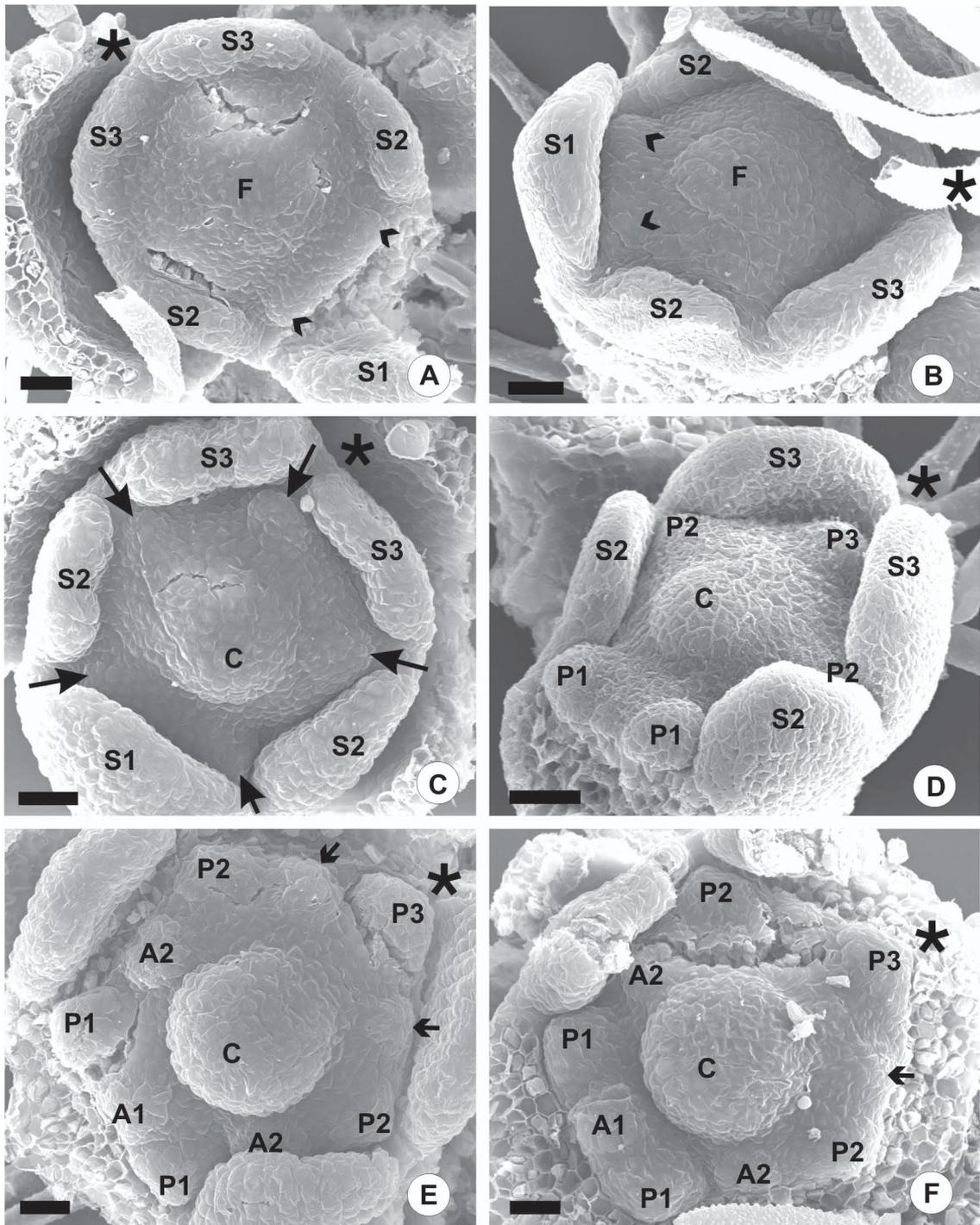


Figura 8: Desenvolvimento de pétalas, carpelo e verticilo antesépalo de estames em *A. falcata*. A: A sépala abaxial mediana foi quebrada para a observação da iniciação dos primórdios de pétalas abaxiais (pontas de seta). B: Iniciação dos primórdios de pétalas abaxiais (pontas de seta) e uma sutil elevação no centro do primórdio floral que originará o carpelo. C: Todos os primórdios de pétalas estão presentes (setas) e o carpelo apresenta-se proeminente no centro meristema. D: A sépala abaxial foi retirada para uma melhor visualização do primórdio floral. Os primórdios de pétalas aumentaram em volume e os laterais têm crescimento retardado em relação aos demais. E e F: Algumas sépalas foram retiradas para uma melhor visualização do primórdio. Os primórdios de estames abaxial e laterais do verticilo antesépalo já estão presentes e os adaxiais estão sendo iniciados (setas), o carpelo é mais alto na face abaxial. A1: estame abaxial do verticilo antesépalo; A2: estames laterais do verticilo antesépalo; C: carpelo; F: primórdio floral; P1: pétalas abaxiais; P2: pétalas laterais; P3: pétala adaxial; S1: sépala abaxial mediana; S2: sépalas laterais; S3: sépalas adaxiais. O asterisco indica a o lado ventral ou o eixo da inflorescência. Barras = 20µm.

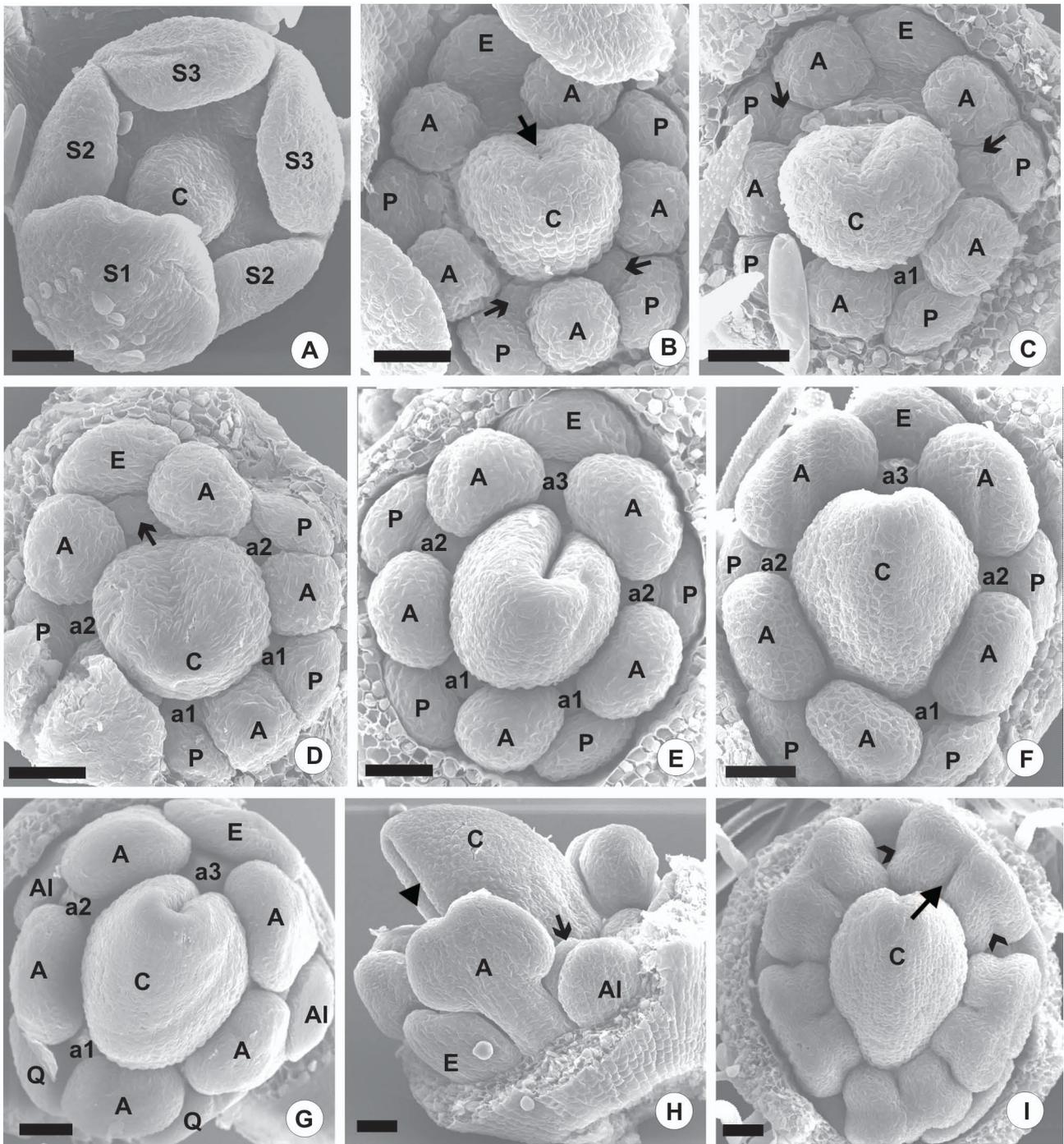


Figura 9: Desenvolvimento do verticilo antepétalo de estames e anteras do verticilo antesépalo de *A. falcata*. A: Verticilo de sépalas cobrindo quase todo o primórdio floral, tricomas sendo formados na face dorsal da sépala abaxial. B: Iniciação dos estames abaxiais do verticilo antepétalo (setas de ponta aberta). Fenda carpelar conspícua (seta de ponta fechada). C: Iniciação dos estames laterais do verticilo antepétalo (setas). D: Iniciação do estame adaxial do verticilo antepétalo (seta). E: Estames do verticilo antesépalo com porção distal dilatada. Primórdio floral completo, as margens do carpelo quase se tocam. Fenda carpelar oblíqua. F: Estames adaxiais do verticilo antesépalo maiores que os demais. G e H: Pétalas achatadas e convexas na face dorsal, fusão das margens do carpelo (ponta de seta) e estames do verticilo antesépalo com filete e anteras diferenciados. A seta aponta um primórdio de estame do verticilo antepétalo. I: A seta aponta o sulco ventral na antera que delimita as tecas e as cabeças de seta apontam sulcos laterais que separam os microsporângios e indicam o local da deiscência. a1: estames abaxiais do verticilo antepétalo; a2: estames laterais do verticilo antepétalo; a3: estame adaxial do verticilo antepétalo; A: estames do verticilo antesépalo; Al: alas; C: carpelo; E: estandarte; P: pétalas; Q: pétalas que constituem a quilha; S1: sépala abaxial mediana; S2: sépalas laterais; S3: sépalas adaxiais. Barras = 30µm.

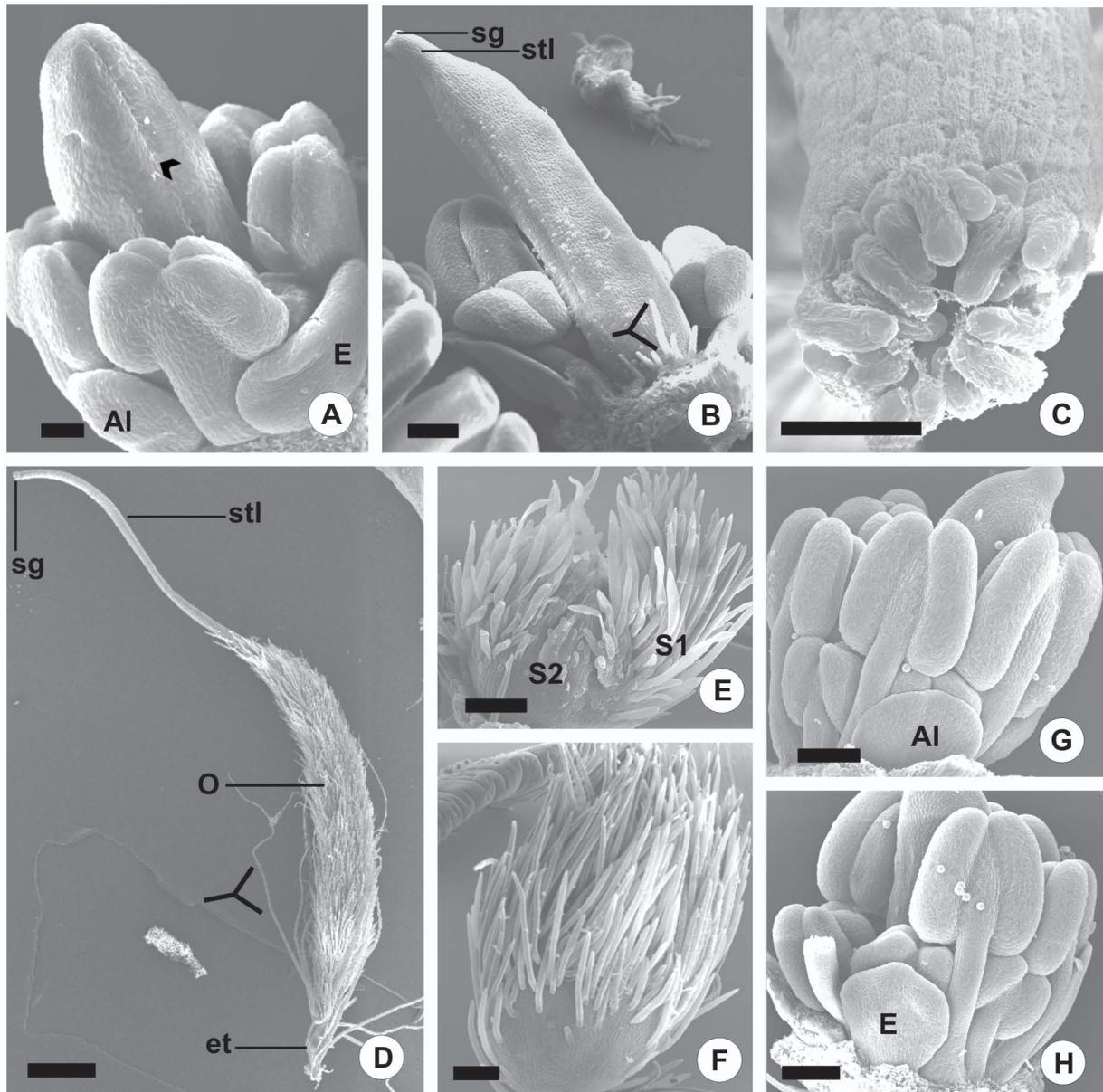


Figura 10: Desenvolvimento do cálice, corola, estames e carpelo de *A. falcata*. A: A ponta de seta indica a região de sutura do carpelo. Pétalas expandidas lateralmente. B: Início do desenvolvimento do estilete e do estigma, tricomas do estipe (apontados pelo Y) crescem rapidamente antes mesmo de este se alongar. C: Estigma papiloso. D: Gineceu durante a antese. Tricomas do estipe apontados pelo Y. E, F: Todas as sépalas já apresentam tricomas, sendo bem distintas uma da outra em E. G e H: Pétalas achatadas e convexas na face dorsal, o estandarte possui ápice acuminado, os estames do verticilo antepétalo com filete e anteras diferenciados. Al: alas; E: estandarte; et: estipe; O: ovário; S1: sépala abaxial mediana; S2: sépalas laterais; sg: estigma; stl: estilete. A, C: Barras = 30 μ m. B, E-H: Barras = 100 μ m. D: Barra = 500 μ m.

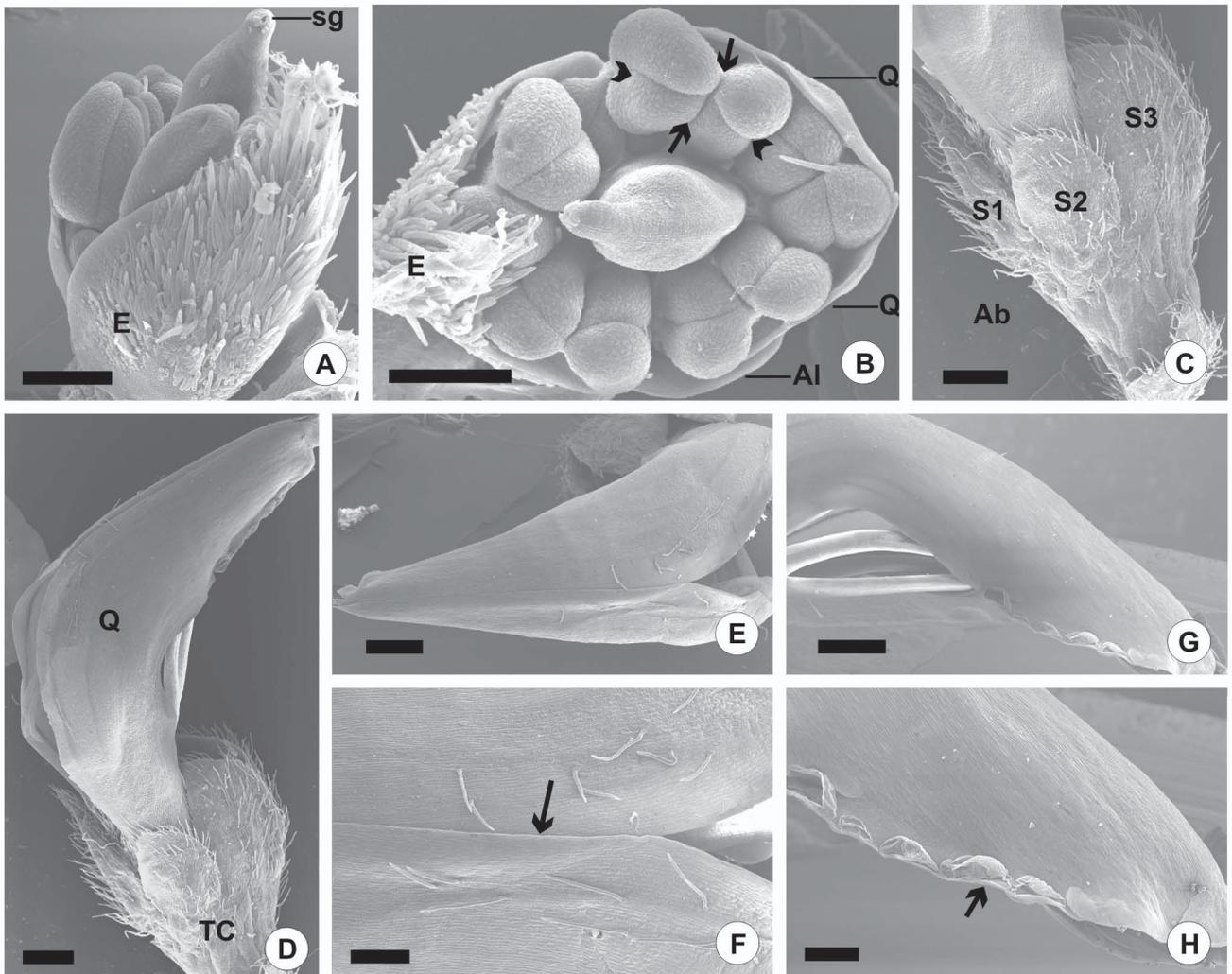


Figura 11: Cálice e corola de *A. falcata*. A: Estandarte pubescente na face abaxial, estigma já aparente. B: Anteras do verticilo antesépalo totalmente desenvolvidas com as setas apontando os sulcos dorsal e ventral e as pontas de seta os sulcos laterais. Já se pode perceber uma ala sobrepondo uma pétala da quilha. C: Tubo do cálice bem desenvolvido com tricomas predominantemente nos dentes. Os dentes das sépalas laterais são os menores. D: Cálice aparente e pétalas que constituem a quilha fusionadas acima e abaixo dos estames, envolvendo-os. E: Adesão entre as pétalas que constituem a quilha acima dos estames. F: Detalhe de E. A seta aponta o local da adesão que constitui apenas uma sobreposição entre as margens das pétalas. G e H: União das pétalas que formam a quilha abaixo dos estames. A seta aponta um entrelaçamento das margens das pétalas. Ab: lado abaxial da flor; Al: alas; E: estandarte; Q: pétalas que constituem a quilha; S1: sépala abaxial mediana; S2: sépalas laterais; S3: sépalas adaxiais; sg: estigma; TC: tubo do cálice. A, B, F, H: Barras = 200µm. C-E, G: Barras = 500µm.

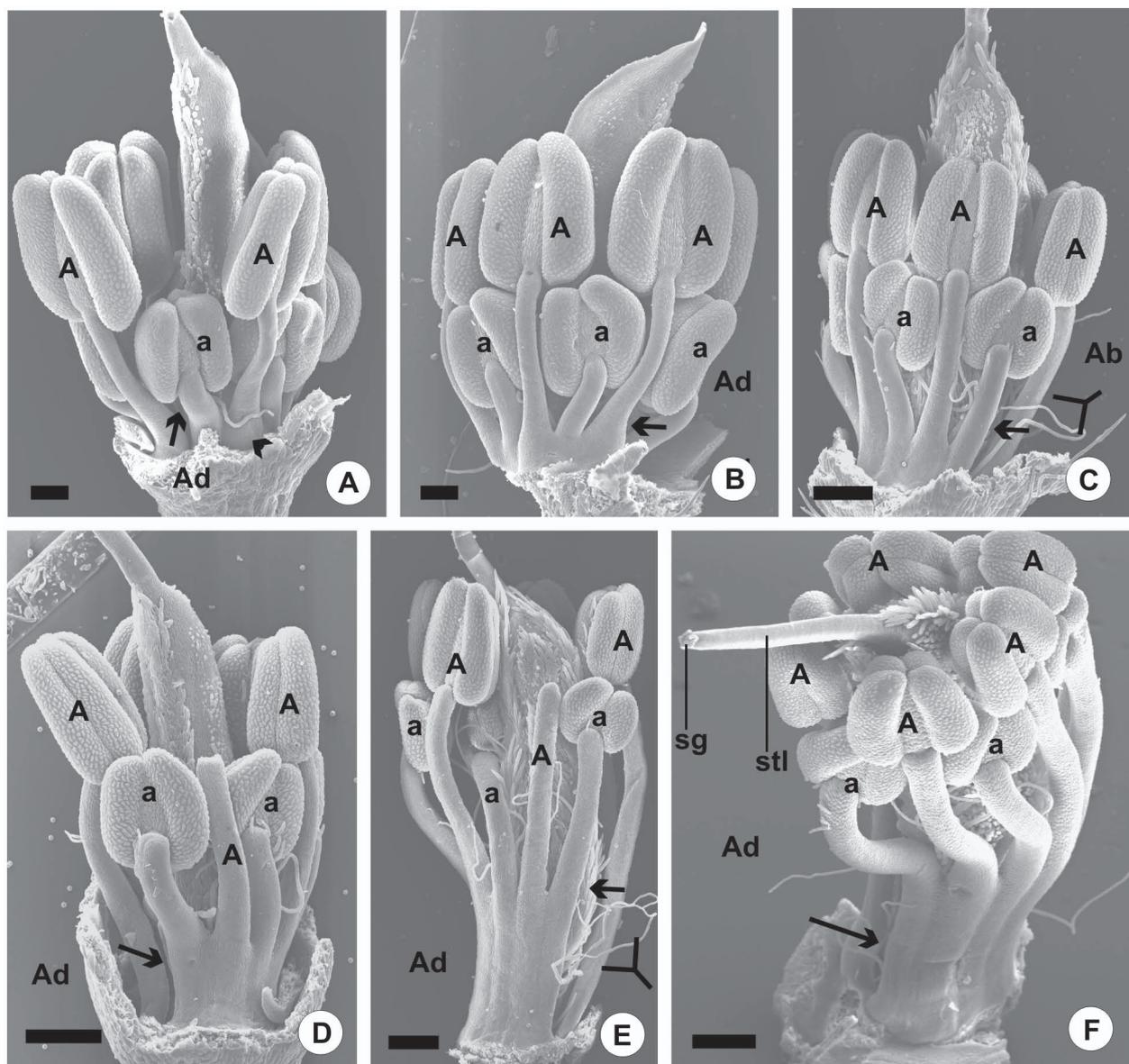


Figura 12: Fusão dos estames de *A. falcata*. A-C: Crescimento intercalar da base dos filetes. A: A cabeça de seta aponta uma base de filete dilatada. A seta aponta a abertura adaxial. B: A seta aponta a abertura adaxial. C: A seta aponta a abertura abaxial. O Y indica os tricomas do estipe. Figuras D-F: Filetes com as bases conspicuamente fusionadas. As setas apontam as aberturas abaxial e adaxial. O Y indica os tricomas do estipe. a: estames do verticilo antepétalo; A: estames do verticilo antesépalo; Ab: lado abaxial da flor; Ad: lado adaxial da flor; sg: estigma; stl: estilete. A, B: Barras = 100µm. C-F: Barras = 200µm.

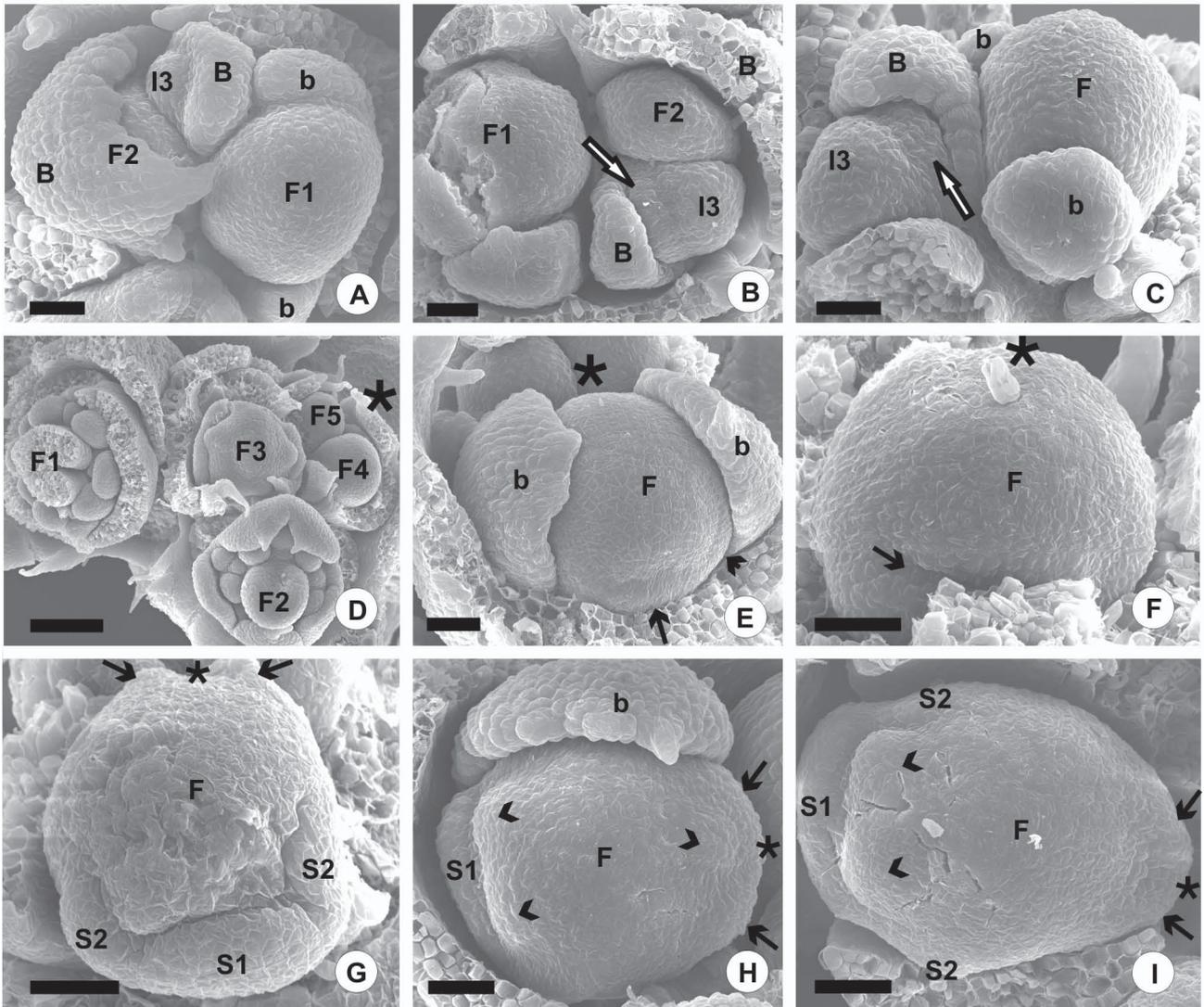


Figura 13: Inflorescência, desenvolvimento do promórdio floral e sépalas em *A. sensitiva*. A: Primórdio floral com bractéolas e ápice da inflorescência originando uma bráctea. B: Primórdio floral, na axila de uma bráctea, com forma oval convexa. O ápice da inflorescência origina um novo primórdio floral alongado (seta) na axila de outra bráctea. C: Primórdio floral com bractéolas e ápice da inflorescência originando um outro primórdio alongado (seta) na axila de uma bráctea. D: Inflorescência com flores de filotaxia sub-dística, as flores estão em estádios sucessionais do desenvolvimento. E: Primórdio floral globular convexo originando a sépala abaxial mediana (seta) e as sépalas laterais (ponta de seta) que formam uma crista no lado abaxial do primórdio. F: Primórdio floral com sépala abaxial mediana bem delimitada por um sulco (seta). G-I: Iniciação dos primórdios de sépalas adaxiais (setas). O primórdio floral alonga-se no sentido dorso-ventral tornando-se polarizado. Iniciação dos primórdios abaxiais de pétalas (pontas de seta). B: bráctea; b: bractéola; F: primórdio floral, os números após o F mostram quais os primórdios florais mais velhos e mais jovens; I3: ápice da inflorescência de terceira ordem; S1: sépala abaxial mediana; S2: sépalas laterais. O asterisco indica a o lado ventral ou o eixo da inflorescência. Barras = 30µm.

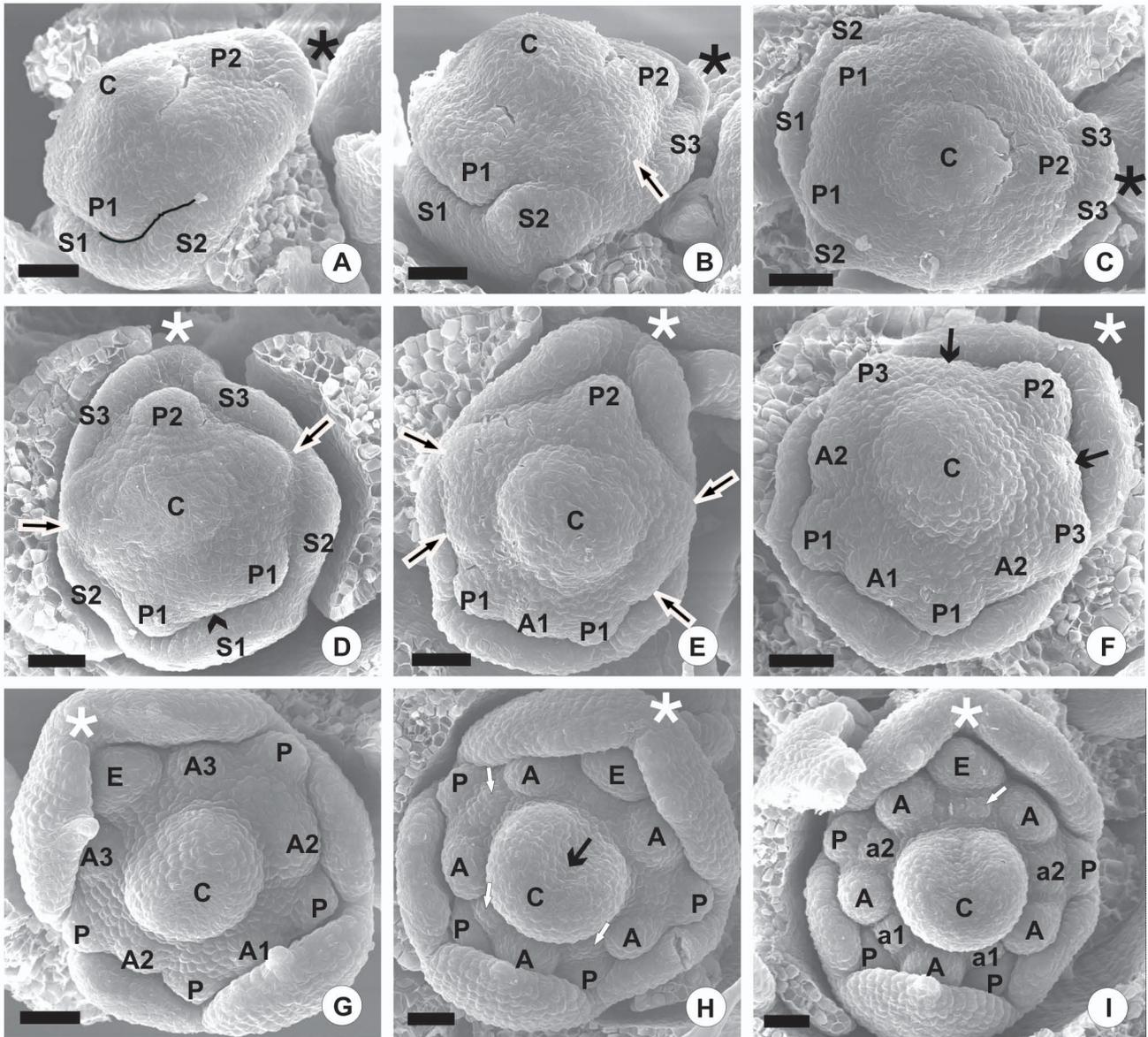


Figura 14: Desenvolvimento de pétalas, estames e carpelo em *A. sensitiva*. A, B: Vista lateral do primórdio floral. Fica nítida a tendência de formação de dois lobos no cálice pela presença de um espaço (seta) entre as sépalas laterais e adaxiais. Pétalas abaxiais e adaxial já iniciadas. Uma sutil elevação no centro do primórdio floral indica a iniciação do carpelo. C: Mesmo primórdio da figura B, porém em vista frontal. D: Cálice bem desenvolvido com lobos abaxial e adaxial distintos. Iniciação das pétalas laterais (setas) e do estame abaxial do verticilo antesépalo (ponta de seta). E: Carpelo muito proeminente. Estame abaxial do verticilo antesépalo presente. Iniciação de pétalas laterais e estames laterais do verticilo antesépalo concomitante (setas). F: Iniciação dos estames adaxiais do verticilo antesépalo (setas). G: Verticilo antesépalo de estames completo, estandarte diferenciando-se das demais pétalas e ápices das sépalas tornando-se acuminados, lobos do cálice conspícuos. H: Iniciação dos estames abaxiais e laterais do verticilo antepétalo de estames (setas brancas). Formação da fenda carpelar (seta preta). I: Iniciação do estame adaxial do verticilo antepétalo (seta branca). a1: estames abaxiais do verticilo antepétalo; a2: estames laterais do verticilo antepétalo; A: estames do verticilo antesépalo; A1: estame abaxial do verticilo antesépalo; A2: estames laterais do verticilo antesépalo; A3: estames adaxiais do verticilo antesépalo; C: carpelo; E: estandarte; P: pétalas; P1: pétalas abaxiais; P2: pétala adaxial; P3: pétalas laterais; S1: sépala abaxial mediana; S2: sépalas laterais; S3: sépalas adaxiais. O asterisco indica a o lado ventral ou o eixo da inflorescência. Barras = 30µm.

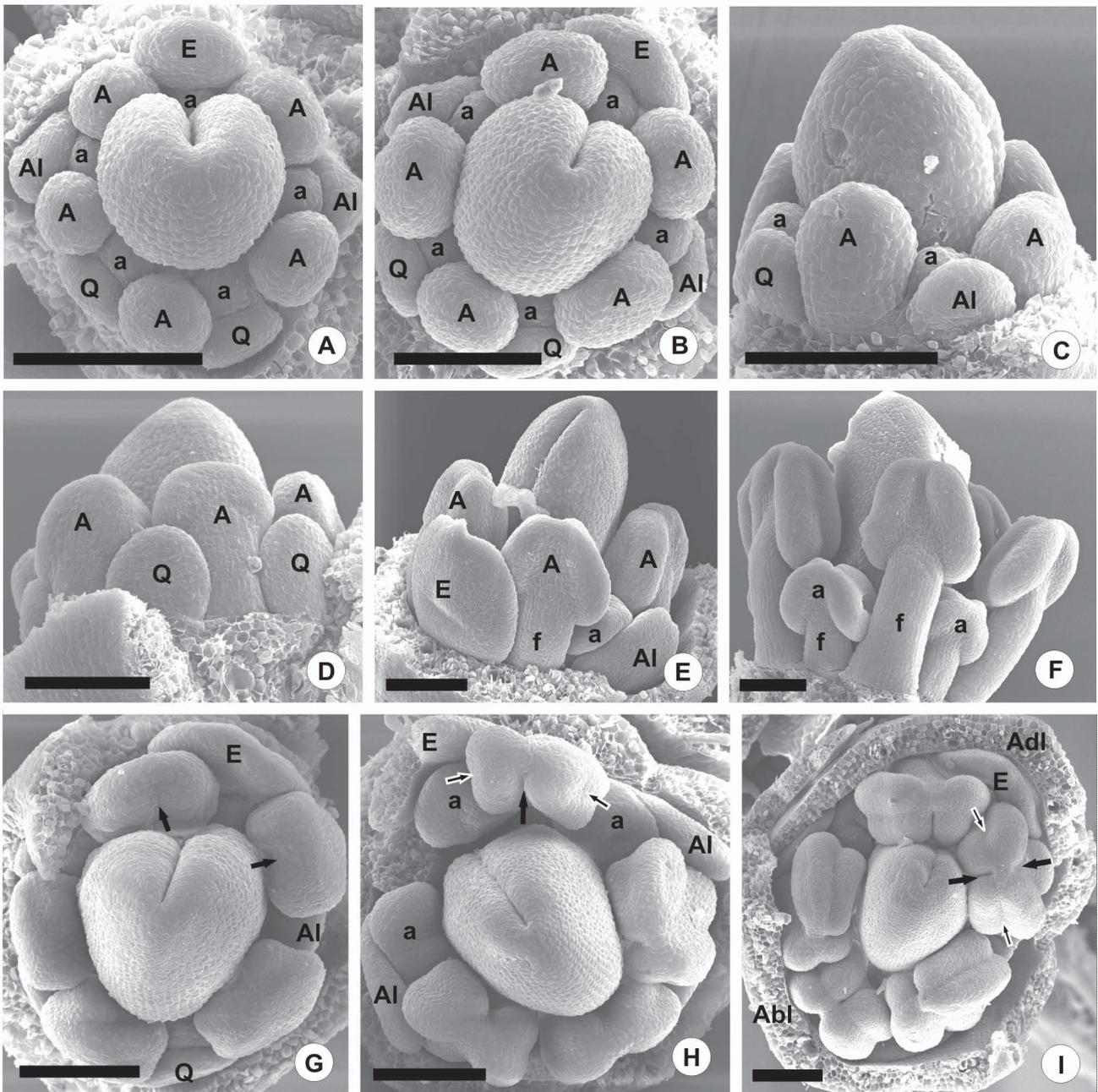


Figura 15: Desenvolvimento de pétalas, estames e carpelo de *A. sensitiva*. As sépalas foram retiradas para uma melhor visualização das demais peças florais. A: Primórdio floral completo; as margens do carpelo quase se tocam. As alas ficam muito inclinadas para o lado abaxial. B: O estandarte fica achatado e mais largo que as demais pétalas, a porção distal dos estames do verticilo antesépalo se dilata indicando a formação das anteras. C: Vista lateral de um primórdio floral no mesmo estágio do da figura A. D: Filete e antera dos estames do verticilo antesépalo distintos. E: Alas fortemente inclinadas para o lado abaxial e o estandarte muito largo com seu ápice acuminado. Estames do verticilo antepétalo aparentes devido à inclinação da ala. F: Estames do verticilo antepétalo com antera e filetes totalmente diferenciados. G e H: Fusão das margens do carpelo e formação de um sulco ventral que delimita as tecas (seta preta) e de sulcos laterais que separam os microsporângios e indicam o local da deiscência (seta de contorno branco). G: Fenda carpelar oblíqua. I: Além do sulco ventral, também pode ser observado um sulco na região dorsal da antera (setas pretas) e os sulcos laterais (setas de contorno branco). Lobo abaxial do cálice sobrepondo o adaxial. a: estames do verticilo antepétalo; A: estames do verticilo antesépalo; Abl: lobo abaxial do cálice; Adl: lobo adaxial do cálice; Al: alas; E: estandarte; f: filete; Q: pétalas que irão constituir a quilha. Barras = 100µm.

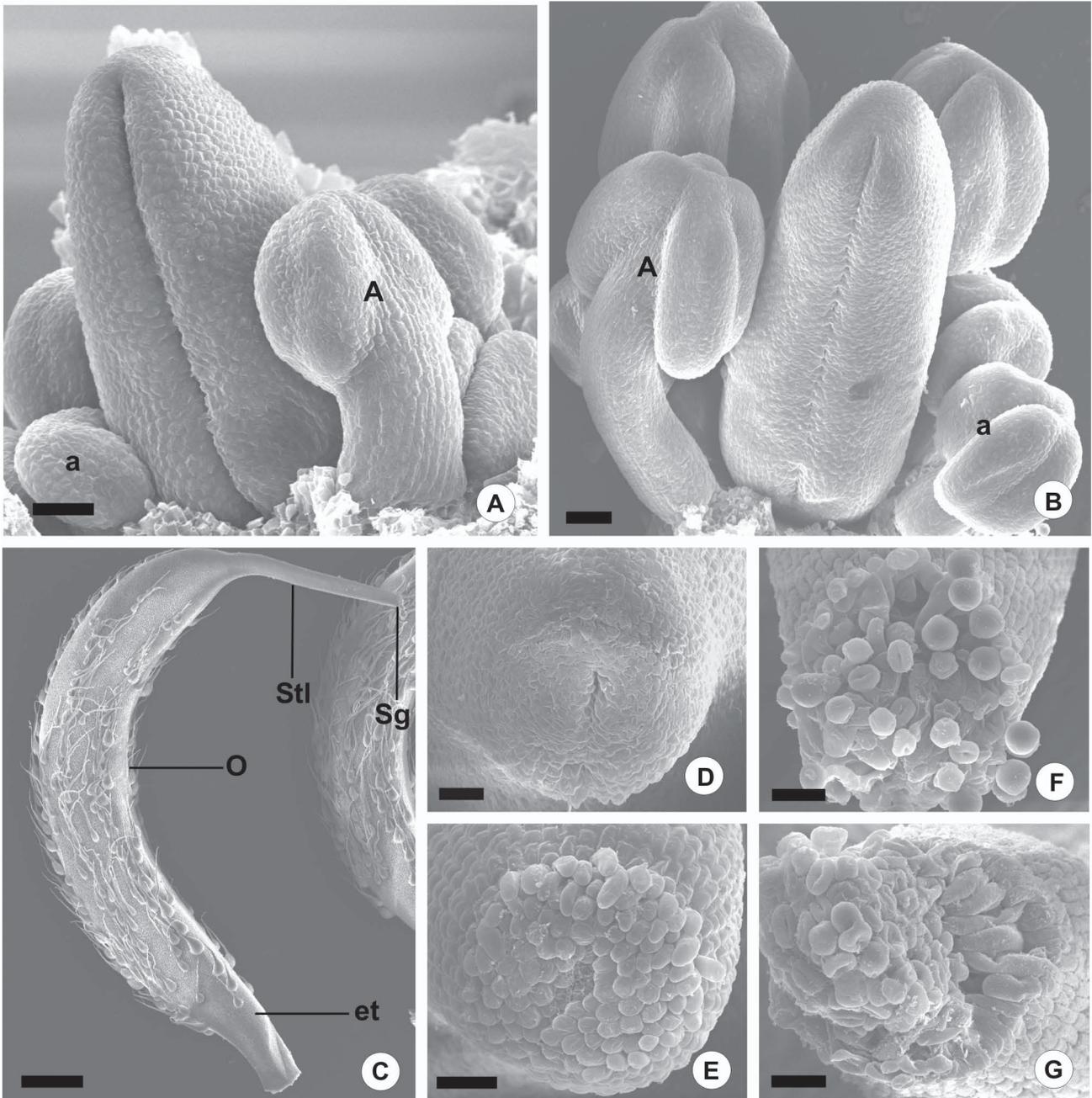


Figura 16: Fechamento do carpelo e desenvolvimento do estigma de *A. sensitiva*. A: Fenda carpelar começando a se fechar. Estame do verticilo antepétalo parece desenvolver os microsporângios antes mesmo de diferenciar o filete. B: Margens do carpelo totalmente fundidas e estame do verticilo antepétalo totalmente desenvolvido. C: Gineceu muito curvo com estipe e estilete curtos e ovário hispiduloso. D, E: Desenvolvimento das papilas estigmáticas, estigma quase maciço, observar o pequeno orifício. F, G: Estigma de flor já polinizada, a massa de pólen impede a visualização das papilas estigmáticas na maturidade. a: estames do verticilo antepétalo; A: estames do verticilo antesépalo; et: estipe; O: ovário; Sg: estigma; Stl: estilete. A, B: Barras = 100µm. C: Barra = 500µm. D-G: Barras = 20µm.

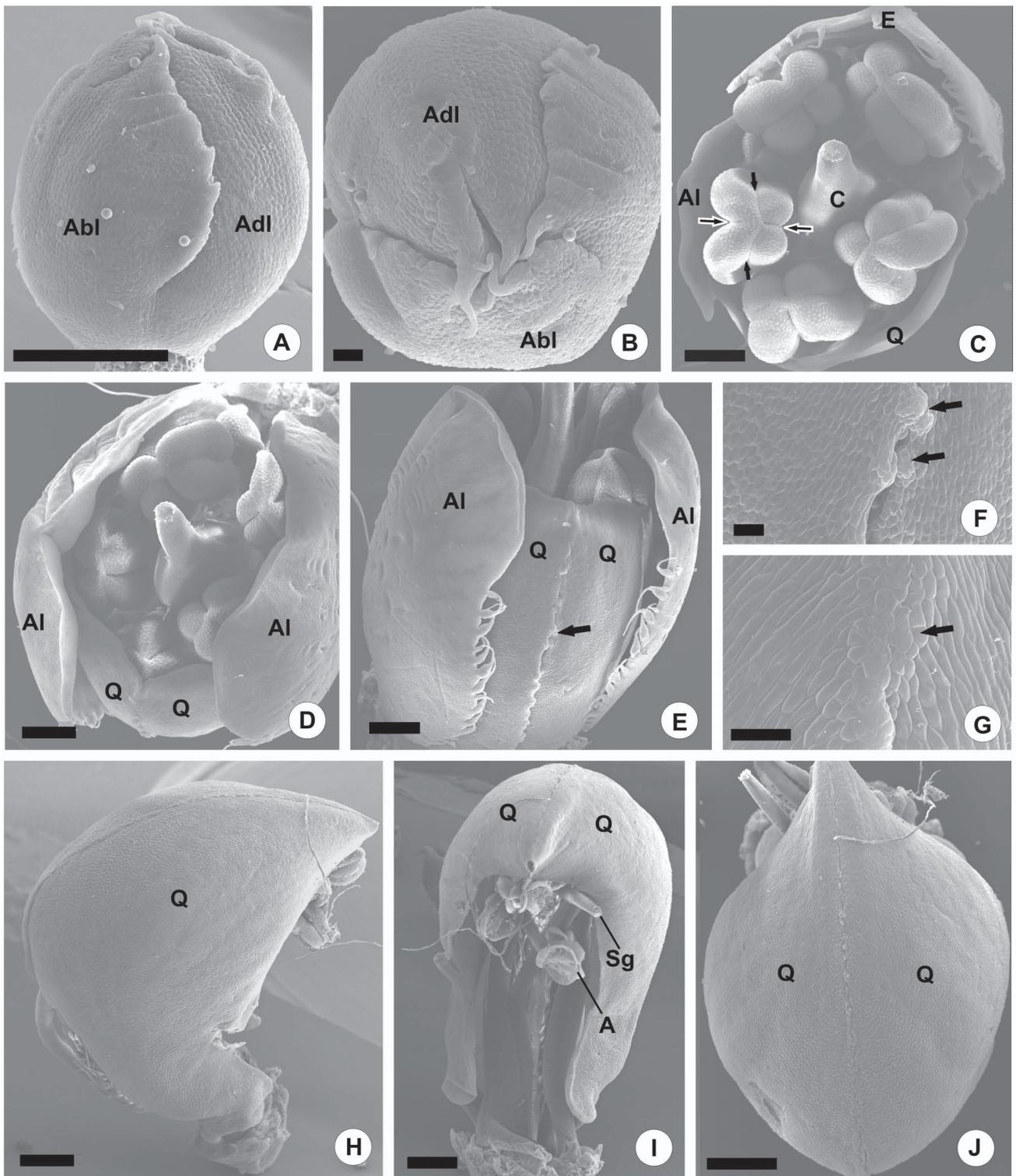


Figura 17: Cálice e corola de *A. sensitiva*. A: Vista lateral do botão, o lobo abaxial do cálice sobrepõe o adaxial, uma discreta união na base pode ser distinta. B: Os dentes do cálice, que representam a localização das sépalas, estão visíveis. C: Estandarte com margens hispíduladas, uma das alas está sobrepondo uma das pétalas que formará a quilha. Todos os sulcos das anteras já estão presentes, sulcos ventral e dorsal (setas de contorno branco) e sulcos laterais (setas pretas). D: As alas sobrepõe as pétalas da quilha que já estão fundidas antes mesmo de se curvarem sobre o estames. E: Alas com margens hispíduladas. A seta aponta a região de fusão das pétalas que vão compor a quilha. F, G: Detalhes da figura E. F: Grupos de células de uma das margens da pétala que compõe a quilha crescendo sobre a margem da outra pétala (seta). G: A seta aponta uma região efetivamente fusionada das margens das pétalas que formam a quilha. H: Visualiza-se a extensão da quilha já com as pétalas fusionadas. I: Quilha sobrepondo os estames e o gineceu. Quase não há fusão abaixo dos estames. J: Detalhe da região fusionada das pétalas da quilha. A: estame com antera após a deiscência; Abl: lobo abaxial do cálice; Adl: lobo adaxial do cálice; Al: alas; C: carpelo; E: estandarte; Q: pétalas constituintes da quilha; Sg: estigma. A, C-E: Barras = 200µm. B, F, G: Barras = 30µm. H-J: Barras = 500µm.

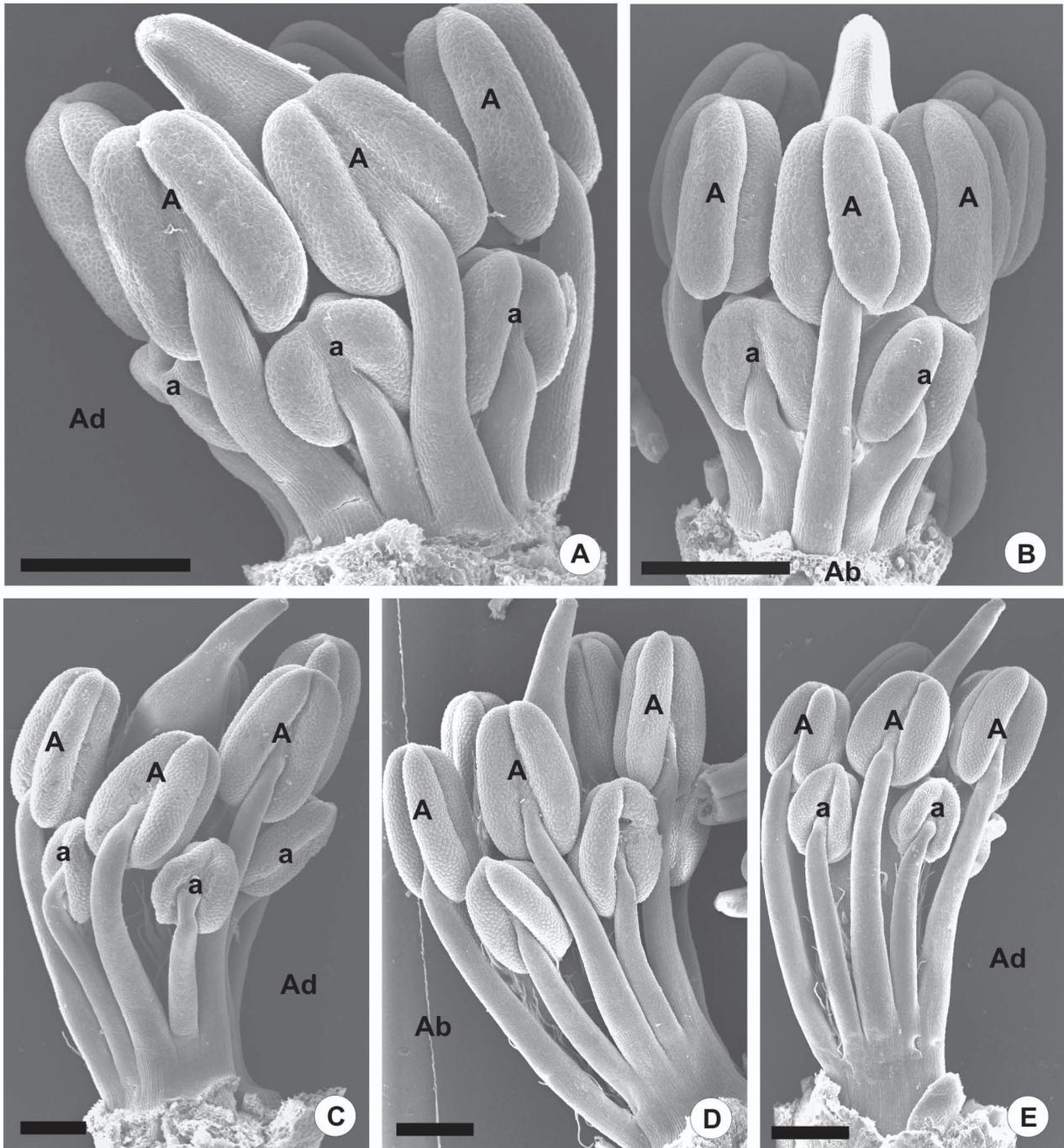


Figura 18: Fusão dos filetes de *A. sensitiva*. A-C: Crescimento intercalar da base dos filetes. A, C: Os estames já estão claramente encurvados para o lado adaxial da flor. B: O estame abaxial do verticilo antesépalo demora mais a se fundir aos demais. D, E: Filetes com as bases nitidamente fusionadas. a: estames do verticilo antepétalo; A: estames do verticilo antesépalo; Ab: lado abaxial da flor; Ad: lado adaxial da flor. Barras = 200µm.

