



Eduardo João Pereira Junior

Ontogenia do Óvulo e da Antera de *Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae)

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Genética.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Eduardo João Pereira Junior

Ontogenia do Óvulo e da Antera de *Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae)

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Concentração em Biologia Celular e Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Neusa Taroda Ranga
Professora Assistente Doutora
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Diana Salles Sampaio
Instituto de Biologia – Universidade Federal de Uberlândia

São José do Rio Preto, 15 de Agosto de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por sempre me indicar o melhor caminho a ser seguido.

À toda a minha família por ter-me proporcionado um ambiente saudável de convivência, amor, respeito e compreensão.

Ao Prof. Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior, meu orientador, pelo rigor científico e pela paciência dispensada desde a iniciação científica.

Aos colegas, atuais e passados, do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela companhia, troca de conhecimentos e motivação.

À Maria Helena Carabolante pela ajuda durante o desenvolvimento desta dissertação e pelos conselhos e amizade.

Aos meus professores da graduação e pós-graduação pela transmissão de conhecimentos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética pelos escassos, mas bons momentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, Vera e Eduardo, pelo exemplo de caráter e pelo apoio incondicional à realização dos meus sonhos.

“O destino baralha as cartas, e nós jogamos.”

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

I. Abstract.....	5
II. Resumo.....	7
III. Introdução.....	9
IV. Objetivos.....	14
V. Capítulo I.....	16
Ontogenia do Óvulo de <i>Cybistax antisiphilitica</i> (Mart.) Mart. (Bignoniaceae)....	17
VI. Capítulo II.....	49
Ontogenia da Antera de <i>Cybistax antisiphilitica</i> (Mart.) Mart. (Bignoniaceae)...	50
VII. Discussão Geral.....	90
VIII. Conclusões Gerais.....	93
Ontogenia do Óvulo.....	94
Ontogenia da Antera.....	94
IX. Referências Bibliográficas.....	96

I. Abstract

Abstract

Embryological characters have systematic value and its usefulness has been demonstrated by several authors to elucidate the phylogenetic position of certain angiosperms families. This study aims to analyze the ontogeny of reproductive structures of *Cybistax antisiphilitica*, with the purpose of adding relevant embryological data to the phylogenetic design of the family or, infra-familial taxonomic categories. The embryological features observed was similar to species belonging to “*Tabebuia* alliance” whose embryology has been investigated. During the ontogeny of *C. antisiphilitica* ovule, only the chalazal megaspore develops, and in the course of its differentiation in the embryo sac mother cell, the micropylar side of its cell wall assumes a concave conformation in which there is an expressive deposition of callose. In the octonuclear stage, there is an accumulation of a fibrogranular substance between the endothelium and megagametophyte wall causing a bottleneck in the middle portion of embryo sac. For anther ontogeny of the species studied, the tapetal layers are dimorphic, although becoming similar at the late pre-meiotic stage. After meiosis, the dimorphism is accentuated between the two tapetal layers. The microspore mother cell amyloplasts are inherited by the microspores and the resulting pollen grains. The pollen grain amyloplasts gradually increasing in number and size in a single amylogenesis/amylolyse cycle. Based on the obtained data we concluded that the configuration of the distal wall of the chalazal megaspore and the accumulation of secretion in the median portion of embryo sac are characters not reported for other species of the family, and may possibly be autapomorphic characters. Regarding the ontogeny of the anther, *Cybistax antisiphilitic* showed a multistratified fibrous endothecium restricted to four sites within the anther and a period in which there was attenuation of dimorphism between the tapetal layers, like reported for *Handroanthus* genera.

Key words: Plant Embryology, ontogeny, ovule, anther.

II. Resumo Geral

Resumo

Caracteres embriológicos possuem valor sistemático e sua utilidade foi demonstrada por diversos autores para elucidar o posicionamento filogenético de certas famílias de angiospermas. Este estudo visa analisar a ontogenia das estruturas reprodutivas de *Cybistax antisiphilitica*, com o propósito de acrescentar dados embriológicos relevantes ao delineamento filogenético da família, ou de categorias taxonômicas infrafamiliares. As características embriológicas observadas demonstraram similaridade com espécies pertencentes à “*Tabebuia alliance*” cuja embriologia já foi investigada. Observou-se durante a ontogenia do óvulo de *C. antisiphilitica* que apenas o ginósporo calazal se desenvolve e, durante sua diferenciação em célula-mãe do saco embrionário, a face micropilar de sua parede celular assume uma conformação côncava, na qual há grande deposição de calose. No estágio octonuclear, há acúmulo de uma substância fibrogranular entre o endotélio e a parede do ginófito fazendo com que o saco embrionário apresente um característico afunilamento mediano. Em relação a ontogenia da antera da espécie estudada, verificou-se que as camadas tapetais são dimórficas, embora ao final do estágio pré-meiótico se tornem similares; embora, após a meiose, o dimorfismo se acentua novamente nas camadas tapetais. Os amiloplastos das células-mãe dos andrósporos são herdados pelos andrósporos e grãos de pólen deles resultantes. Os amiloplastos dos grãos de pólen gradualmente aumentam em número e tamanho em um único ciclo de amilogênese/amilólise. Com base nos dados obtidos conclui-se que a configuração da parede distal do ginósporo calazal e o acúmulo de secreção na porção mediana do saco embrionário são características não relatadas para outras espécies da família e podem ser caracteres autapomórficos para *C. antisiphilitica*. Em relação à ontogenia da antera, *C. antisiphilitica* apresentou endotécio fibroso multiestratificado restrito a quatro sítios dentro da antera e um período no qual houve atenuação do dimorfismo entre as camadas tapetais, assim como reportado para o gênero *Handroanthus*.

Palavras-chave: Embriologia vegetal, ontogenia, óvulo, antera.

III. Introdução

III. Introdução

A família Bignoniaceae é composta por aproximadamente 827 espécies distribuídas em 82 gêneros (Lohmann & Ulloa 2007). É uma família predominantemente neotropical, sendo um importante componente nesta região, com menor contribuição nas florestas tropicais da África, de Madagascar e do Sudeste Asiático (Olmstead *et al.* 2009).

Bignoniaceae consiste em uma família facilmente reconhecível por seu conjunto de características vegetativas e reprodutivas, sendo que as três características que evidenciam sua monofilia consistem em: (1) sementes com endosperma reduzido; (2) estigma sensitivo bilamelado e (3) duas placentas por carpelo (Manning 2000, Judd *et al.* 2002).

Estudos filogenéticos recentes, baseados em caracteres moleculares (regiões *ndhF*, *trnL-F* e *rcbL* do cpDNA), propuseram que dentro de Bignoniaceae a tribo Jacarandae é a mais basal, consistindo em um grupo irmão do agrupamento mais inclusivo que contém o restante dos taxa da família, este último é designado como *Core Bignoniaceae*, um clado fortemente suportado pelos dados moleculares (Olmstead *et al.* 2009). A tribo Tourrettieae é, dentro do *Core Bignoniaceae*, a que mais características compartilham com Jacarandae, como semelhanças entre os grãos de pólen das duas tribos (tricolpados e psilados) e a presença de folhas duplamente compostas (Gentry & Tomb 1979).

Nos últimos estudos filogenéticos (Gentry 1980, Fischer *et al.* 2004), Tecomeae consistia em um grande grupo parafilético que compreendia todos os taxa com frutos biloculares cuja deiscência era perpendicular ao septo. No tratamento de Olmstead *et al.* (2009), Tecomeae foi desmembrada e um número reduzido de espécies foi circunscrito dentro deste grupo, passando a ser constituído por apenas 12 gêneros e 55 espécies, sendo os C-4 formil iridóides, encontrados quase que exclusivamente neste táxon, uma possível característica distintiva do grupo. Dentre os grupos que foram desmembrados se encontram: Jacarandae, Catalpeae, *Tabebuia* alliance (incli

Crescentieae), aliança paleotropical (inclui Coleeae), mais dois gêneros isolados (*Argylia* e *Delostoma*) (Olmstead *et al.* 2009).

Foi proposto um clado informal e não ranqueado, contudo com monofila bem suportada, denominado Crescentiina com 34 gêneros e 300 espécies, este é formado por um clado estritamente paleotropical e outro clado neotropical – denominado “*Tabebuia* alliance” (ambos parafiléticos). Dentro do primeiro está incluído Coleeae e do segundo Crescentieae (Olmstead *et al.* 2009). Segundo Olmstead *et al.* (2009), as tribos Oroxyleae e Catalpeae se mostraram filogeneticamente próximas constituindo-se em grupos irmãos de Crescentiina, e a reunião destes três taxa forma um agrupamento mais inclusivo que, por sua vez, é irmão de Bignoniaceae.

A embriologia das angiospermas abrange a investigação de virtualmente todos os eventos relevantes à reprodução sexual (Schnarf 1931) e contribuiu, preponderantemente, no século passado, para a compreensão da diversidade estrutural na andro- e ginosporogênese, andro- e ginogametogênese, fertilização, desenvolvimento do embrião, endosperma e tegumento da semente. Em vários momentos no passado, um esforço foi feito para compilar os dados acumulados e definir os atributos embriológicos de cada família (Tobe 1989).

A despeito do grande valor dos caracteres embriológicos na sistemática das angiospermas, estudos de embriologia têm se tornado progressivamente inativos a partir da última metade do século XX, com um decréscimo significativo das publicações na área (Tobe 1989). Isto aconteceu, em parte porque os grupos mais acessíveis já foram estudados e, em parte, pela dificuldade técnica e pelo tempo consumido em estudos de Embriologia Vegetal baseados, sobretudo, na confecção de secções histológicas por microtomia e análise das mesmas em microscopia óptica (Tobe 1989).