4 - Discussão

Em Leguminosae, o tipo básico de inflorescência é o racemo, mas mudanças evolutivas levaram a pseudoracemos em cinco tribos de Papilionoideae e cimosas em alguns grupos (Tucker, 1999). As espécies de *Aeschynomene* analisadas neste trabalho apresentam um padrão homotético de desenvolvimento da inflorescência, segundo os conceitos de Troll (Weberling, 1989), onde o eixo principal ou de primeira ordem não forma racemo terminal, permanecendo com crescimento vegetativo. Além disso, as espécies diferem por formar racemos laterais de segunda ordem em *A. falcata* e de terceira ordem em *A. sensitiva*. A observação do desenvolvimento de ramos de ordens sucessivas de *Trifolium pratense* mostra que o número de inflorescências depende da longevidade e vigor do ramo floral principal (Picklum, 1954). Em *A. falcata*, a raquis e os pedicelos alongam-se bastante durante a maturação das flores, o que favorece que elas sejam vistas pelos polinizadores, já que as plantas são rasteiras e geralmente encontradas sob gramíneas (Figuras 1A-C). Em *A. sensitiva*, à medida que o eixo de uma inflorescência se alonga, a sua folha axilar cresce e fica nítida a distinção entre as inflorescências de terceira ordem.

As flores das duas espécies estudadas são típicas de Leguminosae: pentâmeras, com 21 partes em verticilos alternados: 5 sépalas, 5 pétalas, 10 estames em dois verticilos, um externo ou antesépalo e outro interno ou antepétalo e um único carpelo central. O papel de proteção da flor é assumido por diferentes estruturas em diferentes estádios de seu desenvolvimento: brácteas, bractéolas ou sépalas. Essas estruturas tendem a funcionar apenas por um curto período de tempo, sendo a função passada a outra estrutura no decorrer do desenvolvimento (Tucker, 1992).

A. falcata e *A. sensitiva* apresentam a sépala abaxial mediana, mas este caráter pode variar entre os táxons, como observado em Caesalpinioideae (Tucker, 1987). *A. falcata* apresenta o desenvolvimento típico do cálice em Papilionoideae, com a formação de um tubo 5 partido, com os ápices das sépalas livres. A ocorrência de uma saliência ou crista no início da formação do cálice em *A. sensitiva* já indica a fusão por crescimento intercalar das margens das sépalas abaxial e laterais, bem como das adaxiais separadamente. A fusão precoce entre os primórdios de sépalas observada em *A. sensitiva* também foi observada em *Pisum sativum* (Tucker, 1989a), sendo que nesta espécie todos os primórdios se fusionam formando um cilindro, enquanto em *A. sensitiva* os primórdios se unem formando dois lobos (um abaxial e outro adaxial).

O cálice bipartido observado em *A. sensitiva* é um caráter compartilhado com todas as outras espécies da subtribo Aeschynomeninae, sendo uma das principais características que a sustenta, estando ausente apenas na secção *Ochopodium* do gênero *Aeschynomene*, separando esta secção do restante do gênero. O tipo de cálice observado em *A. falcata* é considerado sinapomórfico para o clado dalbergiíide (Klitgaard, 1999), enquanto o observado em *A. sensitiva* é considerado a mais notável derivação desta condição dentre os legumes dalbergiíides, ocorrendo apenas na subtribo Aeschynomeninae (Lavin *et al.*, 2001). Tucker (1987) destaca que a expressão precoce de caracteres ontogenéticos compartilhados entre espécies indica uma relação filogenética forte, como deve ser o caso do cálice bipartido de *A. sensitiva* compartilhado com o restante da subtribo Aeschynomeninae, o que confirma as análises de Lavin e colaboradores (2001). Em alguns legumes como *Psoralea pinnata* e *Bauhinia fassoglensis*, também ocorre um cálice altamente zigomórfico, mas raramente esta forte zigomorfia surge cedo no desenvolvimento (Tucker, 1987).

Prenner (2004) descreve seis diferentes tipos de iniciação do cálice: unidirecional modificado, simultâneo, unidirecional abaxial, bidirecional, com tendência a ser simultâneo e seqüencial. Além desses tipos, Moço (comunicação pessoal) observou o tipo unidirecional adaxial (inverso) em algumas espécies do gênero *Adesmia*. Segundo Prenner (2004), existe uma tendência à iniciação simultânea de sépalas em Papilionoideae baseado nos vários casos de iniciação de sépalas que se mostram diferentes do unidirecional abaxial. Se considerado que as sépalas laterais surgem concomitantemente à abaxial em *A. sensitiva*, este padrão poderia representar uma tendência ao tipo simultâneo nesta espécie. Apesar de os tipos de iniciação do cálice em Papilionoideae serem considerados dispersos na filogenia do grupo (Prenner, 2004), a grande semelhança entre o cálice dos membros da secção *Aeschynomene* e subtribo Aeschynomeninae indica que este deve ser importante estado de caráter, além de a iniciação unidirecional abaxial encontrada em *A. falcata* estar presente em grupos basais da subfamília.

O afastamento dos lobos do cálice de *A. sensitiva* pode contribuir para que as pétalas laterais, que estão localizadas exatamente em frente ao espaço entre os lobos, sejam as últimas a serem iniciadas em seu verticilo. Dessa forma, a polaridade do cálice influenciaria na ordem assimétrica de iniciação das pétalas, fazendo com que os primórdios de pétalas laterais surjam tardiamente, o que, conseqüentemente, influenciaria a sobreposição entre a iniciação das pétalas e do verticilo antesépalo de estames.

O desenvolvimento tardio da corola durante a formação das anteras é comum entre as espécies de Papilionoideae (Tucker, 1989b) e observado nas duas espécies em estudo. Na maioria das flores de leguminosas, onde as pétalas possuem base e limbo, a base origina-se

tardamente, pouco antes da antese, através do alongamento da região proximal da pétala (Tucker, 1987), de forma que, a inclinação precoce das alas para o lado abaxial em *A. sensitiva* representa uma inclinação do limbo. Foram encontradas diferenças morfológicas significativas entre a corola de *A. falcata* e *A. sensitiva* relacionadas principalmente ao grau de dobramento do estandarte, ao formato e disposição das esculturas nas alas, à curvatura da quilha e seu tipo e região de fusão, entretanto, segundo Tucker (1987), a forma da corola é geralmente uniforme nos gêneros o que sugeriria que estas espécies não pertencem ao mesmo gênero. O estandarte pubescente, caráter diagnóstico para a secção *Ochopodium* (Fernandes, 1996), está presente em *A. falcata*, bem como em *M. villosum*- tribo Dalbergieae (Klitgaard, 1999), mas ausente em *A. sensitiva*, corroborando os estudos filogenéticos de Lavin *et al.* (2001).

Em Papilionoideae, as alas têm função de atrativo, plataforma de pouso para abelhas e como alavanca para deprimir e elevar a quilha (Stirton, 1981), possuindo esculturas características na face dorsal que apresentam variações entre espécies, gêneros e tribos (Stirton, 1981). Estas esculturas correspondem à polinização por abelhas (Tucker, 1994), e como o próprio nome se refere, serve como apoio para as patas destes insetos. Foram detectadas diferenças marcantes entre as alas das espécies em estudo, desde seu formato até a localização das esculturas lunares e sua exposição, o que pode evidenciar linhas evolutivas diferenciadas, bem como detalhes no mecanismo de polinização, já que o desenvolvimento evolutivo das alas pode refletir o desenvolvimento evolutivo da flor como um todo (Stirton, 1981). O padrão das esculturas detectado em *A. falcata* – superior basal central - é o mais comum dentre as Papilionoideae (Stirton, 1981) e o encontrado em outras espécies da secção *Ochopodium* (Oliveira, 2002), enquanto o detectado em *A. sensitiva* – superior central distal - é dos mais raros (Stirton, 1981) e o correspondente às espécies da secção *Aeschynomene* (Oliveira, 2002). Stirton enfatiza que a região da pétala coberta pelas esculturas é imparcialmente uniforme entre gêneros, mais um indício de que a secção *Ochopodium* não faz parte do gênero *Aeschynomene*. Aeschynomeneae e Adesmieae estão entre as tribos caracterizadas por esculturas nas alas, a tribo Dalbergieae ainda não foi bem estudada quanto a este caráter. As esculturas em forma de luas são quase restritas às tribos Crotalarieae, Aeschynomeneae e alguns gêneros de Genisteae e Dalbergieae (Stirton, 1981).

Em *A. sensitiva*, a fusão entre as margens das pétalas que compõe a quilha parece ser similar ao observado na maioria das Papilionoideae onde ocorre apressão, desdiferenciação, divisões celulares e o realinhamento das células na epiderme e mesofilo adjacentes (Tucker, 1992). Este tipo de fusão é bem mais efetivo que o observado em *A. falcata*, neste trabalho, e

M. villosum (Klitgaard, 1999), onde se vê apenas uma sobreposição das margens. O tubo formado pela quilha em *A. falcata* fica cheio de pólen, bem como a cavidade onde ficam os estames em *A. sensitiva*, permitindo o íntimo contato entre o pólen e o estigma, o que pode favorecer uma autopolinização. Este fenômeno, ainda não estudado para *A. falcata* e *A. sensitiva*, já foi verificado em *Aeschynomene americana*, pertencente à secção *Aeschynomene* (Mckellar *et al.*, 1991). A auto-polinização nesta espécie deve ocorrer principalmente devido à apresentação do pólen e a receptividade do estigma se darem antes das abelhas produtoras de mel estarem ativas no campo (Mckellar *et al.*, 1991). A tribo Aeschynomeneae é considerada predominantemente auto-compatível (Kalin Arroyo, 1981). Além de *A. americana* (Mckellar *et al.*, 1991), já foram estudadas espécies dos gêneros *Arachis*, *Stylosanthes*, *Zornia* e *Chaetocalyx* para este caráter (Kalin Arroyo, 1981). A presença de um mecanismo de disparo do pólen e a abertura de poucas flores por dia são estratégias reprodutivas que aumentam a probabilidade de ocorrer a polinização cruzada em espécies herbáceas auto-compatíveis. O fato de os gêneros de Dalbergieae serem auto-incompatíveis (Kalin Arroyo, 1981) sugere a importância de se verificar se há auto-incompatibilidade também em *A. falcata*, dada sua relação filogenética próxima com alguns gêneros desta tribo.

A morfologia papilionácea da corola está intimamente relacionada à função de cada pétala na polinização, o estandarte serve para a atração, a quilha para proteção da coluna estaminal e as alas, juntamente com a quilha, agem como plataforma de pouso para os polinizadores (Kalin Arroyo, 1981). O mecanismo de disparo do pólen domina a arquitetura floral como, por exemplo, estames unidos permitindo grande precisão de disparo, cálice marcadamente bilabiado fornecendo um bom suporte para a quilha durante o disparo, presença de aurículas que interconectam alas e quilha. As flores são disparadas pela pressão exercida pelo inseto quando este pousa sobre as alas e vai de encontro ao nectário interestaminal, então as pétalas se separam e o tubo de estames e o estigma saltam para fora da quilha (Kalin Arroyo, 1981). Segundo esta autora, o disparo pode ser reversível ou não e os apiculturistas consideram verdadeiro apenas os irreversíveis. As diferenças detectadas entre o formato de alas e quilha entre *A. falcata* e *A. sensitiva* podem representar diferenças no mecanismo de disparo, o que é reforçado pelo cálice marcadamente bilabiado de *A. sensitiva*, a maior curvatura de estames e carpelo e o menor comprimento das alas e quilha nesta espécie. Baseado na característica cálice bilabiado, *A. sensitiva* teria um mecanismo de disparo mais eficiente que o de *A. falcata*.

Os microsporângios tornam-se delimitados pela formação de ranhuras medianas dorsais e ranhuras laterais (Tucker, 2002) como descrito para as espécies em estudo, embora

nestas existam ranhuras ou sulcos ventrais, dorsais e laterais. Na tribo Aeschynomeneae, representada pelo gênero *Aeschynomene*, estão presentes todos os tipos de fusionamento de estames, monadelfo (*Aeschynomene katangense* –Tucker, 1996), diadelfo e pseudomonadelfo fazendo desta tribo uma das exceções na subfamília, uma vez que o desenvolvimento de estames monadelfos e pseudomonadelfos provavelmente se dá em diferentes linhas evolutivas (Tucker, 1989b). Este fato reforça a presença de diferentes tendências evolutivas dentro do gênero, concordando com trabalhos de filogenética molecular (Lavin *et al.*, 2001). Outros exemplos de gêneros com diadelfia com dois grupos de cinco estames são *Dalbergia* – considerado próximo de *A. falcata* (Lavin *et al.* 2001)- e *Stylosanthes* da mesma subtribo (Tucker, 1987). A adesão observada adaxialmente na porção média do tubo de estames em *A. falcata* já havia sido reportada para o gênero (Burkart, 1939). A atividade meristemática na base dos dois blocos de estames eleva esta região do receptáculo e a base dos estames fica unida em um tecido comum (Picklum, 1954; Tucker, 1996). A fusão dos estames é encontrada na maioria dos táxons de Papilionoideae, exceto nas tribos Sophoreae (Tucker, 1996) e Adesmieae, nas quais ocorre uma reversão (Lavin *et al.*, 2001). Foi reportada a ocorrência de perfurações, denominadas fenestras, na base da coluna dos filetes e relacionadas à polinização em *A. katangense* (Tucker, dados não publicados em Tucker & Kants, 1997), aspecto não observado nas espécies estudadas.

Estames com dimorfismos são descritos como de ocorrência comum entre as Leguminosae, podendo diferir em tamanho, comprimento do filete, formato da antera e momento de deiscência (Tucker, 1996), sendo *Aeschynomene* dado como exemplo (Rudd, 1981; Tucker, 1987). Neste trabalho, o único indício de dimorfismo entre os estames ocorreu em *A. falcata*, já tendo sido descrito por Burkart (1939), com as anteras basifixas no verticilo antesépalo e dorsifixas no antepétalo. A antera é usualmente dorsifixas em Leguminosae embora anteras basifixas possam ocorrer, como por exemplo, em *A. katangense* (Tucker, 1996) e *A. falcata*. Em *Cercis*, as anteras passam de basifixas a dorsifixas durante o desenvolvimento (Tucker, 2002). Um hipanto muito sutil, com breve fusão entre as bases das sépalas, pétalas e estames foi observado em *A. sensitiva*, como já havia sido descrito para a tribo Aeschynomeneae, podendo apresentar-se curto ou longo (Rudd, 1981).

O primórdio solitário de carpelo das Leguminosae normalmente surge como uma elevação hemisférica originando-se centralmente a partir do que restou do primórdio floral, durante a iniciação de pétalas ou estames do verticilo externo, dependendo da espécie (Tucker, 1987; Retallack & Willison, 1990; Tucker & Kants, 2001). Segundo Tucker (1987), o carpelo torna-se mais alto em um ponto excêntrico próximo ao lado abaxial do cume, como

o observado nas espécies do gênero *Aeschynomene* aqui estudadas. O surgimento da fenda carpelar é o primeiro indício da simetria bilateral do carpelo, seu fechamento se dá por apressão seguida por divisões celulares e a fusão de tecidos é o padrão predominante de fechamento nesta família (Tucker & Kantz, 2001). A fenda carpelar não aparece num plano sagital em algumas flores, como observado nas espécies estudadas, devido a uma das margens crescer mais que a outra, o que pode ser considerado um tipo de assimetria passageira (Endress, 2001), pois é um caráter observado apenas no início do desenvolvimento. O estigma papiloso provém do lado abaxial do ápice do estilete em *T. pratense* (Picklum, 1954). Kantz & Tucker (1994) mostraram a presença de diferenças no desenvolvimento do estigma em *Caesalpinia*, sugerindo sua potencialidade como estado de caráter, podendo, então, ser significativo nas espécies analisadas de *Aeschynomene*. O estipe longo de *A. falcata* já havia sido reportado por Burkart (1939). O estipe desenvolve-se por crescimento intercalar na base do carpelo, elevando-o em um estágio tardio do desenvolvimento; a presença de estipe é uma especialização, sendo todos os carpelos sésseis no início do desenvolvimento (Tucker, 1987), sua presença foi reportada para as subtribos Aeschynomeninae e Ormocarpiniae (Rudd, 1981).

Dentre as espécies de Leguminosae, o desenvolvimento de rudimentos seminiais ainda com a fenda carpelar aberta foi observado em 25 destas espécies de 16 gêneros de três tribos da subfamília Caesalpinioideae e uma espécie de Papilionoideae, não sendo observado dentre as Mimosoideae, segundo Tucker & Kantz (2001). Somente *A. americana* L. (Tucker & Kantz, 2001) e *Exostyles venusta* (Mansano *et al.*, 2002) foram reportadas dentre as Papilionoideae como possuindo carpelo aberto durante o início da formação dos rudimentos seminiais. Nas espécies em estudo este caráter esteve ausente.

As fusões produzem muitas das características diagnósticas importantes para as espécies de leguminosas, como o tubo do cálice, tubo estaminal, hipanto, pétalas da quilha fusionadas e estames adnatos e o momento da fusão em várias porções da flor difere entre os táxons, como observado nas espécies em estudo. A fusão pode se dar tanto por uma fusão superficial ou por crescimento intercalar (Tucker, 1987). A fusão das margens de órgãos já formados pode ocorrer tanto por apressão epidérmica ou pela sobreposição de tricomas marginais, como nas pétalas de *A.americana*.

Segundo Tucker (1989b), a uniformização do tamanho dos órgãos de um mesmo verticilo parece representar uma modificação ancestral no caminho do desenvolvimento das Papilionoideae, ao qual são adicionados os passos para produzir uma corola tipicamente papilionóide. Em *A. falcata*, o cálice não possui uma uniformização total no tamanho das sépalas, a abaxial é maior durante boa parte do desenvolvimento, sendo alcançada

posteriormente pelas adaxiais e as laterais permanecem como as menores neste verticilo. Quanto às pétalas, ocorre uma uniformização logo após a sua formação, que é encerrada pelo desenvolvimento mais acelerado do estandarte. Nos verticilos de estames, logo após sua iniciação, também se observa uma uniformização, porém, no verticilo antesépalo, os estames adaxiais tornam-se mais volumosos que os demais. Em *A. sensitiva*, o cálice não sofre uniformização de seus órgãos, sendo as sépalas laterais menores que as demais durante todo o seu desenvolvimento. No verticilo de pétalas ocorre o mesmo que no cálice, as pétalas laterais são menores que as demais e o estandarte logo se torna a maior de todas. Nesta espécie, a uniformização só ocorre nos verticilos de estames.

A simetria floral é considerada produto da organogênese mais o desenvolvimento subsequente dos órgãos (Tucker, 1999). A subfamília Papilionoideae expressa a simetria zigomórfica a partir da iniciação unidirecional dos órgãos florais. A ordem de iniciação dos órgãos fornece forte evidência do tipo de simetria floral, as espécies de Papilionoideae quase uniformemente manifestam a simetria zigomórfica durante a iniciação das sépalas e mantém esta simetria durante o seu desenvolvimento. Análises moleculares indicam que a simetria floral seja regulada por mais de um gene, sendo cada um expresso em um pólo da flor, ocorrendo da mesma forma para cada órgão floral (Hudson, 2000; Zik & Irish, 2003). A zigomorfia, condição derivada na evolução das flores, é expressa cedo no desenvolvimento das duas espécies estudadas, entretanto os eventos ontogenéticos iniciais em *A. sensitiva* são marcadamente zigomórficos, enquanto em *A. falcata* são representados apenas pela predominância da sépala abaxial mediana, como ocorre em tribos basais de Papilionoideae e em Caesalpinioideae (Tucker, 1994; Tucker & Kantz, 1997; Klitgaard, 1999), e pela iniciação unidirecional abaxial dos órgãos. O desenvolvimento floral marcadamente zigomórfico de *A. sensitiva* pode representar uma sinapomorfia para a subtribo Aeschynomeninae, ausente em *A. falcata*, comprovando que o momento em que a zigomorfia é inicialmente expressada na ontogenia pode revelar diferenças entre os táxons (Tucker, 1999) e dentro da idéia de que a precocidade de uma determinada característica é considerada uma especialização (Tucker, 1984; 1989b).

Alguns lapsos na iniciação zigomórfica podem levar a uma estabilização da assimetria, como, por exemplo, a inclinação oblíqua da fenda carpelar originada num plano sagital de simetria e verificada nas espécies de *Aeschynomene* aqui estudadas, embora este alinhamento oblíquo não seja detectável durante a antese (Endress, 2001). A assimetria floral e a assimetria dos órgãos parecem ser reguladas por mecanismos moleculares distintos e existem evidências de que a simetria floral pode afetar a simetria dos órgãos (Zik & Irish, 2003).

A ordem de iniciação dos órgãos em Caesalpinioideae e Papilionoideae é similar na maioria dos gêneros que foram investigados, exceto pelo cálice (Tucker, 1987), demonstrando ser este um estado de caráter mais variável, podendo apontar os gêneros de Caesalpinioideae que mais se aproximam das Papilionoideae (Prenner, 2004). Em *A. falcata*, os órgãos de um verticilo iniciam-se separadamente, sucessivamente e do lado abaxial para o adaxial do primórdio floral, como foi verificado para a maioria das espécies de Papilionoideae (Tucker 1987). A iniciação unidirecional abaxial parece ser uma sinapomorfia para as Papilionoideae, predominando nos verticilos de pétalas e estames (Tucker, 1984). A ordem de iniciação unidirecional aparentemente é incomum entre as famílias de plantas com flores (Tucker, 1984). As exceções já descobertas em Papilionoideae devem representar autapomorfias na ordem da iniciação dos órgãos de um verticilo. Alguns exemplos são: *Crotalaria mucronata* – iniciação helicoidal do cálice (Tucker, 1984), *A. latifolia* – com iniciação simultânea do cálice (Moço & Mariath, 1999), *A. punctata*, *A. tristis*, *A. ciliata*, *A. muricata*, *A. riograndensis* e *A. securigerifolia* – com iniciação unidirecional adaxial do cálice (Moço & Mariath, 2001; Moço, dados não publicados), *D. brasiliensis* – com iniciação helicoidal modificada do cálice, *P. rotundifolius* – com iniciação bidirecional do verticilo interno de estames (Klitgaard, 1999), *A. fruticosa* - com iniciação bidirecional das sépalas (Tucker dados não publicados em Tucker & Kantz, 1997) e *Galega orientalis* – com algum outro tipo de iniciação em todos os verticilos (Tucker, 1984). *A. sensitiva* é mais uma espécie acrescentada a esta lista pela iniciação unidirecional tendendo a simultânea no cálice e a iniciação assimétrica encontrada em suas pétalas, o que pode se repetir para outros gêneros de Aeschynomeninae, além dos diversos casos referentes ao cálice reportados por Prenner (2004). Estudos de outras espécies e gêneros relacionados às listadas acima podem apontar a presença de grupos infragenéricos e supragenéricos.

A sobreposição no tempo de iniciação dos órgãos de diferentes verticilos já foi verificada em 12 tribos de Papilionoideae, dentre elas Aeschynomeneae, representada por *A. americana*, e agora por *A. sensitiva*, ambas pertencentes à secção *Aeschynomene* do gênero *Aeschynomene*, o que poderia representar uma sinapomorfia da secção, embora tal tendência pareça ter se desenvolvido paralelamente entre as tribos de Papilionoideae (Tucker, 1989a). Segundo Tucker (1989a), primórdios comuns podem ser a consequência no aumento da sobreposição no tempo de iniciação dos órgãos, representando uma tendência em tribos altamente especializadas, o que pode estar próximo ao observado nos primórdios laterais de pétalas e estames do verticilo antesépalo em *A. sensitiva*. Entretanto, a ocorrência de sobreposição na iniciação dos órgãos (Mansano *et al.*, 2002) e primórdios comuns (Tucker,

2002) em Swartzieae coloca em dúvida o fato de este caráter ocorrer preferencialmente em tribos especializadas, parecendo representar uma convergência entre os grupos.

A. falcata apresenta muitas semelhanças morfológicas a *M. vilosum* (Klitgaard, 1999) da tribo Dalbergieae, confirmando os indícios moleculares de que a secção *Ochopodium* (*A. falcata*) seja mais próxima do gênero *Machaerium* que do restante de toda a subtribo Aeschynoméninae (Lavin *et al.*, 2001). As semelhanças observadas são quanto ao cálice com 5 dentes, tricomas na face abaxial do estandarte, pétalas da quilha “fusionadas” em quase todo o seu comprimento, aderidas ao longo das margens inferiores, iniciação unidirecional abaxial de todos os verticilos florais e a sépala abaxial mediana apresenta o mesmo comportamento, sendo maior, rapidamente coberta por tricomas na face abaxial e se arqueando sobre o primórdio floral. As pétalas iniciam-se quase simultaneamente. As características do cálice e a iniciação unidirecional abaxial dos verticilos parecem ser plesiomórficas para Papilionoideae, pois também ocorrem nas tribos Swartzieae (*Lecointea hatschbachii*, *Zollernia ilicifolia*, *E. venusta* e *Harleyodendron unifoliolatum* - Mansano *et al.*, 2002), com algumas variações, e Sophoreae (grupos Myroxylon e Angylocalyx - Tucker, 1993; gênero *Sophora* - Tucker, 1994), consideradas grupos basais. Também observou-se as margens das pétalas ligeiramente aderidas em algumas espécies de *Sophora* (Tucker, 1994) e os estames curvando-se adaxialmente na flor madura (Tucker, 1993).

O fato de as diferenças entre os grupos surgirem tardiamente sugere que estes sejam intimamente relacionados, e as que aparecem cedo no desenvolvimento afastam grupos evolutivamente, como foi o caso de *A. falcata* e *A. sensitiva* (Tucker, 1984). Os caracteres expressados cedo no desenvolvimento são usualmente estáveis e caracterizam níveis supragenéricos de hierarquia (subfamílias, tribos), enquanto estados de caráter especializados geralmente caracterizam gêneros ou espécies (Tucker, 1997). Devido à relativa estabilidade dos caracteres expressados nos primeiros estádios do desenvolvimento floral, os eventos subsequentes no desenvolvimento não seriam quebrados. As diferenças entre *A. falcata* e *A. sensitiva* ocorrem predominantemente nos estádios iniciais do desenvolvimento e provavelmente, numa nova circunscrição, serão agrupadas em subtribos distintas, já tendo sido colocadas em diferentes sub-clados de acordo com análises moleculares (Lavin *et al.*, 2001).

Apesar de Lavin e colaboradores (2001) discordarem da idéia de que os caracteres florais necessariamente provêm as melhores informações taxonômicas em Leguminosae (Tucker & Douglas, 1994), o presente trabalho reuniu caracteres de ontogênese floral que corroboram com os dados obtidos por estes autores, provando que este tipo de estudo ainda

pode contribuir muito para análises filogenéticas e taxonômicas na família. O mesmo ocorre com o trabalho de Tucker (1993), que após analisar dois grupos de Sophoreae, sugere que *Ateleia* seja retirado de Sophoreae, o que corrobora o encontrado por Doyle *et al.* (1997) que aceita este gênero como parte de Swartziae. Um montante cada vez maior de informações prova que a ontogênese floral pode prover informações valiosas para complementar dados moleculares em análises cladísticas (Tucker, 2002), dependendo apenas de se considerar os caracteres evolutivamente significativos.

Os dados obtidos neste trabalho não suportam a monofilia do gênero *Aeschynomene*, corroborando a hipótese da hierarquia (Tucker 1997) e com dados moleculares que removeriam a secção *Ochopodium* da subtribo Aeschynomeninae, colocando-a mais próxima de gêneros da tribo Dalbergieae (Lavin *et al.*, 2001).

5 - Referências Bibliográficas

- BURKART, A. 1939. Estudios sistemáticos sobre las Leguminosas-Hedisareas de la República Argentina y regiones adyacentes. **Darwiniana**, v. 3, p. 117-302, pls 1-22.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L.; BALLENGER, J. A.; DICKSON, E. E., KAJITA, T. & OHASHI, H. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **American Journal of Botany**, v. 84, n. 4, p. 541-554.
- ENDRESS, P. K. 2001. Evolution of floral symmetry. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 86-91.
- FERNANDES, A. 1996. **O taxon *Aeschynomene* no Brasil**. EUFC: Fortaleza.
- GERSTERBERGER, P. & LEINS, P. 1978. Rasterelektronmikroskopische Untersuchungen na Blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae). **Ber. Deutsch Bot. Ges.**, v. 91, p. 381-387.
- HUDSON, A. 2000. Development of symmetry in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 349-370.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. Mc Graw-Hill Book Company, New York.
- KALIN ARROYO, M. T. 1981. Breeding Systems and Pollination Biology in Leguminosae. In: **Advances in Legume Systematics 2** (eds.) R. M. Polhill, & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 723-769.
- KANTZ, K. E. & TUCEKR, S. C. 1994. Developmental basis of floral characters in the Caesalpinioideae. In: **Advances in Legume Systematics 6: Structural Botany**. (eds.) I. K. Ferguson & S. C. Tucker. p. 33-40.
- KLITGAARD, B. B. 1999. Floral ontogeny for four *taxa* of Dalbergieae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 219, p. 1-25.
- LAVIN, M.; PENNINGTON, R. T.; KLITGAARD, B. B.; SPRENT, J. I.; LIMA, H. D. & GASSON, P. E. 2001. The dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 503-533.

- MANSANO, V. F.; TUCKER, S. H. & AZEVEDO TOZI, A. M. G. 2002. Floral ontogeny of *Lecointea*, *Zollernia*, *Exostyles*, and *Harleyodendron* (Leguminosae: Papilionoideae: Swartzieae S.L.). **American Journal of Botany**, v. 89, n. 10, p. 1553-1569.
- McKELLAR, M. A., DEREN, C. W. & QUESENBERRY, K. H. 1991. Outcrossing in *Aeschynomene*. **Crop Science**, v. 31, p. 476-478.
- MOÇO, M. C. C. 2002. Desenvolvimento floral em *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae). **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 121p.
- MOÇO, M. C. C. & MARIATH, J. E. A. 1999. A radial symmetry at early stage floral organogenesis in *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae). **Acta Microscopica**, v. 8, Suppl. C, p. 789-790.
- MOÇO, M. C. C. & MARIATH, J. E. A. 2001. A new pattern of sepal initiation order in *Adesmia punctata* (Poir.) DC. var *hilariana* Benth. (Leguminosae – Papilionoideae). **Acta Microscopica**, v. 2, Suppl. B, p. 25-26.
- OLIVEIRA, M. L. A. A. 2002. Sinopse taxonômica do gênero *Aeschynomene* L. (Leguminosae-Faboideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, v. 57, n. 2, p.279-301.
- PICKLUM, W. E. 1954. Developmental morphology of the inflorescence and flower of *Trifolium pratense* L. **Iowa State College Journal of Science**, v. 28, n. 4, p. 477-495.
- PRENNER, G. 2004. New aspects in floral development of Papilionoideae: initiated but suppressed bracteoles and variable initiation of sepals. **Annals of Botany**, v. 93, p. 537-545.
- RESTALLACK, B. & WILLISON, J. H. M. 1990. Floral development in Ottawa and Florex Red Clover *Trifolium pratense*. **American Journal of Botany**, v. 77, n. 9, p. 1222-1230.
- RUDD, V. E. 1981. Aeschynomeneae (Benth.) Hutch. (1964). In: **Advances in Legume Systematics Part 1**, (eds.) R. M. Polhill & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p.347-354.

- STIRTON, C. H. 1981. Petal sculpturing in papilionoid legumes. In: **Advances in Legume Systematics 2** (eds.) R. M. Polhill & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 771-788.
- TUCKER, S. C. 1984. Unidirectional organ initiation in leguminous flowers. **American Journal of Botany**, v. 71, n. 8, p. 1139-1148.
- TUCKER, S. C. 1987. Floral initiation and development in Legumes. In: **Advances in Legume Systematics**, part 3, (eds.) C. H. Stirton, Royal Botanical Gardens, Kew, p. 183-239.
- TUCKER, S. C. 1989a. Overlapping organ initiation and common primordial in flowers of *Pisum sativum* (Leguminosae: Papilionoideae). **American Journal of Botany**, v. 76, n. 5, p. 714-729.
- TUCKER, S. C. 1989b. Evolutionary implications of floral ontogeny in legumes. In: **Advances in Legume Biology Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.** (eds.) C. H. Stirton & J. L. Zarucchi, v. 29, p. 59-75.
- TUCKER, S. C. 1992. The role of floral development in studies of legume evolution. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 692-700.
- TUCKER, S. C. 1993. Floral ontogeny in Sophoreae (Leguminosae: Papilionoideae): I. *Myroxylon* (Myroxylon group) and *Castanospermum* (Angylocalyx group). **American Journal of Botany**, v. 80, n. 1, p. 65-75.
- TUCKER, S. C. 1994. Floral ontogeny in Sophoreae (Leguminosae: Papilionoideae): II. *Sophora* sensu lato (Sophora group). **American Journal of Botany**, v. 81, n. 3, p. 368-380.
- TUCKER S. C. 1996. Stamen structure and development in legumes, with emphasis on poricidal stamens of caesalpinoid tribe Cassieae. In: **The Anther form, function and filogeny.** (eds.) W. E. Arcy & R. C. Keating. Cambridge University Press. P.236-254.
- TUCKER, S. C. 1997. Floral evolution, development, and convergence: the hierarchical-significance hypothesis. **International Journal of Plant Science**, v. 158 (6 suppl.), p. S143-S161.

- TUCKER, S. C. 1999. Evolutionary lability of symmetry in early floral development. **International Journal of Plant Science**, v.160 (6 suppl.), p. S25-S39.
- TUCKER, S. C. 2002. Floral ontogeny of *Cercis* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae): does it show convergence with papilionoids? **International Journal of Plant Sciences**, v. 163, n. 1, p. 75-87.
- TUCKER, S. C. & DOUGLAS, A. W. 1994. Ontogenetic evidence and phylogenetic relationships among basal taxa of legumes. In: **Advances in Legume Systematics Part 6** (eds) I. K. Ferguson & S. Tucker, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 11-32.
- TUCKER, S. C. & KANTZ, K. E. 1997. Comparative floral development and evolution in tribe Caesalpinioideae (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Haematoxylum*. **American Journal of Botany**, v. 84, n. 8, p. 1047-1063.
- TUCKER, S. C. & KANTZ, K. E. 2001. Open carpels with ovules in Fabaceae. **International Journal of Plant Sciences**, v. 162, n. 5, p. 1065.
- WEBERLING, F. 1989. **Morphology of Flowers and Inflorescences**. Cambridge, Cambridge University Press. 405p.
- ZIK, M. & IRISH, V. F. 2003. Flower development: initiation, differentiation, and diversification. **Annual Reviews of Cell Development and Biology**, v. 19, p. 119-140.

**CAPÍTULO III: ORGANOGÊNESE FLORAL DE *AESCHYNOMENE FALCATA*
(POIR.) DC. E *AESCHYNOMENE SENSITIVA* SW. (PAPILIONOIDEAE -
LEGUMINOSAE): ÊNFASE NO DESENVOLVIMENTO DO PRIMÓRDIO
ESTAMINAL**

Diana Salles Sampaio ^{1,3} & Jorge Ernesto de Araujo Mariath ^{2,3}. 1 Pós-Graduanda; 2 Professor Titular e Pesquisador CNPq; 3 Departamento de Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

“O homem nasceu para aprender.
Aprender tanto quanto a vida lhe permita.”

Guimarães Rosa

RESUMO

O presente trabalho descreve a organogênese floral de *Aeschynomene falcata* e *Aeschynomene sensitiva* baseado em dados anatômicos, dando ênfase ao desenvolvimento dos primórdios estaminais, área totalmente desconhecida para o gênero. Comprovou-se a presença de 3 camadas germinativas nos primórdios florais das espécies estudadas: CI (dérmica), CII (subdérmica) e CIII (central). O tubo do cálice de *A. falcata* e os lobos do cálice de *A. sensitiva* são detectados cedo no desenvolvimento da flor. Em ambas espécies as sépalas iniciam-se por divisões na camada CII, podendo receber contribuições da CIII, como também foi verificado para as pétalas. Primórdios de estames são identificados devido ao alongamento de células da CII e subsequente ciclo de divisões mitóticas, porém a maior contribuição para a formação do primórdio é dada pela CIII. A iniciação do carpelo, que ocupa quase toda a região central do primórdio floral, tem alguma contribuição da camada CII com predominância absoluta da CIII. Em *A. sensitiva*, quando primórdios de sépalas e pétalas já estão visíveis, o primórdio floral torna-se mais alto que o de *A. falcata*. *A. falcata* apresenta inúmeras células mucilaginosas na epiderme de brácteas, bractéolas e sépalas, podendo formar verdadeiras bolsas de mucilagem no mesofilo das sépalas. Em *A. sensitiva*, predominaram células repletas de compostos fenólicos associadas aos feixes vasculares. A diferenciação dos microsporângios, na porção distal do primórdio de estame, tem por responsável a camada subdérmica, derivada da CII do meristema floral. As células da CII, nos quatro ângulos do primórdio, são consideradas iniciais meristemáticas, pois dão origem à principal linhagem celular do estame. A inicial meristemática divide-se periclinalmente originando as células esporogênica primária (cep) e parietal primária (cpp), a primeira originará o tecido esporogênico e a segunda as células parietal secundária interna (cpsi) e externa (cpse). A cpsi diferencia-se diretamente em tapete externo e a cpse divide-se periclinalmente e origina uma camada externa abaixo da protoderme (ce) e uma camada média interna (mi). A ce, por sua vez, também se divide periclinalmente formando, externamente, o endotécio (ed) e, mais internamente, a camada média externa (me). O tipo de formação dos estratos parietais da antera é o Dicotiledôneo e a formação do tapete interno se dá através do recrutamento de células derivadas da CII contíguas às células iniciais meristemáticas.

1 – Introdução

O estudo da formação de órgãos (organogênese) em plantas, com base na Anatomia Vegetal, envolve a análise dos meristemas vegetativo e reprodutivo e faz necessário o uso de algumas teorias chave para a análise e discussão dos resultados. Dentre elas, as mais importantes incluem a teoria das camadas histogênicas (ou meristemáticas, ou germinativas), a teoria da posição-dependência e a teoria telomática para a origem dos órgãos, as quais serão discutidas ao longo da análise de dados deste Capítulo.

Apesar do alto grau de conservação dos eventos ontogenéticos nas flores, que garante a manutenção do processo reprodutivo nas angiospermas, diferenças significativas são detectadas na ontogênese floral de diferentes famílias (Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992; Santos, 1993; Bittencourt Jr., 1995; Oliveira, 2001; Moço, 2002). Essas diferenças englobam, de forma geral, a ordem de surgimento dos órgãos, nível de contribuição das camadas histogênicas para a formação de cada órgão e sua histo-diferenciação. *Adesmia latifolia* (Moço, 2002) foi a espécie mais próxima filogeneticamente do gênero *Aeschynomene*, segundo Polhil *et al.* (1981), na qual a ontogenia floral e da antera foram detalhadas, sendo que, alguns desses aspectos já foram publicados de forma dispersa em outras espécies de *Aeschynomene*, porém sem uma atenção específica para o gênero.

O uso de anteras para a classificação dos diferentes grupos vegetais mostra-se importante devido à variabilidade da forma das tecas e dos esporângios (Mariath *et al.*, 2003). A antera das espécies de angiospermas possui, normalmente, quatro microsporângios, as espécies de algumas famílias são bisporagiadas e de outras multispórangiadas - resultado de partição do tecido esporogênico por septos estéreis (Bhandari, 1984). Segundo Davis (1966), o comportamento dos estratos parietais da antera constitui caráter taxonômico ao nível de família. Em angiospermas primitivas, por exemplo, a parede da antera é formada por um grande número de camadas médias e em famílias mais derivadas, a parede da antera é fina. O tapete possui uma camada simples, mas pode tornar-se bisseriado ou até multisseriado e, em alguns casos, é simples na face voltada para a epiderme e multisseriado na face voltada ao conectivo (Bhandari, 1984).

Um dos interesses na biologia da antera ainda diz respeito a informações sobre o desenvolvimento ao nível molecular e de engenharia genética visando o melhoramento das plantas cultivadas. A produção de híbridos necessita, em vários casos, da manipulação de anteras para evitar a autopolinização (Goldberg *et al.*, 1993), sendo indispensável o conhecimento prévio de seu desenvolvimento e morfologia. A antera ainda representa um

órgão ideal para estudos de diferenciação dos tipos celulares de plantas (Goldberg *et al.*, 1993).

O objetivo do presente Capítulo consiste em descrever a organogênese floral de *Aeschynomene falcata* e *Aeschynomene sensitiva* e o posterior desenvolvimento dos estames acompanhando a diferenciação dos tecidos nas anteras.

2 – Material e Métodos

Inflorescências de *A. falcata* e *A. sensitiva* foram coletadas nos meses de abril e dezembro do ano de 2003. A coleta de *A. falcata* realizou-se em populações no topo do Morro da Polícia e do Morro Santana (ICN 127556 e ICN 127557, respectivamente) e, a de *A. sensitiva*, em uma população no Parque Estadual Delta do Jacuí, Ilha das Flores - Braço Norte (ICN 127555), ambas localizadas no município de Porto Alegre no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

O material foi fixado em solução de glutaraldeído 1% e formaldeído 4% (McDowell & Trump, 1976) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 e, logo após a coleta, submetido a vácuo por, pelo menos, duas horas. A desidratação foi realizada em série etílica (Johansen, 1940) com passagem em soluções de álcool etílico: clorofórmio (3:1, 1:1 e 3:1) para a retirada das ceras epicuticulares, retornando-o ao álcool etílico absoluto e sendo incluído em hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid, 1983).

Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo de rotação Zeiss Mikron equipado com navalha de vidro de 8mm, obtendo-se seções de 1,5 a 3,0µm de espessura. O material foi corado com Azul de Toluidina O (C.I. 52040) 0,05%, em tampão benzoato de sódio, pH 4,4 (Feder & O'Brien, 1968). A análise do material e as fotomicrografias foram realizadas nos microscópios Olympus BX41 e Leica DMRB.

3 - Resultados

3.1 - *Aeschynomene falcata*

Nas proliferações laterais da inflorescência observa-se a formação das brácteas florais e, nas axilas destas, a individualização do futuro primórdio floral, cujo primeiro sinal morfológico de sua diferenciação é o lançamento de duas bractéolas ou prófilos (Figuras 1A, B).

As brácteas florais, durante o surgimento das bractéolas, apresentam-se com uma estrutura interna semelhante a de um primórdio foliar, com células pavimentosas na epiderme, tricomas em diferenciação, e um mesofilo indiferenciado com meristema provascular diferenciando-se em elementos condutores (Figura 3A). Na maturidade, as células da face adaxial da epiderme diferenciam-se em células produtoras de mucilagem (Figuras 1A, B), tornando-se muito volumosas e apresentando lamelações internas, seu citoplasma fica restrito à porção adjacente da parede periclinal externa (Figuras 2C-E, G). As paredes dessas células freqüentemente se rompem para o interior do mesofilo formando verdadeiras bolsas de mucilagem (Figuras 1A, 2B). Essas bolsas, por sua vez, podem romper-se para o meio externo, fazendo com que a mucilagem fique em contato com a gema ou meristema foral muito jovem (Figuras 1A, 2F). Extravasamentos de mucilagem a partir dos estômatos também foram observados (Figura 2G). As células do mesofilo que circundam as células produtoras de mucilagem apresentam plastídios mais desenvolvidos com acúmulo de grãos de amido (Figura 2C). Na seqüência do desenvolvimento, as bractéolas e as sépalas também apresentam células epidérmicas diferenciadas em produtoras de mucilagem, entretanto, nas bractéolas ocorrem na face adaxial da epiderme (Figuras 4A, B), enquanto que nas sépalas, na face abaxial (Figuras 1D, F). Em alguns cálices, pode-se perceber através da morfologia externa, a presença de bolsas de mucilagem assemelhando-se a câmaras de ar, nesses casos, as seções histológicas revelam que as células da face adaxial da epiderme também se diferenciaram em produtoras de mucilagem (Figura 2A). Cristais e tricomas tectores também foram registrados nas epidermes desses órgãos (não demonstrado).

O primórdio floral ainda em forma de domo, apresenta três camadas distintas: camada dérmica, ou camada germinativa I (CI), camada subdérmica, ou camada germinativa II (CII) e camada central, ou camada germinativa III (CIII) (Figura 3A). O par de bractéolas é iniciado concomitantemente através de divisões periclinais na CII perpendiculares à bráctea (Figuras 1A, B, 3A). As células da CII apresentam-se alongadas e as da CIII dividem-se anticlinal e, principalmente, periclinalmente aumentando o volume do primórdio (Figuras 3A, B). Nessa fase, inicia-se, através de divisões periclinais das células da CII, o primórdio abaxial mediano do verticilo de sépalas que cresce rapidamente com a proliferação dessa camada, cobrindo o meristema floral (Figuras 3B-D). A CIII contribui com células para a formação do procâmbio em bractéolas e sépalas (Figuras 3A, 4B, C). Os demais primórdios de sépalas também são iniciados por divisões periclinais na CII.

Os primórdios de pétalas surgem através de divisões periclinais na CII (Figuras 3D, E, 4A). A iniciação carpelar se dá concomitantemente ao surgimento das pétalas através de

divisões periclinais na CII e, predominantemente, na CIII (Figura 3F) resultando na completa conversão do centro do primórdio floral em estrutura carpelar. Um alongamento muito pronunciado das células da CII e algumas divisões na CIII formam uma pequena protuberância no primórdio floral indicando o surgimento dos primórdios de estames do verticilo antesépalo (Figura 3F). Tanto as células da CII quanto as da CIII dividem-se periclinamente contribuindo para a iniciação dos primórdios estaminais, entretanto, na primeira, parece ocorrer apenas um ciclo de divisões periclinais até que o primórdio adquira forma de bastão (Figuras 4B-D). Nessa fase, o carpelo aparece mais volumoso do lado abaxial (Figuras 4A-C). Os primórdios do verticilo antepétalo surgem da mesma maneira que os do antesépalo (Figuras 4E, F). Quando os primórdios de pétalas ainda apresentam poucas células de largura seu formato é achatado, o que os diferencia dos primórdios de estames (Figura 1C). A pré-floração vexilar somente se torna visível em estádios adiantados do desenvolvimento floral, quando a microgametogênese já foi iniciada (Figura 1E).

O primórdio de estame apresenta a mesma organização em camadas germinativas que o primórdio floral (Figuras 5A, B). Os primórdios de estame do verticilo antepétalo apresentam seção quadrangular no início de seu desenvolvimento, enquanto os do verticilo antesépalo apresentam seção triangular (Figuras 5A, B). Ambos primórdios se tornam retangulares em seção através de algumas divisões nas células da camada CIII, que diferenciam grandes vacúolos (Figuras 5D, E). Observam-se divisões periclinais na CII e um aumento em diâmetro do primórdio estaminal em sua porção distal, caracterizando o início da formação dos microsporângios (Figuras 5C-E). Em cada ângulo destes primórdios ocorrem, geralmente, duas células iniciais meristemáticas na CII. As células iniciais passam por uma divisão periclinal originando a célula esporogênica primária (cep) internamente, e a célula parietal primária (cpp) externamente (Figuras 5C-E, 6A, 20A, B).

As células da camada parietal primária logo se dividem periclinamente originando a camada parietal secundária interna (cpsi) e externa (cpse) (Figuras 5D, 6A-F, 20B, C). As células dorsais e ventrais da CII do primórdio, adjacentes à região que dará origem ao conectivo, não se dividem periclinamente, exceto as que estão em contato direto com as iniciais (Figuras 6B-F – células contornadas de amarelo). Já as células da CII, que estão localizadas nos flancos do primórdio, alongam-se muito e passam por outras divisões periclinais e anticlinais (Figura 6 – células contornadas de branco). Nesse estádio, já se pode observar células da CIII, de menor diâmetro e citoplasma denso, diferenciadas em procâmbio na região dorsal do estame (Figuras 6A-F). Os microsporângios em desenvolvimento já podem ser detectados pela morfologia externa da antera que apresenta um conspícuo sulco ventral (Figuras 6A-C, E). A camada

parietal secundária externa passa por uma divisão periclinal que origina a camada média interna e uma camada mais externa, abaixo da epiderme (Figuras 6F, 20D). É importante ressaltar que as células derivadas da CII, contíguas às iniciais, tanto nas regiões dorsal e ventral, quanto nos flancos do primórdio, passam a circundar internamente todas as derivadas das iniciais em cada ângulo do primórdio (Figuras 6C-F) e darão origem ao tapete interno (Figura 7).

As camadas derivadas da cpse passam por divisões anticlinais incrementando a antera em diâmetro (Figuras 6B, D, 7, 20C, D). As cep se proliferam dando origem ao tecido esporogênico, caracterizado por possuir células volumosas e de citoplasma denso (Figura 7). As células derivadas da cpsi originam diretamente o tapete externo (Figuras 7, 20D), em *A. falcata* foram detectados poucos casos onde estas células passaram por uma divisão periclinal que, provavelmente, originaria um tapete externo irregularmente bisseriado (Figuras 7C, D, 8B). O tapete interno tem origem nas células adjacentes ao tecido esporogênico, derivadas da CII tanto das regiões dorsal e ventral, quanto dos flancos do primórdio, que se dividiram anticlinalmente (Figura 7). As células derivadas da CII, que se localizam em uma região mediana entre dois microsporângios de uma mesma teca, formarão o septo da antera. Quando a antera já é nitidamente identificada pela presença do conectivo e das tecas, com dois microsporângios cada (Figura 8A), a camada mais externa, abaixo da epiderme, passa por uma última divisão periclinal, originando externamente o endotécio e mais internamente a camada média externa (Figuras 8C, D). Todo o microsporângio, exceto pela epiderme, é constituído pela proliferação da CII do primórdio de estames (Figura 19). O tipo de desenvolvimento dos estratos parietais da antera é classificado como Dicotiledôneo (Figuras 20, 21), segundo Davis (1966).

Completando o desenvolvimento dos estames, forma-se um tubo estaminal diadelfo pelo crescimento intercalar dos filetes, com o estame adaxial do verticilo antepétalo integrado ao conjunto de estames do lado esquerdo e o estame abaxial do verticilo antesépalo ao conjunto de estames do lado direito, em vista frontal (Figura 1F). Observa-se também que os dois conjuntos de filetes estão em contato um com o outro no lado adaxial da flor, correspondendo a aderência mencionada no Capítulo II (Figura 1F).

3.2 - *Aeschynomene sensitiva*

A inflorescência de *A. sensitiva* apresenta um grau de complexidade maior que o encontrado em *A. falcata* devido à presença de ramos de primeira, segunda e terceira ordens. O ápice da inflorescência de segunda ordem, que não apresenta flor terminal, origina continuamente folhas estipuladas, na axila das quais surgem inflorescências de terceira ordem

(Figuras 9B, C, 10A-D). No ápice de inflorescência de segunda ordem podem-se distinguir nitidamente as três camadas histogênicas: CI, CII, CIII (Figura 9A). O ramo de terceira ordem produz racemos com brácteas de filotaxia dística e possui uma flor terminal encerrando o desenvolvimento da inflorescência (Figuras 9B, C). Esta filotaxia pode parecer subdística quando as inflorescências estão mais desenvolvidas (Capítulo II). As seções transversais dos ramos de segunda ordem evidenciam que os ramos de terceira ordem são ortogonais entre si e que quando jovens, são protegidos mecanicamente pelas estípulas foliares (Figuras 10A-D).