Em relação ao emprego de dados embriológicos na taxonomia da família Bignoniaceae é evidente o fato de que a grande maioria dos trabalhos publicados, que se ocupam no estudo da ontogenia dos óvulos e das anteras (Tabela 1), foca seus esforços na descrição detalhada dos eventos ontogenéticos observados. Poucas e insipientes foram as abordagens sistemáticas a partir dos dados embriológicos. A primeira categorização das espécies da família com base em dados

embriológicos foi feita por Mauritzon (1935), que delimitou dois tipos de desenvolvimento do endosperma, o tipo “*Incarvillea*” e o “*Catalpa*” com base no número de células do haustório calazal deste tecido, sendo tipo “*Catalpa*” considerado o caráter plesiomórfico.

Shivaramiah (1998) deixou claro que as investigações morfológicas e embriológicas em Bignoniaceae estão longe de estarem completas com respeito ao posicionamento sistemático. Estes se restringem apenas à comparação sem valer-se da utilização ampla e sistemática das características para fazer inferências filogenéticas. Para que isso seja possível, é necessário não apenas uma padronização dos métodos de estudo, como também a ampliação do número de espécies estudadas e o confronto dos dados embriológicos com as filogenias geradas por diferentes fontes de dados, visto que, juntamente com dados moleculares e paleontológicos, caracteres embriológicos podem ser usados para reconstruir a história evolutiva das angiospermas (Płachno & Świątek 2009).

Tabela 1: Histórico dos estudos sobre a Ontogenia dos Óvulos e das Anteras em Bignoniaceae

Pesquisador e Data	Aspecto investigado	Espécies (Sinônimo que consta na publicação)
DUGGAR (1899)	Desenvolvimento do pólen, do Saco embrionário e do embrião	<i>Pyrostegia venusta</i> (= <i>Bignonia Venusta</i>)
MAURITZON (1935)	Desenvolvimento do saco embrionário, endosperma e embrião	<i>Dolichandra unguis-cati</i> (= <i>Bignonia tweediana</i>), <i>Catalpa bungei</i> , <i>Campsis radicans</i> , <i>Campsis grandiflora</i> (= <i>Campsis chinensis</i>), <i>Catalpa bignonioides</i> , <i>Amphitecna macrophylla</i> (= <i>Crescentia macrophylla</i>), <i>Jacaranda Mimosaeifolia</i> , <i>Amphilophium</i> sp. (= <i>Phaedranthus</i> sp.), <i>Tecoma stans</i> var. <i>sambucifolia</i> (= <i>Tecoma sambucifolia</i>)
GOVINDU (1950)	Ginosporigênese, ginogametogênese e desenvolvimento do endosperma	<i>Jacaranda mimosifolia</i> , <i>Parmentiera cerifera</i> , <i>Kigelia africana</i> (= <i>Kigelia pinnata</i>) e <i>Tecoma stans</i>
GHATAK (1956)	Citologia e anatomia da antera, desenvolvimento do óvulo (ginosporigênese e ginogametogênese) e semente (embriogenia e desenvolvimento do endosperma)	<i>Oroxylum indicum</i>
GUPTA & NANDA (1978a, b e c)	Androsporigênese, androgametogênese, desenvolvimento da parede da antera (ênfase no tapete)	<i>Pyrostegia venusta</i> (= <i>Pyrostegia ignea</i>), <i>Tecoma stans</i>
MEHRA & KULKARNI (1985)	Androsporigênese, androgametogênese, desenvolvimento da parede da antera. Ginosporigênese, ginogametogênese e desenvolvimento do endosperma	<i>Tabebuia rosea</i> , <i>Millingtonia hortensis</i> , <i>Dalichandrone fulcata</i> , <i>Fernandoa adenophylla</i> (= <i>Heterophragma adenophyllum</i>), <i>Stereospermum chelonoides</i>
BITTENCOURT (1996); BITTENCOURT & MARIATH (1997; 2002a, b e c)	Androsporigênese, androgametogênese e desenvolvimento do tapete e das camadas parietais da antera. Ginosporigênese, ginogametogênese e desenvolvimento do tegumento.	<i>Handroanthus ochraceus</i> (= <i>Tabebuia ochracea</i>), <i>Handroanthus pulcherrimus</i> (= <i>Tabebuia pulcherrima</i>),
GALATI & STRITTMATTER (1999a, b e c)	Androsporigênese e androgametogênese, ginosporigênese e ginogametogênese e desenvolvimento dos corpúsculos de Ubish	<i>Jacaranda mimosifolia</i>
DE SOUZA <i>et al.</i> (2010)	Aspectos gerais da morfologia da antera e ovário.	<i>Adenocalymna marginatum</i> , <i>Fridericia mutabilis</i> (= <i>Arrabidaea mutabilis</i>), (= <i>Macfadyena unguis-cati</i>), <i>Tynanthus micranthus</i> .

IV. Objetivos

IV. Objetivos

- Investigar o desenvolvimento do óvulo de *Cybistax antisiphilitica*, incluindo a ginosporogênese e a ginogametogênese, contribuindo para o entendimento da organização do gametófito feminino em Bignoniaceae.
- Descrever a ontogenia da antera de *C. antisiphilitica* com atenção especial ao desenvolvimento do tapete e das demais camadas parietais, à androsporogênese e à androgametogênese.
- Contribuir para a compreensão do desenvolvimento das estruturas reprodutivas na família Bignoniaceae, assim como obter dados embriológicos relevantes para o delineamento filogenético da família, ou de categorias taxonômicas infrafamiliares.

V. Capítulo I

Ontogenia do Óvulo de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae)

EDUARDO JOÃO PEREIRA JUNIOR^{1,3}; NELSON SABINO BITTENCOURT JÚNIOR²

¹ Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo, 2265.
Bairro: Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo, 2265.
Bairro: Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, Departamento de Zoologia e Botânica, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
nesbitte@ibilce.unesp.br

³ Autor para correspondência: eduardojpjr@yahoo.com.br

Abstract

In spite of the remarkably preserved morphology of the megagametophyte in angiosperms, there is a wide diversity of forms, which can only be understood with the increase of embryological studies within the flowering plants families. This work aimed to analyze the ovule development in *Cybistax antisiphilitica*, including megasporogenesis and megagametogenesis, to generate data for phylogenetic delineation of infra-familial taxa of Bignoniaceae. The ovule of *Cybistax antisiphilitica* is anatropous, unitegmic and tenuinucellate. The nucellus shows a trizonate histological organization and the integument is initiated by periclinal divisions in the dermal layer, around the base of the archesporium. The single archesporial cell differentiates directly into the megaspore mother cell, undergoes meiosis, and originates a linear tetrad of megaspores. Only the chalazal megaspore develops, and during its differentiation in the embryo sac mother cell, the micropylar side of its cell wall assumes a concave conformation in which there is an expressive deposition of callose. The mature embryo sac mother cell is elongated, possess a conspicuous central nucleus, and a characteristic bipolar vacuole with fibrous-granulated content. The inner cell layers of the integument differentiate in an amyloplast-rich endothelium. In the octonuclear stage, there is an accumulation of a fibrogranular substance between the endothelium and megagametophyte wall causing a bottleneck in the middle portion of embryo sac. The chalazal megaspore develops in a *Polygonum*-type embryo sac. During megagametogenesis, endothelial cells adjacent to the micropylar pole of the embryo sac undergo apoptosis. In the mature embryo sac, the egg cell is slightly chalazal in relation to the synergids, and its micropylar end does not touch the micropylar channel. The antipodals organize themselves in a triangular or a linear disposition. The configuration of the distal wall of the chalazal megaspore and the accumulation of secretion in the median portion of embryo sac are characters not reported for other species of the family, and may possibly be autapomorphic characters.

Key Words: Ovule, integument, endothelium, embryo sac, egg apparatus.

Resumo

A despeito dos ginófitos das angiospermas serem notavelmente, conservados em sua morfologia, ainda assim há uma ampla diversidade de formas que só pode ser compreendida com o aumento de estudos embriológicos dentro das famílias de angiospermas. Este trabalho objetivou investigar o desenvolvimento do óvulo de *Cybistax antisiphilitica*, incluindo a ginospogênese e a ginogametogênese, de modo a gerar dados que possam contribuir no delineamento filogenético de Bignoniaceae. Os óvulos de *Cybistax antisiphilitica* são anátropos, unitégmicos e tenuinucelados. Histologicamente, o nucelo apresenta estrutura trizonada e o tegumento é iniciado por divisões periclinais na camada dérmica, ao redor da base do arquespório. A célula arquespórica diferencia-se diretamente em célula-mãe dos ginósporos, sofre meiose e origina uma tétrade linear de ginósporos. Apenas o ginósporo calazal se desenvolve e, durante sua diferenciação em célula-mãe do saco embrionário, a face micropilar de sua parede celular assume uma conformação côncava, na qual há grande deposição de calose. A célula-mãe do saco embrionário torna-se alongada, com núcleo central e vacuoma bipolar apresentando conteúdo fibrogranular. As camadas celulares mais internas do tegumento diferenciam-se em endotélio rico em amiloplastos. No estágio octonuclear, há acúmulo de uma substância fibrogranular entre o endotélio e a parede do ginófito fazendo com que o saco embrionário apresente um característico afunilamento mediano. O saco embrionário originado é do tipo *Polygonum* e, durante seu desenvolvimento, as células do endotélio adjacentes ao pólo micropilar entram em apoptose. A oosfera é ligeiramente calazal em relação às sinérgides e sua extremidade micropilar não estabelece contato com o canal micropilar. As antípodas variam quanto a sua disposição tridimensional, podendo se organizar triangularmente ou de maneira linear. A configuração da parede distal do ginósporo calazal e o acúmulo de secreção na porção mediana do saco embrionário são características não relatadas para outras espécies da família e podem ser caracteres autapomórficos para *C. antisiphilitica*.