As bractéolas, primeiro sinal de diferenciação do primórdio floral, iniciam-se através de divisões na CII (Figura 11A), em posição ortogonal à bráctea, mas ligeiramente voltadas para o lado adaxial do primórdio (Figuras 10E-H). Após o surgimento das bractéolas, o primórdio floral se estende em altura e largura mantendo um formato convexo (Figura 11B) bem mais acentuado que o de *A. falcata* (compare com as Figuras 3A-E). Divisões periclinais na CII são observadas em quase toda a periferia do primórdio floral interrompidas apenas na região entre os dois lobos do cálice. Isso indica a iniciação, praticamente simultânea, dos primórdios de sépalas e uma fusão precoce das sépalas de cada lobo (Figura 11B). Na região abaxial do primórdio floral as divisões periclinais da CII estão mais adiantadas, confirmando a iniciação unidirecional abaxial deste verticilo tendendo a simultânea com predominância da sépala abaxial mediana.

A iniciação dos primórdios de pétalas já pode ser observada e também ocorre através de divisões periclinais da CII (Figuras 11B-F). Após o início do surgimento das primeiras pétalas, emerge o primórdio de carpelo, resultado da conversão do restante do meristema floral através de divisões periclinais na CII e, predominantemente, na CIII (Figuras 11D-F). O surgimento dos verticilos florais não altera o aspecto cônico do primórdio floral, devido a maior proliferação de linhagens celulares derivadas da CIII entre os verticilos, promovendo a elevação rápida do primórdio carpelar (Figuras 11B, D-F). Na região entre os dois lobos do cálice a pequena fusão em sua base, bem como as pétalas laterais ficam dispostos mais perpendicularmente ao eixo floral (Figura 11F).

Após a iniciação do carpelo, a base do primórdio floral se alarga, pois a CIII contribui igualmente com divisões anticlinais e periclinais, o primórdio floral torna-se achatado, perdendo a forma cônica, e os verticilos passam a estar dispostos em um mesmo plano (Figuras 11G, 12). Os primórdios de pétalas ainda aumentam em volume por divisões celulares na CII, enquanto que os primórdios de estames do verticilo antesépalo são iniciados pelo alongamento e divisão das células da CII seguidas por divisões periclinais na CIII (Figuras 11G, 12B, C). O desenvolvimento dos estames do verticilo antepétalo segue o mesmo padrão encontrado no antesépalo, porém com um alongamento mais proeminente das células da CII que eleva uma

protuberância no primórdio floral, seguido pela participação da CIII na formação do corpo do estame (Figuras 12D-F).

Na base do botão ainda jovem, um inconspícuo tubo do cálice é formado por uma leve fusão entre os lobos adaxial e abaxial do cálice (Figuras 11F, 13A). As pétalas são achatadas dorsi-ventralmente, o estandarte é diferenciado pela sua maior largura e as alas por estarem deslocadas para a face abaxial, o verticilo antesépalo de estames é identificado pelos filetes diferenciados e o antepétalo por sua porção distal sutilmente dilatada (Figura 13A). Numa região mais acima no botão, o lobo abaxial do cálice sobrepõe o adaxial (Figuras 13B-D). Ao longo do desenvolvimento, os primórdios de estames passam de um formato de seção aproximadamente quadrangular a retangular (Figuras 13A, B). O sulco formado no lado interno do primórdio de estame divide as duas tecas da antera (Figura 13C) e, posteriormente, o sulco externo e dois laterais individualizam as lojas (Figura 13D).

Células volumosas associadas aos principais feixes vasculares de todos os órgãos florais possuem substâncias coradas em verde pelo Azul de Toluidina indicando a presença de compostos fenólicos (Figuras 13B-D). Essas células podem ser as mesmas manchas escuras observadas nas brácteas, bractéolas e cálice (Figuras 5D, E do Capítulo II), provavelmente desempenhando um papel de defesa da planta. Células produtoras de mucilagem estão presentes, eventualmente, na face abaxial da epiderme das brácteas e em estádios mais avançados do desenvolvimento, também foram vistas em sépalas (Figuras 13B, C), embora em proporções muito menores do que em *A. falcata*.

Primórdios estaminais de formato claviforme apresentam as células da camada CII mais altas do que as demais quando observados em seções longitudinais (Figuras 14A-C) e transversais (Figuras 14D-F). Na região dos ângulos destes primórdios estão localizadas as células iniciais meristemáticas que originam, por divisão periclinal, uma camada parietal primária (cpp) e uma esporogênica primária (cep) (Figuras 14D-F, 20A, B). As células da cpp ainda podem sofrer divisão anticlinal, com conseqüente aumento em diâmetro do primórdio (Figura 14F). As células da camada CII, localizadas nos flancos do primórdio, dividem-se periclinalmente e alongam-se, enquanto que a cpp, derivada da célula inicial, divide-se periclinalmente originando as camadas parietais secundárias externa e interna (cpse e cpsi) (Figuras 14G, 15A, 20B, C). As células da camada CII, das regiões dorsal e ventral do primórdio adjacentes à região do conectivo não se dividem (Figuras 14G, 15A).

O alongamento das células da CII nos flancos do primórdio torna-se mais conspícuo e estas células se dividem anticlinalmente, dando origem a parte das células do tapete interno (Figura 15B – células contornadas em branco). Da mesma forma, as células derivadas da CII

das regiões dorsal e ventral do primórdio, contíguas às iniciais dos ângulos da antera, dividem-se periclinalmente, contornando as derivadas das iniciais e pré-estabelecendo o posicionamento das demais células do tapete interno (Figuras 15C, D – células contornadas em amarelo). As cep dividem-se periclinalmente e formam duas células precursoras do tecido esporogênico (Figuras 15E, F).

Como resultado dessas divisões da CII, a porção distal do primórdio de estame aumenta muito em volume praticamente sem a participação da CIII (Figuras 16A, B, 19). As células dos flancos do primórdio mantêm seu padrão alongado e proliferam, evidenciando a região do septo e parte das células do tapete interno (Figuras 16C-F, 17F). As células do tecido esporogênico tornam-se evidentes devido ao seu citoplasma mais denso e o tapete interno contorna a porção interna do mesmo (Figuras 16C-F). Com isso, pode-se afirmar que todas as células que formarão o microsporângio, exceto a epiderme, têm origem na camada subdérmica (Figuras 19, 21) derivada da CII do meristema floral (Figuras 17, 21). O tapete externo tem origem nas iniciais meristemáticas (Figuras 20, 21) e o interno nas células derivadas da CII dos flancos e das regiões dorsal e ventral do primórdio adjacentes às iniciais (Figuras 16C-F, 17, 21).

Algumas divisões nas células da camada CIII, sem uma orientação preferencial, diferenciam-se em procâmbio (Figura 17A). As divisões anticlinais observadas na camada parietal secundária externa acompanham o aumento em diâmetro do microsporângio (Figura 17B) e as divisões periclinais originam a camada média interna e uma camada mais externa abaixo da epiderme (Figura 17C, E, 20D). Eventuais divisões periclinais das células precursoras do tapete interno caracterizam a formação de um tapete interno irregularmente biestratificado (Figura 17B), já as divisões anticlinais acompanham a extensão do órgão (Figuras 17D, E). Durante esses eventos o tecido esporogênico prolifera em número de células (Figura 17F). As divisões na camada mais externa dos estratos parietais dão origem ao endotécio, externamente, e à camada média externa, mais internamente (Figuras 18, 20E). Algumas células derivadas da CII na região dos flancos, também podem originar, além das células do septo, células dos estratos parietais (endotécio e células da camada média).

O tipo de desenvolvimento dos estratos parietais em *A. falcata* e *A. sensitiva* é o Dicotiledôneo, segundo Davis (1966) (Figuras 20, 21). Todo o microsporângio de *A. falcata* e *A. sensitiva*, excetuando-se a epiderme, é formado por células derivadas da camada subdérmica do primórdio estaminal (Figuras 19, 21), que, por sua vez, tem origem na camada CII do primórdio floral. A diferenciação da antera com surgimento dos microsporângios e a

diferenciação do procâmbio ocorre mais rapidamente em *A. falcata* que em *A. sensitiva* (Figuras 6, 15).

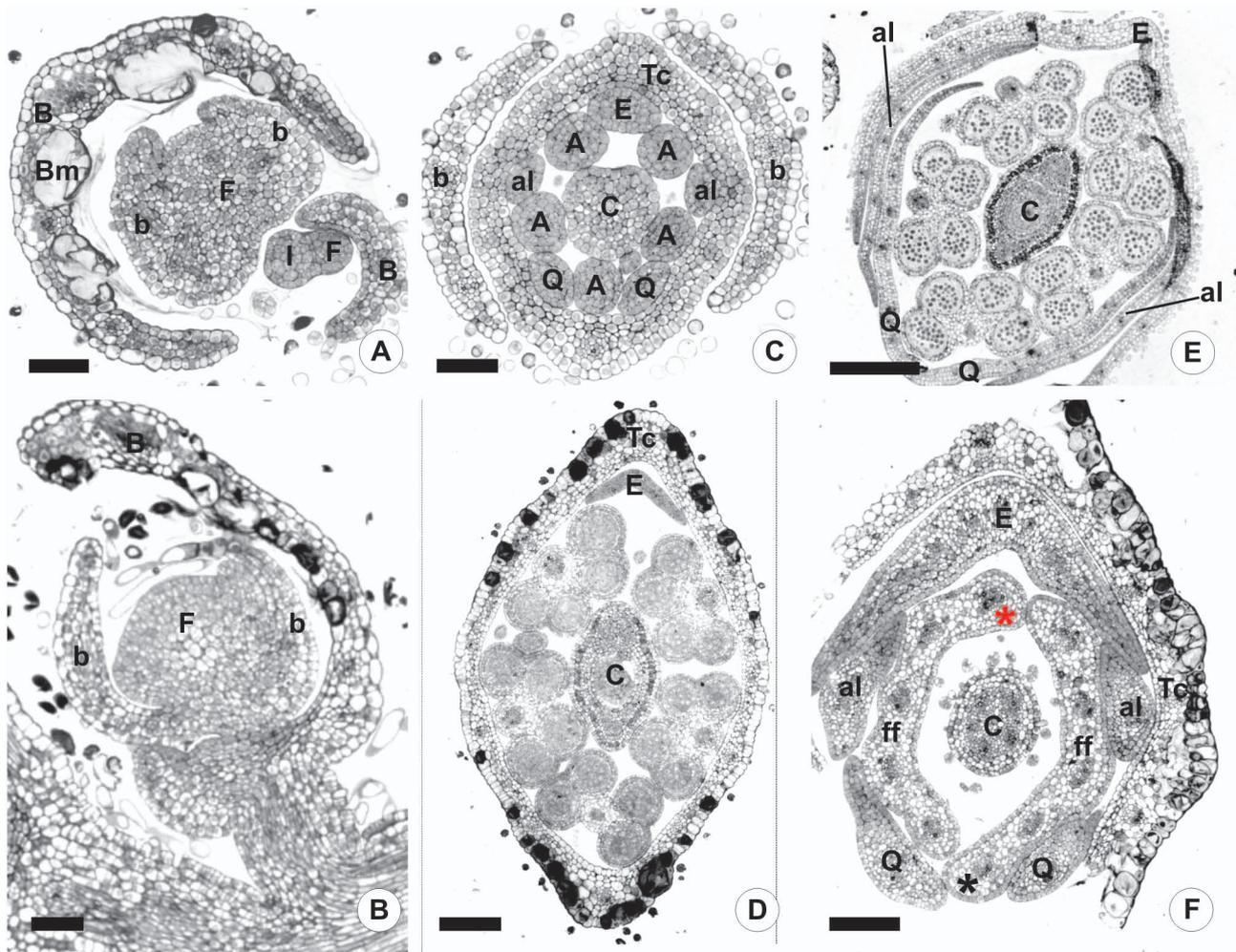


Figura 1: *A. falcata*. A, B: Primórdios florais. C-F: Secções transversais de botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento. A: Secção transversal da inflorescência. Um primórdio floral com brácteolas está visível e a bráctea adjacente apresenta bolsas de mucilagem na face adaxial da epiderme. O ápice da inflorescência está originando um novo primórdio floral na axila de uma bráctea. B: Secção longitudinal da inflorescência. Observa-se bráctea e botão floral no mesmo estádio descrito anteriormente. O ápice da inflorescência não está visível. C: Botão jovem com bractéolas ainda sem produção de mucilagem. Tubo do cálice conspícuo e primórdios de estames do verticilo antesépalo muito jovens. Pétalas iniciando seu achatamento dorsi-ventral, as alas são retas em relação aos demais verticilos. D: O tubo do cálice apresenta células mucilaginosas na face abaxial da epiderme. As anteras do verticilo antesépalo já estão formadas, mas ainda não ocorreu a meiose. D, E: O ovário apresenta as células da camada subdérmica com abundância de fenólicos. E: Já ocorreu a meiose nas anteras e as pétalas apresentam pré-floração vexilar. F: Cálice com células mucilaginosas na face abaxial da epiderme. Base das pétalas visível. As bases fundidas dos filetes do tubo de estames diadelfo (5+5) estão aparentes. O asterisco vermelho indica o estame adaxial do verticilo antepétalo e o preto o estame abaxial do verticilo antesépalo. Os dois conjuntos de estames estão em contato no lado adaxial da flor. A: primórdio de estame do verticilo antesépalo; al: alas; B: bráctea; b: bractéola; Bm: bolsa de mucilagem; C: carpelo; E: estandarte, F: primórdio floral; ff: filetes fusionados; I: ápice da inflorescência; Q: pétalas que constituem a quilha; Tc: tubo do cálice. A-C: Barras = 50µm. D, F: Barras = 100µm. E: Barra = 200µm.

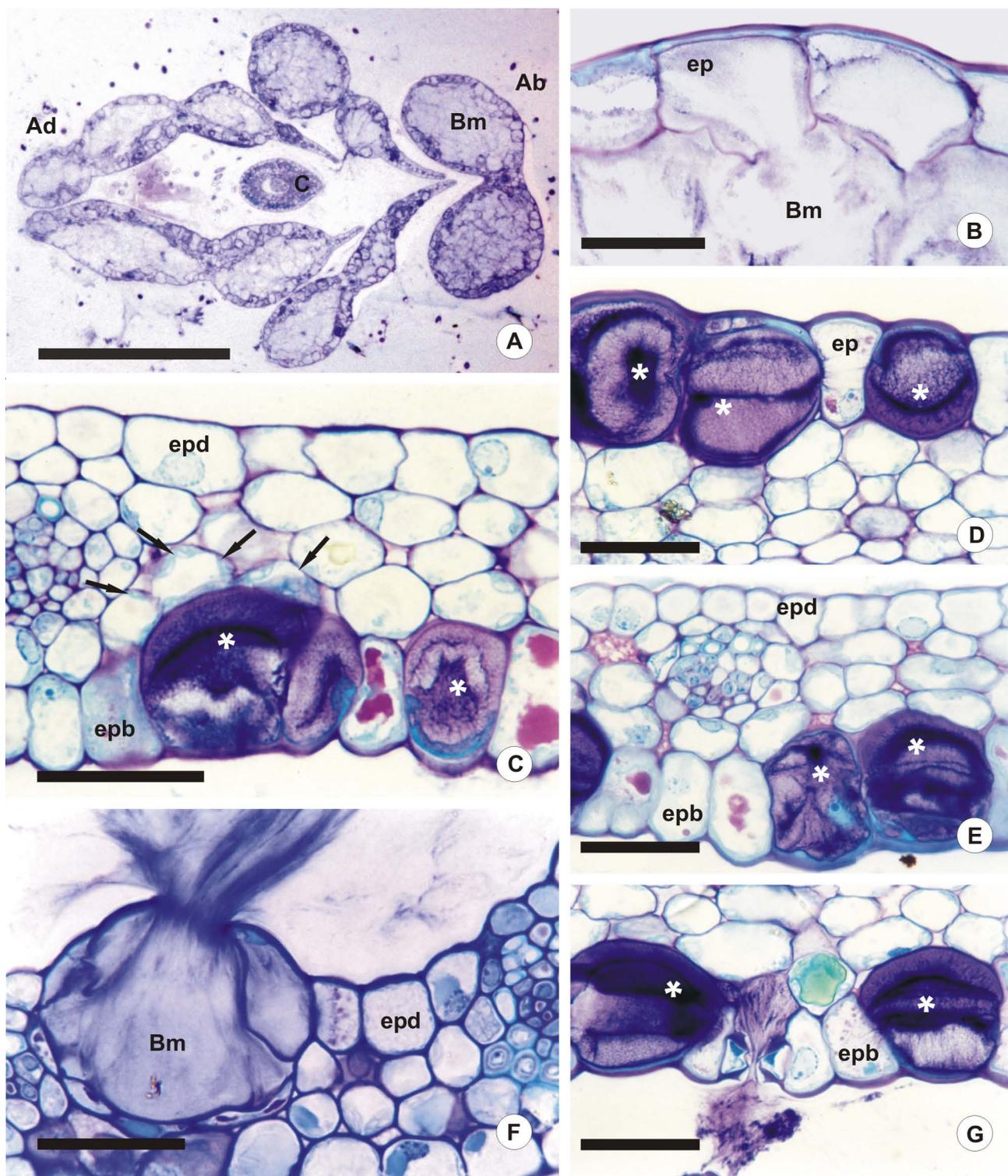


Figura 2: Células produtoras de mucilagem em *A. falcata*. A: Região superior do cálice. Os dentes do cálice estão com o mesofilo repleto de bolsas de mucilagem. B: A mucilagem produzida nas células epidérmicas extravaza para o mesofilo através do rompimento das paredes celulares formando as bolsas de mucilagem. C-E, G: As células epidérmicas produtoras de mucilagem são lameladas (asteriscos brancos) e têm o citoplasma corado em azul brilhante confinado à região adjacente à parede periclinal externa. C: Grandes plastídios de células do mesofilo (setas) estão associados às células mucilaginosas. F: Células epidérmicas produtoras de mucilagem rompendo-se para o exterior do órgão. G: Estômato liberando para o meio externo mucilagem da célula produtora ao seu lado. Ab: lado abaxial da flor; Ad: lado adaxial da flor; Bm; bolsa de mucilagem; C: carpelo; ep: epiderme; epb: epiderme abaxial; epd: epiderme adaxial. A: Barra = 500µm. B-G: Barras = 25µm.

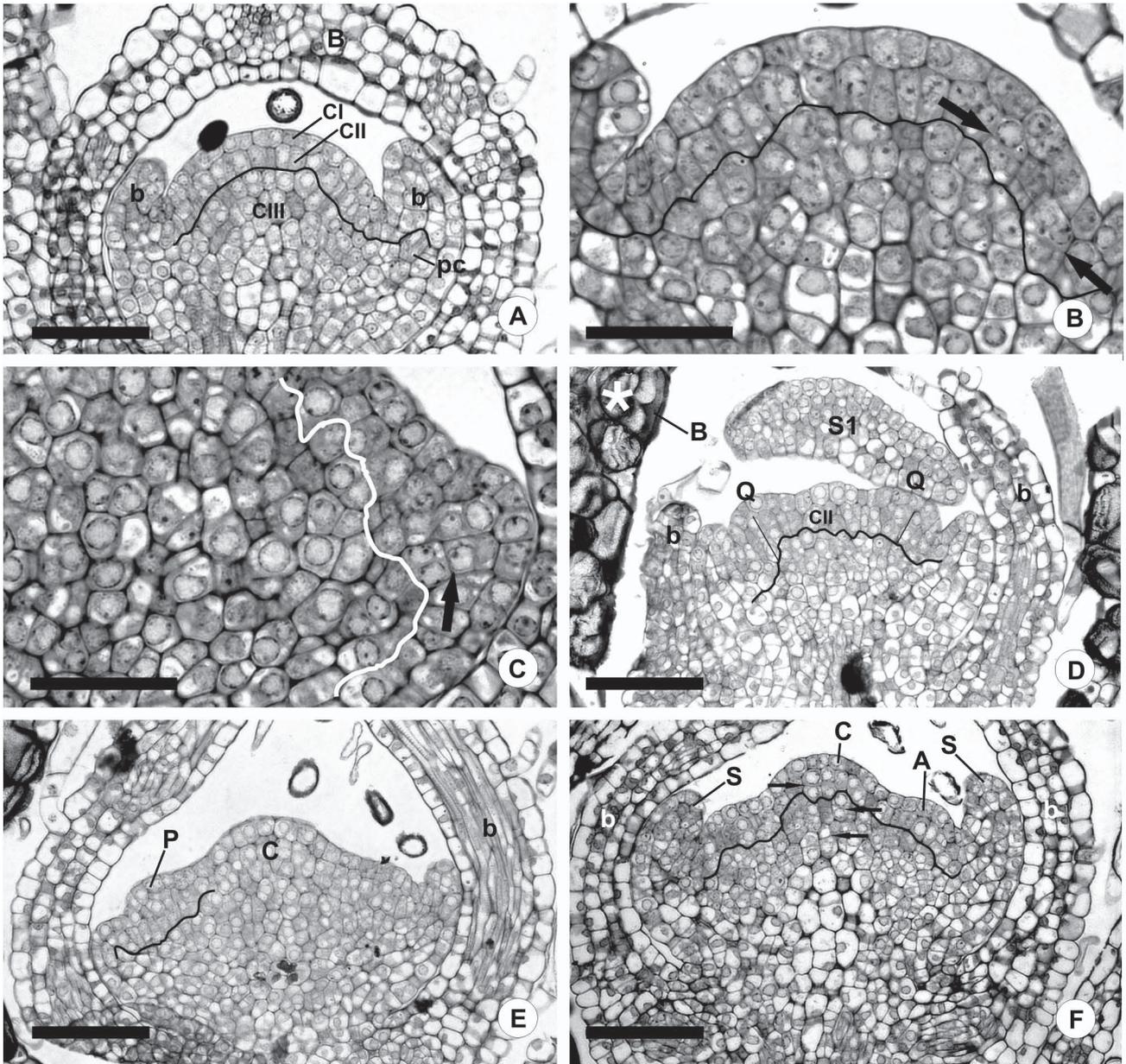


Figura 3: Secções longitudinais de primórdios florais de *A. falcata* em início de desenvolvimento. As linhas marcam a separação entre as células derivadas das camadas CII e CIII. A: Bráctea e bractéolas aparentes, ambas iniciadas pela CII. B: Primórdio floral com divisões periclinais aparentes na CII que inicia um primórdio de sépala (setas). C: Estádio mais adiantado de B, primórdio de sépala visível externamente. D: Células derivadas da CII iniciando as quilhas (retas), sépala abaxial mediana aparente, começando a se curvar sobre o primórdio. O asterisco indica células produtoras de mucilagem. E: Primórdio de pétala e carpelo aparentes. F: Região central do primórdio floral sendo convertida em carpelo através de divisões na CII e, principalmente, na CIII (setas). O primórdio de estame do verticilo antesépalo eleva-se por um alongamento nas células da camada CII e algumas divisões na CIII. D-F: Notar como os verticilos surgem no mesmo plano uns dos outros. A: estame do verticilo antesépalo; B: bráctea; b: bractéola; C: carpelo; CI: camada germinativa I; CII: camada germinativa II; CIII: camada germinativa III; P: primórdio de pétala; pc: procâmbio; Q: quilha; S: primórdios de sépalas; S1: sépala abaxial mediana. B, C: Barras = 25µm. A, D-G: Barras = 50µm.

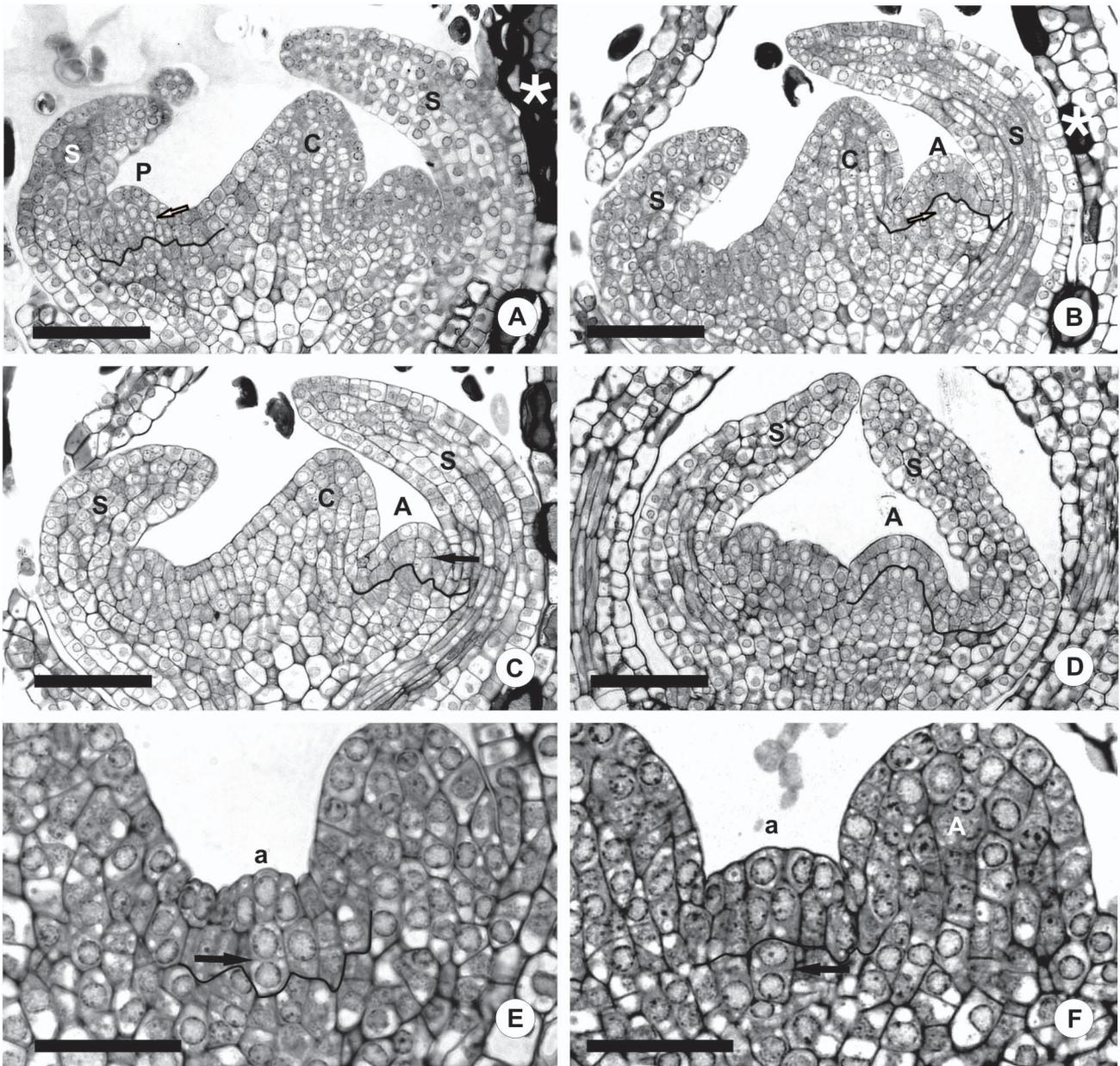


Figura 4: Secções longitudinais de primórdios florais de *A. falcata* em início de desenvolvimento. As linhas pretas marcam a separação entre as células derivadas das camadas CII e CIII. A: Carpelo inclinado para o lado abaxial da flor, primórdio de pétala nitidamente iniciado por células da CII (seta). B, C: Primórdios de estames antesépalos formados por divisões nas camadas CII e CIII. A seta aponta divisões periclinais na CIII em B e na CII em C. D: A camada CII parece ter se reorganizado ou não se dividido e o estame é formado predominantemente pela CIII. E, F: Iniciação dos estames do verticilo antepétalo. Divisões na CII e CIII (setas). Os asteriscos indicam células produtoras de mucilagem. A: estame do verticilo antesépalos; a: estame do verticilo antepétalo; C: carpelo; P: primórdio de pétala; S: primórdios de sépalas. A-D: Barras = 50µm. E, F: Barras = 25µm.

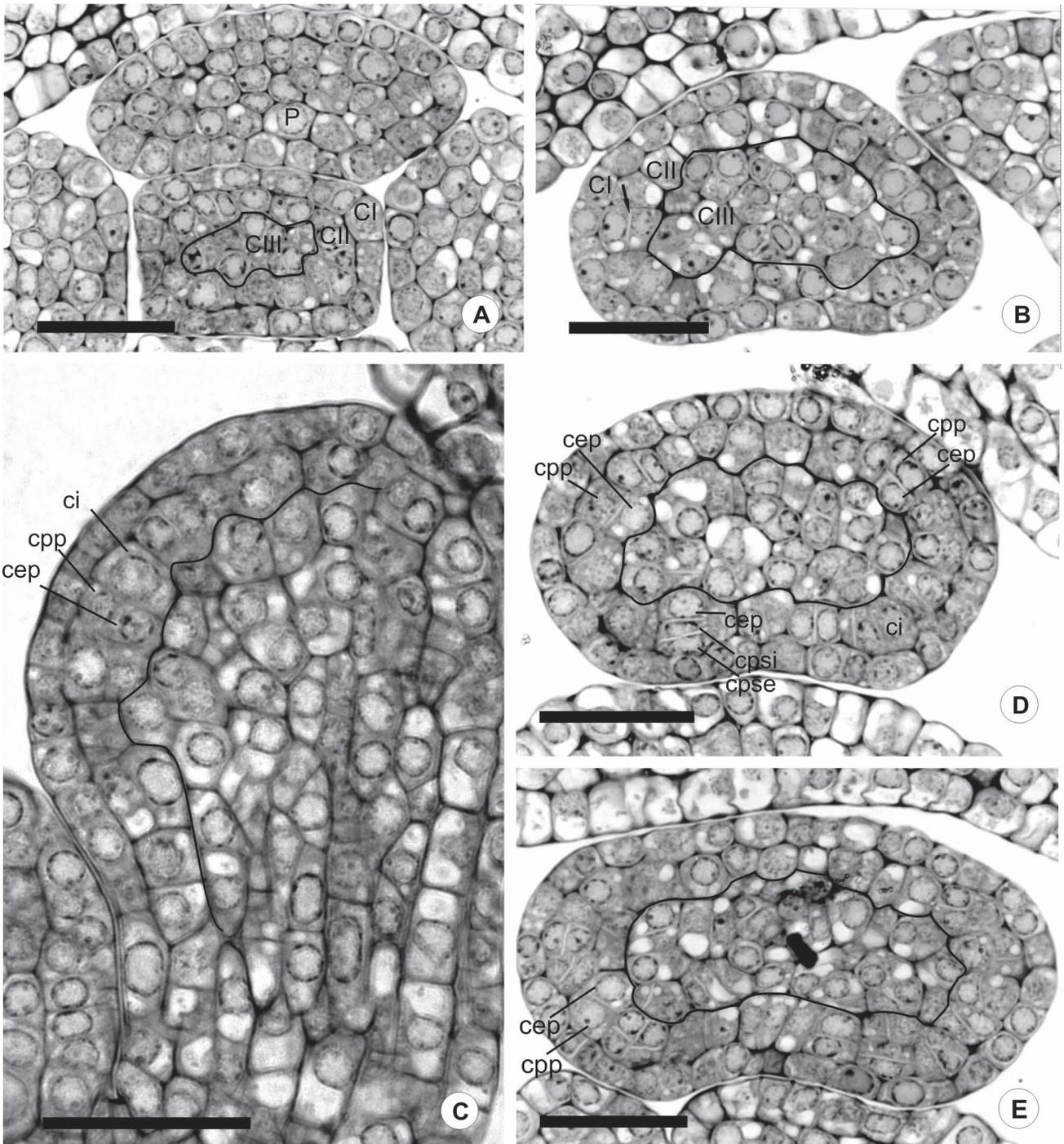


Figura 5: Primórdios de estame de *A. falcata*. As linhas pretas marcam a separação entre as células derivadas das camadas CII e CIII. A: Primórdio de estame do verticilo antepétalo com formato quadrangular e as camadas histogênicas CI, CII e CIII visíveis. B: Primórdio de estame do verticilo antesépalo com formato triangular, uma primeira divisão periclinal na camada CII é indicada pela seta. C: Secção longitudinal do primórdio de estame onde observa-se uma célula inicial (ci) e ao seu lado uma ci que se dividiu em célula parietal primária (cpp) e célula esporogênica primária (cep). D: Em um dos ângulos do primórdio estaminal observa-se a célula inicial, em outros dois, a célula esporogênica primária e parietal primária, e no último a célula parietal primária já se dividiu originando as camadas parietais secundárias interna (cpsí) e externa (cpse). E: O primórdio já se alargou e fica retangular embora ainda não tenham ocorrido divisões na camada parietal primária. CI: camada germinativa I; CII: camada germinativa II; CIII: camada germinativa III; cep: célula esporogênica primária; ci: célula inicial; cpse: camada parietal secundária externa; cpsí: camada parietal secundária interna; cpp: camada parietal primária; P: pétala. Barras = 25µm.

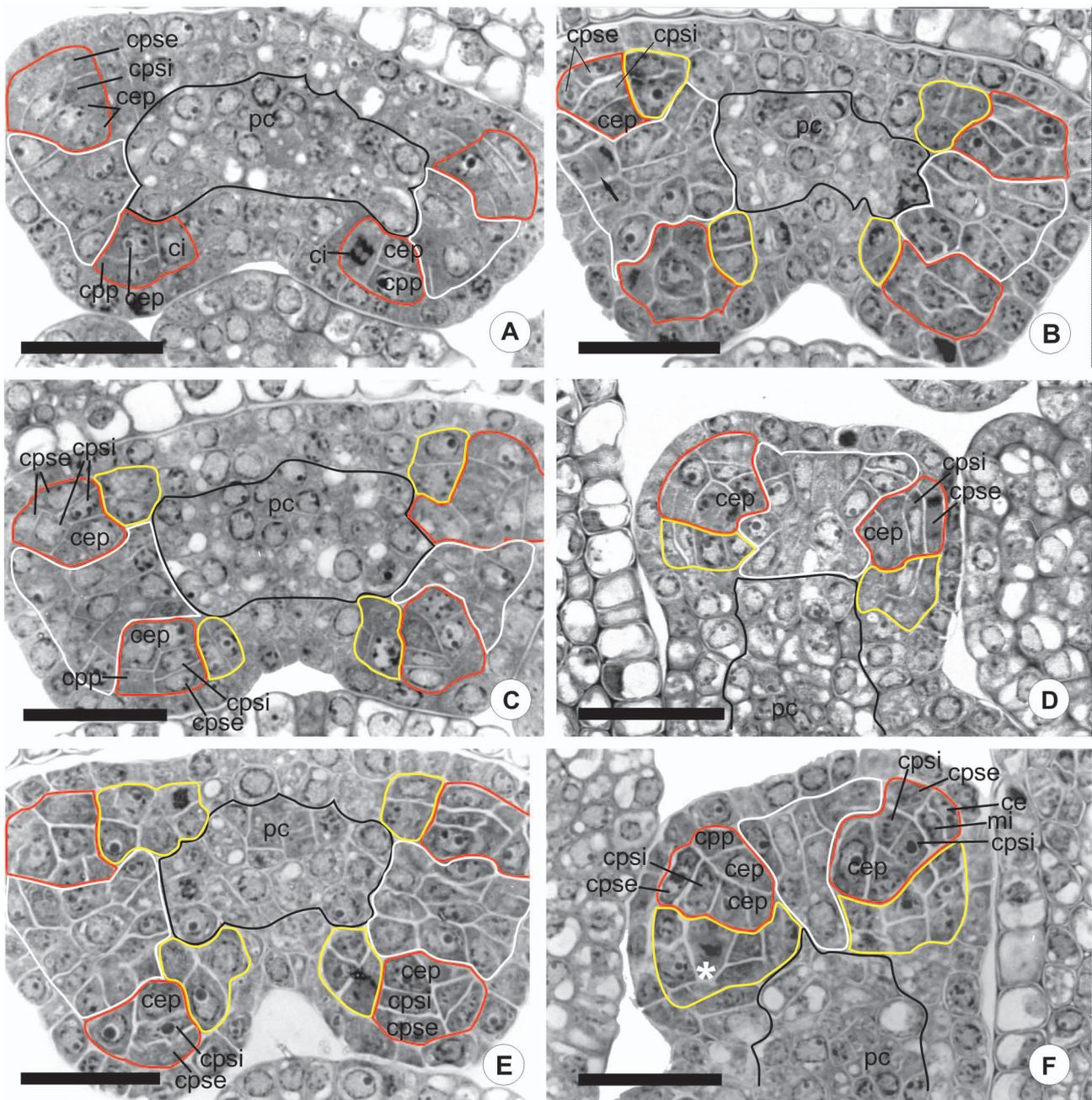


Figura 6: Formação da antera de *A. falcata*. Secções transversais. A cor das linhas indica a linhagem das células. As linhas pretas indicam a separação entre as células derivadas das camadas CII e CIII. As linhas brancas delimitam as células provindas da CII dos flancos do primórdio. As linhas amarelas delimitam as células derivadas da CII das regiões dorsal e ventral adjacentes às iniciais. As linhas vermelhas delimitam as células originadas das iniciais. A: Célula inicial dividindo-se periclinalmente para formar a cpp e a cep. Uma divisão periclinal de cpp originou as camadas parietal secundária externa (cpse) e interna (cpsi). B: Célula da camada CII dos flancos do primórdio em telófase dividindo-se periclinalmente (seta). C: As cpse e cpsi estão sendo formadas em todos os ângulos do primórdio. Nos flancos do primórdio as células da CII dividiram-se rapidamente periclinal e anticlinalmente e tornaram-se mais altas do que largas. D-F: As células derivadas da CII das regiões dorsal e ventral, adjacentes às iniciais, alongam-se e dividem-se periclinal e anticlinalmente (asterisco em F), de forma que estas contornem as esporogênicas por um lado e as derivadas dos flancos do primórdio por outro. F: cpse divide-se periclinalmente e origina uma camada mais externa (ce) abaixo da protoderme e a camada média interna (mi), internamente. ce: camada mais externa derivada da cpse; cep: célula esporogênica primária; ci: célula inicial; cpp: camada parietal primária; cpse: camada parietal secundária externa; cpsi: camada parietal secundária interna; mi: camada média interna; pc: procâmbio. A-F: Barras = 25µm.

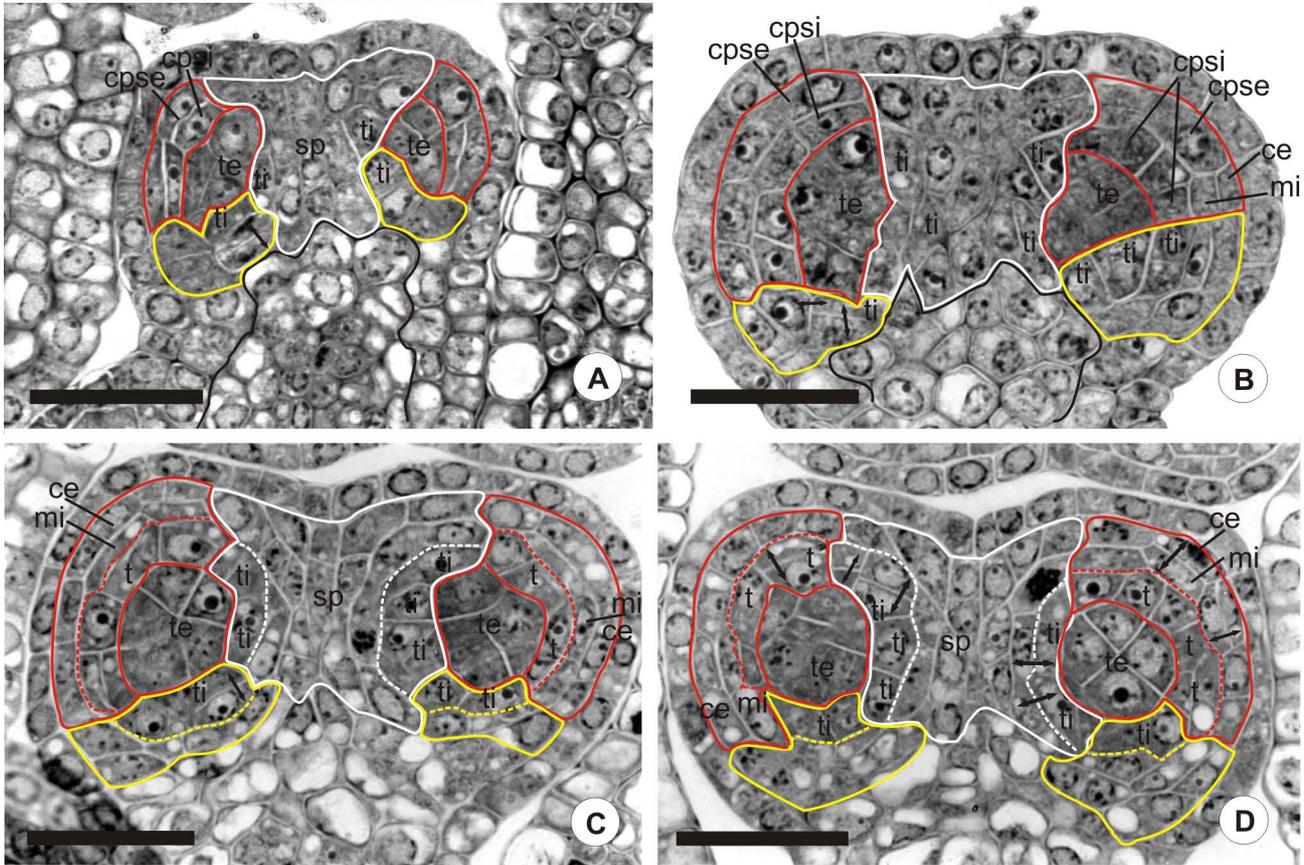


Figura 7: Acompanha-se a formação do tapete exclusivamente a partir de células derivadas da camada CII e a diferenciação do tecido esporogênico em *A. falcata*. A cor das linhas indica a linhagem das células. As linhas pretas indicam a separação entre as células derivadas das camadas CII e CIII. As linhas brancas delimitam as células provindas da CII dos flancos do primórdio. As linhas amarelas delimitam as células derivadas da CII das regiões dorsal e ventral adjacentes às iniciais. As linhas vermelhas delimitam as células originadas das iniciais. A: Células derivadas da CII das regiões dorsal e ventral do primórdio e dos flancos do mesmo adjacentes às iniciais, começam a tomar a posição de células do tapete interno. B: Tecido esporogênico totalmente circundado pelas células do tapete interno em diferenciação. C, D: O tapete já diferenciado, com células de contorno quadrângular e citoplasma denso, é delimitado por linhas pontilhadas. Raras divisões periclinais foram detectadas no tapete externo. As setas duplas indicam células que se originaram da mesma “célula mãe”. ce: célula mais externa derivada da cpse; cpse: camada parietal secundária externa; cpsi: camada parietal secundária interna; mi: camada média interna; sp: septo; t: tapete externo; te: tecido esporogênico; ti: tapete interno. A-D: Barras = 25µm.

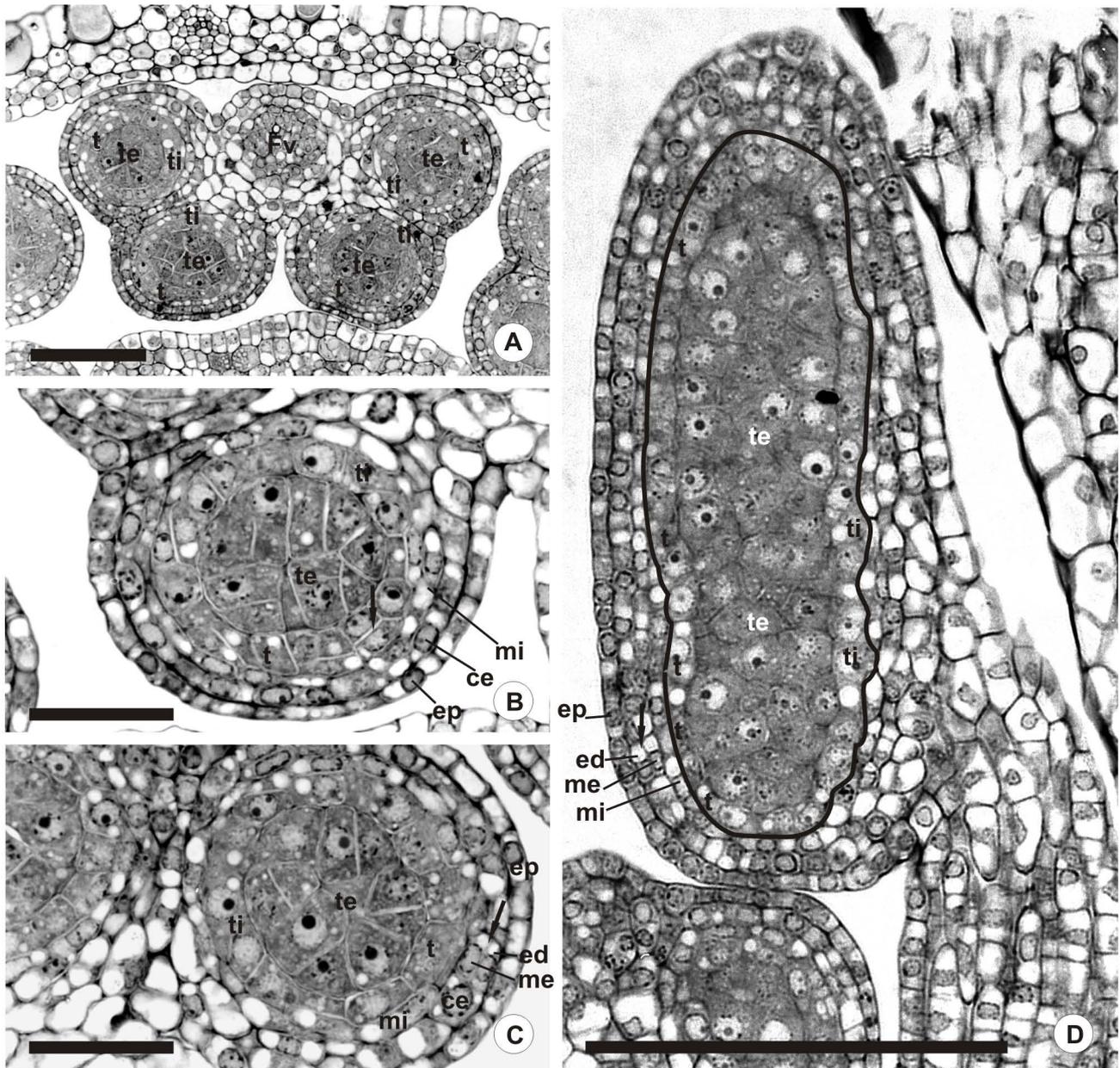


Figura 8: Formação das últimas camadas dos estratos parietais da antera de *A. falcata*. A-C: Secções transversais. D: Secção longitudinal. A: Antera com microsporângios bem delimitados. O tecido esporogênico tem células grandes de citoplasma muito denso e o tapete já pode ser diferenciado por ter células menos vacuoladas que as dos outros estratos parietais e de formato quadrangular. B: Detalhe de um microsporângio. A camada parietal secundária interna diferenciou-se em tapete, e a camada parietal secundária externa dividiu-se em uma camada mais externa e na camada média interna. Divisões periclinais incomuns nas células do tapete externo diferenciado (seta) foram observadas, possivelmente formando um tapete irregularmente bisseriado. C, D: Divisões periclinais nas células da camada mais externa (setas) indicam a formação do endotécio externamente e da camada média externa. D: A linha preta separa o tapete das demais camadas parietais. ce: célula mais externa; ed: endotécio; ep: epiderme; Fv: feixe vascular; me: camada média externa; mi: camada média interna; t: tapete; te: tecido esporogênico; ti: tapete interno. A: Barra = 50µm. B-D: Barras = 25µm.

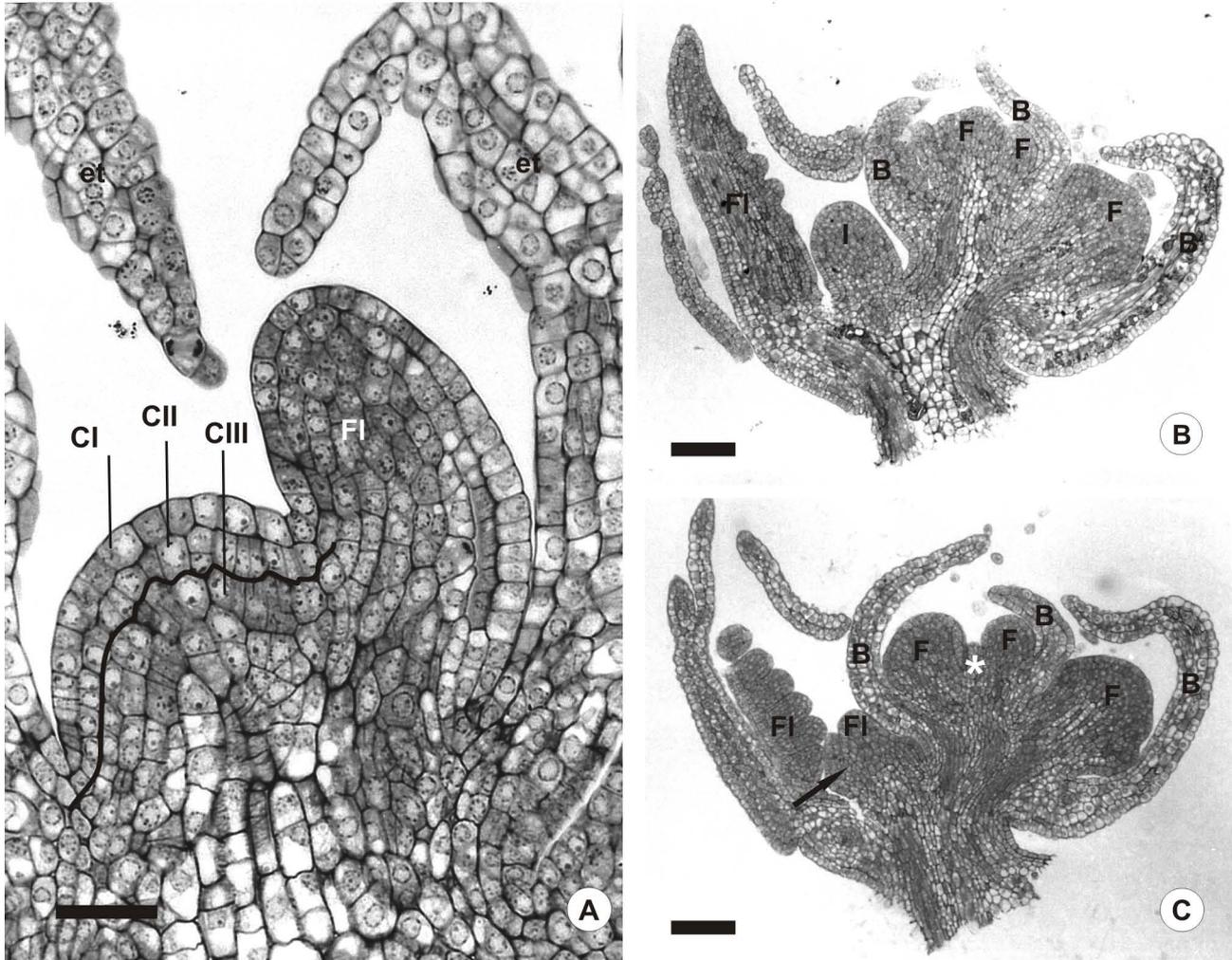


Figura 9: Secções longitudinais de ramos de segunda e terceira ordens de *A. sensitiva*. A: Meristema apical do eixo de segunda ordem aparente com as camadas CI, CII e CIII, observa-se um primórdio foliar produzido por este meristema e suas estípulas adjacentes. B, C: Folha jovem com uma inflorescência de terceira ordem (racemo) em sua axila, o pedúnculo ainda é curto e a flor terminal da inflorescência foi observada. Também pode-se observar o ápice do eixo de segunda ordem originando estípulas (seta) e um primórdio foliar. O asterisco indica o eixo da inflorescência de terceira ordem. B: bráctea; CI: camada germinativa I; CII: camada germinativa II; CIII: camada germinativa III; et: estípula; F: primórdio floral; FI: primórdio foliar; I: ápice da inflorescência de segunda ordem. A: Barra = 50µm. D, E: Barras = 100µm.