Palavras-chave: Óvulo, tegumento, endotélio, saco embrionário, aparelho oosférico.

Introdução

Os gametófitos femininos das angiospermas são altamente organizados e também notavelmente conservados em sua morfologia, indicando que existem restrições que governam o seu desenvolvimento (Rudall 2006). Apesar de sua estrutura básica conservada, os óvulos alcançaram uma ampla diversidade de formas e, embora, por si só, o estudo isolado do desenvolvimento do óvulo de uma determinada espécie possa não ter nenhum interesse especial, quando se toma o conjunto de dados gerados pelos estudos individuais têm-se um “tesouro” valioso relativo às informações sobre a diversidade dos óvulos, cujo valor só aumenta a cada novo estudo realizado (Endress 2011).

Considerando a diversidade de espécies característica da família, estudos embriológicos em Bignoniaceae são escassos (Galati & Strittmatter 1999). No que concerne ao estudo da ginosporogênese e ontogenia do saco embrionário na família, as investigações tiveram início no final do século XIX, com o estudo de Guignard (1882 *apud* Schnarf 1931), sobre a ontogenia do saco embrionário em *Tecoma capensis* (= *Bignonia capensis*). A literatura existente sobre a ontogenia do gametófito feminino em Bignoniaceae demonstrou que o óvulo pode ser bizonado, como em *Jacaranda mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999) ou trizonado, como em *Handroanthus pulcherrimus* (= *Tabebuia pulcherrima*) (Bittencourt & Mariath 2002a). Os óvulos são tenuinucelados, unitegmentados e geralmente anátropos, tal como verificado em *J. mimosifolia* (Govindu 1950, Galati & Strittmatter 1999), *Tecoma stans* (Govindu 1950), *Tabebuia rosea*, *Dolichandrone falcata*, *Fernandoa adenophylla* (= *Heterophragma adenophyllum*) (Mehra & Kulkarni 1985) e *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath 2002a). Óvulos hemianátropos foram observados em *Stereospermum chelonoides* e *Millingtonia hortensis* (Mehra & Kulkarni 1985). Alguns óvulos hemianátropos foram observados em *Oroxylum indicum*, embora a maioria dos óvulos desta espécie sejam anátropos (Ghatak 1956). Óvulos hemianátropos, ocasionalmente,

também foram observados em *Kigelia africana* (= *Kigelia pinnata*) e *Parmentiera cereifera* (Govindu 1950).

A divisão do ginosporócito, via de regra, resulta em uma tétrade linear de ginósporos dos quais apenas um se desenvolve e dá origem ao ginófito – sendo este, geralmente, o ginósporo calazal. Entretanto, há variações neste padrão, como em *K. africana*, na qual as tétrades possuem formato em T ou isobilateral (Govindu 1950), *J. mimosifolia* com tétrades lineares ou com formato em T (Galati & Strittmatter 1999) e *P. cereifera* com arranjo decussado (Govindu 1950). O ginófito do tipo *Polygonum* que caracteriza mais de 70% das espécies de angiospermas estudadas (Rudall 2006), também é o padrão para a família (Govindu 1950, Ghatak 1956, Mehra & Kulkarni 1985, Bittencourt & Mariath 2002b).

O presente estudo tem por objetivo investigar o desenvolvimento do óvulo de *Cybistax antisiphilitica*, incluindo a ginosporogênese e a ginogametogênese, contribuindo para o entendimento da organização do gametófito feminino em Bignoniaceae, bem como levantar dados embriológicos relevantes para o delineamento filogenético da família, ou de categorias taxonômicas infra-familiares.

Material e Métodos

Cybistax Martius ex Meisner é um gênero monotípico e *C. antisiphilitica* tem uma ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo naturalmente no território extra-amazônico do Brasil (exceto pelo nordeste) e nas áreas mais secas da vertente amazônica dos Andes peruanos, apresentando ainda uma população disjunta no extremo sul do Suriname (Gentry 1992). Trata-se de uma árvore decídua, muito comum no Cerrado, sendo utilizada para a arborização urbana, no Brasil (Lorenzi 2002). Caracteriza-se por atingir de 1,5 a 20 m de altura e apresentar ramos prolépticos e decussados. Possui folhas palmadas com cinco a sete folíolos e inflorescências terminais do tipo tirso. As flores são verde-claras e tubulares, não possuem odor e permanecem semi-ocultas durante

a floração devido ao desenvolvimento das inflorescências ser precedido pela formação de folhas jovens nos nós subjacentes, com coloração similar às flores. Os frutos dessa espécie são cápsulas loculicidas que liberam sementes aladas após a deiscência. *Cybistax antisyphilitica* pertence a um clado monofilético interno em Bignoniaceae, constituído de árvores e arbustos de folhas palmadas (exceto por poucas espécies que provavelmente sofreram reversão à condição de folhas simples por redução no número de folíolos), denominada “*Tabebuia* alliance” (Grose & Olmstead 2007, Olmstead *et al.* 2009).

Flores e botões florais em vários estádios de desenvolvimento foram coletados de setembro a outubro, nos anos de 2008 a 2010, de quatro indivíduos localizados no município de São José do Rio Preto, SP, Brasil. Após a dissecação, os ovários foram fixados em solução composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 1% e tampão fosfato pH 7,2, 0,1M (McDowell & Trump, 1976) e estocadas em álcool etílico 70%. Posteriormente, as peças foram infiltradas e emblocadas em historesina e seccionadas transversalmente em micrótomo rotatório Leica RM2255. As secções histológicas semisseriadas de 1-4 µm foram aderidas a lâminas de vidro, submetidas a testes histoquímicos, à coloração com azul de toluidina O (O’Brien & McCully, 1981) e montadas utilizando-se resina Permount®.

Os testes histoquímicos empregados foram o Ácido Periódico - Schiff (PAS) para detecção de polissacarídeos insolúveis, precedido pelo tratamento das secções com bloqueador de aldeídos (O’Brien & McCully 1981). Para a detecção de calose foi utilizado o método fluorocromático com azul de anilina (Eschrich & Currier 1964), e o vermelho de rutênio para a verificação de compostos ácidos, incluindo ácidos pécticos (Southworth 1973). Todo o material foi analisado em um microscópio óptico Zeiss Axioskop e fotografado em fotomicroscópio Olympus BX51, equipado com câmera digital Olympus Q-Color 5.

Resultados

Ginosporogênese e Desenvolvimento do Tegumento

Tendo em vista o padrão de divisões celulares nos meristemas das placentas, antes do início da ontogenia dos óvulos, constata-se que estas apresentam estrutura trizonada (Figuras 1 e 2). Na camada dérmica (zona I) as divisões celulares são apenas anticlinais. Na camada subdérmica (zona II) ocorrem, predominantemente, divisões anticlinais embora tenham sido observadas também divisões oblíquas e periclinais (Figura 2). No tecido subjacente à camada subdérmica (zona III) não há um padrão regular de divisões celulares (Figura 2).

O desenvolvimento do óvulo inicia-se pela proliferação celular que tem lugar na zona III da placenta. As células das camadas dérmica e subdérmica do óvulo imaturo apresentam os mesmos padrões de divisões celulares observados nos primórdios das placentas, ou seja, os primórdios de óvulos também são trizonados (Figuras 3 e 4).

Após a emergência dos primórdios ovulares na superfície das placentas, ocorre a diferenciação de uma única célula arqueospórica na porção superolateral da camada subdérmica do nucelo, apresentando citoplasma denso e núcleo proeminente (Figuras 5 e 6). Tão logo se inicia a emergência do óvulo, este progressivamente adquire a curvatura anátropa, ocasionada pela proliferação celular mais acentuada em um dos lados do mesmo (Figura 6). Simultaneamente, o tegumento se origina por divisões periclinais de células da camada dérmica em torno da base do arquespório (Figura 6). Em seguida, células da camada subdérmica também se dividem periclinalmente, impelindo aquele grupo de células de origem dérmica laterais à célula arquesporial em direção ao topo do nucelo, região onde se constituirá a micrópila. Este processo acarreta a perda dos limites entre as células de origem dérmica e subdérmica no tegumento em formação (Figuras 7 e 8). Enquanto ocorrem divisões anticlinais nas células das camadas mais externas do tegumento, os estratos internos, por meio de divisões periclinais e oblíquas, contribuem para o espessamento do tegumento, que é único e maciço e se desenvolve em torno do nucelo, tendo suas células se originado, portanto, das camadas dérmica e subdérmica do primórdio ovular.

O arqueosporio passa diretamente a funcionar como célula-mãe dos ginósporos (CMG). Durante sua diferenciação, a CMG sofre aumento volumétrico, torna-se progressivamente alongada e expande-se em sua porção distal, o que lhe confere um formato oval (Figuras 8 e 9). A CMG apresenta núcleo proeminente com nucléolo evidente portando pequenos vacúolos nucleolares (Figura 8). Um maior número de vacúolos é encontrado no citoplasma da CMG, do que no estágio anterior, contudo, no início da meiose, estes já não são mais observados (Figura 10).