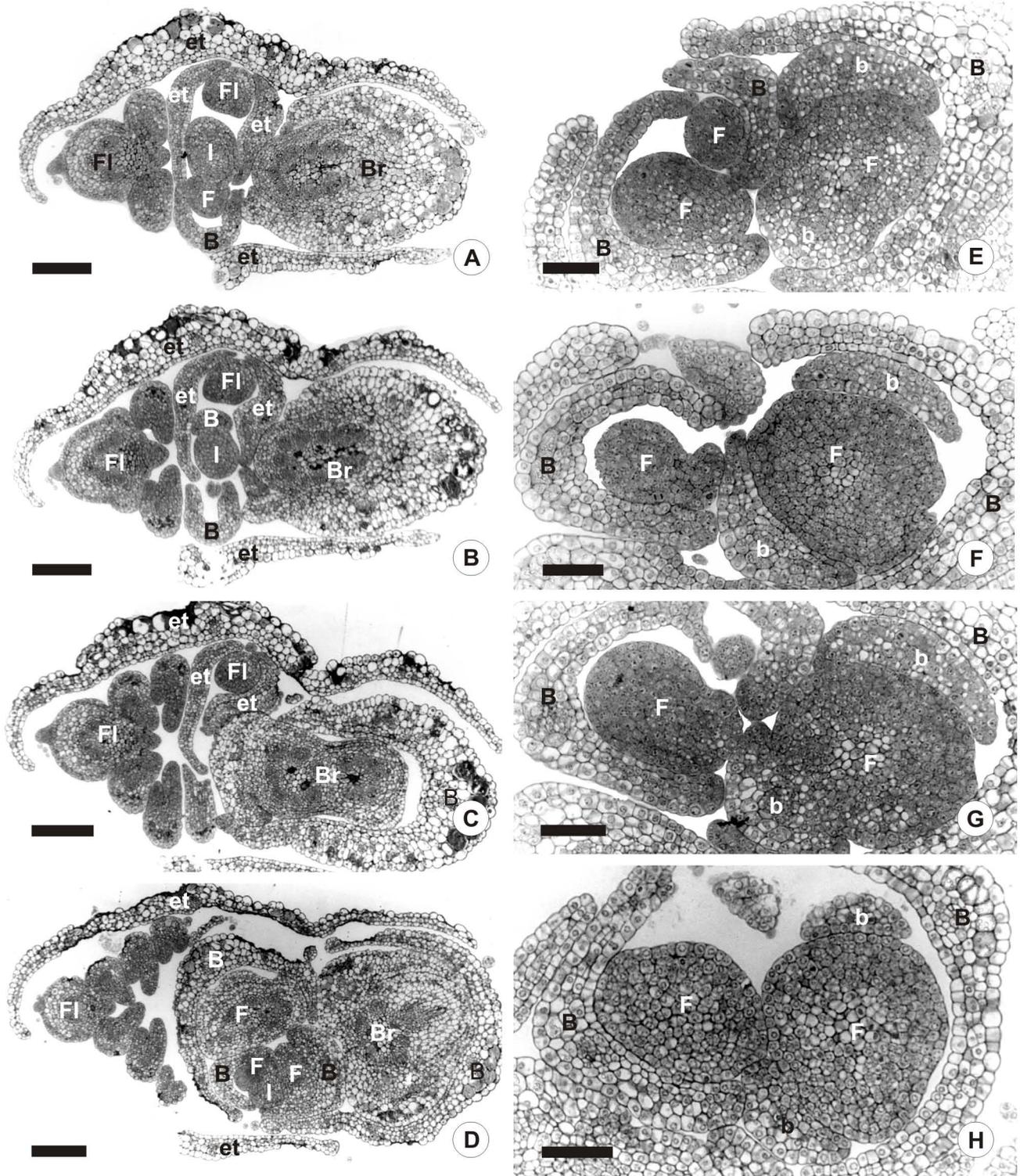


Figura 10: Secções transversais de ramos de segunda e terceira ordens de *A. sensitiva*. A-D: Folha jovem e estípulas aparentes, a base de um racemo está presente em sua axila. Entre a base do racemo e a folha surgem um novo primórdio foliar e o racemo axilar. Através da sequência de cortes (que estão dispostos do ápice para a base do ramo) observam-se o novo primórdio foliar, suas estípulas e o racemo axilar com o ápice da inflorescência, o primeiro primórdio floral na axila de uma bráctea e uma segunda bráctea sendo originada pelo ápice. D: O corte mais basal evidencia os primórdios florais do racemo mais velho, do qual apenas a base era observada nos cortes apicais. E-H: Nesta sequência de cortes dispostos do ápice para a base do racemo, primórdios florais com brácteas e bractéolas em diferentes estádios de desenvolvimento são observados. B: bráctea; b: bractéola; Br: base de racemo; et: estípula; F: primórdio floral; FI: primórdio foliar/folha; I: ápice da inflorescência. A-D: Barras = 100µm. E-H: Barras = 50µm.

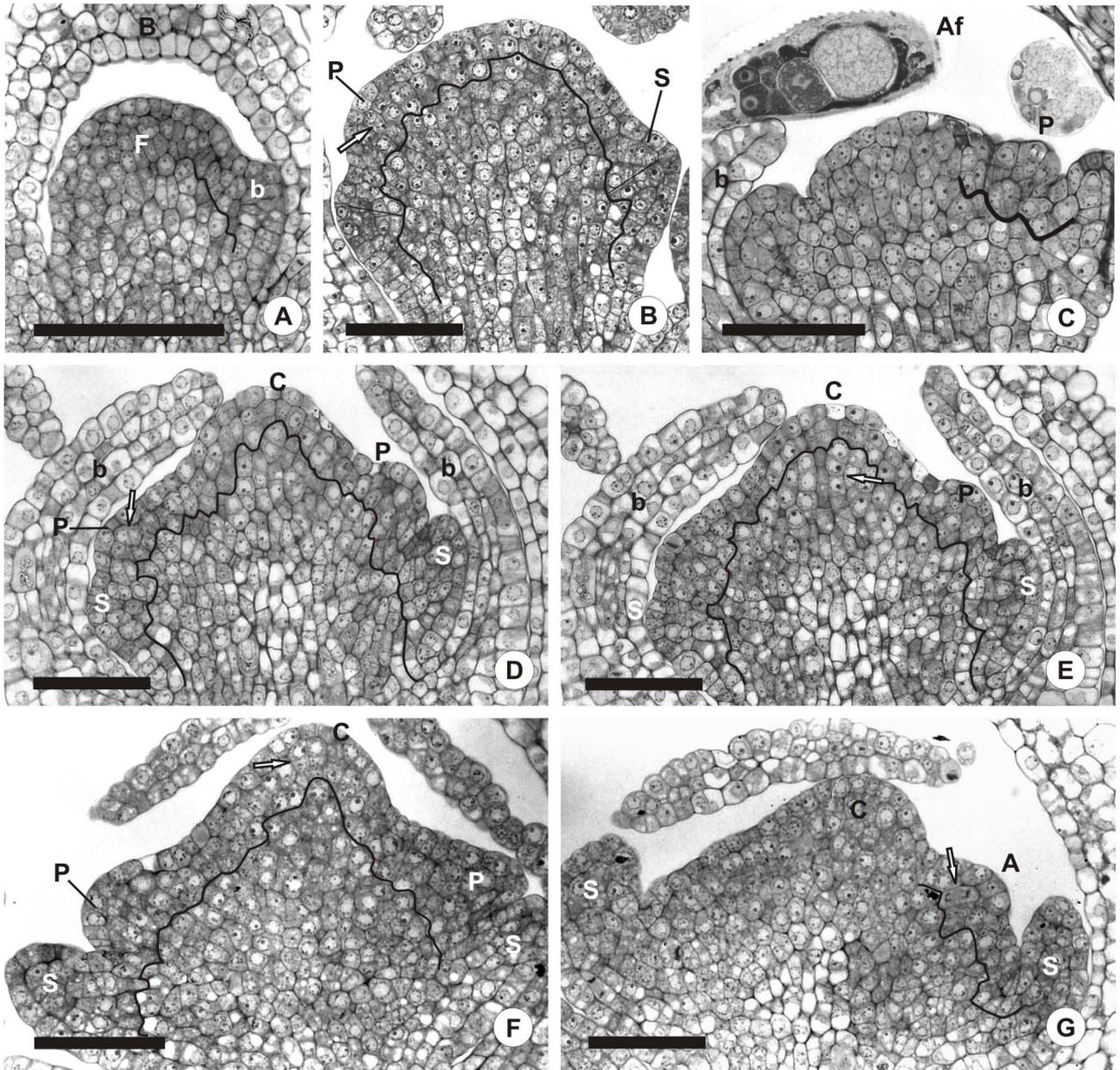


Figura 11: Secções longitudinais de primórdios florais de *A. sensitiva* em desenvolvimento. As linhas pretas marcam a separação entre as células derivadas das camadas CII e CIII. A: Inicialização de bractéola a partir da camada CII. B: Primórdio floral convexo com formação de primórdios de sépalas e pétala a partir de divisões periclinais de células da camada CII (seta). C: Primórdio de pétala danificado por ataque de afídio. D, E: Formação de sépalas e pétalas, iniciação do carpelo com uma maior contribuição da CIII e poucas divisões periclinais na CII. As setas indicam células que se dividiram periclinamente. Os verticilos surgem em diferentes alturas devido ao formato cônico do primórdio floral. F: Secção da região do primórdio floral entre os dois lobos do cálice. Observam-se as pétalas laterais com posição mais perpendicular ao eixo que as demais e uma pequena porção fusionada entre os lobos do cálice. Divisões na CII para a formação do carpelo são observadas (seta). G: A seta aponta uma célula da camada CII em anáfase, iniciando a formação do estame antesépalo. A: estame do verticilo antesépalo; Af: afídio; b: bractéola; B: bractea; C: carpelo; F: primórdio floral; P: primórdio de pétala; S: primórdios de sépalas. A-G: Barras = 50μm.

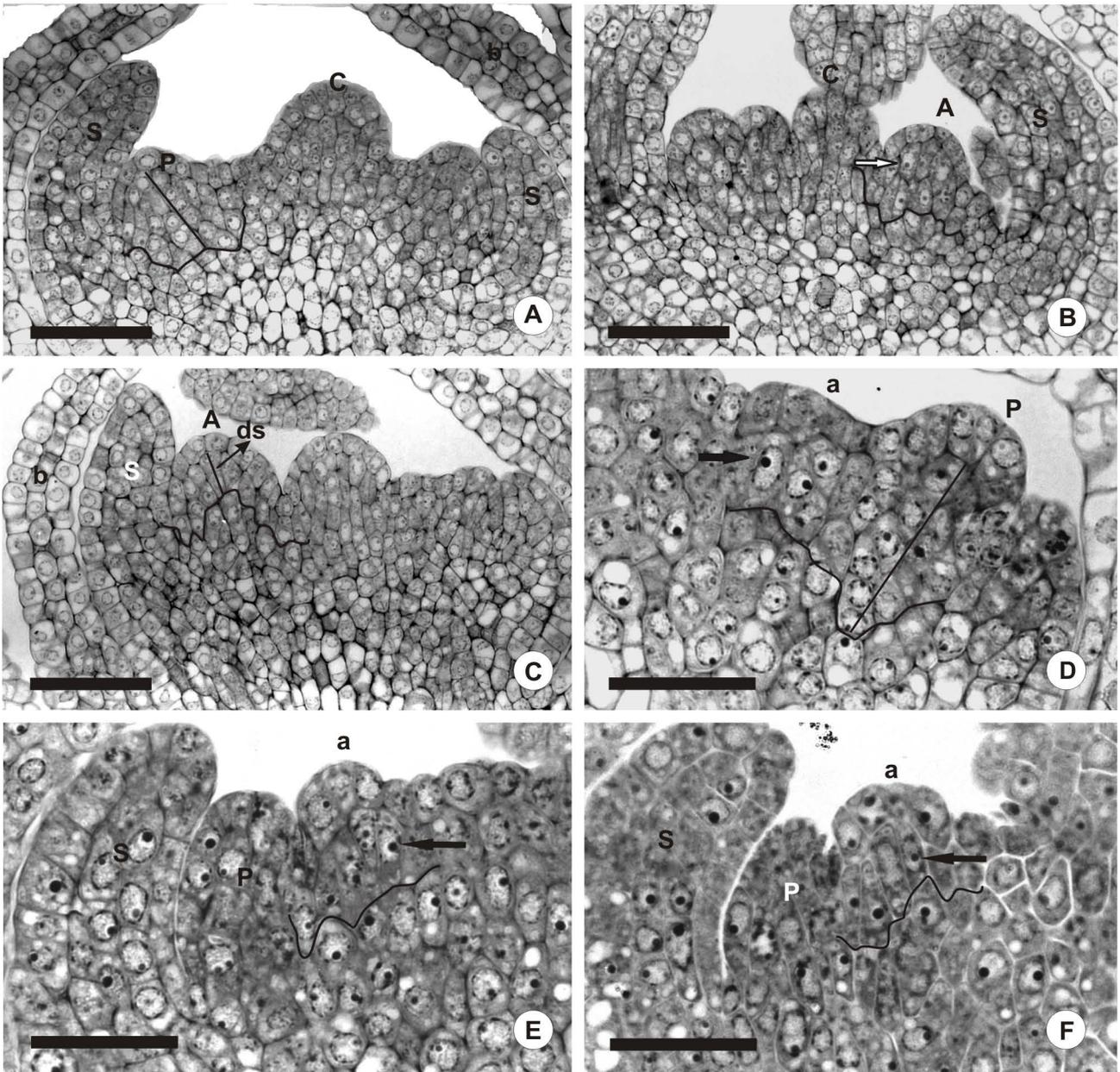


Figura 12: Secções longitudinais de primórdios florais de *A. sensitiva* em desenvolvimento. As linhas pretas indicam a separação entre as células derivadas das camadas CII e da CIII. A: Primórdio de pétala com todas as células originadas de divisões periclinais na camada CII (barra). B: Primórdio de estame do verticilo antesépalo formado por duas camadas de células derivadas de uma primeira divisão na camada CII (seta branca). C: Primórdio de estame do verticilo antesépalo com duas camadas de células derivadas da CII (barra) e as demais da CIII. D: Primórdio de pétala com uma sequência de células originadas da camada CII (barra). D-F: Primórdio de estame do verticilo antepétalo iniciado pelas células da CII que aumentam muito em altura (setas pretas) para uma posterior divisão periclinal. A: primórdio de estame do verticilo antesépalo; a: primórdio de estame do verticilo antepétalo; b: bractéola; C: carpelo; ds: células derivadas da CII; P: primórdio de pétala; S: primórdio de sépala. A-C: Barras = 50µm. D-F: Barras = 25µm.

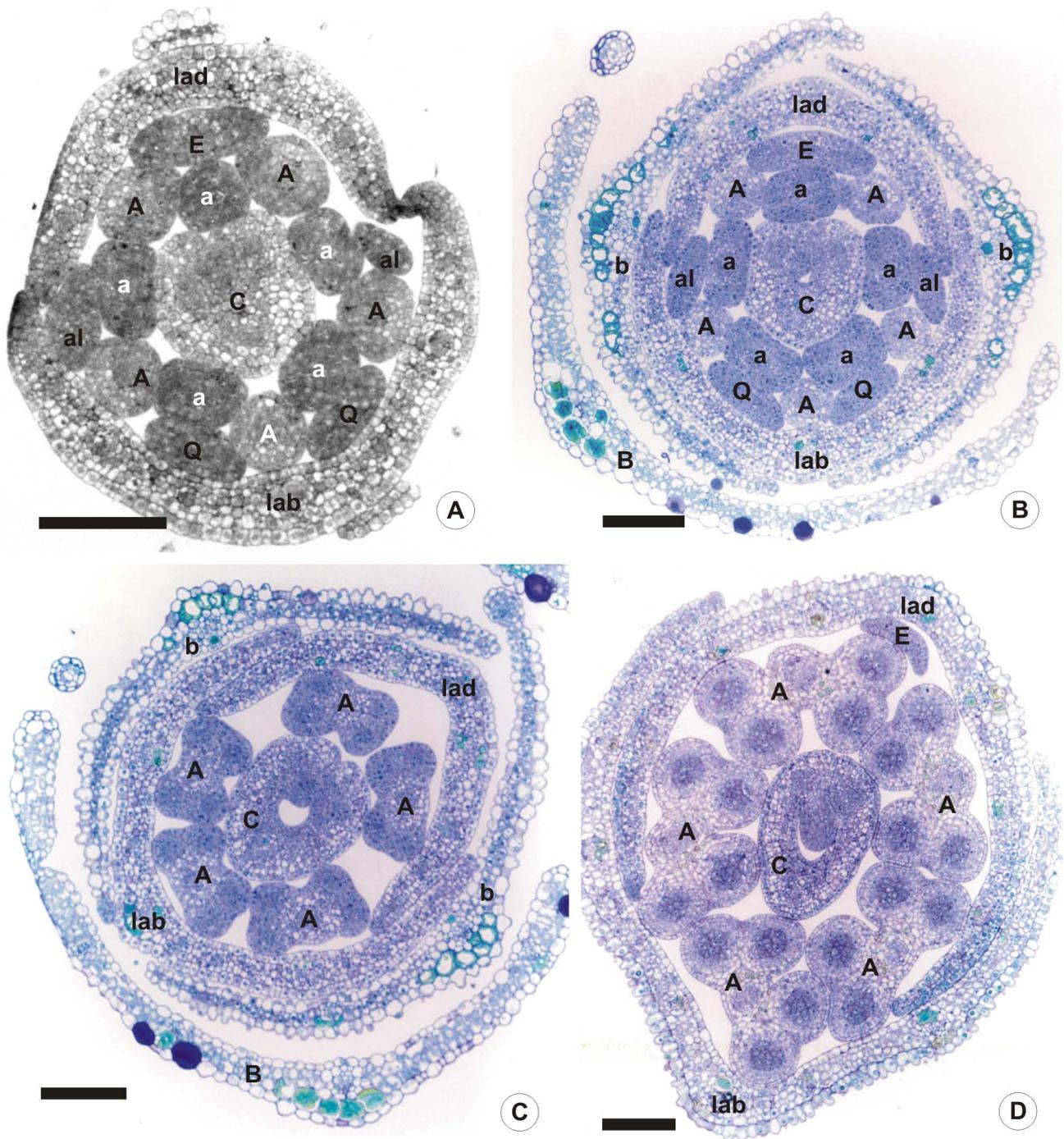


Figura 13: Botões florais de *A. sensitiva* em diferentes estádios de desenvolvimento em secção transversal. A, B: Todos os verticilos florais estão aparentes. Os primórdios das alas estão inclinados para o lado abaxial do botão floral. A: Corte de uma região basal do botão estando evidente a pequena fusão entre os lobos do cálice. As anteras do verticilo antepétalo ainda não se diferenciaram. B: Estame do verticilo antepétalo com porção distal dilatada de formato retangular. B, C: Bráctea e bractéolas presentes, lobo abaxial do cálice sobrepondo o adaxial. Células com abundância de compostos fenólicos (em verde) são frequentes sob os feixes vasculares de brácteas e bractéolas, estando em menor quantidade no cálice. C, D: Dos verticilos de estames apenas o antesépalo está aparente. C: O formato da antera já é bem definido com sulcos dorsal e ventral aparentes. D: Anteras com tecido esporogênico formado. A: primórdio de estame do verticilo antesépalo; a: primórdio de estame do verticilo antepétalo; al: alas; B: bráctea; b: bractéola; C: carpelo; E: estandarte; lab: lobo abaxial do cálice; lad: lobo adaxial do cálice; Q: pétalas que constituem a quilha. A-D: Barras = 100µm.

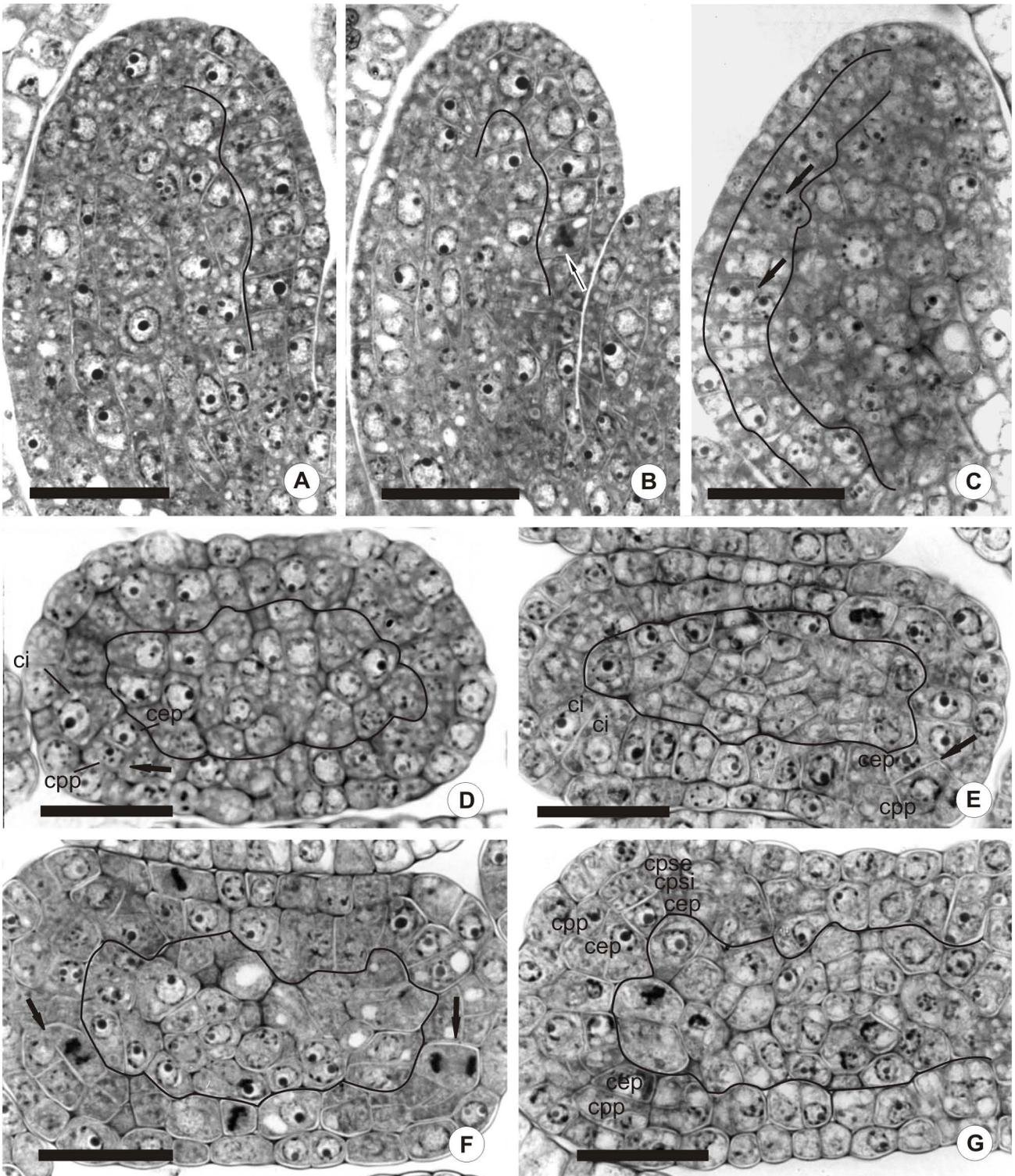


Figura 14: Primórdios de estame de *A. sensitiva*. A-C: Secções longitudinais. D-G: Secções transversais. As linhas pretas indicam a separação entre as células derivadas das camadas CII e CIII. A-F: Crescimento em altura da maioria das células da CII e sua posterior divisão periclinal. Em cada ângulo do primórdio existem duas células consideradas iniciais meristemáticas, pois dão origem à camada parietal primária (cpp) externamente e a camada esporogênica primária (cep) internamente. Nas regiões dorsal e ventral do primórdio, as células da CII não se dividem. G: As células da cpp dividem-se periclinalmente e formam as camadas parietal secundária externa (cpse) e interna (cpsi). As setas apontam as células alongadas ou dividindo-se. cep: célula esporogênica primária; ci: célula inicial; cpp: camada parietal primária; cpse: camada parietal secundária externa; cpsi: camada parietal secundária interna. A-G: Barras = 25µm.

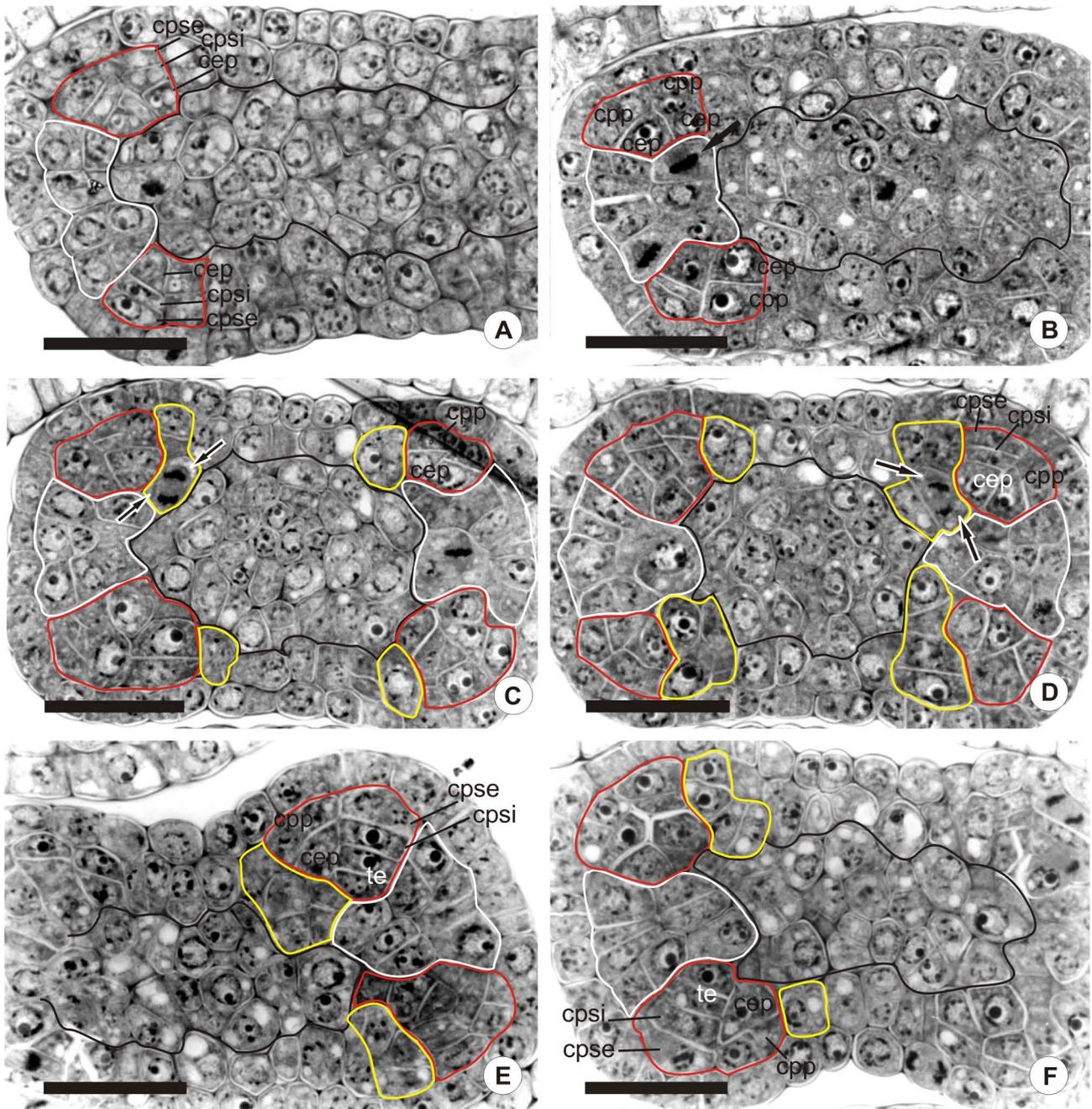


Figura 15: Formação da antera de *A. sensitiva*. Secções transversais. A cor das linhas indica a linhagem das células. As linhas pretas indicam a separação entre as células derivadas das camadas CII e CIII. As linhas brancas delimitam as células provindas da CII dos flancos do primórdio. As linhas amarelas delimitam as células derivadas da CII das regiões dorsal e ventral adjacentes às iniciais. As linhas vermelhas delimitam as células originadas das iniciais. A: As camadas parietal secundária externa (cpse) e interna (cpsi) e a célula esporogênica primária (cep) estão presentes nos ângulos do primórdio. Nos flancos do primórdio observam-se apenas uma camada interna e outra externa originadas da CII. B: As células dos flancos dos primórdios ficam muito altas em comparação às derivadas das iniciais e dividem-se anticlinalmente (seta). A cpp pode dividir-se anticlinalmente antes de dar origem à cpse e cpsi. C, D: As células da CII das regiões dorsal e ventral do primórdio, adjacentes às derivadas da inicial alongam-se e dividem-se periclinalmente, de forma que estas contornem internamente as derivadas da inicial juntamente com as células dos flancos. E, F: A célula esporogênica primária se divide originando as precursoras do tecido esporogênico. cep: célula esporogênica primária; cpp: camada parietal primária; cpse: camada parietal secundária externa; cpsi: camada parietal secundária interna; te: células precursoras do tecido esporogênico. A-F: Barras = 25µm.

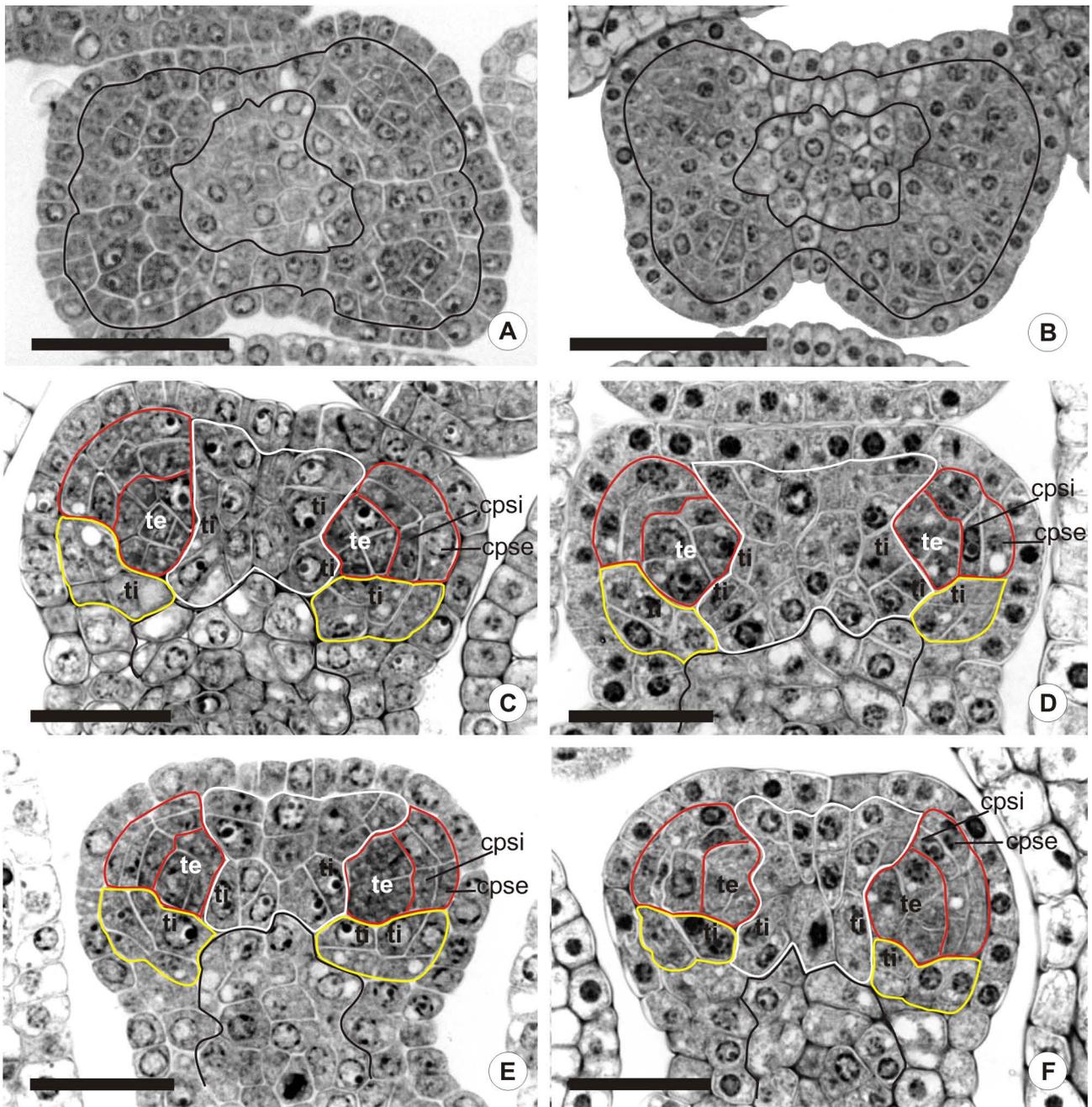


Figura 16: Formação da antera de *A. sensitiva*. Seções transversais. A, B: O início da formação dos microsporângios modifica o formato dos primórdios estaminais onde a morfologia de uma antera fica nítida. As linhas pretas delimitam as células derivadas das camadas CI, CII e CIII. Notar que os microsporângios são totalmente formados pelas células derivadas da CII. C-F: A cor das linhas indica a linhagem das células. As linhas pretas indicam a separação entre as células derivadas das camadas CII e CIII. As linhas brancas delimitam as células provindas da CII dos flancos do primórdio. As linhas amarelas delimitam as células derivadas da CII das regiões dorsal e ventral adjacentes às iniciais. As linhas vermelhas delimitam as células originadas das iniciais. As células precursoras do tecido esporogênico ficam mais conspícuas devido ao citoplasma denso. As células derivadas da CII dos flancos do primórdio continuam se dividindo periclinal e anticlinalmente e formarão células do septo e do tapete interno. cpse: camada parietal secundária externa; cpsi: camada parietal secundária intena; te: células precursoras do tecido esporogênico; ti: células precursoras do tapete interno. A, B: Barras = 50µm. C-F: Barras = 25µm.

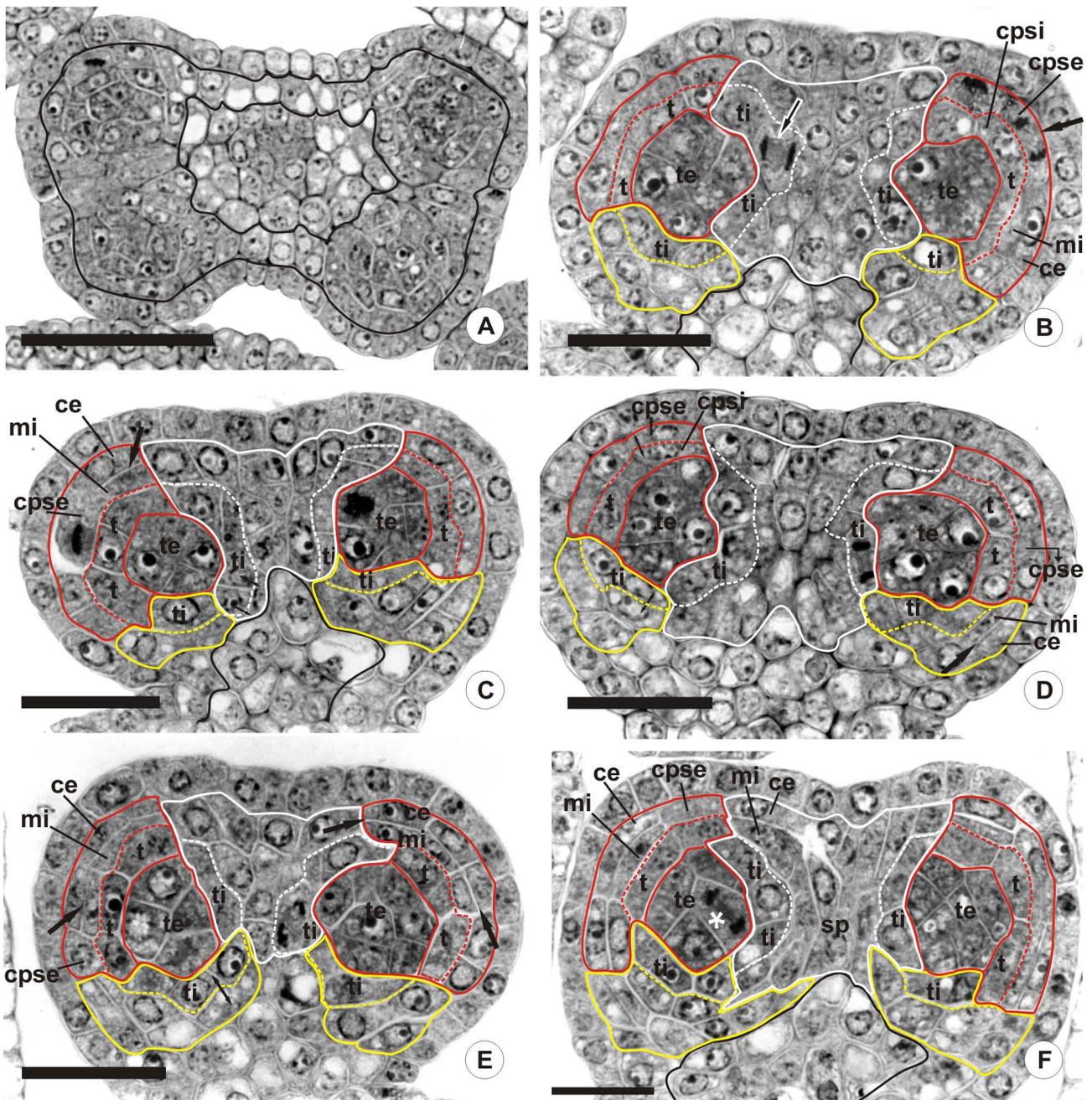


Figura 17: Formação da antera de *A. sensitiva*. Seções transversais. A: Microsporângios conspícuos com células tapetais em diferenciação. As linhas pretas delimitam as células derivadas das camadas CI, CII e CIII. B-F: A cor das linhas indica a linhagem das células. As linhas pretas indicam a separação entre as células derivadas das camadas CII e CIII. As linhas brancas delimitam as células provindas da CII dos flancos do primórdio. As linhas amarelas delimitam as células derivadas da CII das regiões dorsal e ventral adjacentes às iniciais. As linhas vermelhas delimitam as células originadas das iniciais. As linhas pontilhadas contornam o tapete. B: A seta de contorno branco aponta uma célula derivada da CII da região do flanco em anáfase, onde uma das derivadas fará parte do tapete interno. A seta preta aponta uma célula da camada parietal secundária externa (cpse) em anáfase (divisão anticlinal) aumentando em diâmetro a extensão do microsporângio. C e D: As setas apontam células derivadas de uma divisão periclinal da cpse originando internamente a camada média interna (mi) e uma camada mais externa (ce) abaixo da epiderme. D: Uma das células constituintes do primórdio de tapete interno divide-se anticlinalmente crescendo em diâmetro a extensão do microsporângio. E: Observa-se o mesmo que em C e D num estágio mais avançado, quase todas as cpse já se dividiram. Uma célula que formará o tapete interno está em anáfase. F: O asterisco indica uma anáfase no tecido esporogênico promovendo a sua proliferação. Setas de ponta dupla indicam células de mesma origem. ce: camada mais externa; cpse: camada parietal secundária externa; cpsi: camada parietal secundária interna; mi: camada média interna; t: tapete externo; te: tecido esporogênico; ti: tapete interno; sp: septo. A: Barra = 50 μ m. B-F: Barras = 25 μ m.

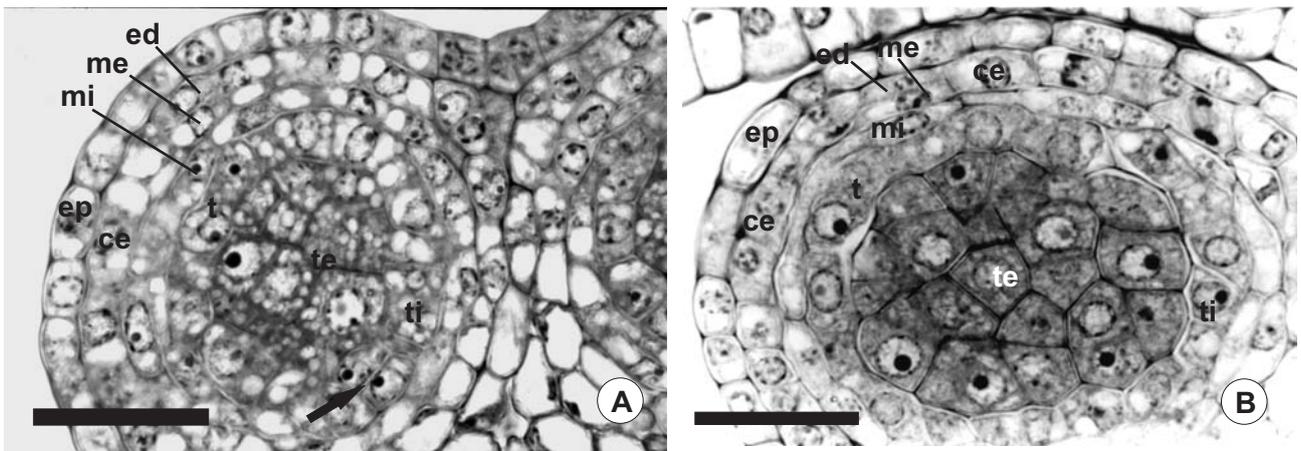


Figura 18: Formação das últimas camadas dos estratos parietais da antera de *A. sensitiva*. A, B: Os microsporângios já estão totalmente formados, a camada mais externa (ce) abaixo da epiderme, derivada da camada parietal secundária externa (cpse) divide-se periclinalmente originando o endotécio externamente e a camada média externa mais internamente. O tecido esporogênico tem células grandes de citoplasma muito denso e o tapete já pode ser diferenciado por ser menos vacuolado que as demais células dos estratos parietais e ter células mais quadrangulares. Em B o tecido esporogênico se proliferou em relação a A. Em A uma célula do tapete interno está se dividindo periclinalmente (seta) originando uma porção bisseriada. ce: camada mais externa derivada da cpse; ed: endotécio; ep: epiderme; me: camada média externa; mi: camada média interna; t: tapete externo; te: tecido esporogênico; ti: tapete interno. A, B: Barras = 25 μ m.

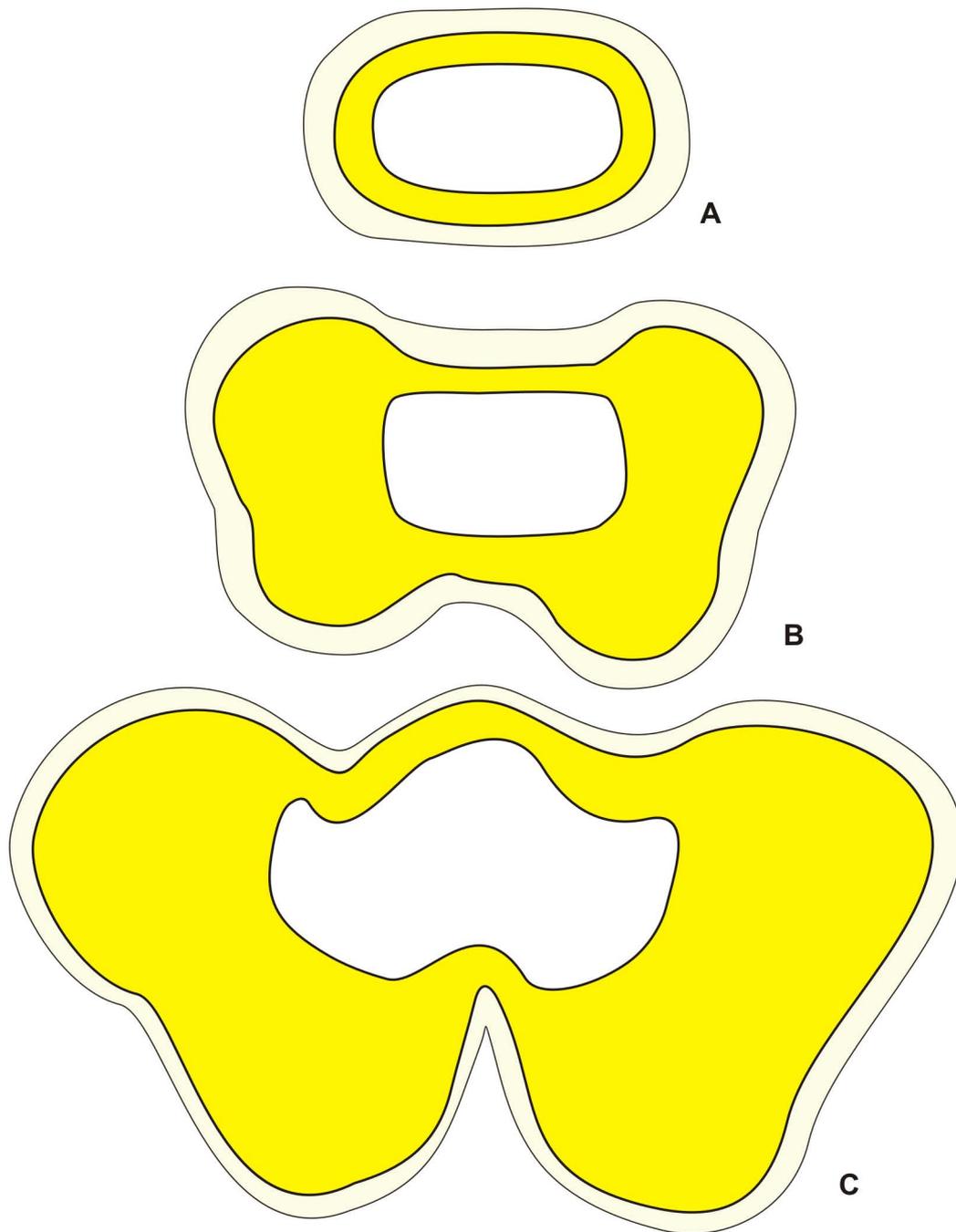


Figura 19: Esquema do desenvolvimento da antera de *A. sensitiva* representando as três camadas histogênicas. Camada CI em pardo, camada CII em amarelo e camada CIII em branco. A: Primórdio de estame no qual as células da camada CII ainda não se dividiram e a maior parte do volume do órgão é dada pelas células da camada CIII. B: A camada CII se dividiu e deu origem a várias células de funções distintas nos microsporângios, neste estágio já se diferenciam o tecido esporogênico e as células precursoras do tapete. C: As células derivadas da camada CII formam todo o microsporângio e constituem a maior parte da antera. A camada CIII se dividiu pouco, o suficiente para a formação do procâmbio e da maioria das células do conectivo.

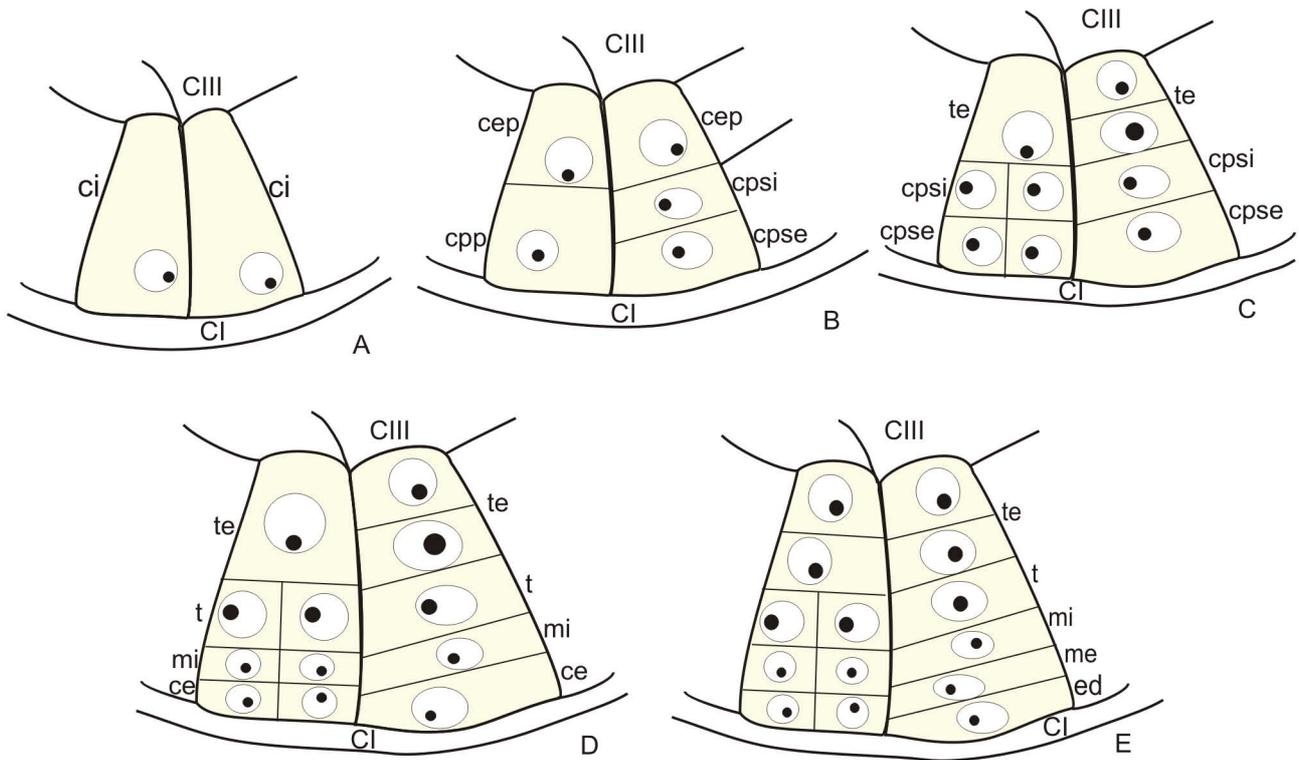


Figura 20: Esquema do desenvolvimento da principal linhagem celular da antera originada das células da camada CII dos ângulos dos primórdios, ou seja, das células iniciais meristemáticas. Este esquema demonstra o tipo Dicotiledôneo de desenvolvimento dos estratos parietais da antera. ce: célula mais externa derivada célula parietal secundária externa; cep: célula esporogênica primária; ci: célula inicial meristemática; CI: camada germinativa I; CIII: camada germinativa III; cpp: célula parietal primária; cpse: célula parietal secundária externa; cpsi: célula parietal secundária interna; ed: endotécio; me: camada média externa; mi: camada média interna; t: tapete externo; te: tecido esporogênico.

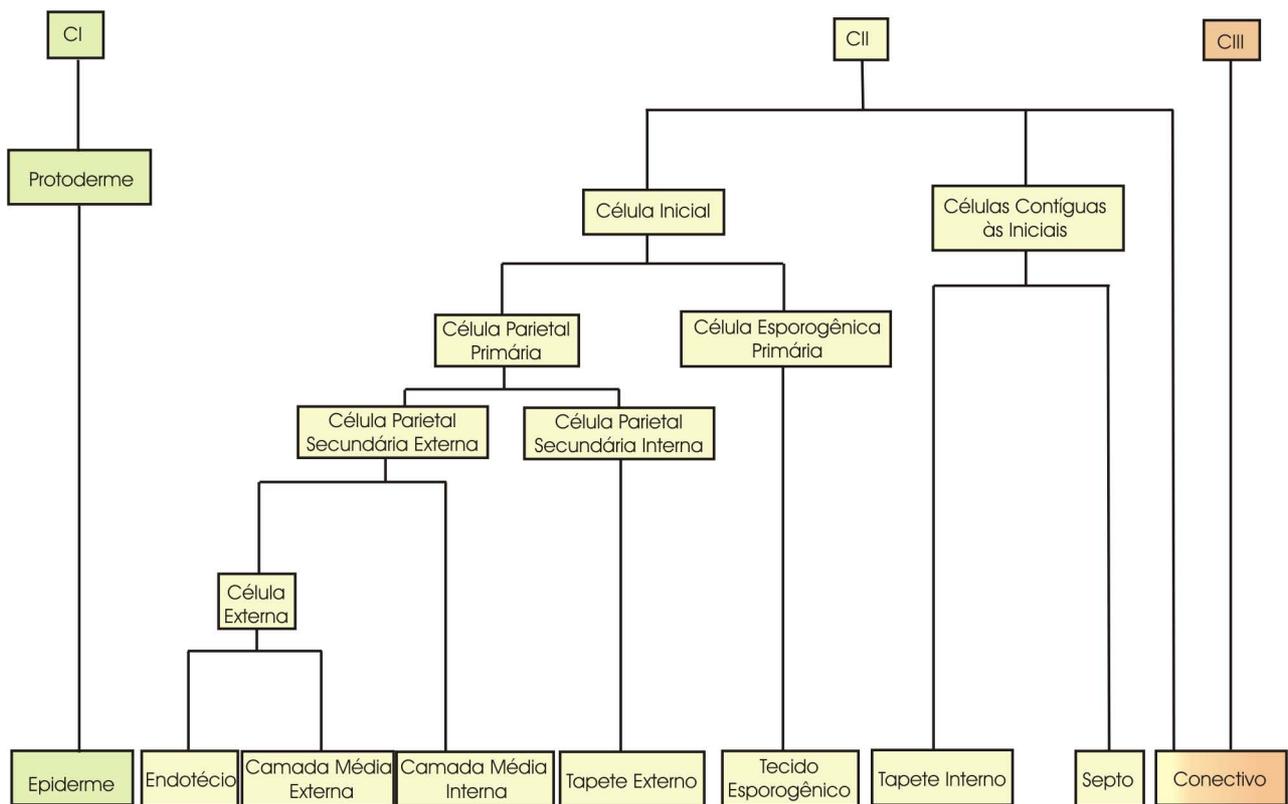


Figura 21: O esquema demonstra como surgem os tecidos da antera a partir das camadas germinativas CI, CII e CIII. As principais linhagens originam-se a partir da camada CII do primórdio estaminal em ambas espécies do gênero *Aeschynomene*.