A CMG permanece com sua porção proximal em contato direto com as células da região calazal e sua maior extensão envolvida pela epiderme nucelar (Figuras 7 e 8). Quando a CMG entra em prófase I da meiose, as bordas do tegumento geralmente já estão bem próximo ao topo do núcleo (Figura 10) e já podem ser vistos pequenos amiloplastos na porção calazal do óvulo, na epiderme nucelar, no tegumento e na própria CMG (Figura 9). As bordas do tegumento se encontram completamente, formando a micrópila, apenas quando a célula mãe do saco embrionário (CMSE) começa a se expandir (Figura 19-21).

Tanto a epiderme nucelar quanto a superfície interna do tegumento são revestidas por uma fina cutícula, permanecendo um espaço estreito entre elas. As camadas celulares do tegumento mais próximas à epiderme nucelar diferenciam-se em endotélio, ainda durante a meiose, apresentando densidade citoplasmática ligeiramente superior à das células das demais camadas e possuindo um formato tangencialmente alongado (Figuras 10 – inserção e 19 – inserção).

A parede celular da porção calazal da CMG, assim como as paredes das células nucleares nesta região sofrem um ligeiro espessamento e passam a corar-se mais intensamente (roxo) pelo azul de toluidina O, adquirindo denso conteúdo citoplasmático (Figuras 10). As paredes celulares desta região também se coram fortemente pelo vermelho de rutênio (dados não apresentados) e são PAS positivas, o que indica o acúmulo de substâncias pécnicas (Figura 9). As células nucleares da região calazal também apresentam vacúolos com conteúdo granular denso, que se cora de magenta pelo azul de toluidina O (Figuras 10-15). Tais características evidenciam a diferenciação inicial das células nucleares da região calazal do óvulo em hipóstase.

No endotélio, o número e o tamanho dos amiloplastos são expressivos, havendo também um grande número de amiloplastos em outras regiões do tegumento e no citoplasma do ginósporo funcional (Figura 16) e da CMSE (Figura 21). A CMG passa por uma divisão meiótica e, durante este processo, as placas metafásicas se posicionam perpendicularmente ao eixo longitudinal do meiócito (Figura 10-14), originando, após citocineses sucessivas, uma tétrade linear de ginósporos (Figura 15-17). Na fase de díade, a citocinese é seguida da deposição de calose (Figura 14) sobre ambos os lados da parede transversal pectocelulósica. Geralmente não há sincronia entre as células da díade e entre suas derivadas, com os eventos meióticos se processando com maior celeridade na célula calazal. Há nova deposição de calose em ambos os lados das paredes transversais dos ginósporos após a formação da tétrade linear (Figura 17 - inserção), não havendo deposição de calose nas paredes laterais das mesmas.

O ginósporo calazal se desenvolve, alongando-se paralelamente ao eixo longitudinal da tétrade (Figuras 15-17). Durante o processo de diferenciação inicial do ginósporo calazal em célula-mãe do saco embrionário (CMSE), a face micropilar de sua parede celular encurva-se em direção ao centro da célula até formar uma pequena depressão, ao fundo da qual a parede celular se torna mais espessada (Figura 18). Tal estrutura foi verificada em todas as secções de óvulos que se encontravam neste estágio. Os demais ginósporos se degeneram em estádios subsequentes, havendo uma pequena variação quanto ao estágio no qual este evento se processa em diferentes óvulos (Figuras 18-24). As células ao redor da micrópila também se tornam endoteliais, apresentando um grande número de amiloplastos que estarão presentes até o momento da fecundação.

A expansão do ginósporo calazal origina uma célula alongada com núcleo conspícuo, centralmente posicionado (Figuras 15 e 16). Um capuz de calose persiste na porção micropilar desta célula, embora esta cobertura se torne progressivamente delgada (Figuras 18-inserção, 19-21). Fica evidente a polarização do citoplasma, com a formação de pequenos vacúolos com conteúdo granular tanto na porção micropilar como na calazal do ginósporo calazal. Em estádios seguintes estes vacúolos se coalescem formando dois vacúolos amplos, um em cada polo da CMSE (Figura

20). Estes vacúolos apresentaram conteúdo fibrogranular que se cora de magenta pelo azul de toluidina O (Figura 20).