4 - Discussão

A análise anatômica do desenvolvimento da inflorescência de *A. sensitiva* corrobora o observado sob MEV (Capítulo II), exceto pela filotaxia subdística das flores descrita no Capítulo II que se mostra dística quando as inflorescências são observadas em estádios mais juvenis sob MO. Outros dados ainda foram acrescentados neste Capítulo, como a posição perpendicular de uma inflorescência de terceira ordem em relação à outra, tendo disposição ortogonal e a função protetora das estípulas em relação às inflorescências recém formadas. Tucker & Grimes (1999) destacam no caso de inflorescências constituídas por sistemas de ramos, que seu formato sofre influência do tempo relativo da expansão do ramo e aumento diferencial ou supressão dos internós. No presente trabalho, verifica-se essa idéia devido a difícil visualização, a olho nu, dos racemos laterais e número de flores em *A. falcata*, pois a visualização das flores se dá apenas após o alongamento de seus pedicelos, próximo à antese. Em *A. sensitiva*, a dificuldade é de visualização das diversas ordens da inflorescência quando ainda jovens, pois além das raquis curtas, o pedúnculo da inflorescência tarda a se alongar.

A transição da fase vegetativa para a reprodutiva é a mais dramática mudança de fase no desenvolvimento da planta, sendo regulada por condições ambientais, bem como por um complexo genético que monitora o estágio de desenvolvimento (Araki, 2001). Uma das mais importantes diferenças entre o meristema floral e o vegetativo é que ele é determinado, de tal forma que todas as células do meristema tornam-se comprometidas para um caminho de diferenciação (Zik & Irish, 2003). O desenvolvimento da flor é um processo de múltiplos passos, incluindo a formação do meristema floral, estabelecimento da identidade de órgãos, seguidos pela diferenciação das estruturas florais (Zik & Irish, 2003).

Segundo Gifford (1954), diversos trabalhos demonstram que os meristemas da flor e da inflorescência exibem, essencialmente, a mesma estrutura do ápice vegetativo, gerado por um grupo de células indiferenciadas, o meristema apical. Após a indução da floração, ambos meristemas, da flor e da inflorescência, mantêm a mesma estrutura em camadas, derivadas do correspondente do meristema apical (Vaughan, 1955 apud Jenik & Irish 2000). Essas camadas foram inicialmente descritas ao nível morfológico: a túnica constituída pelas células das camadas mais externas do meristema apical, as quais geralmente se dividem apenas anticlinalmente, e o corpo com células que se dividem em todas as direções, aumentando o volume do meristema (Schmidt, 1924). A análise de citoquimeras de diferentes espécies demonstrou presença de três camadas histogênicas independentes no meristema apical (Satina *et al.*, 1940; Dermen, 1947) e Dermen (1947) sugeriu que a camada dérmica fosse chamada

camada germinativa I (CI), a subdérmica de camada germinativa II (CII) e a central de camada germinativa III (CIII), nomenclatura adotada no presente trabalho.

As plantas utilizam um controle rigoroso nas taxas e planos de divisão celular durante o desenvolvimento, gerando órgãos em número e posição apropriados, com dimensão e forma características (Meyerowitz, 1997; Steeves & Sussex, 1989). O controle da orientação das divisões celulares previne a mescla de camadas durante a organogênese, embora uma possa assumir a posição e a função da outra (Dermen, 1947; 1951; 1953), evidenciando o padrão posição-dependência e não linhagem dependência. A relação entre as camadas histogênicas e os tecidos primários não é rígida. A CI pode sofrer divisões em vários planos quando há um fusionamento de sépalas e pétalas (Satina & Blakeslee, 1941), além de participar na formação do tegumento dos rudimentos seminais (Dermen, 1947; Bittencout Jr., 1995) ou dar origem a um ramo inteiro (Dermen, 1953), indicando que a protoderme não está confinada apenas à produção de uma camada de cobertura. Portanto, a contribuição das camadas histogênicas aos órgãos florais pode diferir entre os diferentes grupos de plantas.

As diferenças no aspecto dos primórdios florais, do surgimento das bractéolas até o surgimento do carpelo, marcam a ontogênese inicial da flor em *A. falcata* e *A. sensitiva*. O receptáculo de *A. falcata* é mais largo que alto em contraposição ao de *A. sensitiva*; as sépalas, embora tenham origem nas mesmas camadas germinativas, em *A. falcata* surgem numa ordem nítida, enquanto em *A. sensitiva* são observadas divisões periclinais em quase toda a circunferência do primórdio (exceto nas regiões entre os lobos), podendo-se identificar apenas a abaxial mediana devido ao seu desenvolvimento um pouco mais acelerado. Isso reforça as análises morfológicas anteriores com a iniciação unidirecional abaxial do cálice tendendo a simultânea em *A. sensitiva*. Outra característica que se mostra importante é a altura do primórdio, bem maior em *A. sensitiva* do que em *A. falcata*, o que parece estar vinculado a uma contribuição mais intensa da CIII na elevação do carpelo, além de haver uma distância maior entre os verticilos de sépalas e pétalas em *A. sensitiva*, talvez devido a um retardo no alongamento do cálice em relação à outra espécie. Em *Trifolium pratense*, o primórdio floral começa a alargar-se com um formato hemisférico, tornando-se quase esférico, passando a achatado com sua atividade meristemática lateral (Picklum, 1954). Os primórdios florais de *A. falcata* e de *A. sensitiva* também se apresentam achatados em um estágio posterior.

A iniciação de sépalas e pétalas a partir da CII e a dos estames por um ciclo de divisões na CII e o restante na CIII em *Aeschynomene* corresponde ao encontrado em *Datura stramonium*, onde folhas, sépalas e pétalas também se iniciam a partir da CII e os estames tem a CIII como responsável pela elevação do primórdio, embora com ausência total de divisões

na CII (Satina & Blakeslee, 1941). Na maturidade, a porção distal do estame que se diferencia nos microsporângios apresenta predominância de células derivadas da CII. As divisões periclinais na camada CII geralmente marcam a iniciação dos primórdios de órgãos fazendo com que a camada receba o nome de organogênica (Picklum, 1954; Bowman & Eshed, 2000; Moço, 2002). As células derivadas da CII ainda dão origem à quase todos os tipos celulares dos esporângios (Oliveira, 2001), inclusive os micrósporos, como parece ocorrer na maioria das espécies de angiospermas (Dermen, 1947; Davis, 1966; Bhandari, 1984; Satina & Blakeslee, 1941).

Moço (2002) realizou análises anatômicas dos meristemas da inflorescência, bem como do desenvolvimento dos primórdios dos verticilos florais em *A. latifolia* e registrou o surgimento dos primórdios de brácteas e sépalas a partir da camada subdérmica e dos demais órgãos das camadas subdérmica e central. O desenvolvimento das pétalas em *Aeschynomene*, até o estágio observado neste capítulo, foi promovido pela camada CII, diferindo de *A. latifolia*, que nos estádios mais juvenis já apresentam contribuições da CIII. Os primórdios estaminais possuem o mesmo padrão de desenvolvimento em ambos gêneros e semelhante a *D. stramonium* (Satina & Blakeslee, 1941). Em *Spondias mombin* (Anacardiaceae), a camada CII contribui mais para a formação do primórdio estaminal que a CIII (Oliveira, 2001). Tucker (1987) já havia detectado em Papilionoideae a iniciação carpelar através de divisões periclinais na CII do ápice floral sendo acrescida de divisões na camada central ou CIII e observou o carpelo tornando-se mais alto em um ponto excêntrico próximo ao lado abaxial do cume, como observado no gênero em estudo.

Alguns autores acreditam que primórdios dos órgãos florais são iniciados da mesma maneira que primórdios foliares (Picklum, 1954) corroborando o postulado pela teoria filomática. Atualmente aceita-se que as folhas, o caule e as flores constituem uma mesma unidade denominada “shoot” (parte da planta exposta ao meio), e que a flor desenvolve-se em paralelo ao ramo vegetativo e não como derivada dele (Fahn, 1990). A origem dos órgãos florais é bem fundamentada pela teoria telomática, como demonstrado no trabalho de Wilson (1942), que ao estudar uma provável origem e evolução dos estames, acredita que estes evoluíram através de sistemas de ramos possuindo esporângios terminais, um sistema existente antes das folhas terem se desenvolvido, não existindo relação filogenética entre eles. Satina & Blakeslee (1941) apontaram para a semelhança entre o desenvolvimento do estame e do eixo caulinar em *D. stramonium* – formados predominantemente pela CIII-, e das sépalas e pétalas com as folhas (iniciadas pela CII, com a CIII constituindo os feixes vasculares), assim

como observado em *Aeschynomene*, o que reforça a teoria telomática para origem dos órgãos esporangiados.

Regiões específicas são estabelecidas cedo no desenvolvimento da antera, nas quais ocorrem eventos únicos de histodiferenciação em uma ordem cronológica precisa, o que ocorre devido ao importante papel da comunicação célula-célula, fazendo com que os quatro microsporângios desenvolvam-se concomitantemente em diferentes regiões da antera (Koltunow *et al.*, 1990; Goldberg *et al.*, 1993). O tecido esporogênico se desenvolve de regiões localizadas nos quatro ângulos da antera em desenvolvimento. Em cada região existe inicialmente uma fileira de células subdérmicas meristemáticas iniciais que se dividem periclinalmente para formar duas camadas (Fahn, 1990), no caso, camada parietal primária e camada esporogênica primária, como as formadas em *Aeschynomene*.

Muitos autores consideraram as células meristemáticas subdérmicas como sendo as iniciais do arquespório (Maheshwari, 1950; Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992), entretanto este conceito é equivocado, uma vez que, a camada parietal primária, originada da primeira divisão das células subdérmicas, é constituída de células meristemáticas vegetativas sem nenhuma relação com o desenvolvimento das células-mãe dos micrósporos (Rutishauser, 1982). Nem mesmo as células esporogênicas primárias poderiam ser consideradas como arquespório, pois podem sofrer vários ciclos de divisões mitóticas antes de entrarem no estágio pré-meiótico, podendo, no máximo, serem denominadas células-mãe do arquespório ou iniciais arquesporiais. Para a utilização de um conceito que reflita a realidade dos acontecimentos, apenas as células-mãe dos micrósporos, que não passam por mais nenhum ciclo mitótico, entrando na fase pré-meiótica, devem ser denominadas arquespório, ou células arquesporiais (Rutishauser, 1982).

O tecido esporogênico prolifera-se concomitantemente aos estratos parietais, intensificando este processo após a formação de todas as camadas parietais da antera/esporângio. Encerradas as divisões mitóticas, as células esporogênicas entram em prófase meiótica, tornando-se células-mãe dos micrósporos (Mariath *et al.*, 2003). O tipo de desenvolvimento dos estratos parietais padrão para as Leguminosae é o Dicotiledôneo (Davis, 1966; Biddle, 1979; Prakash, 1987; Ashrafunnisa & Pullaiah, 1994; Ashrafunnisa & Pullaiah, 1999), marcado pela conversão da camada parietal secundária interna em tapete, como encontrado em *Aeschynomene*. Algumas variações desse padrão foram registradas para a família, como o tipo Básico encontrado em *Psophocarpus tetragonolobus* (Lim & Prakash, 1994) e *Rhynchosia capitata* (Oomman, 1971).

Consideramos em *Aeschynomene* a linhagem originada da célula inicial ou meristemática subdérmica a principal linhagem da antera, pois origina o tecido esporogênico. As células derivadas das subdérmicas dos flancos da antera e das regiões dorsal e ventral, contíguas às células iniciais, não apresentam relação ontogenética com a célula inicial, mas originam o tapete interno e podem formar algumas poucas células de camadas médias e endotécio nos flancos dos microsporângios, sendo recrutadas devido ao seu posicionamento. Estas células recrutadas têm especial importância para a origem do tapete interno, que se diferencia juntamente ao externo, em paralelo à diferenciação do tecido esporogênico.

Na maioria dos casos, tecidos e células individuais derivam de uma única camada germinativa, mas no caso do tapete a origem é reportada como sendo de duas camadas, CII e CIII (Goldberg *et al.*, 1993). As observações que verificam a origem de todo o tapete a partir da camada parietal são, em geral, devido ao fato dos investigadores concentrarem sua atenção à região protuberante (externa) do microsporângio (Bhandari, 1984). Bhandari (1984) aceita a interpretação de Periasamy & Swamy (1966) de que a origem dupla para o tapete (em diferentes camadas germinativas) em angiospermas é uma conclusão lógica. Periasamy & Swamy (1966) consideram a origem do tapete dupla, pois as células derivadas das camadas parietais não cobrem a face interna do tecido esporogênico e análises ontogenéticas comprovam esse padrão. Muitos trabalhos consideram o tapete como sendo de origem dupla, derivado das camadas subdérmica e central ou parietal e conectival (Periasamy & Swamy, 1966; Vijayaraghavan & Ratnaparkhi, 1973; Gupta & Nanda, 1978; Nanda & Gupta, 1978; Mehra & Kulkarni, 1985; Chapman, 1987; Bittencout Jr., 1992; Bittencout Jr., 1995).

Em *A. latifolia* a origem do tapete interno é referida à camada central (Moço, 2002), não tendo sido reportada para outras espécies de Leguminosae. Em *Aeschynomene*, foi verificada a origem deste tecido de células derivadas da camada subdérmica adjacentes às células iniciais, sendo todo tapete de origem subdérmica, estando as células do conectivo já diferenciadas e com elevado grau de vacuolação. O desenvolvimento do tapete interno das espécies aqui investigadas de *Aeschynomene*, o de *Spondias mombin* (Oliveira, 2001) e o de *Ilex paraguayensis* (Santos, 1993) acontecem em um padrão diferenciado, entretanto, o fato de os esporângios terem origem integral a partir da camada subdérmica ou das células iniciais do esporângio Santos (1993), é uma concordância entre estes trabalhos.

Considerando-se os casos da diferenciação do tapete externo e interno a partir da camada celular subdérmica, pôde-se perceber que o modo como o tapete interno se diferencia varia entre as famílias, ele é derivado das células adjacentes às iniciais em *A. falcata* e *A. sensitiva* (Leguminosae), das células iniciais do esporângio em *I. paraguayensis*

(Aquifoliaceae) e da célula precursora interna em *S. mombin* (Anacardiaceae). Nos dois últimos casos, fazendo parte da linhagem principal, com origem na mesma célula subdérmica que dará origem ao arquespório. Dessa forma, a origem tapetal em uma ou mais camadas germinativas confirma a idéia de que a histodiferenciação do tapete tem um condicionamento posição-dependente, provavelmente estando relacionada ao contato direto com o tecido esporogênico, não dependente da linhagem celular (Bowman & Eshed, 2000). Embora a diferenciação de tecidos não dependa de sua linhagem celular (Koltunow *et al.*, 1990; Goldberg *et al.*, 1993), as linhagens ordenadas são fundamentais na formação de um órgão e podem ser corrigidas pelas interações celulares, atingindo formas funcionais a partir de tecidos formados por linhagens distintas, mas com posição semelhante (Sachs, 1991). Ambos tipos de tapete atingem seu máximo crescimento antes do início da meiose (Gupta & Nanda, 1978).

Muitas evidências têm sido apontadas como sinal de que a diferenciação de tecidos na planta é dependente de sua posição no órgão em diferenciação, ao invés de dependente da linhagem, a qual pertencem as células em questão (Sachs, 1991). A posição das células no meristema é o principal fator que especifica seu destino, o que fica claro quando células de uma camada invadem outra camada e diferenciam-se de acordo com esta. A teoria da posição – dependência pode ser explicada através da ação de genes nos meristemas, que são responsáveis pela diferenciação dos tecidos em suas respectivas posições (Bowman & Eshed, 2000; Laux, 2003). O fato de os órgãos laterais produzidos conterem células das três distintas camadas (CI, CII, CIII), indica que a comunicação entre as células das camadas é necessária para coordenar o processo de desenvolvimento (Bowman & Eshed, 2000; Doerner, 2003).

Diferenças no comportamento das camadas parietais secundárias foram reportados em Anacardiaceae (Oliveira, 2001). Alguma variação foi verificada no comportamento da camada parietal secundária interna, em *A. falcata*, que normalmente se diferencia diretamente em tapete externo, podendo dividir-se periclinalmente. Devido à adiantada diferenciação do tapete é provável que esta divisão na cpsi formará uma porção de tapete externo bisseriada, não envolvendo desdiferenciação. Porções do tapete interno também podem se apresentar bisseriadas, embora sem interferir no tipo de formação dos estratos parietais, diferenciando duas camadas tapetais, ao invés da diferenciação de uma camada de tapete e outra de septo ou conectivo. Divisões periclinais ocasionais no tapete, tornando-o irregularmente bisseriado, foram reportadas e parecem ser uma expressão da potencialidade latente a divisões periclinais, não sendo um caráter consistente (Davis, 1966; Bhandari, 1984).

A presença abundante de células produtoras de mucilagem em *A. falcata* diferencia-se do encontrado em *A. sensitiva* e pode estar relacionada ao tipo de habitat em que *A. falcata* se encontra, campos de pastagem. O fato destas células serem tão abundantes em brácteas, bractéolas e cálice, além da presença de tricomas tectores, representa uma manutenção da quantidade de água necessária ao desenvolvimento dos primórdios florais dessa espécie, podendo ser mais um fator que explica a sua marcante resistência a ambientes inóspitos. Os tricomas, além de ajudarem a manter a umidade, também são úteis na proteção contra os ataques de insetos.

Em *Araucaria angustifolia*, as células produtoras de mucilagem, embora de origem distinta destas encontradas em *Aeschynomene*, possuem a função de controle hídrico, comprovada através de estudos imunocitoquímicos (Mastroberti, 2003). A mucilagem nas células de *A. angustifolia* é secretada entre o vacúolo e o citoplasma, de modo que este se tornava periférico (Mastroberti, 2003), diferentemente do observado em outras células mucilaginosas, onde a mucilagem é secretada entre a plasmalema e a parede celular (Bakker & Gerritsen, 1992). Este último tipo é provavelmente o que ocorre nas espécies aqui estudadas, devido à semelhança encontrada quanto à localização parietal da secreção. O rompimento das paredes das células mucilaginosas já foi verificado promovendo a formação de canais (Bakker & Gerritsen, 1992), mas sua liberação desordenada para dentro do mesófilo pode ser um evento particular de *A. falcata*. A secreção para o exterior se dá através do rompimento das paredes celulares e até mesmo pelos estômatos. Células epidérmicas mucilaginosas também já foram descritas para *Hibiscus schizopetalus* (Bakker & Gerritsen, 1992), *Myrsine umbellata* e *Luehea divaricata* (Sartori, 2003), dentre outras.

A. sensitiva, por sua vez, é típica de ambientes alagados, e um número reduzido de células mucilaginosas foi detectado. Os compostos fenólicos mostram-se abundantes nesta espécie, sendo conhecidos na proteção contra o ataque de predadores. Apesar da abundância destes compostos em células associadas aos feixes vasculares, principalmente em brácteas, bractéolas e cálice, os primórdios florais desta espécie são intensamente atacados por afídeos.

As diferenças encontradas na organogênese floral de *A. falcata* e *A. sensitiva* correspondem às observadas nas análises de MEV, como o desenvolvimento da inflorescência, altura do primórdio floral, desenvolvimento do cálice e alas. Outras características que não puderam ser detectadas pela metodologia utilizada no Capítulo II envolvem o armazenamento de diferentes compostos, o formato dos primórdios estaminais logo após o seu surgimento (analisados sob secções transversais) e uma variação no comportamento da camada parietal secundária interna em *A. falcata*.

O fato dos órgãos florais das espécies estudadas possuírem uma igual origem nas camadas histogênicas primárias confirma a conservação destas características ao longo do tempo. Este fato faz com que as diferenças encontradas, principalmente nos estádios iniciais de desenvolvimento, quanto ao formato dos primórdios florais e a velocidade de alongamento dos órgãos, principalmente sépalas, bem como as diferenças marcantes do fusionamento deste verticilo, diferentes compostos armazenados de formas distintas e alguma variação no comportamento tapetal, reforcem a hipótese de que *A. falcata* e *A. sensitiva*, que representam secções distintas do gênero *Aeschynomene*, estejam distantes filogeneticamente (Lavin *et al.*, 2001). A distinção entre os caracteres observada neste Capítulo é importante, tendo em vista os aspectos conservadores dos caracteres relacionados ao desenvolvimento floral, valorizando os dados de ontogênese floral em análises filogenéticas de grupos distantes.

5 - Referências Bibliográficas

- ARAKI, T. 2001. Transition from vegetative to reproductive phase. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 63-68.
- ASHRAFUNNISA & PULLAIAH, T. 1994. Embryology of *Galactia* (Fabaceae). **Phytomorphology**, v. 44, n. 3, 4, p. 253-260.
- ASHRAFUNNISA & PULLAIAH, T. 1999. Embryology of *Teramnus labialis* (Fabaceae). **Phytomorphology**, v. 49, n. 2, p. 197-202.
- BAKKER, M. E. & GERRITSEN, A. F. 1992. The development of mucilage cells in *Hibiscus schizopetalus*. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 41, p. 31-42.
- BHANDARI, N. N. 1984. The microsporangium. In: **Embryology of Angiosperms**. (ed.) B. M. Johri, Springer-Verlag, Berlin, p. 53-121.
- BIDDLE, J. A. 1979. Anther and pollen development in garden pea and cultivated lentil. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1883-1900.
- BITTENCOURT JR., N.S. 1992. Anatomia floral de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae): histologia, vascularização e ontogenia com especial referência ao desenvolvimento do óvulo e da antera. **Monografia de Bacharelado - ICB**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 121p.
- BITTENCOURT JR., N.S. 1995. Ontogenia da antera e do rudimento seminal de *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae). **Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre. 112p.
- BOWMAN, J. L. & ESHED, Y. 2000. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 3, p. 110-115.
- CHAPMAN, G. P. 1987. The tapetum. **International Review of Cytology**, v. 107, p. 111-125.
- DAVIS, O. L. 1966. **Systematic embryology of the Angiosperms**. (eds.) John Wiley & Sons, Inc. New York, London, Sidney.

- DERMEN, H. 1947. Periclinal cytochimeras and histogenesis in cranberry. **American Journal of Botany**, v. 34, p. 32-43.
- DERMEN, H. 1951. Ontogeny of tissues in the stem and leaf of cytochimeral apples. **American Journal of Botany**, v. 38, p. 753-760.
- DERMEN, H. 1953. Periclinal cytochimeras and the origin of tissues in stem and leaf of peach. **American Journal of Botany**, v. 40, p. 154-168.
- DOERNER, P. 2003. Plant meristems: a merry-go-round of signals. **Current Biology**, v. 13, p. 368-374.
- FAHN, A. 1990. **Plant Anatomy**. 4ed. New York: Pergamon Press. 588p.
- FEDER, N. & O'BRIEN, T. P. 1968. Plant microtechnique; some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, p. 123-142.
- GERRITS, P. O. & SMID, L. 1983. A new, less toxic polymerisation system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v. 132, p. 81-85.
- GIFFORD JR., E. M. 1954. The shoot apex in angiosperms. **The Botanical Review**, v. 20, n. 8, p. 477-529.
- GOLDBERG, R. B.; BEALS, T. P. & SANDERS, P. M. 1993. Anther development: basic principles and practical applications. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1217-1229.
- GUPTA, S. C. & NANDA, K. 1978. Studies in Bignoniaceae. I. Ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Pyrostegia*. **American Journal of Botany**, v. 65, n. 4, p. 395-399.
- JENIK, P. D. & IRISH, V. F. 2000. Regulation of cell proliferation patterns by homeotic genes during *Arabidopsis* floral development. **Development**, v. 127, p.1267-1276.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. Mc Graw-Hill Book Company, New York.
- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B. & SRIVASTAVA, P. S. 1992. **Comparative Embryology of Angiosperms**. Vol.1. Springer-Verlag, Berlin.

- KOLTUNOW, A. M.; TRUETTNER, J.; COX, K. H.; WALLROTH, M. & GOLDBERG, R. B. 1990. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. **The Plant Cell**, v. 2, p. 1201-1224.
- LAUX, T. 2003. The stem cell concept in plants: a matter of debate. **Cell**, v. 113, p. 281-283.
- LAVIN, M.; PENNINGTON, R. T.; KLITGAARD, B. B.; SPRENT, J. I.; LIMA, H. D. & GASSON, P. E. 2001. The dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 503-533.
- LIM, A. L. & PRAKASH, N. 1994. Embryology and seed development in the Winged Bean, *Psophocarpus tetragonolobus*. **Gardens Bulletin (Singapore)**, v. 46, n. 2, p. 79-92.
- MAHESHWARI, P. 1950. **An Introduction to the Embryology of Angiosperms**. (5^a Reprint) McGraw-Hill Company Inc., NY. p. 453.
- MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JR., N. S. 2003. A flor. In: **Anatomia Vegetal**. (eds.) S. M. Appezato-da-Glória & B. Carmello-Guerreiro, Editora UFV, Viçosa. P.329-373.
- MASTROBERTI, A. A. 2003. Morfologia e citologia das células compartimentadas em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Araucariaceae). **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 113p.
- McDOWELL, E. M. & TRUMP, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414.
- MEHRA, K. R. & KULKARNI, A. R. 1985. Embryological studies in Bignoniaceae. **Phytomorphology**, v. 35, n. 3-4, p. 239-251.
- MEYEROWITZ, E. 1997. Genetic control of cell division patterns in developing plants. **Cell**, v. 88, p. 299-308.
- MOÇO, M. C. C. 2002. Desenvolvimento floral em *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae). **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 121p.

- NANDA, K. & GUPTA, S. C. 1978. Studies in Bignoniaceae. II. Ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Tecoma*. **American Journal of Botany**. v. 65, n. 4, p. 400-405.
- OLIVEIRA, J. M. S. 2001. Androsporogênese e Androgametogênese em *Spondias mombin* L. (cajazeira-Anacardiaceae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 123p.
- OOMMAN, C. I. 1971. Studies in Papilionaceae. 2. Gametophytes of *Rhynchosia capitata* D.C. (*R. aurea* D.C.). **Botanique**, v. 2, n. 2, p. 145-150.
- PERIASAMY, K. & SWAMY, G. L. 1966. Morphology of the anther tapetum of Angiosperms. **Current Science**, v. 35. p. 427-430.
- PICKLUM, W. E. 1954. Developmental morphology of the inflorescence and flower of *Trifolium pratense* L. **Iowa State College Journal of Science**, v. 28, n. 4, p.477-495.
- POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. & STIRTON, C. H. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: **Advances in Legume Systematics Part 1** (eds.) R. M. Polhill & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p.1-26.
- PRAKASH, N. 1987. Embriology of the Leguminosae. In: **Advances in legume Systematics** (eds.) C. H. Stirton, Royal Botanic Gardens, Kew.
- RUTISHAUSER, A. 1982. **Introduccion a la Embriologia y Biologia de la Reproduccion de las Angiospermas**. Editorial Hemisferio Sur S. A., Buenos Aires. 185p.
- SACHS, T. 1991. **Pattern Formation in Plant Tissues**. Cambridge University Press. p. 234.
- SANTOS, R. P. S. 1993. Androsporogênese, androgametogênese e desenvolvimento do androsporângio de *Ilex paraguayensis* St. Hill. (Aquifoliaceae). **Monografia de Bacharelado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 104p.
- SARTORI, J. S. 2003. Anatomia foliar de espécies de uma mata estacional em Porto Alegre, RS, Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 81p.

- SATINA, S. & BLAKESLEE, A. F. 1941. Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. **American Journal of Botany**, v. 28, p. 862-871.
- SATINA, S.; BLAKESLEE, A. F & AVERY, A. G. 1940. Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. **American Journal of Botany**, v. 27, p. 895-905.
- SCHMIDT, A. 1924. Histologische Studien an Phanerogamen Vegetation-spunkten. **Botanisches Archiv**, v. 42, p. 461-502.
- STEEVES, T. & SUSSEX, I. 1989. **Patterns in Plant Development**. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- TUCKER, S. C. 1987. Floral initiation and development in Legumes. In: **Advances in Legume Systematics**, part 3, (eds.) C. H. Stirton, Royal Botanical Gardens, Kew, 183-239.
- TUCKER, S. C. & GRIMES, J. 1999. The inflorescence: Introduction. **The Botanical Review**, v. 65, n. 4, p. 303-316.
- VIJAYARAGHAVAN, M. R. & RATNAPARKHI, S. 1973. Dual origin and dimorphism of the anther tapetum in *Alectra thomsoni* Hook. **Annals of Botany**, v. 37, p. 355-359.
- WILSON, C. L. 1942. The telome theory and the origin of the stamen. **American Journal of Botany**, v. 29, p. 759-764.
- ZIK, M. & IRISH, V. F. 2003. Flower development: initiation, differentiation, and diversification. **Annual Reviews of Cell Development and Biology**, v. 19, p. 119-140.

**CAPÍTULO IV: MICROSPOROGÊNESE E MICROGAMETOGÊNESE EM
AESCHYNOMENE FALCATA (POIR.) DC. E *AESCHYNOMENE SENSITIVA* SW.
(PAPILIONOIDEAE - LEGUMINOSAE)**

Diana Salles Sampaio ^{1,3} & Jorge Ernesto de Araujo Mariath ^{2,3}. 1 Pós-Graduanda; 2 Professor Titular e Pesquisador CNPq; 3 Departamento de Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele, o oceano seria menor”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O presente capítulo descreve a esporogênese e gametogênese em anteras de *Aeschynomene falcata* e *Aeschynomene sensitiva*, bem como a formação da esporoderme nos grãos de pólen e a ontogenia dos estratos parietais da antera, utilizando-se MO e MEV. As anteras das espécies analisadas são tetrasporangiadas. Os esporângios apresentam epiderme, endotécio, duas camadas médias e tapete, que circunda o tecido esporogênico. Com o início da prófase I e a deposição da parede de calose, as células-mãe do micrósporo (CMM) estabelecem canais citomíticos entre si que permitem sua comunicação e o sincronismo durante a meiose. Em *A. falcata* observa-se uma camada péctica entre a membrana plasmática e a parede de calose. A citocinese entre os micrósporos é simultânea e as tétrades são tetraédricas. Ainda nas tétrades ocorre o depósito da primexina. A parede de calose é dissolvida e os micrósporos tornam-se livres, nessa fase já se pode perceber o início da formação da sexina e da nexina-1. O oncus da exina é formado por um acúmulo péctico em três regiões onde não ocorrerá depósito de esporopolenina e estarão localizadas as aberturas. A diferenciação de um vacúolo volumoso no micrósporo de *A. falcata* e vários menores no de *A. sensitiva*, faz com que o núcleo torne-se periférico. A deposição da nexina-2, mais espessa sob os colpos, é observada. Ocorre a deposição da intina-1, péctica, mais espessa sob as aberturas constituindo o oncus da intina e a deposição da intina-2, celulósica. Nas células do endotécio, o espessamento fibroso do tipo palmado com placa basal é formado, embora em *A. falcata* não ocorra uma placa basal verdadeira. Inicia-se a divisão mitótica assimétrica do microgametófito que origina uma célula generativa parietal e uma vegetativa de volume muito maior. Até este momento, as paredes das células tapetais reagiram negativamente à presença de celulose que agora começa a ser depositada. Em *A. sensitiva*, as paredes periclinais internas das células tapetais são retas e em *A. falcata*, apresentam-se fortemente onduladas. A célula generativa é englobada pelo citoplasma da vegetativa e torna-se fusiforme concomitantemente ao ciclo amilogênico; as células tapetais são colapsadas ainda com as paredes celulósicas. Durante a deiscência, apenas a epiderme e o endotécio estão presentes. Os grãos de pólen das duas espécies são tricolporados, com sexina reticulada. O opérculo foi detectado apenas em *A. sensitiva*. Salvo algumas características como camadas pécticas entre a membrana plasmática e a parede de calose, formato das placas basais do endotécio, das paredes periclinais internas do tapete e a ocorrência de opérculo, que podem refletir a separação das secções do gênero *Aeschynomene*, as características da microsporangênese e microgametogênese de *A. falcata* e *A. sensitiva* não apresentam maiores diferenças, evidenciando a grande conservação destes processos.

1 - Introdução

Os grãos de pólen constituem os gametófitos das Angiospermas responsáveis pelo transporte dos gametas masculinos. Eles passam por um processo de desidratação e possuem reservas no citoplasma da célula vegetativa para garantir a germinação do tubo polínico após a hidratação dos grãos no estigma da flor. O grão de pólen representa um dos mais simples sistemas celulares das plantas com flores, possuindo apenas duas ou três células em sua maturidade, o que representa a máxima redução da planta gametofítica quando comparada aos demais grupos de plantas (Knox, 1984). O desenvolvimento e dispersão dos grãos de pólen estão intimamente relacionados às paredes da antera constituídas pela epiderme, endotécio, camadas médias e tapete.

Os processos de microsporogênese e microgametogênese, que resultam na produção dos grãos de pólen, são muito bem conservados dentre as plantas com flores (Maheshwari, 1950), o que garante a estabilidade do ciclo reprodutivo e a perpetuação das espécies. As diferenças mais marcantes dentre os grupos de Angiospermas dizem respeito ao sincronismo durante a divisão meiótica dentro de uma mesma antera, ao número de células presentes no microgametófito, às camadas da esporoderme quanto a sua espessura e ornamentação da sexina e ao comportamento das camadas parietais da antera (Davis, 1966; Prakash, 1987; Johri *et al.*, 1992). Os padrões de deposição da sexina são considerados uns dos fatores mais variáveis, com distintos padrões de ornamentação, tendo grande especificidade taxonômica (Dickinson & Helsop-Harrison, 1968; Guinet, 1981; Ferguson & Skvarla, 1981; Guinet & Ferguson, 1989) e, por isso, sendo primordiais na análise de registros fósseis (Helsop-Harrison, 1968b).

O conhecimento de características embriológicas fornecem subsídios indispensáveis à pesquisa aplicada. O detalhamento da ontogenia dos carpelos e da antera é pré-requisito para os trabalhos que visam a manipulação de variabilidade genética no melhoramento, como a geração de plantas haplóides baseada na embriogênese dos micrósporos e do pólen (Rodrigues *et al.*, no prelo; Mazzocato, no prelo) ou a produção de embriões somáticos (Costa *et al.*, 2004; Rodrigues, 2004). Na família Leguminosae, a qual possui inúmeras espécies de interesse agrônomo, o conhecimento de padrões de desenvolvimento dos microsporângios e grãos de pólen é de fundamental importância para que o melhoramento ou controle da dispersão possa ser realizado, além de contribuírem para estudos sistemáticos e poderem estabelecer novos padrões de desenvolvimento dos órgãos reprodutivos.

Baseado no aqui exposto, este Capítulo tem como objetivo descrever a esporogênese e gametogênese em anteras de *Aeschynomene sensitiva* e *Aeschynomene falcata*, bem como a formação da esporoderme nos grãos de pólen.

2 - Material e Métodos

Inflorescências de *A. falcata* e *A. sensitiva* foram coletadas nos meses de abril e dezembro do ano de 2003. A coleta de *A. falcata* realizou-se em populações no topo do Morro da Polícia e do Morro Santana (ICN 127556 e ICN 127557, respectivamente) e, a de *A. sensitiva*, em uma população no Parque Estadual Delta do Jacuí, Ilha das Flores - Braço Norte (ICN 127555), ambas localizadas no município de Porto Alegre no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

O material foi fixado em solução de glutaraldeído 1% e formaldeído 4% (McDowell & Trump, 1976) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, logo após a coleta, e submetido a vácuo por, pelo menos, duas horas. A desidratação foi realizada em série etílica (Johansen, 1940) com passagem em solução álcool etílico:clorofórmio (3:1, 1:1 e 3:1) para a retirada das ceras epicuticulares, retornando ao etanol absoluto e sendo incluído em hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid, 1983). Os cortes foram realizados em micrótomo de rotação Zeiss Mikron equipado com navalha de vidro de 8mm, obtendo-se secções de 1,5 a 3 µm de espessura. O material foi corado com Azul de Toluidina O (C.I. 52040) 0,05% em tampão benzoato de sódio, pH 4,4 (Feder & O'Brien, 1968) para observação sob microscopia de campo claro.

A determinação dos constituintes celulares foi realizada através de reagentes específicos de uso corrente em Anatomia Vegetal. A reação com IKI serviu para a identificação de amido (Johansen, 1940), com Coomassie Brilliant Blue R-205 (C.I. 42660), 0,25% em solução acética 7%, para a identificação de proteínas totais (Southworth, 1973), com Calcofluor White (C.I. 40622), 0,01% em solução aquosa, para detecção de celulose (Pacini *et al.*, 1999), com Alcian Blue (C.I. 74240) em solução aquosa, para a detecção de pectinas (Luque *et al.*, 1996), com Aniline Blue (C.I. 42755) para a detecção de calose (Martin, 1959) e com Sudan III (C.I. 26100) para a detecção de lipídios totais (O'Brien & McCully, 1981). O teste com Sudan III foi realizado tanto com anteras fixadas e posteriormente esmagadas entre lâmina e lamínula quanto em anteras que passaram pelo processo de desidratação e infiltração. A análise do material e as fotomicrografias foram realizadas em microscópio Olympus BX41 e Leica DMRB. As observações de reação fluorescente (Aniline Blue e Calcofluor White) foram realizadas no microscópio Leica

DMRB, com filtro UV 340-380nm (Dichromirror 400nm). As observações sob microscopia de contraste interferencial também foram realizadas neste mesmo microscópio.

Flores maduras foram fixadas em FAA (5 partes de formol: 5 partes de ácido acético:90 partes de etanol 50%) (Johansen, 1940), desidratadas em série etílica e, apenas os estames, foram transferidos ao dimetoximetano (Gersterberger & Leins, 1978), onde permaneceram por 12 horas. No Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, o material desidratado foi submetido à secagem através do método de ponto crítico utilizando CO₂ líquido, com auxílio de um aparelho Balzers CPD 030. Posteriormente, as anteras foram rompidas sobre fita metálica aderida a suportes de alumínio, liberando os grãos de pólen. Os grãos de pólen foram recobertos com ouro, na espessura de 15 nm, com auxílio de um aparelho metalizador tipo “sputtering” Balzers SCD 050. As eletromicrografias foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Jeol JSM 5800, sob 20 kV.

3 – Resultados

3.1 - Microsporogênese

Os dez estames apresentam anteras tetrasporângiadas (Figura 1B). Quando as quatro camadas parietais da antera abaixo da epiderme estão totalmente formadas: endotécio, camada média externa, camada média interna e tapete, as três primeiras são constituídas de células com as paredes periclinais alongadas e bastante vacuoladas (Figuras 1B, 10A, C). Desde o princípio, as células da camada média interna são as mais estreitas e as epidérmicas aumentam rapidamente em altura e largura (Figuras 10A, C). Antes mesmo da formação de todos os estratos parietais as células do tapete já estão diferenciadas, com o citoplasma muito denso e núcleo avantajado. As paredes destas células reagem negativamente ao Calcofluor White (Figuras 1D, 10B, D), provavelmente devido a uma fraca deposição de fibrilas de celulose. O tapete é do tipo secretor com células uninucleadas, sem presença de cristais (Figuras 1A, C, 10A, C).

Neste estágio, o tecido esporogênico não sofre mais mitoses e as células-mãe dos micrósporos – CMM (ou células arquesporais), entram em estágio pré-meiótico, com uma deposição de calose entre a parede celular, provavelmente péctica, e a membrana plasmática (Figuras 1A-C, 10B-D). Com o desenvolvimento da parede de calose, as lamelas médias e paredes das CMM são degeneradas formando uma matriz péctica que preenche os espaços do lóculo (Figuras 1B, C, 10C). A porção mais significativa da deposição de calose se dá durante

a prófase I da meiose. Em *A. sensitiva*, as CMM entram no estágio de prófase I ainda sem deposição da parede de calose (Figuras 10A), enquanto, em *A. falcata*, uma sutil deposição dessa parede foi observada antes do núcleo entrar em prófase I (Figuras 1A, C), sendo assim, os eventos morfológicos que marcam o início da fase pré-meiótica nessas espécies são distintos.

O estágio de prófase I da meiose é facilmente identificável nas CMM devido ao espiralamento dos cromossomos (Figuras 1C, 2A, 10A, C). A prófase I é um estágio que possui 4 fases: leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno (Rangel, 1974; Dickinson, 1987), neste trabalho observaram-se duas delas, leptóteno em que os cromossomos parecem enovelados, ainda com presença de nucléolo (Figuras 1C, 10A, C) e paquíteno, no qual os cromossomos atingem o nível máximo de espiralamento (2A, D). A metáfase I também pode ser identificada devido à visualização das fibras do fuso e os cromossomos alinhados (Figuras 11A, B). Um outro estágio observado foi a telófase I, com cada conjunto de cromossomos em um canto da célula e núcleo interfásico ainda não reestruturado (Figuras 2B, E, 11C), sem formação de placa equatorial. A prófase II é identificada pelo restabelecimento dos nucléolos e da membrana nuclear (Figura 11E). O outro estágio observado corresponde ao final da telófase II, com os quatro núcleos haplóides interfásicos reestruturados, a cariocinese se completou, mas a citocinese ainda não ocorreu (Figuras 2C, F, 11F). Em *A. falcata*, já no final da prófase I, observa-se um material de mesma coloração da parede celular, provavelmente péctico, sendo depositado entre a membrana plasmática e a parede de calose (Figuras 2A-F), o que não foi observado em *A. sensitiva* (Figuras 11A-F).

Canais citomíticos são estabelecidos entre as CMM durante a prófase I da meiose e permanecem visíveis até o final da cariocinese (Figuras 2B, C, 11A-F). A citocinese é simultânea, com as paredes de calose crescendo centripetamente (Figuras 3A, B, 12A-C) e dando origem a uma tétrade tetraédrica, o que individualiza os micrósporos (Figuras 3C-F, 12D, E). Cordões citoplasmáticos ainda são conspícuos durante a citocinese, sendo perdidos quando completado o processo (Figuras 12A, B). As comunicações estabelecidas pelos canais citomíticos entre as CMM garantem uma grande sincronia durante a meiose em um mesmo microsporângio. Apesar de alguma assincronia entre os microsporângios de uma mesma antera durante a meiose, após essa divisão as anteras de um mesmo verticilo de estames apresentam grande sincronia entre si.

Antes de haver a dissolução das paredes de calose, pode-se observar a deposição da primexina nos micrósporos dentro das tétrades, a qual cora-se de róseo com o Azul de Toluidina indicando a presença de polissacarídeos (Figuras 3C, D, 12D) e, de Azul com o

Coomassie Blue, reagente para proteínas (Figura 12F). Ocorre, então, a dissolução da parede de calose e os micrósporos tornam-se livres, com núcleo central (Figuras 4A, 13A, B). Inicia-se a diferenciação da esporoderme, algumas regiões da primexina começam a se diferenciar em sexina e nexina-1, evidenciadas através da coloração azulada da esporopolenina em reação ao corante utilizado. No mesmo estágio, também se observa outra região na primexina que cora-se de roxo mais intenso, representando um acúmulo de polissacarídeos (oncus da exina) (Figura 13A). Com a reação de Coomassie Blue verifica-se a presença de proteínas na sexina ainda pouco estruturada, e sua ausência na região das aberturas (Figura 13B). Com a formação de um vacúolo volumoso em *A. falcata* (Figura 4B) e vários menores em *A. sensitiva* o núcleo do micrósporo torna-se parietal. A sexina está mais espessa com coloração verde azulada, a região do acúmulo de primexina permanece visível como oncus da exina, que delimita as endoaberturas, e a nexina-2, de coloração azulada, é mais abundante sob os colpos, não se depositando abaixo do oncus da exina onde está demarcado o poro (Figuras 4A-C, 13C). Uma tênue linha rosada é observada sobre a nexina-1 e provavelmente é um resíduo da matriz de primexina que possuía mesma coloração (Figura 4B-D, F, 5D, 13C). O material da dissolução das espessas paredes de calose provavelmente contribui como fonte de energia para o desenvolvimento dos micrósporos. As células tapetais parecem estar em plena atividade, são volumosas e apresentam núcleos ativos, participando da nutrição dos micrósporos e da produção dos precursores de esporopolenina. Células tapetais hipertrofiadas foram encontradas em *A. sensitiva* (Figuras 13A, B). A observação de teto e báculo, componentes da sexina, através da MO foi dificultada devido à fraca coloração com Azul de Toluidina e a melhor definição de sua morfologia foi obtida através da reação com Coomassie Blue (Figuras 13B, D, 16C).

Em *A. sensitiva*, as paredes periclinais internas do tapete, em contato com o lóculo da antera, são planas (Figuras 13C, D, 14A-D, 16E) ao contrário do encontrado em *A. falcata*, onde estas paredes são tortuosas e podem até englobar um micrósporo (Figuras 4A, B, 8C, E, F). No estágio de micrósporo livre ocorre um aumento na altura das paredes anticlinais das células do endotécio e o aparecimento de espessamentos fibrosos lignificados (Figuras 4B, E, F, 14B).

3.2 - Microgametogênese

Observa-se a formação de um vacúolo volumoso no micrósporo de *A. falcata* que é o primeiro sinal morfológico da diferenciação do gametófito masculino, em *A. sensitiva*, apenas vacúolos menores foram observados. A limitação do citoplasma na porção marginal do gametófito acarreta a divisão mitótica assimétrica – metáfase, anáfase e telófase puderam ser observadas (Figuras 4D-F, 14A, B). O vacúolo de *A. falcata* torna-se menos conspícuo durante a divisão mitótica. A célula generativa é, aproximadamente, três vezes menor que a vegetativa e de posição parietal no gametófito (Figuras 5A, 14C), uma parede de calose foi detectada separando-a da célula vegetativa (Figura 5B). Essa divisão no microgametófito é ligeiramente assincrônica em um mesmo lóculo. A forma lenticular da célula generativa se mantém enquanto a mesma está em posição parietal (Figura 14C), passando a esférica quando englobada pelo citoplasma da célula vegetativa (Figuras 5E, 14E, F). Observa-se a degeneração do citoplasma e núcleo tapetais, enquanto as paredes celulares permanecem presentes, mantendo a morfologia diferenciada entre as duas espécies (Figuras 4E, F, 5E, 8F, 14D).

Após a vacuolação do micrósporo e durante sua preparação para a divisão mitótica observa-se a presença da intina-1, péctica (Figuras 5C, D, 6C, 15E), que se espessa na área do poro, constituindo o oncus da intina (Figuras 5C, D, 14F, 15A-E). Após o aparecimento do oncus da intina, o oncus da exina é comprimido e pode ser identificado apenas por uma linha de coloração mais escura (Figuras 5C, E, 15E). A intina-2, de composição celulósica, é menos visível e reage positivamente ao Calcofluor White (Figura 6D) e ao Coomassie Blue (Figura 16C). A camada média interna apresenta-se colapsada e a externa tem células mais altas parecendo estar intercaladas com as células do endotécio. A epiderme apresenta células com as paredes periclinais alongadas devido ao rápido crescimento dos microsporângios (Figuras 5C, 15G).

Inicia-se um ciclo de amilogênese no citoplasma da célula vegetativa (Figuras 5F, 6A-B, 15F-J). A intina péctica e o oncus da intina são observados através da reação com Alcian Blue evidenciando pectinas (Figuras 6C, 15I). A célula generativa adquire formato fusiforme com núcleo muito denso ficando adjacente ao núcleo da célula vegetativa (Figuras 5F, 6A, 15F-G). Na sexina, báculas e teto podem ser observados e sua melhor definição foi obtida quando se fez a reação com Coomassie Blue, estando a sexina impregnada de proteínas (Figura 16C). A microscopia de contraste interferencial revelou o formato dos colpos (Figura 7A). As duas espécies são tricolporadas, os colpos são equatoriais e equidistantes e não se

encontram na região polar (Figuras 7B-D, 16A, B); a endoabertura é circular nas duas espécies. A exina é mais finamente reticulada em *A. falcata* do que em *A. sensitiva* e verificou-se que a sexina é semireticulada na região que margeia os colpos em *A. falcata* (Figuras 7B-D), mas observa-se uma área lisa conspícua em *A. sensitiva* (Figuras 16A, B). Na região dos colpos de *A. falcata*, observa-se apenas fragmentos de sexina que não chegam a constituir um opérculo, entretanto, em *A. sensitiva*, uma deposição mais maciça de sexina já caracteriza a presença de um opérculo (Figura 7B-D, 16A). A protrusão do citoplasma da célula vegetativa pode ser observada também sob MEV (Figuras 7B-D). Os grãos de pólen de *Aeschynomene* são relativamente pequenos, variando de 10µm a 20µm de diâmetro, sendo que os de *A. falcata* são maiores que os de *A. sensitiva* cerca de 5µm. Os grãos têm o eixo polar maior que o equatorial, sendo classificados como prolatos ou sub-prolatos.

Durante toda a esporogênese, a reação com Calcofluor White é negativa para as paredes tapetais, indicando a ausência ou muito baixa concentração de fibrilas de celulose (Figuras 1D, 3B, E, 8A, 10B, D, 12C, 16D). Em estádios avançados da gametogênese, a reação torna-se positiva para a presença de fibrilas de celulose nas paredes tapetais (Figuras 8B, D, 16E). No estádio em que os grãos de pólen estão repletos de grãos de amido e a célula generativa tem formato fusiforme e posição central, as células tapetais colapsam, podendo-se perceber apenas a presença da camada média externa, endotécio e epiderme (Figuras 6D, 16F). Não foram detectados membrana tapetal ou orbículos. Esmagamentos das anteras puderam revelar a presença de lipídios no fluido locular, utilizando-se Sudan III (Figura 17E), o que não foi possível em lâminas permanentes, devido à extração dos lipídios realizada pela passagem em série alcoólica e clorofórmio, neste caso apenas a cutícula e pequenos grânulos nas paredes colapsadas foram detectados (Figura 17F). Esse problema técnico impediu que a dinâmica de lipídios nas anteras fosse acompanhada, permitindo apenas a inferência de que as gotas de lipídio detectadas poderiam corresponder ao "pollenkit", principalmente devido às massas de pólen observadas no estigma no Capítulo II (Figuras 16F, G).

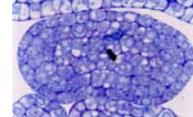
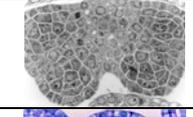
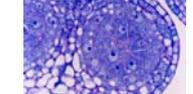
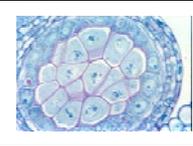
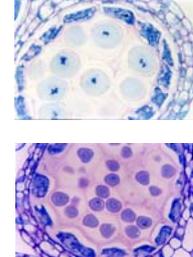
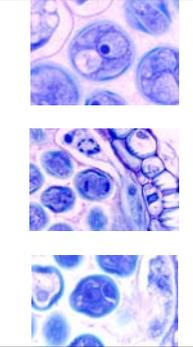
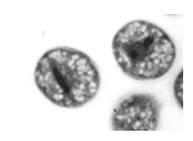
Na maturidade da antera observa-se a degeneração do septo interesporangial, fazendo com que existam apenas dois lóculos, os quais ainda apresentam um fluido locular de coloração rósea, muito abundante em *A. falcata*. Nesse estádio, pode-se observar que a antera de *A. sensitiva* é maior que a de *A. falcata* (Figuras 9A, 17A). A próxima fase no desenvolvimento da antera é a deiscência, momento no qual as células da camada média externa se colapsam, e o fluido locular não está mais presente (Figura 9B). As células estomiais possuem diâmetro muito reduzido quando comparadas às demais células epidérmicas (Figura 17B). Epiderme e endotécio mantêm sua estrutura típica até o final do

desenvolvimento, apresentando núcleos picnóticos e citoplasma escasso (Figuras 9C, D, 17B). Os espessamentos das células do endotécio são usualmente denominados fibrosos ou fibras do endotécio, assemelhando-se a barras em forma de U, abertas na parede periclinal externa e fechadas na interna, sendo caracterizado como do tipo palmado com placa basal, devido ao encontro das barras de espessamento (Figuras 9C-F, 17C, D). Em *A. sensitiva*, a placa basal é pequena, porém as fibras estão efetivamente fusionadas (Figura 17D), enquanto que em *A. falcata* é maior, mas não apresenta fusão entre as bandas fibrosas do endotécio, estando localizadas lado a lado (Figura 9F).

Os grãos de pólen são dispersos na fase bicelular com abundância de grãos de amido, mas observaram-se alguns eventos em que grãos tricelulares foram encontrados antes da deiscência. Alguns grãos de pólen foram encontrados com o oncus da intina muito inchado e outros germinando dentro do lóculo da antera; neste caso, pode-se observar a intina formando o tubo polínico e a presença da unidade germinativa masculina (Figuras 15B-D, G, H).

As Tabelas 1 e 2 representam a correspondência entre os tamanhos dos botões florais e a fase de desenvolvimento das anteras, considerando-se ontogenia da antera, esporogênese e gametogênese. O comprimento do botão floral em *A. sensitiva* tem uma correspondência precisa com o estágio do desenvolvimento dos microsporângios, enquanto que em *A. falcata* ocorre uma sobreposição de estádios em botões de diferentes comprimentos, podendo significar que nesta espécie as peças do perianto apresentam uma maior variação em seu crescimento (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Relação entre os comprimentos dos botões florais e os estádios de desenvolvimento das anteras em *Aeschynomene falcata*.

Comprimento dos Botões (mm)	Estádio de Desenvolvimento das Anteras	
0,31-0,6	Primórdios recém-formados. Primeiras divisões na camada CII para formação das anteras.	
0,6-0,92	Proliferação da camada CII para formação das anteras. Diferenciação do tecido esporogênico e tapete.	
1,0	Tecido esporogênico formado, presença de 4 camadas parietais (t, cmi, ce, ep).	
1,2-1,5	Diferenciação da célula-mãe do micrósporo, presença das 5 camadas parietais (t, cmi, cme, ed, ep). Tapete diferenciado com núcleos grandes. Micrósporos livres e vacuolados.	
1,6-2,0	Células-mãe dos micrósporos. Meiose. Tétrades de micrósporos. Micrósporos livres. Todas as camadas parietais presentes, média interna colapsada e tapete com células de tamanho avantajado.	
2,5-2,7	Esporos vacuolados. Micrósporos passando por uma divisão mitótica. Microgametófitos com célula generativa parietal. Endotécio diferenciado.	
3,0-3,5	Célula generativa central. Citoplasma e núcleo tapetais em degeneração.	
4,0-4,5	Célula generativa central, célula vegetativa com amido. Células do tapete com as paredes presentes, começando a se colapsar, com citoplasma e núcleo degenerados.	
4,8-5,3	Célula generativa central e alongada, célula vegetativa com amido. Paredes tapetais colapsadas em degeneração, septos interesporangiais degenerados.	

*Os estádios que estão escritos com letra vermelha são aqueles que sobrepõe o estágio imediatamente anterior ou posterior.

Tabela 2: Relação entre os comprimentos dos botões florais e os estádios de desenvolvimento das anteras em *Aeschynomene sensitiva*.

Comprimento dos Botões (mm)	Estádio de Desenvolvimento das Anteras	
0,45-0,57	Primórdios recém-formados.	
0,6-0,7	Primeiras divisões na camada CII durante a diferenciação das anteras. Diferenciação do tecido esporogênico e tapete.	
1,2-1,4	Tecido esporogênico formado, presença de 4 camadas parietais (cpsi, cmi, ce, ep). Diferenciação da CMM, presença das 5 camadas parietais (t, cmi, cme, ed, ep). Tapete diferenciado com núcleos de dimensões avantajadas.	
1,7-2,0	CMM durante a divisão meiótica.	
2,2-2,5	Tétrades com paredes de calose. Microsporos livres.	
2,6-2,8	Microgametófitos passando pela primeira divisão mitótica. Microgametófitos com célula generativa parietal. Endotécio diferenciado.	
3,4-3,5	Célula generativa tomando posição central. Início de degeneração do citoplasma das células tapetais.	
3,7-5,6	Célula generativa central e alongada. Paredes tapetais colapsadas e degenerando-se, septos interesporangiais degenerados.	

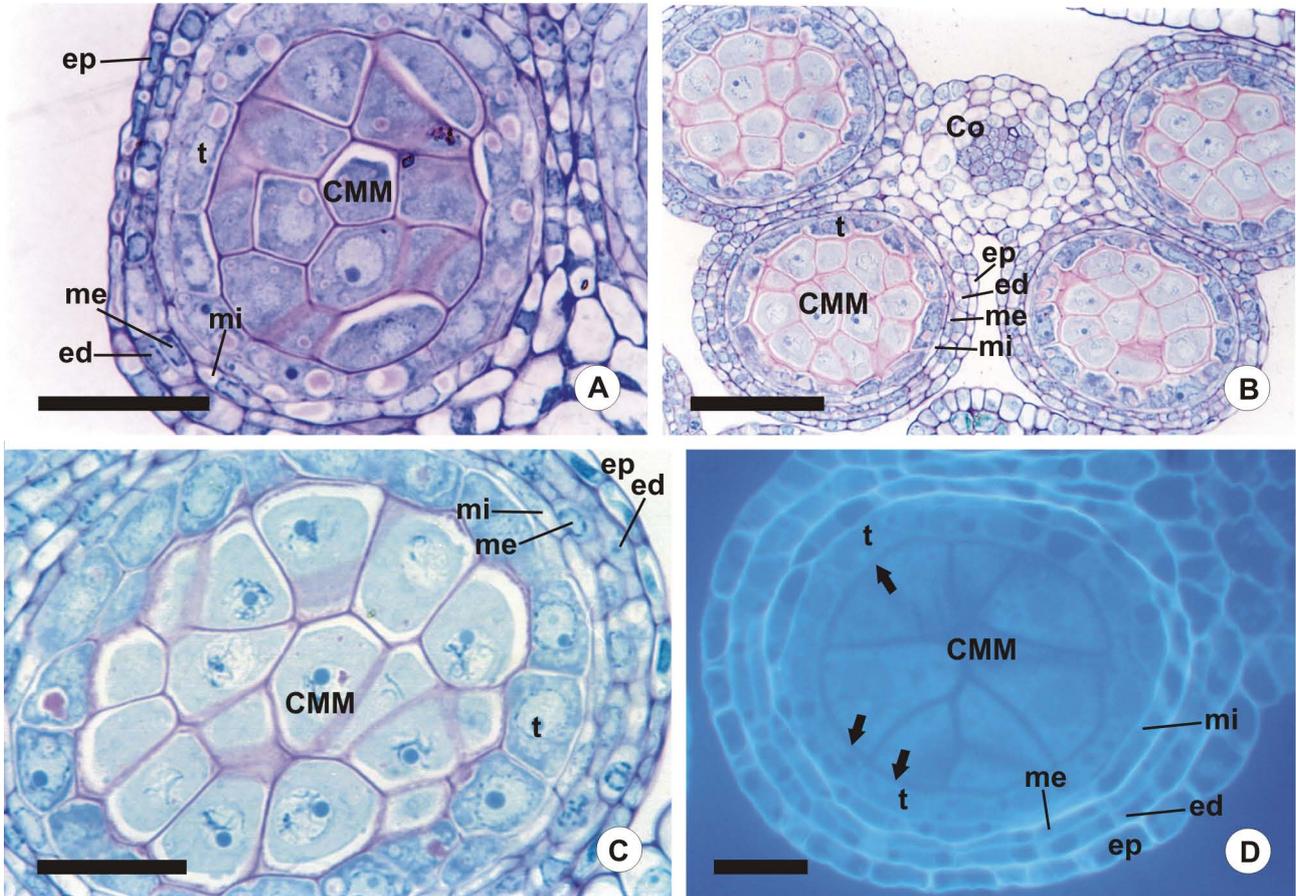


Figura 1: *A. falcata*. As células do tecido esporogênico entram na fase pré-meiótica com deposição das paredes de calose, sendo denominadas células-mãe dos micrósporos (CMM). A: A deposição de calose pode ser percebida em algumas células indicando que estas estão entrando no estágio pré-meiótico. A divisão da camada mais externa dos estratos parietais ainda está ocorrendo com a formação do endotécio e da camada média externa. O tapete apresenta vácuolos contendo uma substância rosea. B: Vista panorâmica de uma antera com todos os meiócitos em prófase I e estratos parietais completos. C: Detalhe de B, observa-se a condensação dos cromossomos na prófase I (leptóteno). D: Reação com Calcofluor White sob microscópio de fluorescência. A reação evidencia as fibrilas de celulose, as células do tapete não reagiram (setas). As paredes de calose ainda não estão presentes. CMM: célula-mãe do micrósporo; co: conectivo; ed: endotécio; ep: epiderme; me: camada média externa; mi: camada média interna; t: tapete. A, C, D: Barras = 25µm. B: Barra = 50µm.

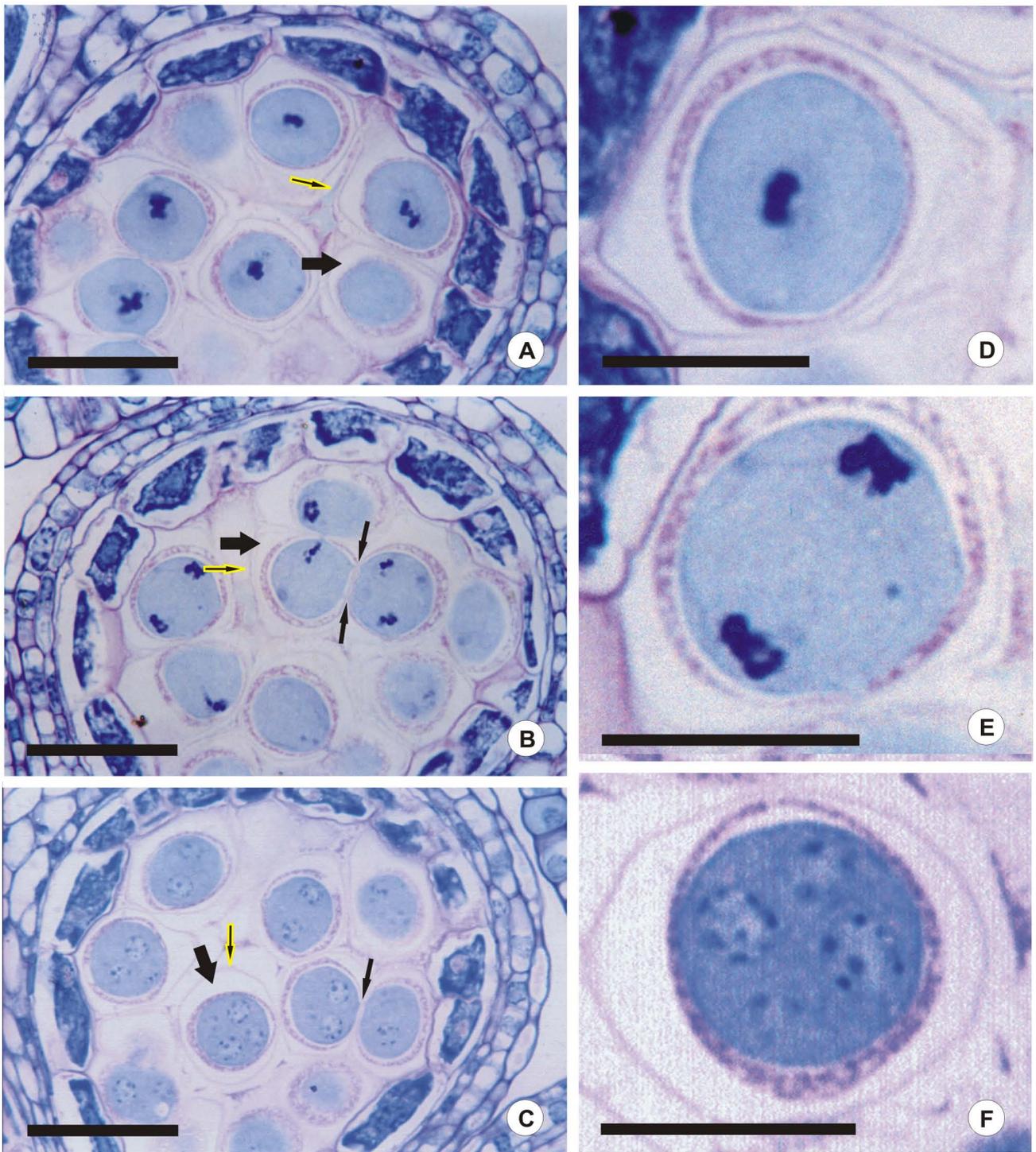


Figura 2: Meiose nas células-mãe dos micrósporos em *A. falcata*. A: Final da prófase I, cromossomos totalmente espiralados. B: Telófase I. C: Fim da cariocinese, quatro núcleos haplóides aparentes. D-F: Detalhes dos estádios da meiose das figuras A-C, respectivamente. As setas grossas indicam as paredes de calose. As setas finas indicam canais citomíticos. As setas de contorno amarelo indicam as paredes celulares das CMM, predominantemente péctica. As CMM produzem uma camada péctica entre a membrana plasmática e a parede de calose. A-C: Barras = 25 μ m. D-F: Barra = 12,5 μ m.

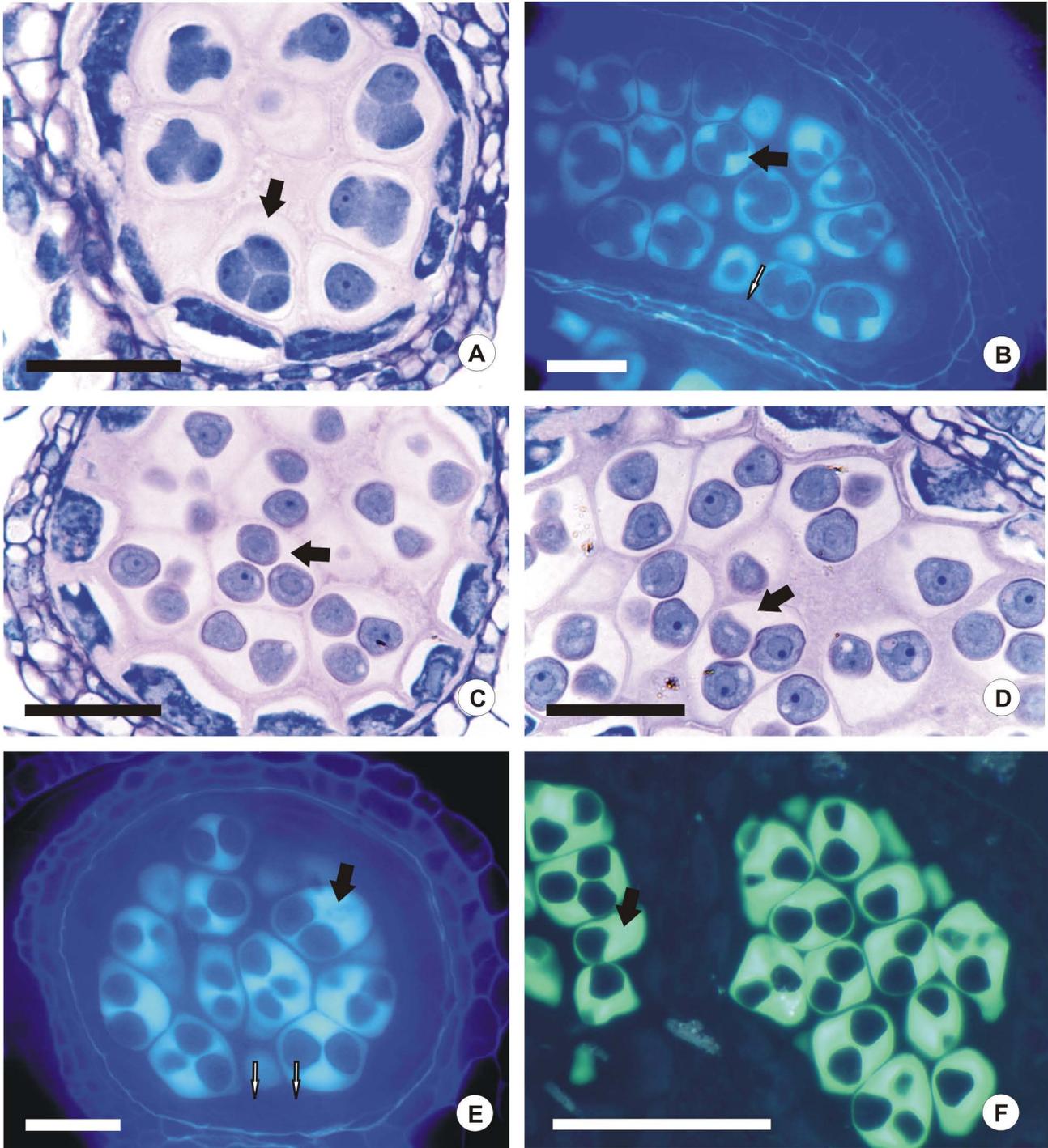


Figura 3: Citocinese simultânea para a formação de micrósporos em *A. falcata*. A, B: Observa-se a citocinese simultânea dos micrósporos com deposição de calose entre eles na direção centrípeta. B: Reação com Calcofluor White sob microscópio de fluorescência para evidenciar fibrilas de celulose. A reação foi negativa para o tapete. A calose apresentou autofluorescência. C-F: Citocinese concluída. C, D: A primexina já pode ser observada nos micrósporos com coloração roxa. E: Reação com Calcofluor White sob microscópio de fluorescência para para evidenciar fibrilas de celulose. A reação foi negativa para o tapete. A calose apresentou autofluorescência. F: Reação com Aniline Blue sob microscópio de fluorescência para evidenciar calose. As setas grossas apontam paredes de calose. As setas brancas apontam a região do tapete. A-E: Barras = 25µm. F: Barra = 50µm.

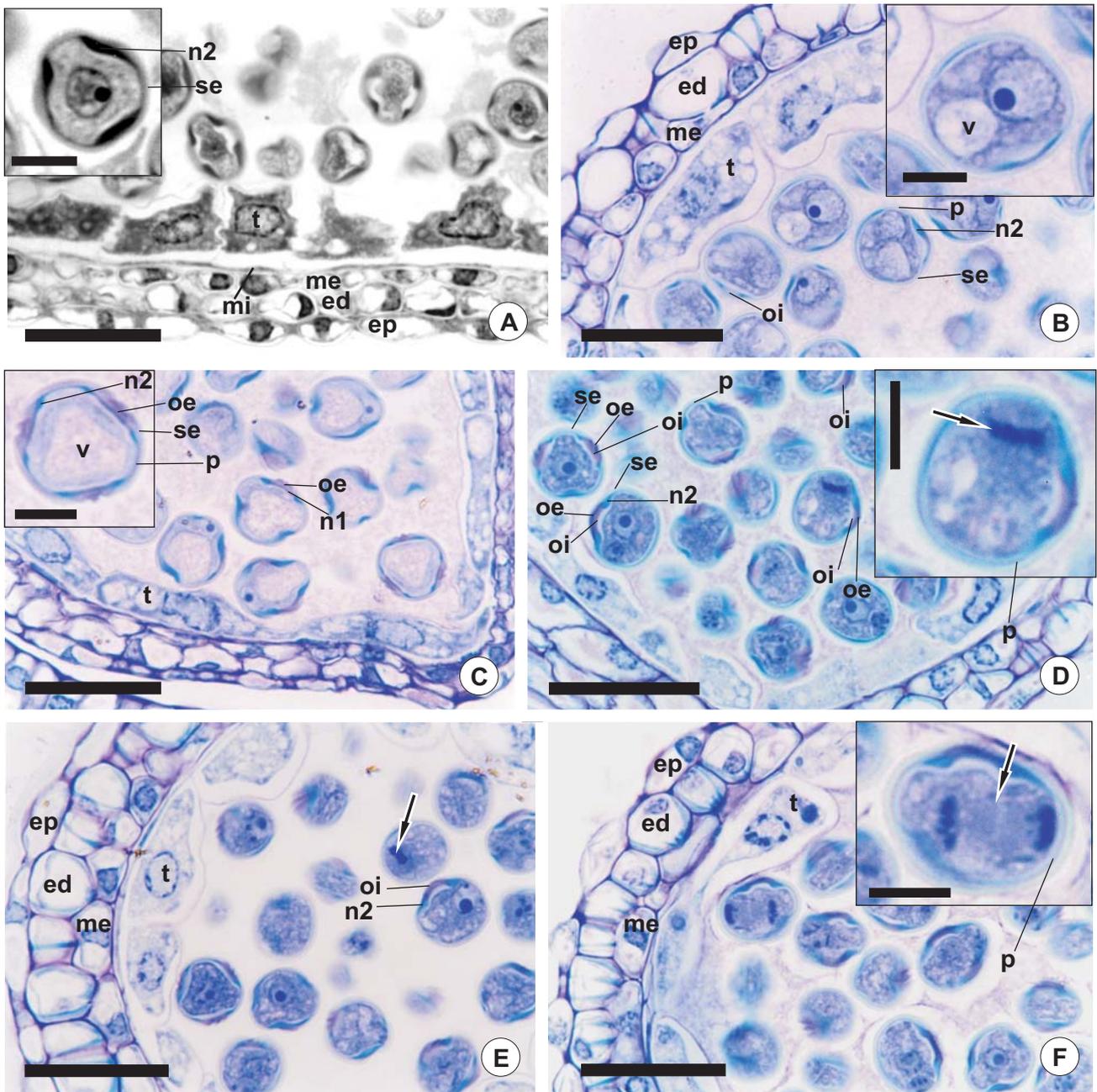


Figura 4: Microgametogênese em *A. falcata*. A: Esporos livres não vacuolados. Células do tapete com citoplasma denso e endotécio sem espessamento. Sexina e nexina-2 podem se distinguir na esporoderme. B: Esporos vacuolados. Tapete com muitas vesículas e endotécio diferenciado, com espessamentos. Camada média interna colapsada. C: Esporo vacuolado. Sexina, membrana do colpo (nexina-1), nexina-2, oncus da exina e restos de primexina visíveis. D: Primeira divisão mitótica do microgametófito. A seta aponta os cromossomos alinhados na metáfase. Em outros microgametófitos evidenciam-se sexina, nexina-2, restos de primexina, oncus da exina e oncus da intina. E: A seta aponta os cromossomos alinhados na metáfase. Os estratos parietais da antera estão totalmente diferenciados, as células da camada média interna apresentam-se colapsadas e as da externa apresentam-se intercaladas com as do endotécio. O tapete apresenta citoplasma menos denso. F: A seta aponta, no detalhe, o fragmoplasto da primeira divisão mitótica de um microgametófito em telófase. ed: endotécio; ep: epiderme; me: camada média externa; mi: camada média interna; n1: nexina-1; n2: nexina-2; oe: oncus da exina; oi: oncus da intina; p: restos de primexina; se: sexina; t: tapete, v: vacúolo. A-F: Barras = 25µm. Detalhes nos cantos superiores das figuras: Barras = 6,25µm.

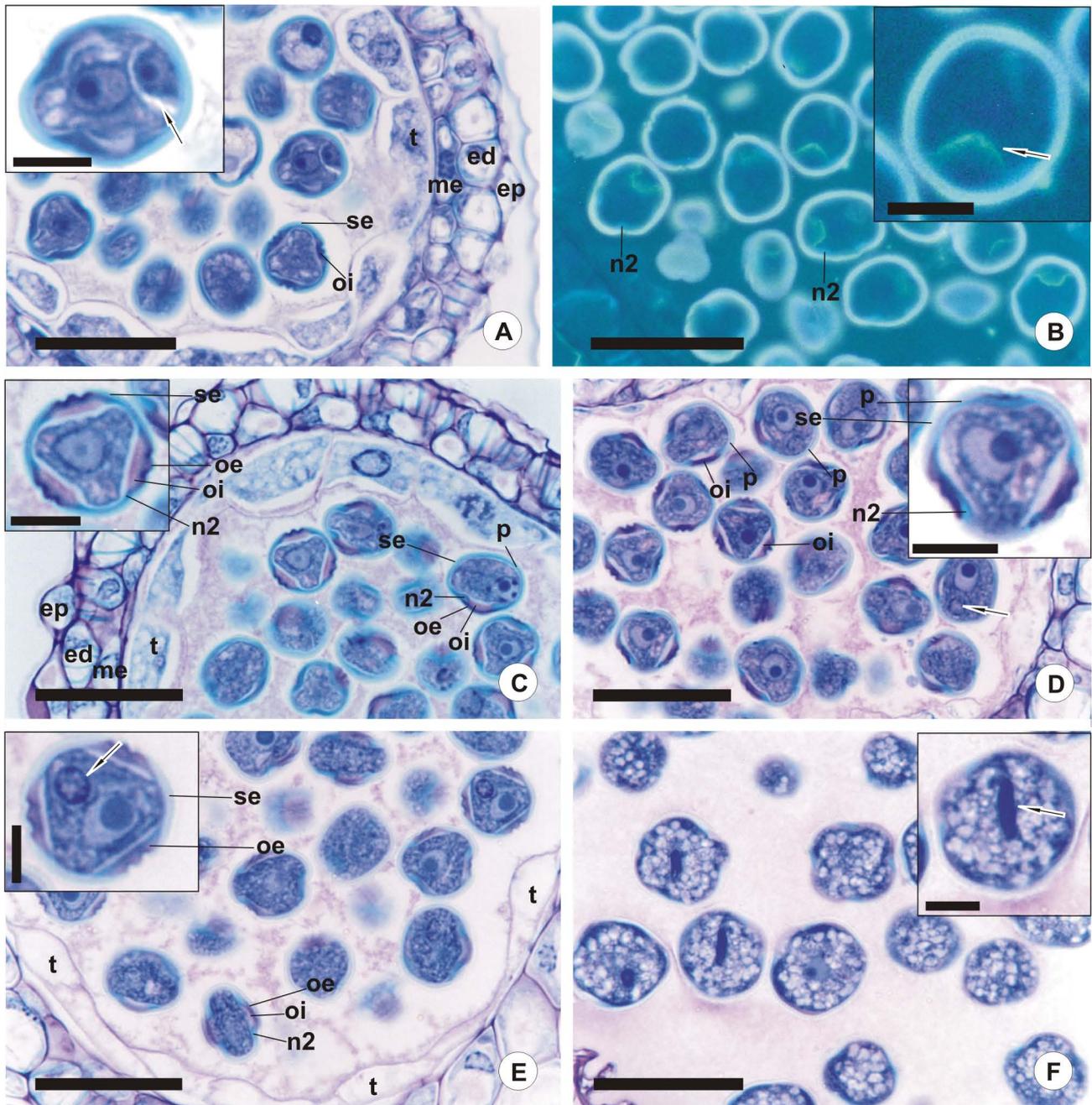


Figura 5: Microgametogênese em *A. falcata*. A: Célula generativa parietal. A seta aponta a parede da célula generativa. Sexina e oncus da intina visíveis. B: Reação com Aniline Blue sob microscópio de fluorescência para detecção de calose. Reação positiva para a parede da célula generativa (seta). Sexina e nexina-1 autofluorescentes. C, D: Ótima visualização das camadas da esporoderme, o oncus da intina com concentração diferencial de pectinas, o oncus da exina foi comprimido e restos de primexina podem ser observados sobre a nexina-1. E: A célula generativa já não apresenta-se em posição parietal, tomando posição central (seta). As células do tapete não apresentam conteúdo citoplasmático, mas suas paredes continuam presentes. F: A célula generativa adquire formato fusiforme e está imersa no citoplasma da célula vegetativa repleto de pequenas vesículas. ed: endotécio; ep: epiderme; me: camada média externa; n2: nexina-2; oe: oncus da exina; oi: oncus da intina; p: restos de primexina; se: sexina; t: tapete. A-F: Barras = 25µm. Detalhes nos cantos superiores das figuras: Barras = 6,25µm.

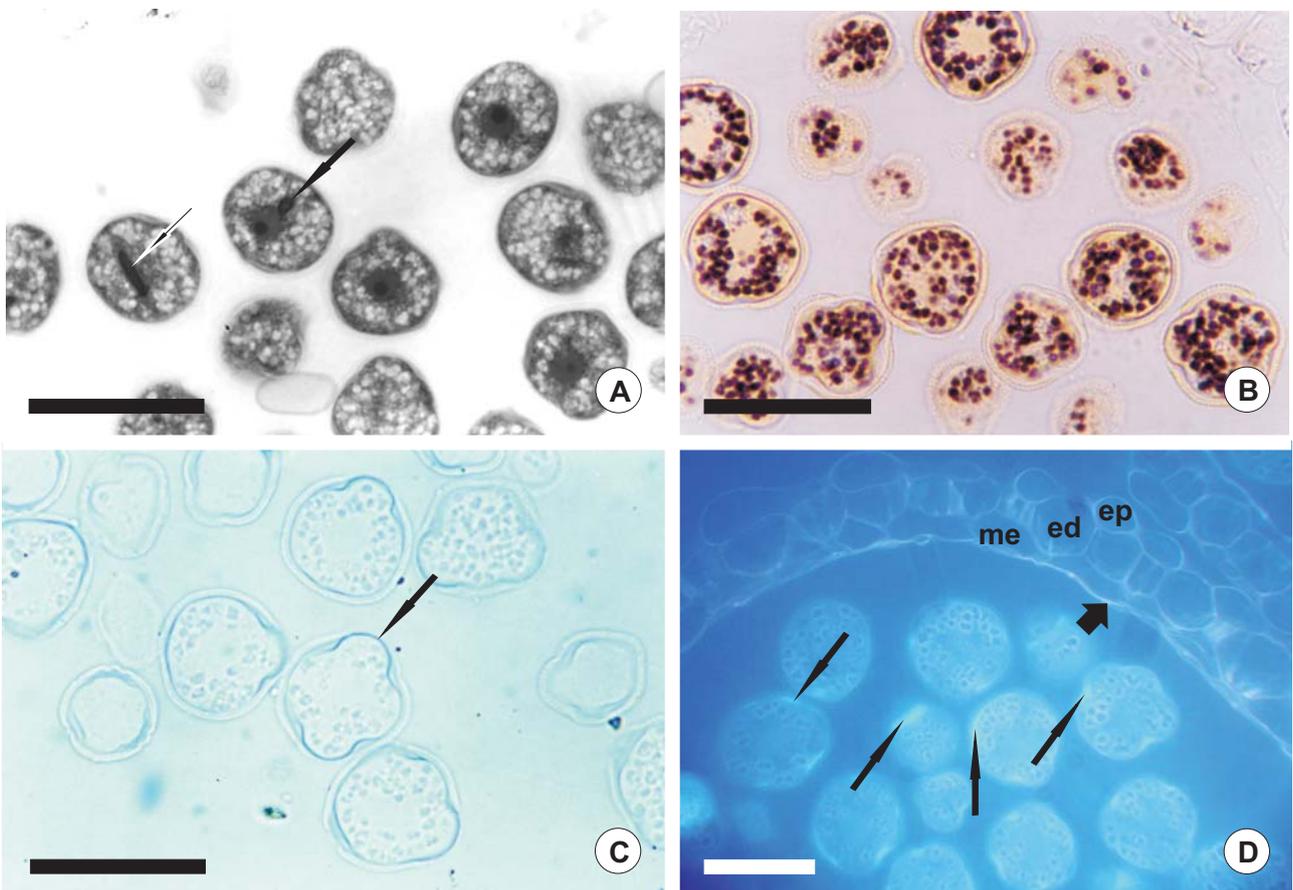


Figura 6: Grãos de pólen maduros e estratos parietais de *A. falcata*. A: Célula generativa fusiforme imersa no citoplasma da célula vegetativa. Célula generativa em secção longitudinal (seta de contorno branco). Célula generativa em secção transversal (seta preta). B: Reação com Iodeto de Potássio (IKI) para a detecção de amido. Reação positiva para as vesículas citoplasmáticas da célula vegetativa. C: Reação com Alcian Blue para a detecção de pectinas. Reação positiva para a intina-1 (seta). D: Reação com Calcofluor White para a detecção de fibrilas de celulose. Reação positiva para as paredes da camada média externa (seta grossa). A parede tapetal já foi degenerada. A reação também foi positiva para intina-2-celulósica (setas finas). ed: endotécio; ep: epiderme; me: camada média externa. A-D: Barras = 25µm.

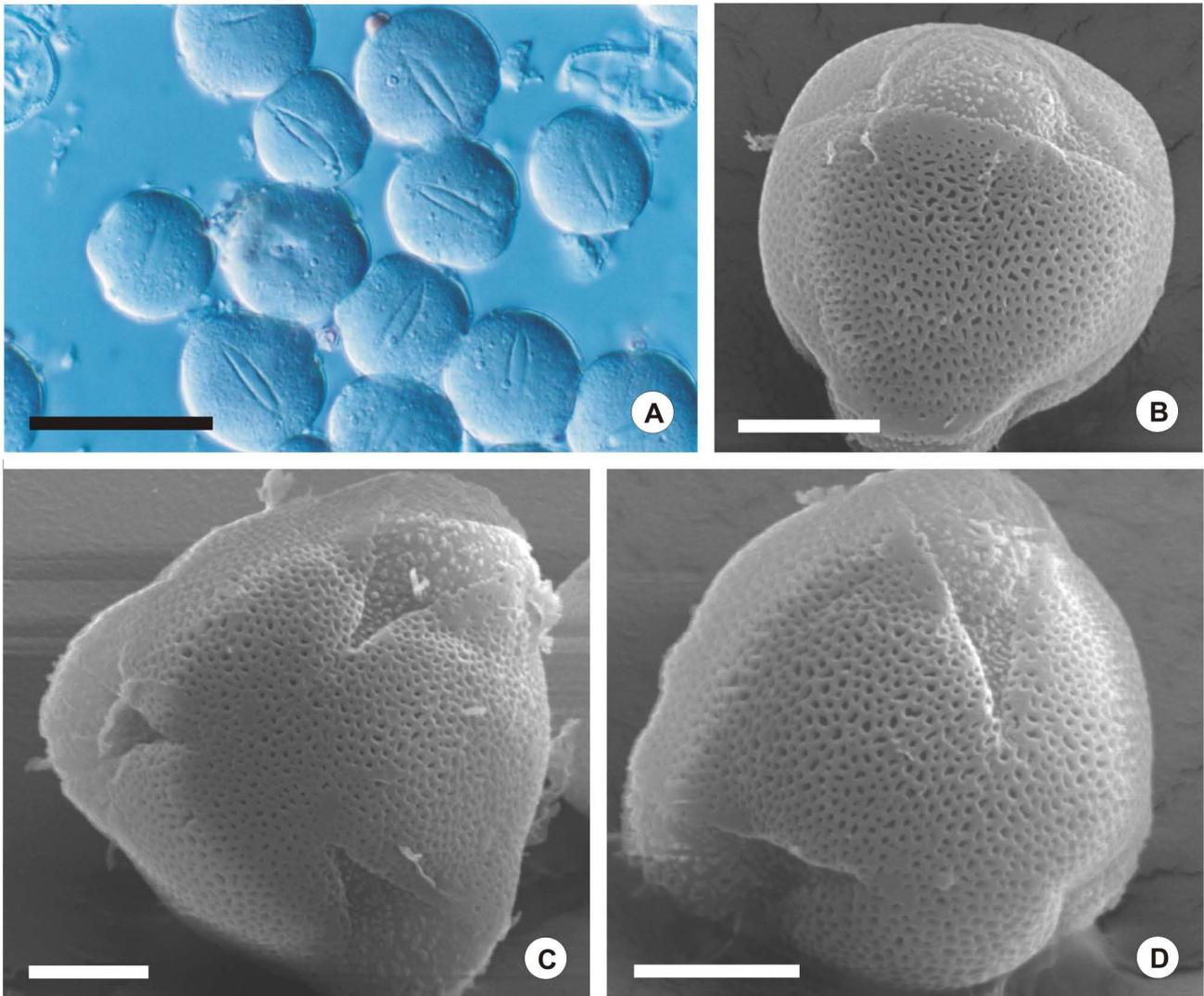


Figura 7: Morfologia externa dos grãos de pólen de *A. falcata*. A: Colpos vistos sob microscopia de contraste interferencial. B-D: Imagens de MEV. B: Vista equatorial. Um dos colpos está visível com o poro dilatado. C, D: Vista polar. O grão de pólen é tricolporado e os colpos não se unem nos pólos. Sexina reticulada. A sexina esparsa sobre os colpos não constitui um opérculo. A: Barra = 25 μ m. B-D: Barras = 5 μ m.

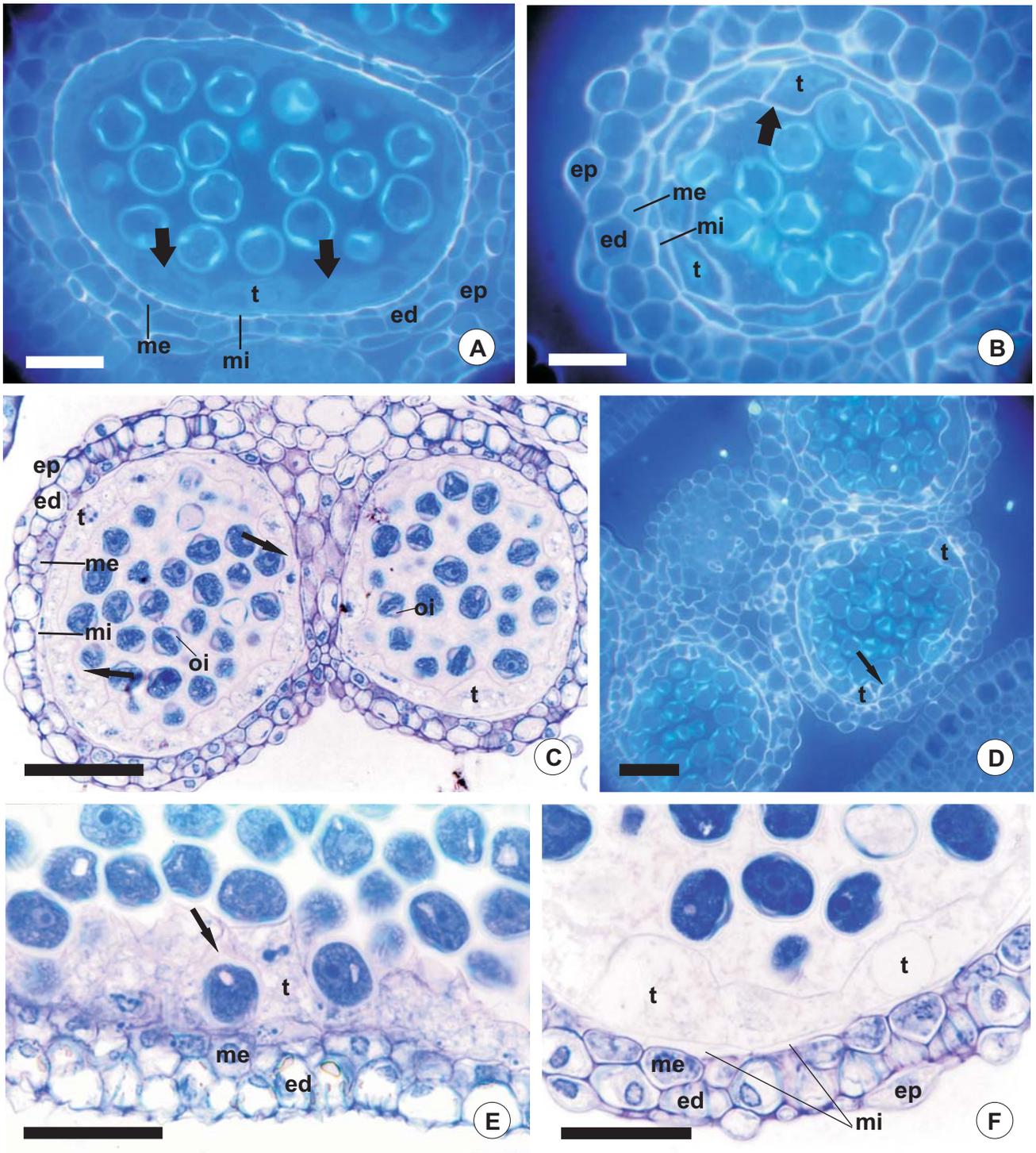


Figura 8: Aspectos importantes do desenvolvimento do tapete em *A. falcata*. A, B, D: Reação com Calcofluor White sob microscópio de fluorescência para a detecção de fibrilas de celulose. A: Início da gametogênese com reação negativa para as células do tapete (seta). B, D: Durante a gametogênese com reação positiva para as células do tapete (setas). C, E: As células do tapete apresentam grandes depressões em suas paredes periclinais internas, onde podem ser encontrados os grãos de pólen (setas). F: Células do tapete com citoplasma escasso. As paredes das células da camada média interna podem ser visualizadas. ed: endotécio; ep: epiderme; me: camada média externa; mi: camada média interna; oi: oncus da intina; t: tapete. A, B, E, F: Barras = 25µm. C, D: Barra = 50µm.

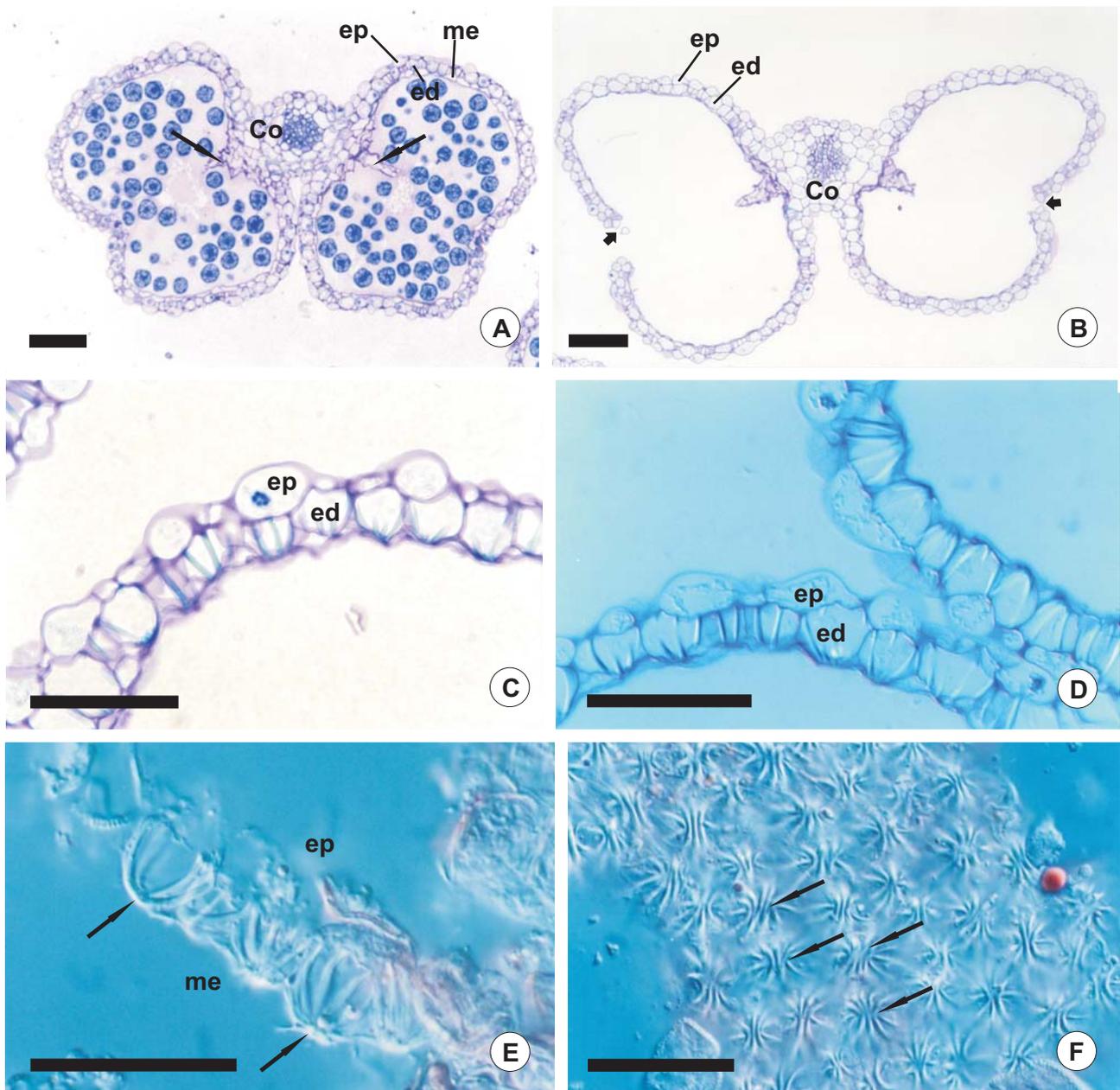


Figura 9: Estratos parietais da antera de *A. falcata* próximo ao momento da antese. D-F: Microscopia de contraste interferencial. A: Antera antes da deiscência. Os septos foram degenerados (setas) e a camada média externa ainda está presente. B: Antera após a deiscência. A camada média externa não está mais aparente. Estômio visível (setas grossas). C, D: Detalhe de B. E, F: Antera esmagada para visualização dos espessamentos do endotécio. E: Vista lateral das células do endotécio. As letras que indicam epiderme e camada média externa estão presentes apenas como referencial. Na parede periclinal interna a placa basal do espessamento é apontada pela seta. F: Vista frontal da parede periclinal interna do endotécio. Observa-se a “placa basal” constituída por fibras distintas e não fusionadas (setas). co: conectivo; ed: endotécio; ep: epiderme; me; camada média externa. A-B: Barras = 50 μ m. C-F: Barras = 25 μ m.

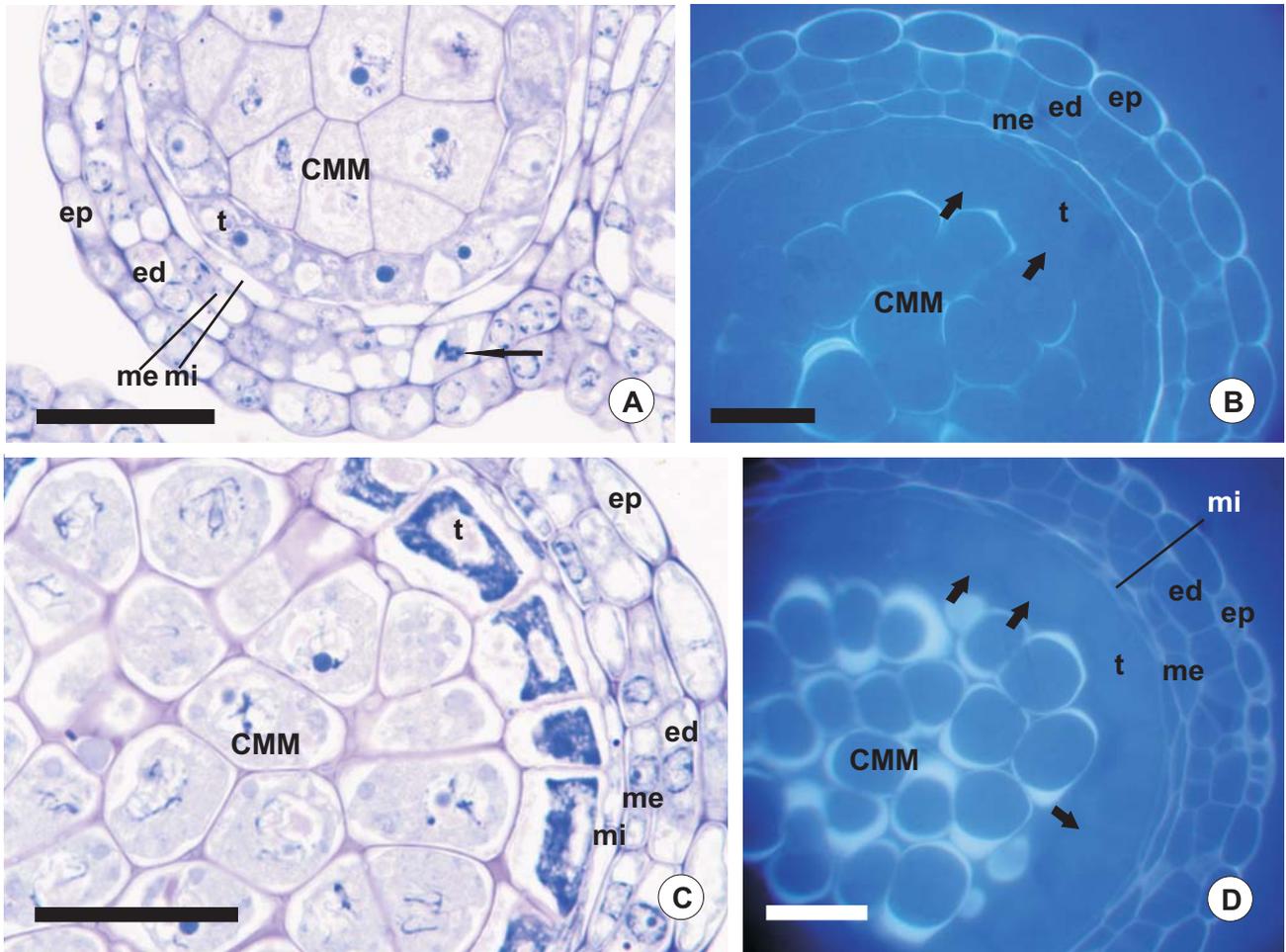


Figura10: A. *sensitiva*. As células do tecido esporogênico iniciam a deposição das paredes de calose e entram num estágio pré-meiótico, sendo denominadas células-mãe dos micrósporos (CMM). B, D: Reação com Calcofluor White sob microscópio de fluorescência. A reação evidência as fibrilas de celulose. A: A divisão da camada mais externa dos estratos parietais ainda está acontecendo (seta) e origina endotécio e camada média externa. O tapete apresenta vácuolos com uma substância rosea. As células do tecido esporogênico estão na prófase I (leptóteno) da meiose. B: A deposição de calose (autofluorescente) ainda é sutil. O tapete reage negativamente para a presença de celulose (setas). C: Com os núcleos das CMM ainda em prófase I (leptóteno), observa-se uma deposição mais avançada da parede de calose. O citoplasma destas células parece estar mais ativo em relação às CMM da figura A. D: Mesmo estágio da figura C, paredes de calose autofluorescentes. As células do tapete não reagiram (setas) ao teste com Calcofluor White. CMM: célula-mãe do micrósporo; ed: endotécio; ep: epiderme; me: camada média externa; mi: camada média interna; t: tapete. A-D: Barras = 25µm.

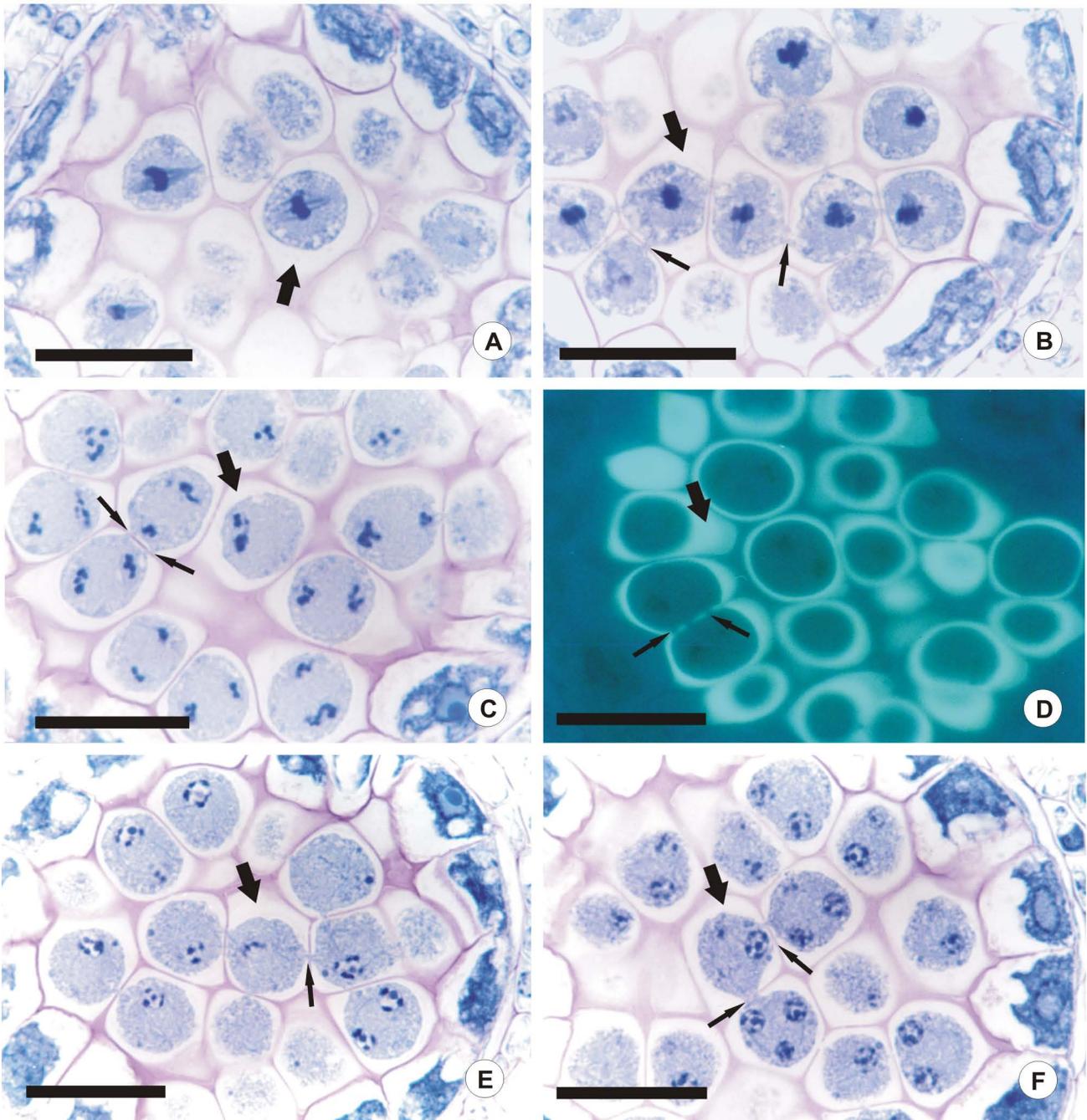


Figura 11: Meiose nas células-mãe dos micrósporos (CMM) de *A. sensitiva*. A, B: Metáfase I. Fibras do fuso visíveis. C: Telófase I. D: Reação com Aniline Blue sob microscópio de fluorescência. A reação evidencia paredes de calose, ver canais citomíticos. E: Prófase II, núcleos prontos para iniciar segunda fase da meiose, nucléolo presente. F: Após a cariocinese os quatro núcleos haplóides estão aparentes, nucléolos presentes. As setas grossas indicam as paredes de calose. As setas finas indicam canais citomíticos. A-F: Barras = 25µm.

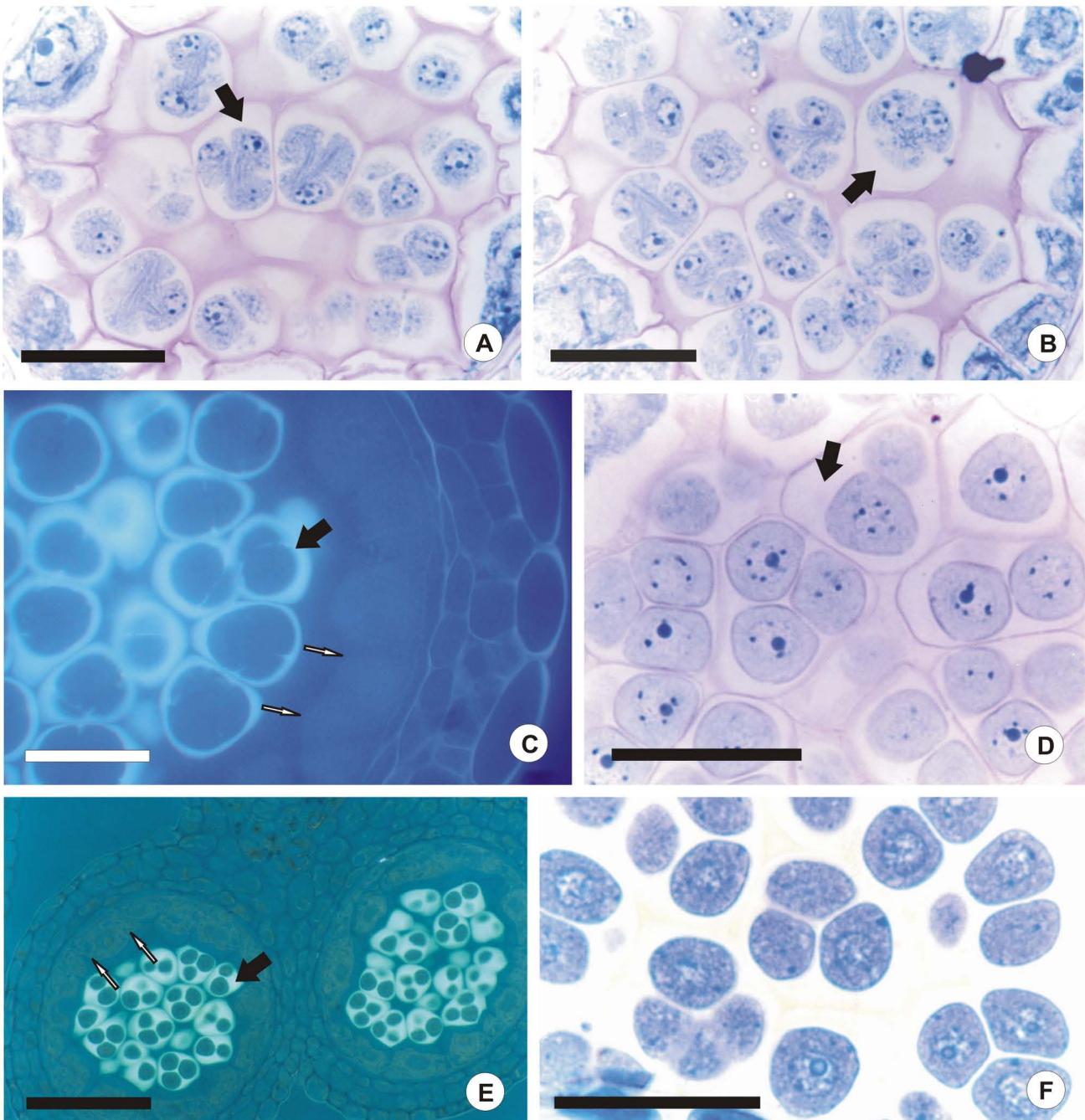


Figura 12: Citocinese simultânea e tétrades de micrósporos em *A. sensitiva*. A, B: Observa-se a citocinese simultânea dos micrósporos com deposição centrípeta da parede de calose entre eles. C: Mesmo estágio de A e B. Reação com Calcofluor White sob microscópio de fluorescência para evidenciar fibrilas de celulose. A reação foi negativa para o tapete. A calose apresentou autofluorescência. D-F: Citocinese concluída, tétrades evidentes. D: A primexina já pode ser observada nos micrósporos, ela se cora de roxo com Azul de Toluidina. E: Reação com Aniline Blue sob microscópio de fluorescência para evidenciar calose. Reação positiva mostrando as paredes de calose das tétrades. F: A primexina reage levemente com o Coomassie Blue, evidenciando a presença de proteínas. As setas grossas apontam paredes de calose. As setas brancas apontam a região do tapete. A-D, F: Barras = 25µm. E: Barra = 50µm.

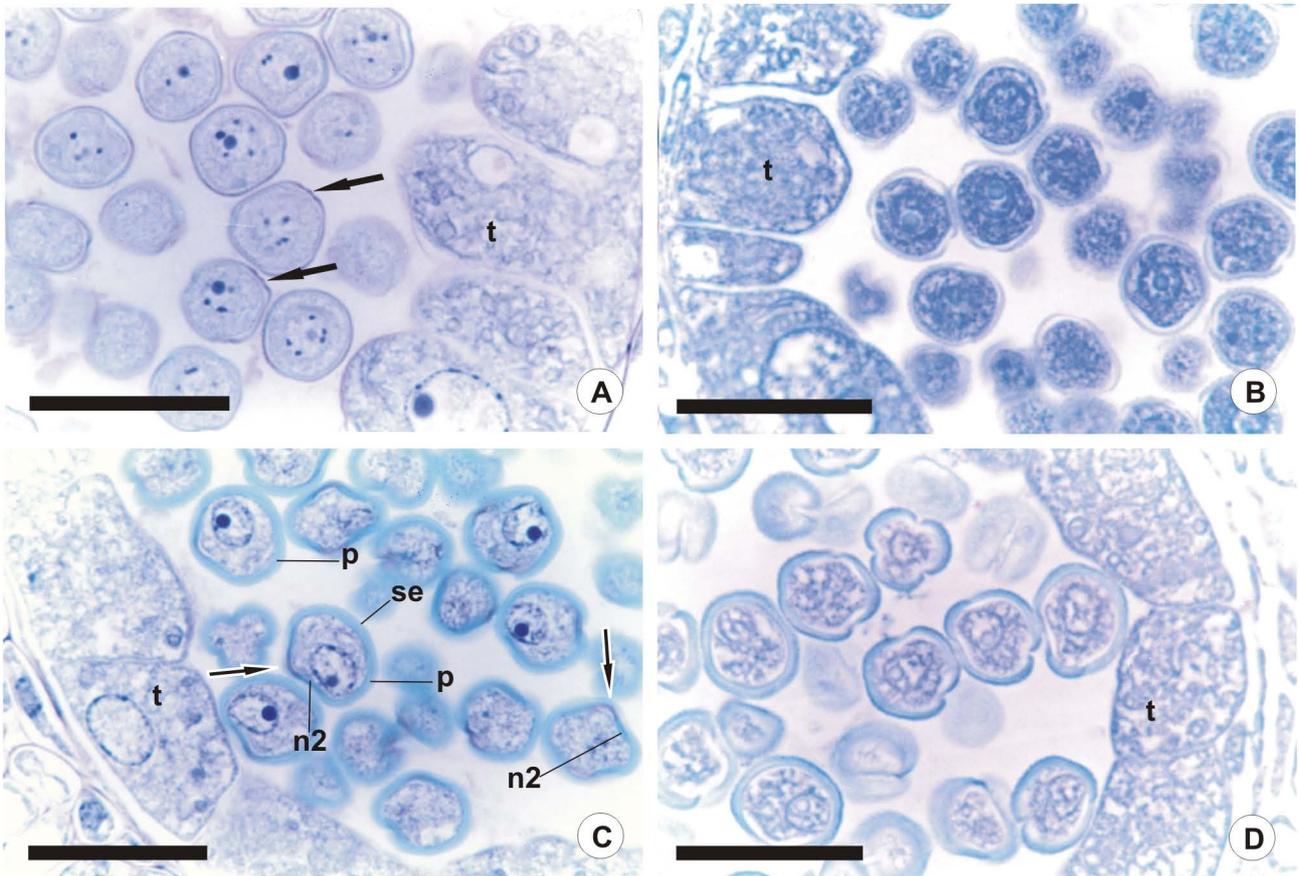


Figura13: Micrósporos de *A. sensitiva*. B, D: Reação com Coomassie Blue para evidenciar a presença de proteínas. A: Micrósporos livres com núcleo central. A região das aberturas já pode ser percebida na primexina. Uma coloração azul-esverdeada indica o início da deposição de esporopolenina. Tapete hipertrofiado. B: A sexina reage positivamente para a presença de proteínas. Tapete hipertrofiado. C, D: Micrósporos livres com núcleo excêntrico e pequenos vacúolos. A esporoderme está mais desenvolvida que em A e B. Tapete com desenvolvimento normal em intensa atividade. C: A sexina cora-se de azul esverdeado pelo Azul de Toluidina, restos de primexina ainda são observados como uma sutil camada rósea, a nexina-2 inicia sua formação e o oncus da exina cora-se de roxo (setas). D: A sexina reage positivamente para a presença de proteínas (principalmente o teto). A formação da sexina com teto e báculas fica mais evidente nesta reação. n2: nexina-2; p: restos de primexina; se: sexina; t: tapete. A-D: Barras = 25µm.

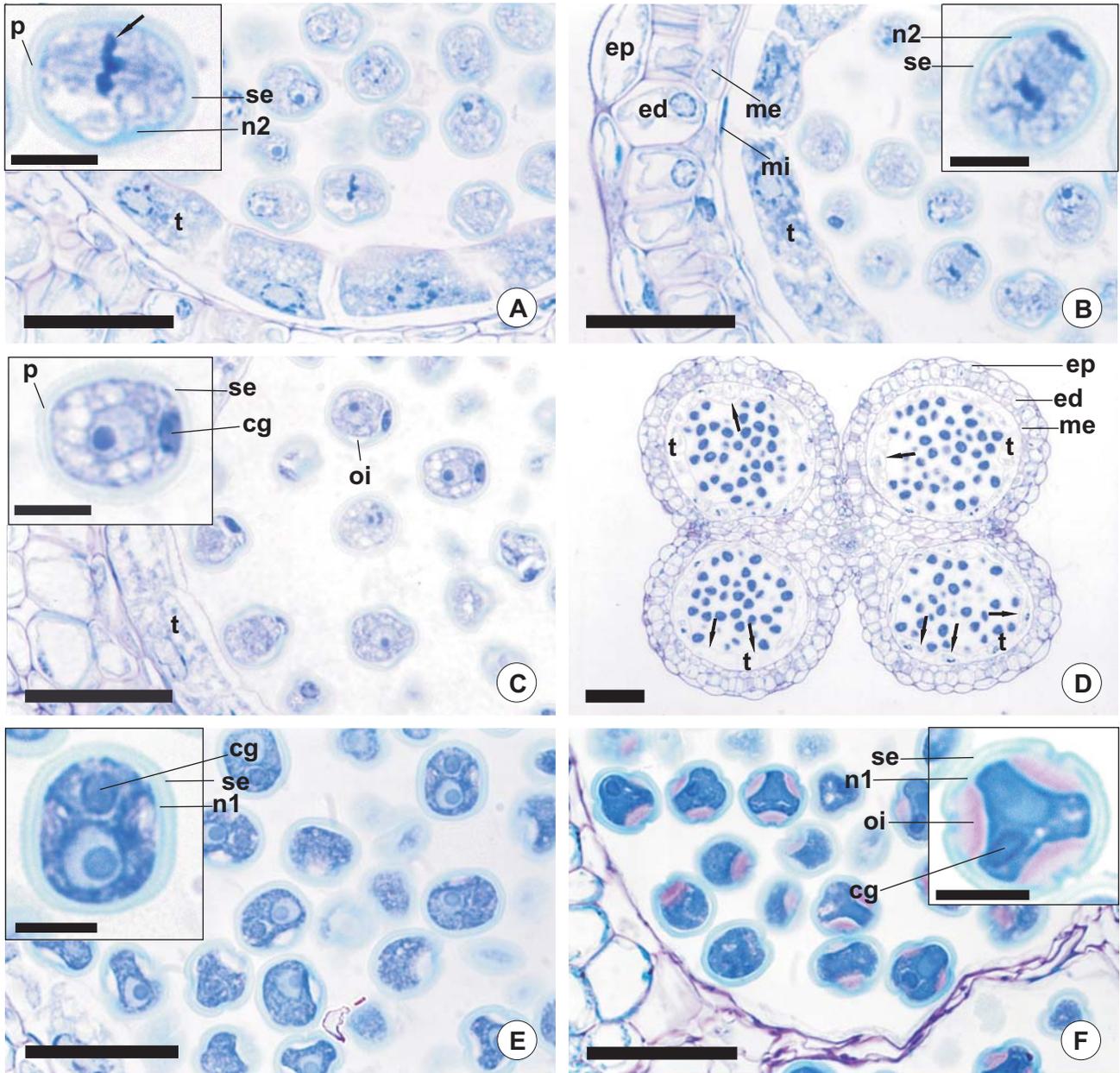


Figura 14: Microgametogênese em *A. sensitiva*. A: Primeira divisão mitótica do microgametófito. A seta aponta os cromossomos alinhados em metáfase. Evidenciam-se a sexina, restos de primexina e nexina-2. B: Anáfase da primeira divisão mitótica do microgametófito. Endotécio com espessamentos fibrosos, camada média interna colapsada. C: Fim da divisão mitótica, célula generativa lentiforme e de posição parietal. A célula vegetativa herdou quase todo o citoplasma do microsporo. Sexina e restos de primexina visíveis. D: Vista panorâmica da antera, paredes tapetais periclinais internas ainda presentes (setas), citoplasma quase todo degenerado. E: Célula generativa com núcleo denso e grande sendo englobada pelo citoplasma da vegetativa. F: Célula generativa central. Oncus da intina visivelmente péptico. Paredes tapetais totalmente colapsadas. cg: célula generativa; ed: endotécio; ep: epiderme; me: camada média externa; mi: camada média interna; n1: nexina-1; n2: nexina-2; oi: oncus da intina; p: restos de primexina; se: sexina; t: tapete. A-C, E, F: Barras = 25µm. D: Barra = 50µm. Detalhes nos cantos superiores das figuras: Barras = 6,25µm.

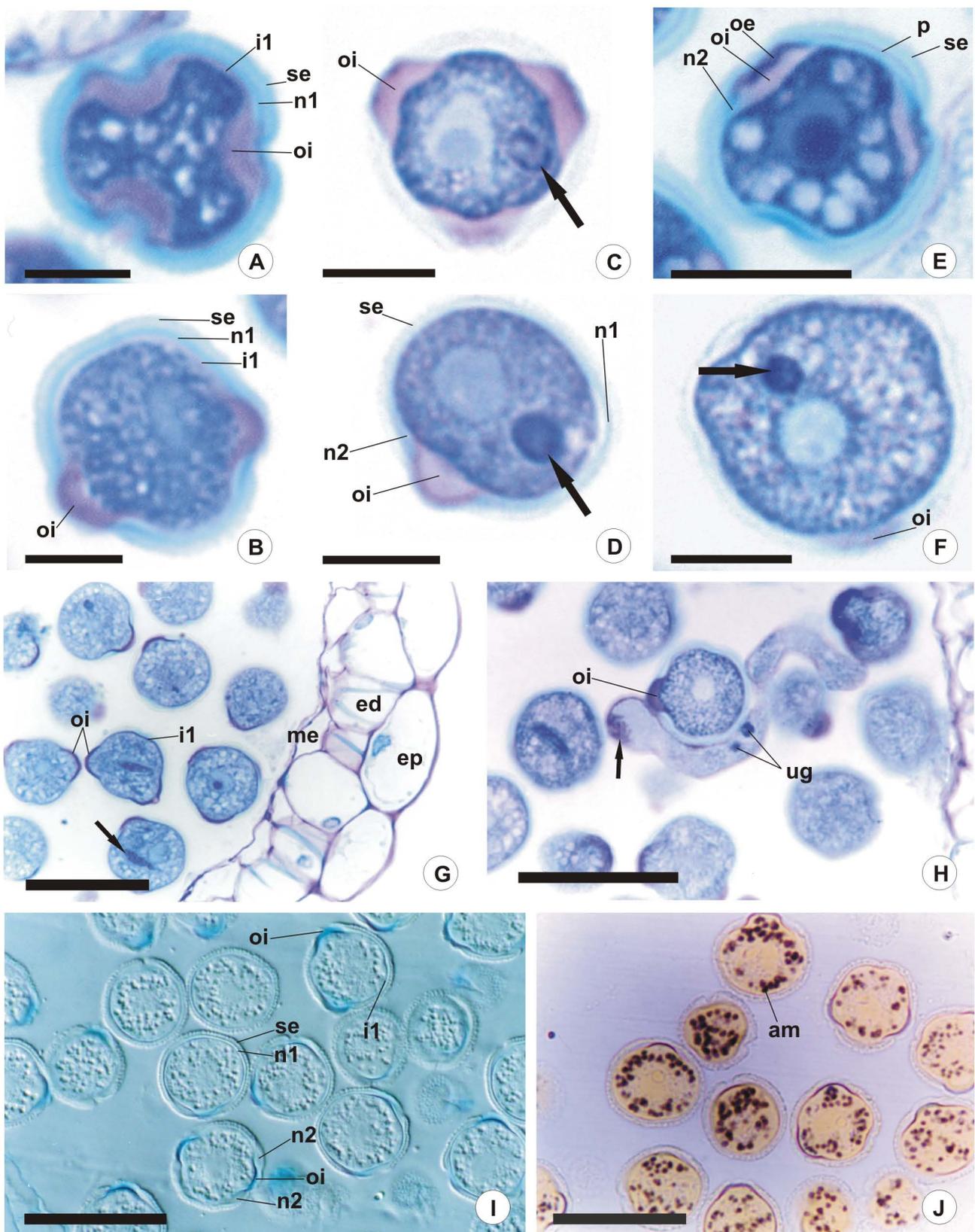


Figura15: *A. sensitiva*. A-F: Detalhes da esporoderme dos grãos de pólen com célula generativa central. C, D, F: A célula generativa torna-se mais estreita durante o desenvolvimento do grão, em secção transversal (seta). G: As células do tapete foram totalmente colapsadas. Em secção longitudinal a célula generativa tem formato de fuso (seta). Os poros estão dilatados e o oncus da intina intensamente corado de roxo pelo Azul de Toluidina. H: Eventualmente encontrou-se grãos de pólen germinando dentro da antera. A unidade germinativa masculina (ug) e a região de síntese do tubo polínico (seta) podem ser observados. I: Reação positiva para a presença de pectinas no oncus da intina e na intina-1, utilizando-se Alcian Blue sob microscópio de contraste interferencial. J: Reação positiva para a presença de amido utilizando-se IKI. am: amido; ed: endotécio; ep: epiderme; i1: intina-1; me: camada média externa; n1: nexina-1; n2: nexina-2; oe: oncus da exina comprimido; oi: oncus da intina; p: restos de primexina; se; sexina. A-F: Barras = 6,25µm. G-J: Barras = 25µm.

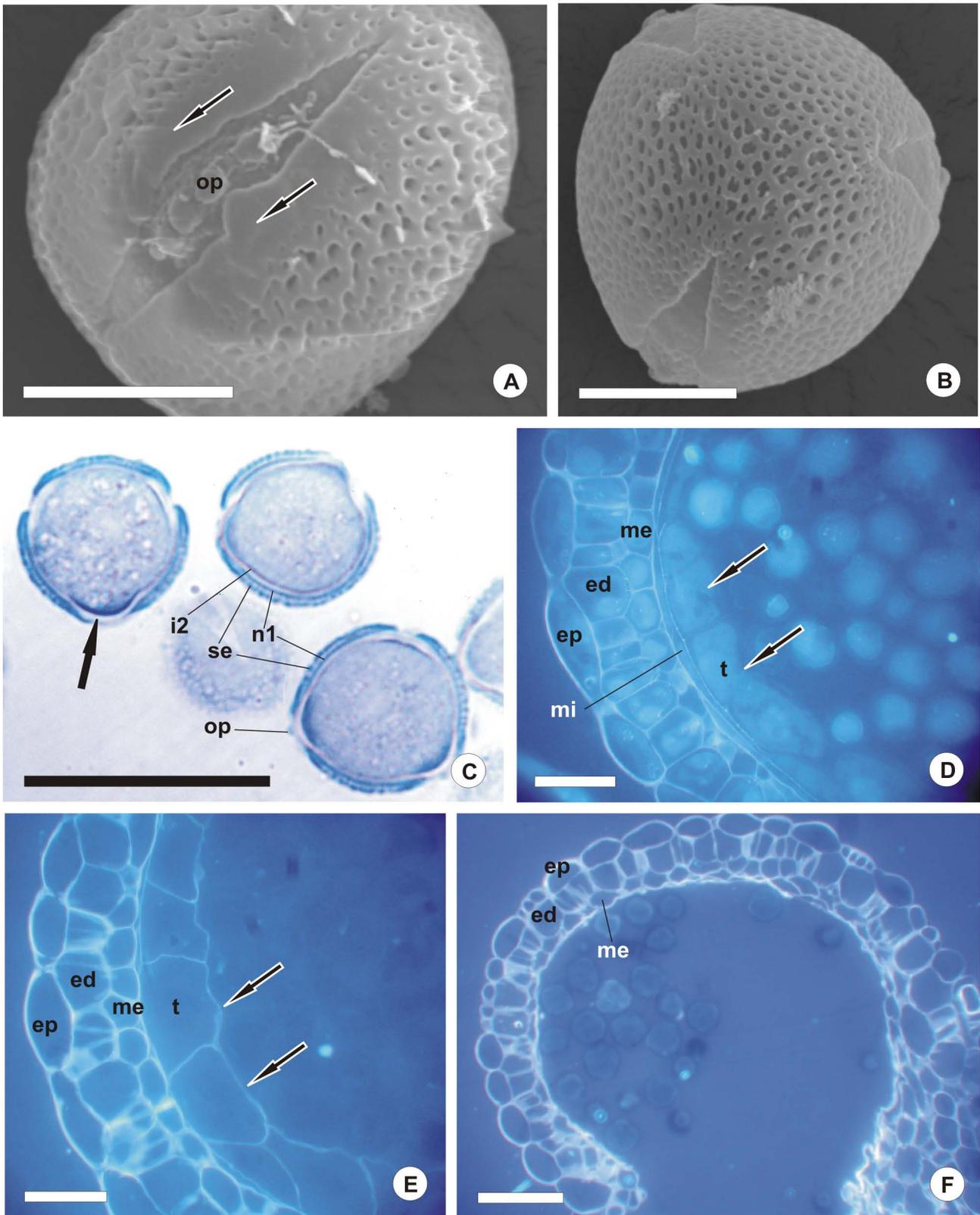


Figura16: *A. sensitiva*. A-B: MEV-Morfologia externa dos grãos de pólen. A: Vista equatorial do grão de pólen. Colpo e opérculo. Notar região mais lisa na sexina margeando o colpo (setas). B: Vista polar do grão de pólen. Os colpos não se unem nos pólos. Sexina reticulada. C: Reação com Coomassie Blue. Teste positivo para proteínas na sexina, nexina-1 e na intina-2, celulósica (seta), o citoplasma adjacente à abertura também tem alta concentração de proteínas. D-F: Reação com Calcofluor White sob microscópio de fluorescência para a detecção de fibrilas de celulose. D: Reação negativa para as células do tapete (setas). Espessamentos do endotécio ausentes. E: Fase adiantada da gametogênese. Reação positiva para as células do tapete (setas). F: Células tapetais colapsadas. ed: endotécio; ep: epiderme; i2: intina-2; me: camada média externa; mi: camada média interna; n1: nexina-1; op: opérculo; se; sexina; t: tapete. A-B: Barras = 5 μ m. C-E: Barras = 25 μ m. F: Barra = 50 μ m.

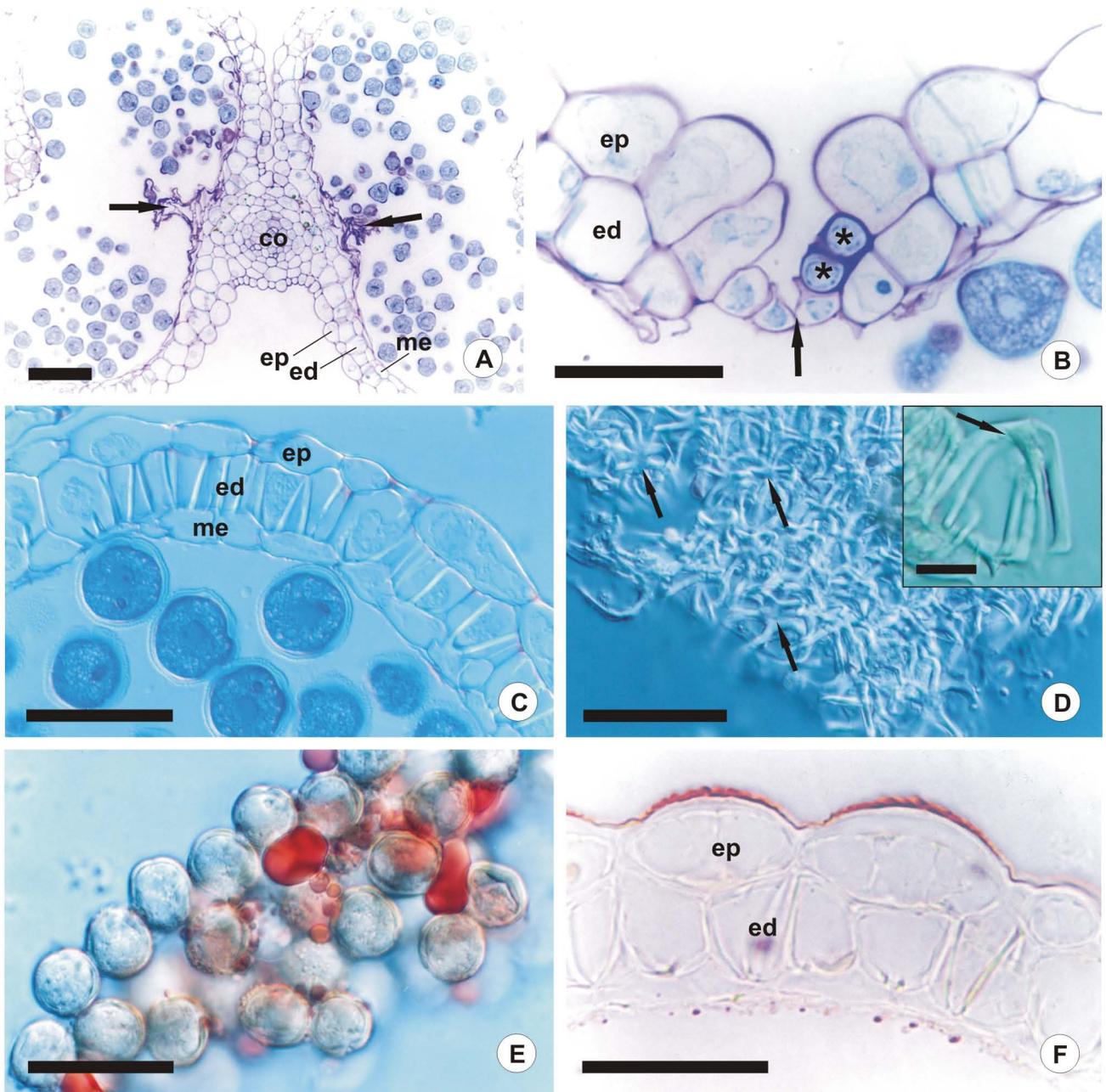


Figura17: Estratos parietais da antera próximo ao momento da antese em *A. sensitiva*. C-E: Microscopia de contraste interferencial. A: Antera antes da deiscência. Os septos foram degenerados (setas) e as paredes celulares da camada média externa ainda estão presentes. B: Células estomiais em menor diâmetro que as demais epidermicas (seta). Os asteriscos apontam células guarda de um estômato adjacente ao estômio. C: Vista lateral das fibras de espessamento do endotécio. D, E: Antera esmagada. D: Vista frontal da parede periclinal interna das células do endotécio com placa basal constituída por fibras fusionadas (setas). E: Reação com Sudan III. Grandes gotas de lipídio foram detectadas em torno dos grãos de pólen, provavelmente originárias do tapete. F: Reação com Sudan III. Cutícula e paredes colapsadas do tapete apresentam reação positiva. co: conectivo; ed: endotécio; ep: epiderme; me; camada média externa. A: Barra = 50µm. B-F: Barras = 25µm. Detalhe no canto superior da figura D: Barra = 6,25µm.

4 - Discussão

4.1-Microsporogênese

A meiose é o evento mais importante no ciclo de vida de uma planta, representa o fim da geração esporofítica e anuncia o início da gametofítica. A duração deste processo pode ser afetada por fatores ambientais como temperatura e umidade, bem como pela ploidia da espécie (Bhandari, 1984). A meiose se inicia no tecido arquesporial ou esporogênico, cujo momento exato em que as células entram no estágio pré-meiótico é desconhecido, embora se saiba que no estágio G2 da interfase as células já não podem mais retornar à mitose (Dickinson, 1987). Com os dados obtidos no Capítulo III acredita-se que as células que se diferenciarão em meiócitos já podem ser identificadas após a terceira divisão periclinal das células iniciais da camada subdérmica do primórdio de estame, quando já apresentam o citoplasma mais denso que as demais e passam a sofrer divisões em planos diferentes das outras células que se originaram da camada subdérmica. As células que formam o tapete ainda não podem ser reconhecidas neste estágio.

Durante a prófase I, na fase de leptóteno, os telômeros dos cromossomos podem ser vistos aderidos à membrana nuclear (Dickinson, 1987) (Figura 10C). A polarização do nucléolo das CMM é uma importante característica do início da prófase I (Bhandari, 1984) e também pode ser observado. A parede predominantemente péctica das CMM é dissolvida após a deposição da calose e a produção de uma nova camada péctica entre a membrana plasmática e a parede de calose em *A. falcata* parece não ser um evento comum entre as plantas. As estruturas globosas observadas em *Aeschynomene*, tanto nas células-mãe dos micrósporos (CMM), quanto nas células tapetais podem estar relacionados às inclusões concêntricas de multimembranas que foram detectadas nas células-mãe dos micrósporos de *Pisum sativum* e *Lens culinare* (Biddle, 1979) e nas células tapetais de *Ulex europaeus* (Misset & Gourret, 1984). No início da prófase I é comum o desaparecimento da população de ribossomos do meiócito relacionado a uma erradicação em largas proporções das informações esporofíticas carregadas por estas moléculas (Dickinson, 1987).

A formação das paredes de calose fornece compartimentos para o desenvolvimento autônomo das células gametofíticas, rompendo sua comunicação com o tapete e funcionando como um filtro molecular que também confere proteção mecânica aos micrósporos em desenvolvimento e evita sua desidratação devido à natureza higroscópica da substância (Bhandari, 1984). A calose é uma substância marcante por ser sintetizada e degradada com

grande facilidade (Helsop-Harrison, 1968b; Bhandari, 1984) e está presente apenas em grupos mais derivados de angiospermas, nos grupos mais basais outros polissacarídeos estão presentes (Pacini & Frachi, 1991). A conexão entre os meiócitos, por sua vez, não é cortada, não só pela permanência dos plasmodesmos restantes, mas pela sua amplificação para formar canais com até 0,5µm de diâmetro, que são denominados canais citomíticos (Dickinson, 1987). Esses canais permitem a passagem de componentes citoplasmáticos de uma célula para outra, inclusive de organelas, formando um verdadeiro sincício em cada lóculo (Helsop-Harrison, 1968b; Bhandari, 1984; Dickinson, 1987), sendo responsável pela grande sincronia na fase inicial do desenvolvimento (Bhandari, 1984; Dickinson, 1987) dentro de cada microsporângio. Canais citomíticos também foram observados em meiócitos das espécies aqui estudadas, bem como nos de *Adesmia latifolia* (Moço, 2002), *P. sativum* e *L. culinare* (Biddle, 1979) e são rompidos após a citocinese dos micrósporos. A ausência de canais citomíticos e a quantidade de calose reduzida parece ser uma característica da microsporogênese em gimnospermas (Biddle, 1979). O momento em que a calase, enzima produzida pelo tapete, fica ativa, é de fundamental importância para o desenvolvimento normal do grão de pólen e está intimamente relacionada com o pH no lóculo (Bhandari, 1984). A calose contribui para a formação da primexina e ainda deixa uma grande quantidade de glicose no lóculo após a sua degeneração (Bhandari, 1984).

A meiose é assincrônica entre os microsporângios de *Glycine max* (Prakash & Chan, 1976) e os de *Psophocarpus tetragonolobus* também podem ser encontrados em diferentes estádios de desenvolvimento (Lim & Prakash, 1994). Em *A. latifolia* verificou-se grande sincronia nos eventos da esporogênese numa mesma antera (Moço, 2002), enquanto nas espécies de *Aeschynomene* estudadas a sincronia ocorreu apenas em um mesmo microsporângio. Em Papilionoideae, a citocinese é simultânea e é considerada por Davis (1966) o tipo mais derivado, onde o isolamento dos micrósporos pelas paredes de calose ocorre centripetamente e as tétrades de micrósporos são geralmente tetraédricas, podendo também ser decussadas, isobilaterais ou em forma de T (Prakash, 1987). Por outro lado, a predominância da citocinese simultânea em angiospermas basais e em plantas terrestres em geral (incluindo as gimnospermas) analisadas em conjunto com dados filogenéticos moleculares e morfológicos, indica que este seja um caráter plesiomórfico em angiospermas (Furness *et al.*, 2002) e contraria o postulado por muitos autores, de que a citocinese sucessiva fosse o caráter plesiomórfico. A citocinese simultânea da CMM é considerada uma exceção, pois não forma fragmoplasto durante a divisão dos micrósporos (Scheres & Benfey, 1999). Os micrósporos individuais separam-se uns dos outros em Papilionoideae, Cesalpinoideae e em

poucas Mimosoideae (Prakash, 1987). O local de formação e o número das aberturas nos grãos de pólen de angiospermas parecem estar condicionados ao último ponto de contato persistente entre o citoplasma dos futuros micrósporos e a ser controlado pela orientação dos microtúbulos do fuso meiótico no final da citocinese, sendo sua distribuição na superfície do pólen muito regular (Furness *et al.*, 2002; Ressayre *et al.*, 2003).

4.2-Microgametogênese

O período de vacuolação dos micrósporos é tido como a fase de transição do micrósporo para o microgametófito, na qual o núcleo adquire uma posição parietal. Nessa fase ocorre um intenso acúmulo de reservas e o micrósporo aumenta em volume (Dickinson, 1987; Bittencourt Jr., 1995; Oliveira, 2001), indicando que as paredes do esporo não constituem barreiras efetivas para a passagem de pequenas moléculas nesta fase do desenvolvimento (Helsop-Harrison, 1968b). A ausência de um vacúolo volumoso durante a transição do micrósporo para o microgametófito, em *A. sensitiva*, não foi reportada em outras espécies. Em tratamentos com colchicina, que impede a formação dos microtúbulos, a célula do micrósporo diferencia-se diretamente em célula vegetativa, ou se divide simetricamente originando duas células vegetativas, o que vem mostrar a grande importância do fuso mitótico durante esta divisão (Scheres & Benfey, 1999). Para que ocorra a divisão assimétrica, na qual a célula vegetativa herda a maior parte do citoplasma do micrósporo, o fuso mitótico é também polarizado tendo uma extremidade grossa no pólo da célula generativa e fina, no pólo da célula vegetativa (Scheres & Benfey, 1999) sendo considerado assimétrico (Terasaka & Niitsu, 1990). A assimetria física das divisões assimétricas em plantas indica que a diferença no destino das células filhas é definido durante o processo de divisão celular, o que faz com que a divisão seja determinada por fatores intrínsecos (Scheres & Benfey, 1999). Na telófase, o fragmoplasto entre as duas células filhas tem um desenvolvimento curvo ao redor do núcleo generativo (Terasaka & Niitsu, 1990) o que conferiria o contorno lenticular desta célula.

A divisão mitótica é sincrônica em espécies em que este evento ocorre dentro das tétrades que ainda apresentam canais citomíticos (Knox, 1984), uma condição rara, diferente do observado nas espécies de *Aeschynomene*, onde a mitose ocorre nos micrósporos livres e é levemente assincrônica entre eles, condição também observada em *Tabebuia ochracea* (Bittencourt Jr., 1995) e em *Spondias mombin* (Oliveira, 2001). Quando as células vegetativa e generativa já estão formadas, o núcleo da célula generativa está envolto por microtúbulos que posicionam-se ao longo do eixo axial da célula, os quais são responsáveis pelo posterior

desenvolvimento de seu formato fusiforme (Terasaka & Niitsu, 1990). A célula generativa está envolta por uma membrana plasmática e uma parede celular que geralmente contém calose, como observado em *Aeschynomene*; estudos com microscopia eletrônica de transmissão não detectaram a presença de plasmodesmos entre essas células (Biddle, 1979). A parede de calose da célula generativa tem papel de isolá-la da célula vegetativa e a célula generativa contém uma quantidade muito limitada de organelas (Knox, 1984). A dupla fecundação pode ser direcionada devido às diferenças entre os gametas masculinos quanto ao tamanho e ao conteúdo de mitocôndrias e plastídios (Knox & Ducker, 1991; Knox *et al.*, 1993). Existem evidências de que a célula rica em plastídios é menor e fecunda a oosfera e a outra, maior, rica em mitocôndrias fecunda a célula média (Knox & Singh, 1987). No tubo polínico, os gametas não se separam (Knox *et al.*, 1993) e um deles ainda fica ligado ao núcleo da célula vegetativa, este conjunto conhecido como unidade germinativa masculina se comporta como um veículo para o transporte dos gametas (Knox & Singh, 1987). No presente trabalho a fecundação não foi analisada, embora a unidade germinativa masculina tenha sido observada em grãos de pólen que germinaram dentro da antera de *A. sensitiva*.

Após a mitose, o grão de pólen passa a armazenar substâncias de reserva (proteínas, carboidratos e lipídios) no citoplasma da célula vegetativa. No gênero em estudo verificou-se a abundância de proteínas e grãos de amido, parecendo, os últimos, serem a principal substância de reserva, embora os lipídios não tenham sido comprovados devido aos procedimentos técnicos de preparo das amostras. Grãos de pólen pequenos como os encontrados nas Papilionoideae (Ferguson & Skvarla, 1981) são geralmente colocados em um grupo, onde a principal reserva é de lipídios (Baker & Baker, 1979). Entretanto, reservas de amido foram reportadas em algumas espécies de Papilionoideae (Prakash, 1987, Moço, 2002) e agora também em *A. sensitiva* e *A. falcata*. Prakash & Chan (1976) observaram um citoplasma granular densamente corado e sem vacúolos proeminentes em soja. Moço (2002) detectou a presença de lipídios e amido no citoplasma da célula vegetativa de *A. latifolia*. Segundo Pacini (2000), os grãos de pólen que apresentam reservas predominantemente lipídicas apresentam como polissacarídeo de reserva frutanos ao invés de amido. Em *Aeschynomene*, apenas uma amilogênese foi observada, ela ocorre após a primeira mitose do grão de pólen e os grãos de amido são parcialmente degradados durante a maturação do pólen, podendo persistir no estágio maduro (Pacini, 1990). Esta degradação total ou parcial origina outros carboidratos que servem para o controle da pressão osmótica, prevenindo a perda e ganho de água (Pacini, 2000). A ausência da degradação dos amiloplastos nos estádios finais

de desenvolvimento e uma pequena quantidade de água indicam um baixo metabolismo celular (Pacini, 2000), o que parece ser o caso do gênero *Aeschynomene*.

4.3-Esporoderme

A esporoderme ocorre desde os grupos mais primitivos de plantas, embora algumas adaptações só ocorram nas angiospermas e tenham crucial importância para o desenvolvimento do grupo (Helsop-Harrison, 1976). Segundo o mesmo autor, a subdivisão em exina e intina como os dois domínios da parede do pólen são características comuns de todas as plantas. As terminologias morfológicas utilizadas para caracterizar a estratificação da parede do grão de pólen variam de acordo com a proposta de trabalho, sendo aqui utilizada aquela baseada em Erdtman (1969). A esporoderme é dividida em dois estratos principais, exina e intina. A exina apresenta-se estratificada em sexina e nexina, a primeira é ornamentada, composta de teto e báculas e a nexina é dividida em uma camada mais externa, a nexina-1 que une as báculas por sua base e por uma camada mais interna, a nexina-2. A intina, camada mais próxima da membrana plasmática, também apresenta subdivisões em intina-1, de composição pectínica e intina-2, de composição celulósica (Helsop-Harrison, 1968b), todas as camadas descritas puderam ser identificadas nas espécies em estudo utilizando-se diferentes reagentes.

A síntese da esporoderme e suas principais características estruturais são iniciadas ainda na tétrade de calose quando os micrósporos ainda não foram liberados (Dickinson, 1970; Helsop-Harrison, 1976). A primexina, o primeiro componente da esporoderme é produzida pelo micrósporo e secretada pela membrana plasmática, sendo composta de fibrilas de celulose, segundo Helsop-Harrison (1968a). Entretanto, Rowley & Dahl (1977) reportam sua natureza de mucopolissacarídes ou glicoproteínas, composição confirmada neste trabalho pela coloração arroxeada, com Azul de Toluidina, que evidencia a presença de ácidos pectínicos e pela coloração azul, com Coomassie Blue, evidenciando a presença de proteínas. A primexina é considerada um molde para a deposição de esporopolenina, análoga a um glicocálice que possuiria receptores específicos para a deposição deste composto (Rowley, 1973; Rowley & Dahl, 1977; Knox, 1984). A primexina apresenta barras atravessadas radialmente em sua estrutura, as probáculas (Helsop-Harrison, 1968a; 1968b; Dickinson & Helsop-Harrison, 1968). Esta camada tem como função, além de determinar o padrão inicial da exina, determinar o local das aberturas (Mariath *et al.*, 2003), no qual foi verificada a formação do oncus da exina, de forte coloração arroxeada (acúmulo de polissacarídeos), onde

não há deposição de esporopolenina. Alguns autores detectaram, sob a membrana plasmática, dictiossomas relacionados com a deposição das probáculas, que estavam ausentes sob os colpos, onde não será depositada a sexina (Dickinson, 1970; Santos, 2000).

A nexina-1 é depositada logo após a formação das probáculas (Helsop-Harrison, 1968b). Localiza-se abaixo da primexina e constitui a base das probáculas, sendo denominada camada basal (Dickinson & Helsop-Harrison, 1968; Dickinson, 1970), além de se estender sob os colpos (Helsop-Harrison, 1968a), onde é denominada membrana do colpo que foi verificada em *A. falcata*. Sexina e nexina-1 são estruturadas inicialmente pela primexina e posteriormente compostas por esporopolenina (Dickinson & Helsop-Harrison, 1968; Helsop-Harrison, 1968b), não apresentam lamelações na maturidade, sendo de composição homogênea (Dickinson & Helsop-Harrison, 1968; Dickinson, 1970).

Quando a sexina e a nexina-1 já foram depositadas ocorre a síntese da nexina-2, mais espessa nas adjacências dos colpos, concomitantemente à síntese da intina. O depósito de nexina-2 é normalmente iniciado ainda na fase de liberação dos micrósporos. Sua deposição é realizada pelo citoplasma do micrósporo, internamente à nexina-1 e inicia-se com uma estrutura lamelada que, posteriormente, recebe precursores de esporopolenina do próprio micrósporo (Dickinson & Helsop-Harrison, 1968). A aparência lamelada da nexina-2 persiste até sua maturidade (Dickinson & Helsop-Harrison, 1968; Helsop-Harrison, 1968b). Sua coloração é diferenciada da nexina-1 e da sexina (Helsop-Harrison, 1968b), principalmente devido às lamelações e à presença de compostos polissacarídicos (Mariath *et al.*, 2003), o que justifica a forte coloração azul da nexina-2 observada em *Aeschynomene* que a diferencia perfeitamente da nexina-1 e sexina fracamente coradas. Foi demonstrado que a deposição de lamelas pela membrana plasmática do esporo, as quais possuem a superfície para deposição dos precursores de esporopolenina, constituem o início da síntese de todas as camadas da exina e não apenas da nexina-2, embora esta mantenha o aspecto de lamelas (Dickinson & Helsop-Harrison, 1968; Dickinson & Helsop-Harrison, 1971, Santos, 2000).

O aumento do volume dos micrósporos recém-liberados da tétrade ocasiona um afinamento da primexina devido ao aumento da superfície, entretanto, os constituintes da sexina não sofrem tal efeito, pois um acréscimo de esporopolenina está ocorrendo continuamente (Helsop-Harrison, 1968b). O restante da matriz de primexina pode ser observado sob microscopia eletrônica como uma massa fibrilar frouxa fora da nexina-1 (Helsop-Harrison, 1968a; Dickinson & Helsop-Harrison, 1968) e foi observada em *Aeschynomene*, sob microscopia óptica, como uma fina camada linear de coloração rósea.

As análises sob microscopia de luz não detectaram a deposição de esporopolenina no estádio de tétrade, nem qualquer tipo de evidência de que probáculas tenham sido formadas nos micrósporos em *Aeschynomene*, mas assim que liberados no lóculo, os micrósporos têm o desenvolvimento da esporoderme acelerado. Os estádios de desenvolvimento das paredes dos micrósporos apresentam sincronia entre as espécies estudadas dos gêneros *Aeschynomene* e *Adesmia* (Moço, 2002). Segundo Helsop-Harrison (1976), a contribuição do tapete parece ser primordial neste processo através da deposição dos precursores de esporolenina na camada basal (nexina-1), báculas e teto, a nexina-2, por sua vez, recebe uma maior contribuição do protoplasma do micrósporo. O depósito de esporopolenina cessa após a primeira divisão mitótica do micrósporo (Knox, 1984), momento em que o tapete inicia o processo de degeneração e, a partir do qual, sexina e nexina-1 tornam-se praticamente transparentes em *Aeschynomene*, utilizando-se como corante o Azul de Toluidina. Em estádios anteriores a este, sexina e nexina-1 apresentam coloração verde clara. O mesmo tipo de resposta foi observado em *Lilium longiflorum* (Helsop-Harrison, 1968a). Esta mudança de reatividade nas camadas da exina pode ser explicada devido à exina responder mais positivamente aos testes para compostos fenólicos nos estádios iniciais de desenvolvimento, sugerindo que na maturidade a reatividade dos compostos fenólicos seja mascarada pelo acréscimo de outros componentes (Helsop-Harrison, 1968b). No presente trabalho, além da presença dos compostos fenólicos verificada com Azul de Toluidina, foi evidenciada a presença de proteínas com o teste de Coomassie Blue. A esporopolenina é um composto presente em toda a exina e oferece impermeabilidade e resistência à degradação físico-química e biológica do grão de pólen (Helsop-Harrison, 1968b). É conhecida como o polímero de parede mais resistente produzido pelas plantas, constituído por compostos fenólicos e lipídios produzidos tanto pela planta esporofítica via tapete, quanto pela gametofítica (Dickinson & Helsop-Harrison, 1968; Helsop-Harrison, 1968b). Lipídios não foram detectados na exina das espécies em estudo.

A maioria das pteridófitas possui exina com ausência de cavidades internas, estando presentes em algumas gimnospermas e em quase todas as angiospermas, devido à presença das báculas ou columelas com espaços entre si (Helsop-Harrison, 1976). Tais estruturas possuem grande importância no desenvolvimento das plantas com flores (Helsop-Harrison, 1976), por exemplo, devido às substâncias que podem ser impregnadas nas cavidades. As câmaras da exina, formadas pelos espaços entre as báculas, que inicialmente são ocupados por restos de primexina em *Aeschynomene*, têm função primordial de armazenamento de materiais provindos do tapete, incluindo vários tipos de proteínas (Helsop-Harrison, 1976).

Em *Aeschynomene*, desde a liberação dos esporos das tétrades, foi observado o acúmulo crescente de proteínas na sexina. As proteínas incorporadas à sexina são consideradas substâncias de reconhecimento e controlam o cruzamento intra e interespecífico, através do sistema de auto-incompatibilidade esporofítico (Helsop-Harrison *et al.* 1973, 1975). O sistema de auto-incompatibilidade esporofítico age assim que o grão de pólen entra em contato com o estigma, devido à liberação das proteínas esporofíticas (Helsop-Harrison *et al.* 1973; Helsop-Harrison *et al.* 1975). O sistema de auto-incompatibilidade gametofítico é mais retardado que o esporofítico, pois só ocorre após a germinação do pólen e crescimento do tubo polínico, permitindo a interação do estigma com as proteínas acumuladas na intina (Helsop-Harrison *et al.* 1973; Helsop-Harrison *et al.* 1975).

Em *L. longiflorum* verificou-se a presença de uma camada de intina mais compacta próximo à membrana plasmática e frouxa externamente (Dickinson & Helsop-Harrison, 1971), indicando as camadas celulósica e pectica, respectivamente. Em *Aeschynomene*, a intina-1 reagiu positivamente para o Alcian Blue, confirmando a presença de pectinas, esta camada forma o oncus da intina em forma de lente, como observado em diversas espécies de angiospermas (Bittencourt Jr., 1995; Oliveira, 2001; Moço, 2002). Foi verificada uma estratificação no oncus da intina, tendo coloração mais clara na região interna, e rosa forte na mais externa quando coradas com Azul de Toluidina. Segundo Helsop-Harrison & Helsop-Harrison (1991), esta estratificação da intina é muito desenvolvida na região das aberturas, mas muito reduzida nas outras regiões. A intina-2, de composição celulósica, foi aqui evidenciada pela reação com Calcofluor White, ficando translúcida com o Azul de Toluidina e reagindo positivamente à presença de proteínas com Coomassie Blue, como também foi verificado em *S. mombin* (Oliveira, 2001). Segundo Helsop-Harrison (1976), a intina recebe frações protéicas móveis derivadas do microgametófito que se concentram nas regiões das aberturas, e são liberadas durante a germinação do grão de pólen. Estas proteínas são responsáveis pela penetração do tubo polínico no estigma e digestão de nutrientes, participam do processo de reconhecimento inter e intraespecífico do grão de pólen, coordenando o sistema de auto-incompatibilidade gametofítico (Knox & Helsop-Harrison, 1970; Knox, 1971; Helsop-Harrison *et al.* 1973; Helsop-Harrison *et al.*, 1975; Helsop-Harrison, 1976; Helsop-Harrison & Helsop-Harrison, 1991).

O estabelecimento das aberturas do grão de pólen é feito impedindo-se a deposição de exina em determinados pontos. Em *L. longiflorum* observou-se uma placa de retículo endoplasmático encontrada regularmente sob as áreas destinadas a serem o colpo do grão de pólen suprimindo o aparecimento da sexina, entretanto, as lamelas que iniciam a formação da

nexina-1 estão presentes nesta região (Dickinson, 1970), provavelmente o que leva à formação da membrana do colpo observada em *Aeschynomene*. Segundo Knox (1984), uma porção péctica da primexina (oncus da exina), confirmada pela coloração arroxeada com Azul de Toluidina, deposita-se em três posições equatoriais e impede a deposição da sexina, exceto pela ocorrência do opérculo que é representado por uma fina camada. Neste trabalho, o opérculo foi observado apenas em *A. sensitiva*. Observa-se a formação do oncus da intina sob os colpos – porção mais espessa da intina péctica identificada pela intensa coloração rósea – que impede a deposição da nexina-2. A região de surgimento das aberturas, onde não é depositada a exina, é determinada pela posição dos micrósporos nas tétrades e pelo contato uns com os outros (Ressayre *et al.*, 2003).

Tanto a intina quanto a exina são altamente adaptadas para a regulação da perda ou ganho de água pelo grão de pólen. O ganho de água pelo microgametófito é facilitado por uma leve extrusão do oncus da intina nas aberturas, observada em ambas espécies de *Aeschynomene*, ainda no lóculo da antera. Quando um opérculo está presente ele é elevado pela extrusão da intina e pode voltar à sua posição inicial caso uma nova desidratação ocorra, o que pode acontecer em *A. sensitiva*, que apresenta opérculo e extrusão do oncus da intina ainda na antera. Segundo Helsop-Harrison (1976), vários ciclos de hidratação e desidratação podem ocorrer sem prejudicar a capacidade de germinação dos grãos de pólen.

4.4-Estratos parietais

O processo celular que regula a diferenciação celular da antera, estabelece padrões de tecido fazendo-a passar de um programa de histodiferenciação (fase 1) para um programa de degeneração celular e deiscência (fase 2) (Goldberg *et al.*, 1993). O processo de deiscência começa após a formação das tétrades e é, temporariamente, coordenado ao processo de diferenciação do grão de pólen (Goldberg *et al.*, 1993), como verificado em *Aeschynomene*. No presente trabalho verificou-se a abertura da antera precedida pela fusão dos lóculos de uma mesma teca que acontece pelo rompimento do septo. Segundo Pacini (2000), este processo aumenta a área entre os grãos de pólen, criando mais espaço para o fluido locular que se torna rarefeito, iniciando o processo de desidratação dos grãos de pólen. Em *Rhynchosia capitata*, a epiderme e o endotécio persistem após a maturidade (Oomman, 1971), bem como nas espécies aqui estudadas.

4.4.1-Epiderme

As células epidérmicas que cobrem a parede dos esporângios são persistentes em Leguminosae (Prakash, 1987, Moço, 2002), como observado em *Aeschynomene*, bem como em diversas famílias de angiospermas (Davis, 1966). Elas podem tornar-se distendidas, comprimidas, dispersas ou completamente separadas devido ao aumento em diâmetro dos microsporângios (Bhandari, 1984), sendo dispersas no gênero em estudo. Nas células epidérmicas de *Aeschynomene*, foram observadas uma espessa cutícula e a presença de compostos fenólicos, como já reportado para outros membros da família (Prakash, 1987). Os sinais de degeneração como a picnose nuclear surgiram apenas durante a deiscência, mostrando a importância da epiderme na proteção dos esporos e na abertura da antera, considerando a presença do estômio. Em *P. sativum*, a maioria das células epidérmicas não possui núcleo e a senescência parece ocorrer primeiro nesta espécie que em *L. culinare*, onde a maior parte das células epidérmicas é nucleada (Biddle, 1979).

4.4.2-Endotécio

O endotécio é uma camada subepidérmica restrita à porção protuberante do esporângio que atua na deiscência da antera (Bhandari, 1984). É composto por células geralmente mortas na maturidade e podem ter espessamentos lignificados (Pacini, 2000), verificados no presente trabalho. Nas famílias mais derivadas apresenta-se unisseriado (Bhandari, 1984), como foi visto nas Papilionoideae aqui estudadas. Os espessamentos fibrosos do endotécio apresentam constituição primariamente celulósica em *P. sativum* e *L. culinare*, acrescida de lignina em *L. culinare* e surgindo na fase de micrósporo vacuolado (Biddle, 1979). Geralmente, a diferenciação do endotécio corresponde à degeneração do tapete (Pacini, 2000), como observado em *G. max* (Prakash & Chan, 1976), bem como em *A. falcata* e *A. sensitiva*.

A distribuição dos padrões de espessamento de parede nas células do endotécio, na família Leguminosae, parece caracterizar grupos taxonômicos e corrobora a subdivisão em subfamílias (Moço, 2002), embora as placas basais tenham se desenvolvido mais de uma vez juntamente com o tipo palmado de endotécio nas Papilionoideae (Manning & Stirton, 1994). O tipo palmado, que compreende depósitos mais espessos nas paredes periclinais internas que derivam braços radiais de espessamento nas paredes anticlinais, foi descrito para táxons derivados de Papilionoideae (Manning & Stirton, 1994; Moço, 2002). As células do endotécio de *A. falcata* e *A. sensitiva* são desse tipo, entretanto, na primeira, as células são mais baixas e não apresentam uma placa basal completamente fusionada tendo as bandas fibrosas

justapostas, enquanto na segunda, as células são mais altas e apesar de mais estreita, a placa basal é efetivamente fusionada, como o observado em *A. latifolia* (Moço, 2002).

4.4.3-Camadas médias

As angiospermas primitivas apresentavam anteras com um grande número de camadas médias e ocasionalmente um tapete bisseriado; nas famílias mais derivadas, ao contrário, a parede da antera, ou do esporângio, é fina, principalmente por apresentar apenas uma camada média (Bhandari, 1984). Papilionoideae e Mimosoideae apresentam uma ou duas camadas parietais médias e a maioria das Caesalpinioideae apresentam três camadas (Prakash, 1987). Observou-se apenas uma camada média para *Zornia diphylla* (Deshpande & Bhasin, 1976), *P. sativum* e *L. culinare* (Biddle, 1979), cinco espécies de *Arachis* (Bharathi & Murty, 1984), *Galactia longifolia* (Ashrafunnisa & Pullaiah, 1994) e *Teramnus labialis* (Ashrafunnisa & Pullaiah, 1999); duas camadas para *Milletia ovalifolia* (Pal, 1960), *G. max* (Prakash & Chan, 1976), *A. latifolia* (Moço, 2002), *A. falcata* e *A. sensitiva* (neste trabalho), e, raramente, três camadas em *P. tetraganobus* (Lim & Prakash, 1994). No tipo de desenvolvimento Dicotiledôneo dos microsporângios, normalmente ocorrem duas camadas médias (Davis, 1966), como aqui verificado para as espécies de *Aeschynomene*.

Aparentemente, em todos os casos, as camadas médias são efêmeras não estando mais presentes por ocasião da deiscência, devido à incapacidade de se dividir anticlinalmente (Davis, 1966). Nas espécies aqui estudadas a camada média interna permanece estreita desde a sua formação e é rapidamente colapsada, já as células da camada média externa crescem em altura durante a gametogênese, tornando-se intercaladas com as células do endotécio. As paredes dessas células ainda são bem visualizadas quando os septos já foram degenerados e são totalmente colapsadas apenas muito próximo à deiscência da antera, o que demonstra uma importância que pode estar relacionada à nutrição dos grãos de pólen, num primeiro momento e com a deiscência, posteriormente.

4.4.4-Tapete

O tapete se diferenciou antes do endotécio na evolução das plantas, tendo sido evidenciado em pteridófitas, enquanto que a presença do endotécio tem registro apenas nas angiospermas (Pacini *et al.*, 1985). O tapete é a camada parietal mais interna do esporângio que circunda o tecido esporogênico e devido a esta posição estratégica possui uma grande importância fisiológica. Dentre as diversas funções do tapete, a nutrição dos micrósporos e dos grãos de pólen é a mais importante e ocorre em todas as plantas terrestres (Pacini *et al.*,

1985). As demais funções do tapete são: *produção do fluido locular, secreção de calase, liberação de polissacarídeos no lóculo, formação dos precursores da esporopolenina, formação dos cordões de vicina, formação da membrana tapetal, formação de orbículos, formação de proteínas esporofíticas, formação do “pollenkitt”* e formação de trifino (Pacini *et al.*, 1985; Pacini, 1990). Nem todas estas funções estão presentes em uma mesma espécie e aquelas que provavelmente ocorrem em *Aeschynomene* foram destacadas em itálico.

O termo “pollenkitt” é aplicado a várias substâncias responsáveis por conferir a característica de aderência dos grãos de pólen. Essas substâncias são originadas da dissolução final do protoplasto das células tapetais (Hesse, 1981; Pacini & Franchi, 1991). Elas compreendem geralmente lipídios e carotenóides e tem a função de atrair insetos, proteger contra raios UV e aderir ao corpo do polinizador (Bhandari, 1984; Pacini & Franchi, 1993). Os lipídios que foram verificados no lóculo da antera de *Aeschynomene* podem estar associados à presença de “pollenkitt” no grão de pólen maduro. Segundo Pacini & Franchi (1993), orbículos geralmente ocorrem em espécies anemófilas e “pollenkitt” em entomófilas, podendo ocorrer concomitantemente em famílias que perderam a especialização em alguma síndrome de polinização. Apenas a presença de “pollenkitt” foi verificada em *A. latifolia* (Moço, 2002), como também foi observado nas espécies aqui estudadas de *Aeschynomene*. *P. sativum* e *L. culinare* também não apresentam orbículos (Biddle, 1979).

O tapete secretor ou glandular predomina dentre as dicotiledôneas (Pacini *et al.*, 1985) e na maioria dos táxons de Leguminosae (Prakash, 1987), exceto as Mimosoideae (Pacini, 1990), sendo considerado um tipo mais primitivo do qual todos os outros se originaram (Pacini *et al.*, 1985). Geralmente em tapetes secretores, as células mantêm sua individualidade e posição e ocorrem em anteras grandes com muitos grãos de pólen, enquanto o plasmodial ocorre em anteras pequenas (Pacini *et al.*, 1985). No tapete do tipo secretor, as células são polarizadas, os nutrientes penetram pelo pólo de absorção (parede periclinal externa) e os produtos do tapete dirigem-se ao lóculo pelo pólo de secreção (parede periclinal interna) (Pacini, 1997) e realizam uma nutrição indireta do pólen através do fluido locular (Pacini *et al.*, 1985). Um contato direto entre as células tapetais e grãos de pólen é dificultado em anteras grandes, mas existe uma difusão de nutrientes para as partes internas do lóculo e uma nutrição uniforme deve ocorrer, devido a uma possível movimentação dos grãos dentro do lóculo (Pacini *et al.*, 1985; Pacini, 1990; Pacini & Franchi, 1991). Em *A. falcata*, observou-se uma forte sinuosidade das paredes periclinais internas do tapete e os grãos de pólen sendo envolvidos e provavelmente movimentando-se na adjacência destas células, o que promoveria uma nutrição mais efetiva. A composição do líquido locular muda de acordo com o estágio de

desenvolvimento e este permanece após a degeneração das células tapetais até que seja reabsorvido ou evaporado para a desidratação do esporângio, antes da antese (Pacini, 1990; Pacini & Franchi, 1991).

As células tapetais têm pouca influência sobre os meiócitos, enquanto esses estão envoltos pelas paredes de calose durante a meiose (Pacini *et al.*, 1985). Neste estágio, as células do tapete aumentam em volume e seu conteúdo citoplasmático fica visivelmente mais rico, com a produção de diferentes compostos que serão liberados nos lóculos das anteras (Bhandari, 1984). Na maioria das angiospermas que possuem tapete secretor, as paredes celulares são degeneradas no estágio de tétrade para que a liberação das substâncias tapetais seja facilitada (Biddle, 1979; Pacini *et al.*, 1985, Pacini, 1997). Em algumas Papilionoideae como *Desmodium glutinosum*, *Desmodium illinoense* (Buss *et al.*, 1969) e *U. europaeus* (Misset & Gourret, 1984), as paredes tapetais se degeneraram no estágio de micrósporos livres. Tapetes secretores com paredes persistentes ocorrem apenas em grupos de plantas terrestres primitivos e grupos que apresentam políades, como por exemplo, as Mimosoideae (Pacini & Franchi, 1991). Em *Aeschynomene*, uma parede tapetal celulósica ficou ausente desde a prófase I da meiose até a primeira divisão mitótica do microgametófito, fase em que o tapete apresenta-se mais ativo, nesse estágio, a parede celular provavelmente tem composição predominantemente pectínica, o que permitiria a passagem dos diversos compostos para o lóculo mais facilmente que uma parede celulósica. Após este estágio, para nossa surpresa, quando citoplasma e núcleo já estavam quase totalmente degenerados, uma reação positiva para a presença de fibrilas de celulose foi observada nas paredes tapetais. A parede celulósica persistiu até o colapso total das células tapetais, correspondendo ao momento em que a célula generativa já estava englobada pelo citoplasma da vegetativa. Em *A. latifolia* (Moço, 2002), também se observou a presença de parede celulósica após a degeneração do citoplasma e durante o colapso total destas células. Essa é uma característica surpreendente, pois as revisões no assunto evidenciam a presença de uma parede predominantemente celulósica antes e durante a meiose (Pacini *et al.*, 1985, Pacini, 1990). Entretanto, segundo Pacini (1990), a persistência ou outros tipos de parede celular e o modo de degeneração podem variar, desse modo, as revelações sobre as paredes tapetais de *Aeschynomene* podem representar um outro tipo de comportamento entre as angiospermas ainda não reportado anteriormente, sendo necessárias investigações mais aprofundadas a este respeito.

Independente da origem e do tipo de tapete é evidente que este tecido mantém um balanço muito delicado com a diferenciação do tecido esporogênico. Qualquer fator que perturbe esta harmonia resulta num desenvolvimento assíncronico e na degeneração do pólen

(Bhandari, 1984; Chapman, 1987). O mau funcionamento e a hipertrofia das células tapetais são alguns fatores que podem causar o aborto dos grãos de pólen (Bhandari, 1984). Em *A. sensitiva* foi verificada a presença de células tapetais hipertrofiadas em algumas anteras, porém é desconhecido se este fator inviabilizou os grãos de pólen. Segundo Bhandari (1984), existem plasmodesmos que conectam as células tapetais entre si e com o tecido esporogênico, entretanto tais conexões não foram observadas em *A. latifolia* (Moço, 2002) e *Aeschynomene*. Canais citomíticos foram detectados entre as células do tapete de *P. sativum* e *L. culinare*, mas não foram observados em *A. latifolia* (Moço, 2002), nem em *Aeschynomene*.

O tapete apresenta diversas particularidades e, muitas delas, parecem ter grande valor taxonômico para a família (Moço, 2002). O tapete pode tornar-se irregularmente bisseriado em *M. ovalifolia* (Pal, 1960), *Parkinsonia aculeata* (Nair & Kahate, 1961) e *Acacia paradoxa* (Fitzgerald *et al.*, 1993). O tapete bisseriado em *R. capitata* diferencia-se apenas em algumas regiões (Oomman, 1971) e divisões periclinais ocasionais foram observadas em *P. sativum* e *L. culinare* (Biddle, 1979), semelhante ao que ocorre em *A. falcata*. Segundo Davis (1966), o tapete consiste, fundamentalmente, de uma camada e as divisões periclinais que são ocasionalmente reportadas, resultando num tapete bisseriado, não constituem um caráter consistente para nenhum táxon e parecem ser uma expressão latente da potencialidade das células parietais em dividirem-se periclinalmente. Em *Aeschynomene*, logo após o estabelecimento do tapete ao redor do tecido esporogênico, algumas de suas células dividem-se assincronicamente, mas, após o estágio pré-meiótico das CMM, as células tapetais apenas aumentam seu volume e não mais se dividem. Essas características são comuns nos tapetes secretores (Iijima, 1962), mas provavelmente não são o suficiente para se estabelecer algum tipo de classificação como sugere este autor.

Cooper (1933) estabelece três tipos de tapete quanto ao comportamento do núcleo: (a) o núcleo não se divide, (b) o núcleo se divide uma vez e as células tornam-se binucleadas, (c) o núcleo se divide mais de uma vez e a célula madura pode ser uni, bi ou multinucleada. As células tapetais são uninucleadas em Papilionoideae e Mimosoideae (Davis, 1966; Buss & Lersten, 1975; Biddle, 1979; Johri *et al.*, 1992; Ashrafunnisa & Pullaiah, 1999), como observado para as espécies de *Aeschynomene* aqui estudadas e para *A. latifolia* (Moço, 2002), caráter considerado derivado, uma vez que, em Caesalpinioideae ocorrem células tapetais com dois ou mais núcleos (Buss & Lersten, 1975; Chapman, 1987). Entretanto, Latter (1926) encontrou ocasionalmente células binucleadas em *Lathyrus odoratus*; Cooper (1938) em *P. sativum*; Lakshmi *et al.* (1987) em *Macroptelium atropurpureum*; Prakash & Chan (1976) observaram células com um ou dois núcleos em *G. max*; Bharathi & Murty (1984)

encontraram células uni, bi ou tetranucleadas em algumas espécies de *Arachis*, com os núcleos geralmente se fusionando e formando um núcleo poliplóide e Mitchell (1975) comprova a replicação de DNA e aumento do volume nuclear em *Vicia faba*. Embora os trabalhos de Latter (1926) e Cooper (1938) tenham sido criticados por Buss & Lersten (1975) e Biddle (1979), os demais aparentemente são válidos para este caráter.

A presença de cristais de oxalato de cálcio nas células do tapete é freqüente em Papilionoideae e Cesalpinioideae, sendo reportada para *Aeschynomene indica*, na qual parecem ocorrer em vacúolos (Buss & Lersten, 1972) e não verificada em *Aeschynomene americana*, *Aeschynomene aspera* e *Aeschynomene virginica* (Buss & Lersten, 1975), bem como em *A. falcata* e *A. sensitiva*. Em espécies do gênero *Adesmia* também não foi verificada a presença de cristais nestas células (Buss & Lersten, 1972; 1975; Moço, 2002).

4.5-Grão de pólen maduro

A maioria das espécies de angiospermas libera o pólen no estágio bicelular (Knox, 1984). A dispersão de ambos tipos de pólen, bicelular e tricolular, ocorre raramente como uma característica constante em um mesmo gênero (Brewbaker, 1967). A maioria das leguminosas apresenta o pólen bicelular durante a sua dispersão, o pólen tricolular foi citado por Brewbaker (1967) no gênero *Calliandra* (Mimosoideae) e, por Pal (1960), como uma anormalidade, em *M. ovalifolia*, também podendo ser interpretado como anormalidade quando encontrado na antera de *A. sensitiva*. A presença de grãos tricolulares e sua germinação dentro do lóculo em *A. sensitiva* podem estar relacionadas a um atraso na desidratação da antera (Pacini, 2000) facilmente justificável devido a esta espécie ser característica de ambientes alagados. Os raros estômatos encontrados nas anteras podem estar relacionados à sua desidratação que pode ser causada por evaporação ou reabsorção do fluido locular (Pacini, 2000). É desconhecido se estes eventos realmente ocorreram devido a um desequilíbrio osmótico no fluido locular ou se são comuns em espécies auto-compatíveis, sabendo-se que a tribo Aeschynomeneae é considerada, predominantemente, auto-compatível (Kalin Arroyo, 1981).

Geralmente os grãos de pólen são dispersos de forma agrupada devido às substâncias viscosas produzidas pelo tapete, facilitando sua aderência aos insetos e assim aumentando a eficiência da polinização (Pacini & Franchi, 1993, Pacini, 2000). O tipo de sexina encontrada em *Aeschynomene*, reticulada e semitectada, corresponde a um tipo de aderência intermediária determinada pela quantidade e tipo de distribuição do “pollenkitt” (Hesse, 1981). Em

Aeschynomene foram observadas massas de pólen nos estigmas de flores polinizadas, podendo indicar a presença de “pollenkitt” em quantidade suficiente para esta função (Capítulo II, Figuras 16F, G). Em Papilionoideae, pode ocorrer de a antera ser aberta enquanto a flor ainda está fechada e, após a abertura espontânea ou por um inseto, o pólen ser disperso no ar aderindo-se ao corpo do polinizador (Pacini, 2000). Espécies com grãos de pólen com sexina reticulada de forma simples são reconhecidamente polinizadas por pequenos insetos, o que ocorre com as Papilionoideae altamente especializadas à polinização por abelhas (Ferguson & Skvarla, 1982).

O tipo básico dos grãos de pólen nas Leguminosas é o simples, tricolporado, com uma endoabertura circular e uma exina semitectada com estrutura columelar (Guinet, 1981; Guinet & Ferguson, 1989). No gênero *Aeschynomene*, os grãos de pólen são tricolporados, com colpos longos, poros usualmente elípticos, exina reticulada, tectada, ectexina mais espessa que a endexina e columelas diminutas (Ohashi, 1971). Em *A. indica* e *A. virginica* os colpos são estreitos, os poros elípticos e os grãos de pólen prolatos a subprolotos - com o eixo polar maior que o equatorial (Ohashi, 1971). Foi observada, no gênero *Aeschynomene*, uma duplicação do número de endoaberturas dentro de cada um dos três colpos equatoriais e na tribo Aeschynomeneae, a presença de fusão dos colpos (Guinet & Ferguson, 1989; Ohe & Dustmann, 1996), eventos não observados nas espécies aqui estudadas. *A. americana* possui os grãos sincolporados, com endoaberturas lolongadas, presença de opérculo e sexina reticulada (Ohe & Dustmann, 1996). Em *A. sensitiva*, são encontradas margens dos colpos muito lisas, sem ornamentação e, segundo Ferguson & Skvarla (1981), diferenças nos padrões esculturais entre as áreas polares e as margens dos colpos são consideradas especializações. Uma deposição esparsa de sexina sem ornamentação é verificada nos colpos de *A. falcata* e o opérculo está presente em *A. sensitiva*, mas não representa uma estrutura tão desenvolvida como em *Aeschynomene schimperii* (Ferguson & Skvarla, 1981) e *A. americana* (Ohe & Dustmann, 1996).

Os grãos de pólen das espécies de *Aeschynomene* aqui investigadas são relativamente pequenos, variando de 10µm a 20µm de diâmetro, semelhante ao encontrado para *A. indica* - 14µm e *A. virginica* - 16,2µm (Ohashi, 1971) e para *A. americana* - 15µm -17µm (Ohe & Dustmann, 1996), uma vez que a média para Papilionoideae é de 50µm (Ferguson & Skvarla, 1981). Pire (1974) avaliou os caracteres palinológicos dos gêneros da tribo Hedysareae e, dentre eles, 16 espécies de *Aeschynomene*. Encontrou algumas características comuns dentro do gênero como: a exina reticulada e fina e todos grãos tricolporados. Ele subdivide o gênero em dois grupos de acordo com o tamanho dos grãos de pólen, o primeiro, com grãos menores

inclui *A. sensitiva* com grãos prolato-esferoidais, endoabertura lalongada e colpo com opérculo, que difere do presente trabalho apenas no tipo de abertura, que neste caso é esferoidal. O segundo, com grãos maiores inclui *A. falcata* com grãos prolato-esferoidais e endoabertura lalongada, que neste trabalho mostrou-se esferoidal. Entretanto, esta subdivisão entre grãos maiores e menores não corresponde à divisão das duas secções do gênero. No presente trabalho também se verificou que os grãos de pólen de *A. falcata* são maiores que os de *A. sensitiva*, cerca de 5µm. Diferentemente das demais de espécies de *Aeschynomene* já analisadas, *A. americana* apresenta seu eixo polar menor que o equatorial (Ohe & Dustmann, 1996). Pire (1974) ainda observa que a morfologia do pólen das espécies de *Adesmia* é muito similar a maioria das *Aeschynomeninae*, o que corrobora com o trabalho de Lavin *et al.* (2001). Moço (2002) reforça esta observação detectando grãos tricolporados, endoabertura circular, opérculo presente e sexina reticulada em *A. latifolia*.

Guinet (1981) e Ferguson & Skvarla (1981), consideram *Aeschynomeneae* dentro de um grupo em *Papilionoideae*, onde a tendência evolutiva consiste em uma redução da nexina-2 ou endexina, nexina-1 persistente e bem desenvolvida, especialização ou perda de abertura lalongada e a ocorrência de uma membrana do colpo ou opérculo, embora a espécie de *Aeschynomene* utilizada por estes autores como exemplo possua nexina-2 espessa, como *A. falcata*. A membrana do colpo foi verificada em *A. falcata* e o opérculo apenas em *A. sensitiva*, característica marcante que difere as duas espécies.

5 – Referências Bibliográficas

- ASHRAFUNNISA & PULLAIAH, T. 1994. Embryology of *Galactia* (Fabaceae). **Phytomorphology**, v. 44, n. 3, 4, p. 253-260.
- ASHRAFUNNISA & PULLAIAH, T. 1999. Embryology of *Teramnus labialis* (Fabaceae). **Phytomorphology**, v. 49, n. 2, p. 197-202.
- BAKER, H. G. & BAKER, I. 1979. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, v. 66, n. 5, p. 591-600.
- BHANDARI, N. N. 1984. The microsporangium. In: **Embryology of Angiosperms**. (ed.) B. M. Johri, Springer-Verlag, Berlin, p. 53-121.
- BHARATHI, M. & MURTY, U. R. 1984. Comparative embryology of wild and cultivated species of *Arachis*. **Phytomorphology**, v. 34, p. 48-56.
- BIDDLE, J. A. 1979. Anther and pollen development in garden pea and cultivated lentil. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1883-1900.
- BITTENCOURT JR., N. S. 1995. Ontogenia da antera e do rudimento seminal de *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae). **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 112p.
- BREWBAKER, J. L. 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. **American Journal of Botany**, v. 54, n. 9, p. 1069-1083.
- BUSS, P. A. & LERSTEN, N. R. 1972. Crystals in tapetal cells of the Leguminosae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 65, p. 81-85.
- BUSS, P. A. & LERSTEN, N. R. 1975. Survey of tapetal nuclear number as a taxonomic character in Leguminosae. **Botanical Gazette**, v. 136, n. 4, p. 388-395.
- BUSS, P. A.; GALEN, D. F. & LERSTEN, N. R. 1969. Pollen and tapetum development in *Desmodium glutinosum* and *D. illinoense* (Papilionoideae: Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 56, n. 10, p. 1203-1208.

- CHAPMAN, G. P. 1987. The tapetum. **International review of Cytology**, v. 107, p. 111-125.
- COOPER, D. C. 1933. Nuclear divisions in the tapetal cells of certain angiosperms. **American Journal of Botany**, v. 20, p. 358-364.
- COOPER, D. C. 1938. Cytological investigations of *Pisum sativum*. **Botanical Gazette**, v. 99, p. 584-591.
- COSTA, M. E; SAMPAIO, D. S; PAOLI, A. A. S. & LEITE, S. C. A. L. 2004. Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 395-406.
- DAVIS, O.L. 1966. **Systematic Embryology of the Angiosperms**. John Wiley & Sons, Inc. New York, London, Sidney.
- DESHPANDE, P.K. & BHASIN, R.K. 1976. A contribution to the life history of *Zornia diphylla* Pers. **J. Indian bot. Soc.**, v. 55, p.115-124.
- DICKINSON, H. G. 1970. Ultrastructural aspects of primexine formation in the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. **Cytobiologie**, v. 1, p. 437-449.
- DICKINSON, H. G. 1987. The physiology and biochemistry of meiosis in the anther. **International Review of Cytology**, v. 107, p. 79-109.
- DICKINSON, H. G. & HELSOP-HARRISON, J. 1968. Common mode of deposition for the sporopollenin of sexine and nexine. **Nature**, v. 220, p. 926-927.
- DICKINSON, H. G. & HELSOP-HARRISON, J. 1971. The mode of growth of the inner layer of the pollen-grain exine in *Lilium*. **Cytobios**, v. 4, p. 233-243.
- ERDTMAN, G. 1969. **Handbook of Palynology: morphology, taxonomy and ecology**. Munksgaard, Scandianavian University Books, 486p.
- FEDER, N. & O'BRIEN, T.P. 1968. Plant microtechnique; some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, p.123-142.

- FERGUSON, I. K. & SKVARLA, J. J. 1981. The pollen morphology of the subfamily Papilionoideae (Leguminosae). In: **Advances in Legume Systematics 2** (eds.) R. M. Polhill & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 859-896.
- FERGUSON, I. K. & SKVARLA, J. J. 1982. Pollen morphology in relation to pollinators in Papilionoideae (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 84, p. 183-193.
- FITZGERALD, M. A.; CALDER, D. M. & KNOX, R. B. 1993. Character of development and initiation of cohesion between compound pollen grains of *Acacia paradoxa*. **Annals of Botany**, v. 71, p. 51-59.
- FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J & SAMPSON, F. B. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, v. 163, n. 2, p. 235-260.
- GERRITS, P. O. & SMID, L. 1983. A new, less toxic polymerisation system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v. 132, p. 81-85.
- GERSTERBERGER, P. & LEINS, P. 1978. Rasterelektronmikroskopische Untersuchungen na Blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae). **Ber. Deutsch Bot. Ges.**, v. 91, p. 381-387.
- GOLDBERG, R. B.; BEALS, T. P. & SANDERS, P. M. 1993. Anther development: basic principles and practical applications. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1217-1229.
- GUINET, Ph. 1981. Comparative account of pollen characters in the Leguminosae. In: **Advances in Legume Systematics 2** (eds.) R. M. Polhill & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 789-799.
- GUINET, Ph. & FERGUSON, I. K. 1989. Structure, evolution and biology of pollen in Leguminosae. In: **Advances in Legume Biology Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.** (eds.) C. H. Stirton & J. L. Zarucchi, v. 29, p. 77-103.
- HELSOP-HARRISON, J. 1968a. Wall development within the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 46, p. 1185-1192.
- HELSOP-HARRISON, J. 1968b. Pollen wall development. **Science**, v. 161, p. 230-237.

- HELSOP-HARRISON, J. 1976. The adaptative significance of the exine. In: **The Evolutionary Significance of the Exine.** (eds.) I. K. Ferguson & Miller. Linnean Society Symposium 1, Academic press, London, p. 27-37.
- HELSOP-HARRISON, J. & HELSOP-HARRISON, Y. 1991. Structural and functional variation in pollen intines. In: **Pollen and Spores.** (eds.) S. Blackmore & S. H. Barnes, Systematics Association Special Volume 44, p. 331-343. Clarendon press, Oxford.
- HELSOP-HARRISON, J.; HELSOP-HARRISON, Y.; KNOX, R. B.; & HOWLETT, B. 1973. Pollen wall proteins: “gametophytic” and “sporophytic”” fractions in the pollen walls of the Malvaceae. **Annals of Botany**, v. 37, p. 403-412.
- HELSOP-HARRISON, J. F R. S.; KNOX, R. B.; HELSOP-HARRISON, Y. & MATTSSON, O. 1975. Pollen wall proteins: emission and role in incompatibility responses. In: **The Biology of the Male Gamete.** (eds.) J. G. Duckett & P. A. Racey, Biological Journal of the Linnean Society, v. 7 (supl. 1), p. 189-201.
- HESSE, M. 1981. The fine structure of exine in relation to the stickiness of angiosperm pollen. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 35, p. 81-92.
- IJJIMA, M. 1962. A comparative study on tapetum. **Cytologia**, v. 27, p. 375-385.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant microtechnique.** Mc Graw-Hill Book Company, New York.
- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B. & SRIVASTAVA, P. S. 1992. **Comparative Embryology of Angiosperms.** Vol.1. (Springer-Verlag, Berlin).
- KALIN ARROYO, M. T. 1981. Breeding Systems and Pollination Biology in Leguminosae. In: **Advances in Legume Systematics 2** (eds.) R. M. Polhill, & P. H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 723-769.
- KNOX, R. B. 1971. Pollen wall proteins: localization, enzymic and antigenic activity during development in *Gladiolus* (Iridaceae). **Journal of Cell Science**, v. 9, p. 209-237.
- KNOX, R. B. 1984. The pollen grain. In: **Embryology of Angiosperms.** (ed.) B. M. Johri, Springer-Verlag, Berlin, p. 197-271.

- KNOX, R. B. & HELSOP-HARRISON, J. 1970. Pollen wall proteins: localization and enzymatic activity. **Journal of Cell Science**, v. 6, p. 1-27.
- KNOX, R. B. & SINGH, M. B. 1987. New perspectives in pollen biology and fertilization. **Annals of Botany**, v. 60, supplement 4, p. 15-37.
- KNOX, R. B. & DUCKER, S. C. 1991. The evolution of gametes – from motility to double fertilization. In: **Pollen and Spores**. (eds.) S. Blackmore & S. H. Barnes, Systematics Association Special Volume 44, p. 345-361. Clarendon press, Oxford.
- KNOX, R. B.; ZEE, S. Y.; BLOMSTEDT, C. & SINGH, M. B. 1993. Male gametes and fertilization in angiosperms. **New Phytology**, v. 125, p. 679-694.
- LAKSHMI, P. S.; KUMARI, N. & PULLAIAH, T. 1987. Embryology of *Macroptilium* (Fabaceae). **Phytomorphology**, v. 37, n. 2/3, p. 201-207.
- LATTER, J. 1926. The pollen development of *Lathyrus odoratus*. **Annals of Botany**, v. 40, n. 158, p. 277-313.
- LAVIN, M.; PENNINGTON, R. T.; KLITGAARD, B. B.; SPRENT, J. I.; LIMA, H. D. & GASSON, P. E. 2001. The dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 503-533.
- LIM, A. L. & PRAKASH, N. 1994. Embryology and seed development in the Winged Bean, *Psophocarpus tetragonolobus*. **Gardens Bulletin (Singapore)**, v. 46, n. 2, p. 79-92.
- LUQUE, R.; SOUZA, H. C. & KRAUS, J. E. 1996. Métodos de Coloração de Roeser (1972)-modificado por Kropp (1972) visando a substituição do Azul de Astra por Azul de Alcão 8GS ou 8GX. **Acta Botânica Brasilica**, v. 10, n. 2, p. 199-212.
- MAHESHWARI, P. 1950. **An Introduction to the Embryology of Angiosperms**. (5^a Reprint) McGraw-Hill Company Inc., NY, p.453.
- MANNING, J. C. & STIRTON, C. H. 1994. Endothelial thickenings and phylogeny of the Leguminosae. In: **Advances in Legume Systematics 6, Structural Botany** (eds.) I. K. Ferguson & S. C. Tucker, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 141-163.

- MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P. & BITTENCOURT JR. JR., N. S. 2003. Flor. In: **Anatomia Vegetal**. (eds.) B. Appezzato-da-Glória & S. M. Carmello-Guerreiro, Editora UFV. p. 329-373.
- MARTIN, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology**, p. 125-128.
- MAZZOCATO, A. C. (no prelo). Análise da androgênese em linhagens selecionadas de cevada (*Hordeum vulgare* L. *vulgare*). **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- McDOWELL, E.M. & TRUMP, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414.
- MISSET, M. T. & GOURRET, J. P. 1984. Accumulation of smooth cisternae in the tapetal cells of *Ulex europaeus* L. (Papilionoideae). **Journal of Cell Science**, v. 72, p. 65-74.
- MITCHELL, J. P. 1975. Megasporogenesis and microsporogenesis in *Vicia faba*. **Canadian Journal of Botany**, v. 53, p. 2804-2812.
- MOÇO, M. C. C. 2002. Desenvolvimento floral em *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae). **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 121p.
- NAIR, N. C. & KAHATE, S. 1961. Floral morphology and embryology of *Parkinsonia aculeata* L. **Phyton**, v. 17, n. 1, p. 77-90.
- O'BRIEN, T. O. & McCULLY, M. E. 1981. **The Study of Plant Structure Principles and Selected Methods**. Termarcaphi Pty. Ltd., Melbourn Australia. 345p.
- OHASHI, H. 1971. A taxonomic study of the tribe Coronilleae (Leguminosae) with a special reference to pollen morphology. **J. Fac. Sci. Univ. Tokyo**, v. 11, p. 25-92, pls.1-10.
- OHE, K. & DUSTMANN, J. H. 1996. Identifizierung einer bisher nicht zugeordneten pollenform in mittelamerikanischen honigen (sog 'Cuba-form'): *Aeschynomene americana* L (Leguminosae, Papilionoideae). **Apidologie**, v. 27, p. 157-163.

- OLIVEIRA, J. M. S., 2001. Androsporogênese e androgametogênese em *Spondias mombin* L. (cajazeira-Anacardiaceae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 123p.
- OOMMAN, C. I. 1971. Studies in the Papilionaceae. 2. Gametophytes of *Rhynchosia capitata* D.C. (*R. aurea* D.C.). **Botanique**, v. 2, n. 2, p. 145-150.
- PACINI, E. 1990. Tapetum and microspore function. In: **Microspores: evolution and ontogeny**, cap. 11, Academic Press Limited.
- PACINI, E. 1997. Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. **Canadian Journal of Botany**, v. 75, p. 1448-1459.
- PACINI, E. 2000. From anther and pollen ripening to pollen presentation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, p. 19-43.
- PACINI, E. & FRANCHI, G. G. 1991. Diversification and evolution of the tapetum. In: **Pollen and Spores: patterns of diversification** (eds.) S. Blackmore & S. H Barnes, Sistematics Association Special Volume, v. 44, p. 301-316, Clarendon Press, Oxford.
- PACINI, E. & FRANCHI, G. G. 1993. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. **Plant Systematics and Evolution Suppl.**, v. 7, p. 1-11.
- PACINI, E.; FRANCHI, G. G. & HESSE, M. 1985. The tapetum: Its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. **Plant Systematics and Evolution**, v. 149, n. 3-4, p. 155-185.
- PACINI, E.; FRANCHI, G. G. & RIPACCIOLI, M. 1999. Ripe pollen structure and histochemistry of some gymnosperms. **Plant Systematics and Evolution**, v. 217, p. 81-99.
- PAL, N. 1960. Development of the seed of *Millettia ovalifolia*. **Botanical Gazette**, v. 122, p.130-137.
- PIRE, S. M. L. 1974. Estudio palinológico de la tribu "Hedysareae" (Leguminosae). **Bonplandia**, Tomo III, n. 12.

- PRAKASH, N. 1987. Embriology of the Leguminosae. In: **Advances in Legume Systematics** (eds.) C. H. Stirton, Royal Botanic Gardens, Kew.
- PRAKASH, N. & CHAN, Y. Y. 1976. Embryology of *Glycine max*. **Phytomorphology**, v. 26, p. 302-309.
- RANGEL, N. M. 1974. **Fundamentos de Citologia Geral**. Guanabara Koogan. 264p.
- RESSAYRE, A.; MIGNOT, A.; SILJAK-YAKOVLEV, S. & RAQUIN, C. 2003. Postmeiotic cytokinesis and pollen aperture number determination in eudicots: effect of the cleavage wall number. **Protoplasma**, v. 221, p. 257-268.
- RODRIGUES, L.R. 2004. Eventos embriogênicos em tecidos estaminais de *Glycine max* (L.) Merrill. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 135p.
- RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S. & MARIATH, J. E. A. (no prelo). Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre.
- ROWLEY, J. R. 1973. Formation of pollen exine bacules and microchannels on a glycolyx. **Grana**, v. 13, p. 129-138.
- ROWLEY, J. R. & DAHL, A. O. 1977. Pollen development in *Artemisia vulgaris* with special reference to glicocalix material. **Pollen et spores**, v. 19, p. 169-284.
- SCHERES, B. & BENFEY, P. N. 1999. Asymmetric cell division in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 505-537.
- SANTOS, R. P. 2000. Ontogenia da esporoderme em *Ilex paraguayensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae). **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 160p.
- SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reativity of pollen walls. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 21, p. 73-80.

TERASAKA, O. & NIITSU, T. 1990. Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells. II. Microtubule dynamics associated with the unequal cell division. **Botanical Magazine Tokyo**, v. 103, p. 133-142.

CAPÍTULO V: DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

“Olhe cada caminho com cuidado e atenção. Tente-o tantas vezes quantas julgar necessárias...
Então, faça a si mesmo e apenas a si mesmo uma pergunta: possui esse caminho um
coração?”

Carlos Castañeda, *The Teachings of Don Juan* (Os ensinamentos de Dom Juan)

O fato de a tribo Aeschynomeneae não ser natural (Chappill, 1995; Doyle *et al.*, 1997; Lavin *et al.*, 2001) e seus elementos estarem dispersos nas três sub-divisões do clado Dalbergia (Lavin *et al.*, 2001) estimulam o estudo de cada uma de suas sub-tribos e gêneros, constituindo um novo desafio para a sistemática de Leguminosae. As inferências de que o gênero *Aeschynomene* também não seja natural nos levou a investigar espécies das suas diferentes secções, *Aeschynomene falcata* (secção *Ochopodium*) e *Aeschynomene sensitiva* (secção *Aeschynomene*) a fim de contribuir com caracteres significativos sobre ontogênese floral para a elucidação da filogenia do grupo.

O recente acréscimo de dados moleculares e os discernimentos resultantes na sistemática de Leguminosae levam a escolha de novos caracteres morfológicos e a uma cuidadosa reinvestigação dos caracteres anteriormente declarados como válidos (Prenner, 2004). O presente trabalho obteve dados de morfologia e anatomia floral das duas diferentes secções do gênero *Aeschynomene* que corroboram com sua separação como preconiza Lavin *et al.* (2001), podendo os caracteres mais marcantes serem utilizados em futuras análises filogenéticas destinadas ao esclarecimento da evolução do grupo. Este tipo de trabalho vem mostrar que os caracteres de desenvolvimento floral continuam sendo muito importantes para a taxonomia dos grupos e não devem ser negligenciados em estudos futuros.

Quanto ao Capítulo II, que trata da ontogênese inicial das flores, os caracteres mais marcantes nele encontrados dizem respeito à iniciação das sépalas, sendo unidirecional abaxial em *A. falcata* e tendendo a um tipo simultâneo em *A. sensitiva*; a polaridade do cálice desta espécie nos estádios iniciais e sua fusão precoce ainda refletem a presença de um cálice bipartido, que é característico de toda a subtribo Aeschynomeninae, exceto da secção *Ochopodium* do gênero *Aeschynomene* (Fernandes, 1996; Lavin *et al.*, 2001). A iniciação assimétrica das pétalas em *A. sensitiva* e a sobreposição entre esse verticilo e o verticilo de estames antesépalos parecem estar condicionados ao desenvolvimento inicial do cálice, que influenciaria o desenvolvimento posterior da flor, podendo seguir a mesma lógica da influência da supressão ou perda de órgãos (Tucker, 1989; 1990; 1991; 1996; Tucker & Kantz, 1997). No desenvolvimento tardio da flor, após o surgimento de todos os órgãos, verificaram-se diferenças importantes, como o cálice e estandarte tomentosos, a leve aderência entre as pétalas da quilha, a presença de tricomas muito longos no estipe, ovário tomentoso, estigma estreito com uma cavidade central e as anteras basifixas na maturidade em *A. falcata* e o cálice e estandarte glabros, a fusão efetiva entre as pétalas da quilha, o estipe curto e glabro, o ovário hispiduloso, o estigma maciço e amplo e as anteras dorsifixas na maturidade em *A. sensitiva*. Segundo Tucker (1997), os caracteres expressados cedo no

desenvolvimento são usualmente estáveis e caracterizam níveis supragenéricos de hierarquia, enquanto estados de caracteres que surgem tardiamente, geralmente caracterizam gêneros ou espécies. As diferenças nos estádios iniciais de desenvolvimento, que continuam existindo no desenvolvimento posterior, reforçam a separação entre as duas secções do gênero e validam caracteres de ontogênese floral para a análise filogenética dos grupos. Entretanto, apenas estudos que abrangem um maior número de espécies de cada secção poderão comprovar estas afirmações.

Os dados obtidos no Capítulo III como abundância de células mucilaginosas, formato achatado do primórdio floral no início do desenvolvimento e comportamento variável das células tapetais em *A. falcata*, enquanto em *A. sensitiva* há abundância de células com compostos fenólicos, formato cônico do primórdio floral e presença de um tapete sempre unisseriado, além das diferenças já comprovadas quanto à presença de um tubo do cálice na primeira e um cálice bipartido na segunda, e ainda, o posicionamento inicial das alas que é diferenciado entre as duas espécies, corroboram os dados obtidos no Capítulo II, através de análises de MEV, compondo importantes características distintivas entre as espécies.

O tipo de desenvolvimento dos microsporângios nas duas espécies de *Aeschynomene*, aqui estudadas, apresenta um padrão diferenciado do até então descrito para as demais espécies de angiospermas. Foi demonstrado que todo o microsporângio provém de células da camada subdérmica, como já havia sido reportado para *Spondias mombin* (Oliveira, 2001) e *Ilex paraguayensis* (Santos, 1993), corroborando a idéia de que a origem dupla do tapete (em diferentes camadas germinativas), descrita por diversos autores (Periasamy & Swamy, 1966; Vijayaraghavan & Ratnaparkhi, 1973; Gupta & Nanda, 1978; Nanda & Gupta, 1978; Mehra & Kulkarni, 1985; Chapman, 1987; Bittencout Jr., 1992; Moço, 2002), seja uma interpretação equivocada dos eventos ontogenéticos (Oliveira, 2001). Entretanto, o tapete interno pode pertencer a diferentes linhagens celulares provindas da camada subdérmica. Em *I. paraguayensis* foi reportada sua origem nas células iniciais do esporângio (Santos, 1993) e em *S. mombin*, na célula precursora interna (Oliveira, 2001), constituindo uma mesma linhagem celular do tapete externo, bem como do tecido esporogênico. Já nas espécies de *Aeschynomene*, as células do tapete interno surgem de células adjacentes à inicial subdérmica, uma linhagem celular paralela à principal, o que vem reforçar a idéia de que não é a linhagem celular que determina a formação de determinado tecido e sim o padrão de posição – dependência (Bowman & Eshed, 2000).

Quanto a microsporogênese e microgametogênese de *A. falcata* e *A. sensitiva*, descrita no Capítulo IV, algumas diferenças também foram detectadas entre espécies. Em *A. falcata*,

não existe uma correspondência precisa entre o tamanho do botão floral e o estágio de desenvolvimento das anteras; um composto aparentemente péctico foi observado entre a membrana plasmática e a parede de calose das células-mãe dos micrósporos; as células do endotécio são mais baixas que em *A. sensitiva* e as bandas fibrosas em forma de U não formam uma placa basal totalmente fusionada; as células tapetais apresentam as paredes periclinais internas irregulares, possuindo sinuosidades que podem chegar a englobar os grãos de pólen e possui um grão de pólen maduro maior que o de *A. sensitiva*, porém com ausência de opérculo. Em *A. sensitiva* existe uma correspondência muito precisa entre o tamanho do botão floral e o estágio de desenvolvimento da antera; as células do endotécio são mais altas que em *A. falcata* e as bandas fibrosas em forma de U formam uma placa basal totalmente fusionada; as células tapetais apresentam paredes periclinais internas retas até os estádios mais avançados do desenvolvimento; não foi verificada a presença de um vacúolo volumoso no citoplasma do micrósporo durante sua transição para microgametófito; o grão de pólen maduro é menor que o de *A. falcata* com opérculo presente, além de apresentar grande quantidade de grãos com os oncus da intina muito inchados antes da deiscência e, até mesmo, grãos germinando no interior do lóculo.

No Capítulo IV também se pode verificar um comportamento peculiar das células tapetais, onde suas paredes reagem negativamente à presença de celulose até o estágio da primeira divisão mitótica do grão de pólen e, somente após a interiorização da célula generativa, estas paredes começaram a reagir positivamente para o teste com Calcofluor White para a presença de celulose, permanecendo assim até a degeneração total do tecido com o colapso de suas células. A permanência de paredes celulósicas até a degeneração total do tapete também foi verificada em *Adesmia latifolia* (Moço, 2002), indicando que este pode representar um caráter comum para gêneros pertencentes ao clado Dalbergia (Lavin *et al.*, 2001). Apesar deste comportamento diferir do restante já descrito para angiospermas (Buss *et al.*, 1969; Biddle, 1979; Misset & Gourret, 1984; Pacini *et al.*, 1985; Pacini, 1997), ele provavelmente permite uma passagem facilitada de compostos produzidos pelo tecido tapetal durante as fases cruciais do desenvolvimento do esporo e do gametófito masculino, adquirindo paredes celulósicas apenas depois do gametófito se encontrar já quase totalmente pronto para a dispersão.

Os Capítulos III e IV, apesar de terem detectado algumas diferenças na ontogênese floral, histologia dos órgãos e leves diferenças na microsporogênese e microgametogênese de *A. falcata* e *A. sensitiva*, têm como principal característica demonstrar a grande conservação no padrão de desenvolvimento dos órgãos em camadas histogênicas distintas, na

diferenciação dos microsporângios e na formação de esporos e gametas nos grandes grupos, uma vez que, destes caracteres depende o desenvolvimento normal dos órgãos reprodutivos, responsáveis pela perpetuação das espécies.

Esta Dissertação de Mestrado demonstrou que a análise dos resultados da ontogênese floral, esporo e gametogênese das anteras de *A. falcata* e *A. sensitiva* apresentam evidências que corroboram as análises filogenéticas de Lavin e seus colaboradores (2001), de que as duas secções do gênero *Aeschynomene* estejam separadas por dados morfológicos e moleculares indicando que este gênero não seja monofilético. Com isso, nós também comprovamos a importância de estudos da ontogênese floral para a sistemática e taxonomia de angiospermas, embora conclusões decisivas sobre a validade de cada caráter só possam ser estabelecidas após o estudo de um maior número de espécies de cada secção do gênero *Aeschynomene*. Alguns aspectos observados ainda merecem estudos mais detalhados como, por exemplo, o novo padrão encontrado para o desenvolvimento do tapete interno durante a ontogenia da antera e as alterações na parede das células tapetais durante o desenvolvimento dos micrósporos e microgametófitos e o motivo pelo qual a celulose seria depositada já num estágio tão tardio de desenvolvimento.

Referências Bibliográficas

- BIDDLE, J. A. 1979. Anther and pollen development in garden pea and cultivated lentil. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1883-1900.
- BITTENCOURT JR., N.S. 1992. Anatomia floral de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae): histologia, vascularização e ontogenia com especial referência ao desenvolvimento do óvulo e da antera. **Monografia de Bacharelado**, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 121p.
- BOWMAN, J. L. & ESHED, Y. 2000. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 3, p. 110-115.
- BUSS, P. A.; GALEN, D. F. & LERSTEN, N. R. 1969. Pollen and tapetum development in *Desmodium glutinosum* and *D. illinoense* (Papilionoideae: Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 56, n. 10, p. 1203-1208.

- CHAPPILL, J. A. 1995. Cladistic analysis of the Leguminosae: The development of an explicit phylogenetic hypotheses. In: **Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny**, (esd) M. Crisp & J. J. Doyle. p. 1-9. Royal Botanic Gardens, Kew.
- CHAPMAN, G. P. 1987. The tapetum. **International Review of Cytology**, v. 107, p. 111-125.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L.; BALLENGER, J. A.; DICKSON, E. E., KAJITA, T. & OHASHI, H. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **American Journal of Botany**, v. 84, n. 4, p. 541-554.
- FERNANDES, A. 1996. **O taxon *Aeschynomene* no Brasil**. EUFC: Fortaleza.
- GUPTA, S. C. & NANDA, K. 1978. Studies in Bignoniaceae. I. Ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Pyrostegia*. **American Journal of Botany**. v. 65, n. 4, p. 395-399.
- LAVIN, M.; PENNINGTON, R. T.; KLITGAARD, B. B.; SPRENT, J. I.; LIMA, H. D. & GASSON, P. E. 2001. The dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 503-533.
- MEHRA, K. R. & KULKARNI, A. R. 1985. Embryological studies in Bignoniaceae. **Phytomorphology**, v. 35, n. 3-4, p. 239-251.
- MISSET, M. T. & GOURRET, J. P. 1984. Accumulation of smooth cisternae in the tapetal cells of *Ulex europaeus* L. (Papilionoideae). **Journal of Cell Science**, v. 72, p. 65-74.
- MOÇO, M. C. C. 2002. Desenvolvimento floral em *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae). **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 121p.
- NANDA, K. & GUPTA, S. C. 1978. Studies in Bignoniaceae. II. Ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Tecoma*. **American Journal of Botany**. v. 65, n. 4, p. 400-405.
- OLIVEIRA, J. M. S., 2001. Androsporogênese e androgametogênese em *Spondias mombin* L. (cajazeira-Anacardiaceae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 123p.

- PACINI, E. 1997. Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. **Canadian Journal of Botany**, v. 75, p. 1448-1459.
- PACINI, E.; FRANCHI, G. G. & HESSE, M. 1985. The tapetum: Its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. **Plant Systematics and Evolution**, v. 149, n. 3-4, p. 155-185.
- PERIASAMY, K. & SWAMY, G. L. 1966. Morphology of the anther tapetum of Angiosperms. **Current Science**, v. 35, p. 427-430.
- PRENNER, G. 2004. New aspects in floral development of Papilionoideae: initiated but suppressed bracteoles and variable initiation of sepals. **Annals of Botany**, v. 93, p. 537-545.
- SANTOS, R. P. S. 1993. Androsporogênese, androgametogênese e desenvolvimento do androsporângio de *Ilex paraguaiensis* St. Hill. (Aquifoliaceae). **Monografia de Bacharelado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 104p.
- TUCKER, S. C. 1989. Evolutionary implications of floral ontogeny in legumes. In: **Advances in Legume Biology Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.** (eds.) C. H. Stirton & J. L. Zarucchi, v, 29, p. 59-75.
- TUCKER, S. C. 1990. Loss of floral organs in *Ateleia* (Leguminosae: Papilionoideae: Sophoreae). **American Journal of Botany**, v. 77, n. 6, p. 750-761.
- TUCKER, S. C. 1991. Helical floral organogenesis in *Gleditsia*, a primitive caesalpinoid legume. **American Journal of Botany**, v. 78, n. 8, p. 1130-1149.
- TUCKER, S. C. 1996. Trends in evolution of flower ontogeny in *Cassia* sensu stricto, *Senna*, and *Chamaecrista* (Leguminosae: Caesalpinoideae: Cassieae: Cassiinae) – a study in convergence. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 687-711.
- TUCKER, S. C. 1997. Floral evolution, development, and convergence: the hierarchical-significance hypothesis. **International Journal of Plant Science**, v. 158 (6 suppl.), p. S143-S161.

TUCKER, S. C. & KANTZ, K. E. 1997. Comparative floral development and evolution in tribe Caesalpinioideae (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Haematoxylum*. **American Journal of Botany**, v. 84, n. 8, p. 1047-1063.

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