Ginogametogênese

A primeira divisão mitótica da CMSE não é seguida de citocinese, sendo que a placa metafásica se orienta perpendicularmente ao eixo longitudinal do óvulo (Figura 22). Os núcleos resultantes afastam-se um do outro migrando para os polos calazal e micropilar, formando um jovem ginófito binucleado (Figura 23 e 24). Este se expande consideravelmente e o vacuoma, que antes era bipolar, se fragmenta e posteriormente origina um grande vacúolo entre os núcleos, e um segundo vacúolo entre o núcleo proximal e a parede calazal do ginófito, ambos contendo substância granular que se cora de magenta pelo azul de toluidina O (Figura 24). Remanescentes dos ginósporos micopilares são esmagados junto à extremidade micropilar do saco embrionário (Figuras 18-24). Nesta fase, as células da epiderme nucelar que originalmente estavam em contato com os ginósporos não funcionais se degeneram e sofrem colapso (Figura 23 e 24). Remanescentes de paredes celulares da epiderme nucelar colapsada permanecem no entorno da porção micropilar do saco embrionário (SE) binucleado, separando-o do endotélio (Figura 24-25). Apenas as células da epiderme nucelar que contornam a porção calazal do ginófito persistem nos estádios subsequentes, embora também passem a apresentar sinais de degeneração (i.e., picnose nuclear, plasmólise e coagulação do citoplasma) (Figuras 24-27).

Durante seu processo degenerativo, as células da epiderme nucelar liberam secreção com as mesmas propriedades de coloração do conteúdo de seus próprios vacúolos, a qual se acumula no espaço onde se constitui o canal micropilar, bem como no entorno do saco embrionário, junto aos resquícios dos ginósporos não funcionais (Figuras 22-24). Tal como citado para a porção micropilar da epiderme nucelar, ocorre apoptose e colapso de células das camadas do endotélio contíguas à porção micropilar do SE em expansão e remanescentes das paredes destas células permanecem no

entorno de toda a porção mais alargada do saco embrionário, formando um envoltório pectocelulósico que persiste até o estágio de saco embrionário maduro (Figuras 27-36). Junto à porção estreita (calazal) do SE, o endotélio permanece íntegro e apresenta células com citoplasma denso (Figuras 27-36).

O segundo ciclo de mitoses acitocinéticas da ginogametogênese ocorre, simultaneamente, nos núcleos calazal e micropilar do SE binucleado (Figura 26). A placa metafásica do núcleo calazal é sempre perpendicular ao eixo longitudinal do SE; por outro lado, no núcleo micropilar a placa é oblíqua ou perpendicular ao eixo longitudinal do SE (Figura 26). Os núcleos calazais distanciam-se um do outro ao longo do eixo do ginófito, enquanto os núcleos micopilares se posicionam em um plano perpendicular ou oblíquo ao eixo do SE (Figura 27). A porção micropilar do saco embrionário se expande tanto lateralmente quanto em direção à micrópila, invadindo regiões originalmente ocupadas por células do endotélio, as quais se degeneram e se colapsam, tal expansão faz com que o SE se torne claviforme (Figuras 27-36).

No estágio tetranucleado, a porção micropilar do SE se expande e grande parte das células tegumentares do canal micropilar entra em apoptose concomitantemente à expansão do SE; contudo, este não atinge o lado externo do tegumento (Figura 27). O conteúdo fibrogranular que está presente no vacuoma desde a diferenciação da CMSE persiste até a maturidade do ginófito. Um grande número de grãos de amido, que foram sintetizados nas células do endotélio, persiste mesmo após tais células terem sido colapsadas. Estes, então, se acumulam ao redor do envoltório do SE, conferindo ao mesmo um contorno ondulado (Figuras 28-36).

Na terceira e última divisão mitótica da ginogametogênese, as placas metafásicas não se dispõem de uma maneira regular como ocorre nas fases precedentes (Figura 28). Após a citocinese, o núcleo mitótico proximal do polo calazal dá origem aos núcleos de duas das antípodas, o núcleo mitótico distal, por sua vez, origina o núcleo de uma das antípodas e o núcleo polar calazal. Na porção micropilar do SE, o núcleo mitótico distal dá origem aos núcleos das duas sinérgides e o núcleo mitótico proximal origina o núcleo polar micropilar e o núcleo da oosfera. Portanto, após o

último ciclo mitótico, origina-se um ginófito com oito núcleos e sete células, sendo elas as três antípodas, localizadas na extremidade calazal, as duas sinérgides e a oosfera, que constituem o aparelho oosférico, localizado no polo micropilar, e uma ampla célula central binucleada (Figuras 29-32). Neste estágio de desenvolvimento, é característico para *C. antisiphilitica* o acúmulo de secreção junto à porção mediana do SE, na região entre o endotélio, a epiderme nuclear colapsada e a parede do SE (Figuras 29 a 31).

Após o terceiro ciclo mitótico, o processo de celularização ocorre no SE com certa celeridade, sendo que, de todos os ginófitos octonucleados analisados, não foi observado nenhum que fosse completamente sincicial. A celularização é concluída primeiramente no polo calazal, visto que em um mesmo SE as paredes celulares já são visíveis nas antípodas, enquanto na porção micropilar as paredes celulares que separam as células do aparelho oosférico não são observadas (Figura 29).

As antípodas possuem citoplasma denso e podem apresentar pequenos vacúolos (Figuras 29, 32, 33 e 34 - Superior). Têm organização variável, se dispõem tanto de forma linear como triangular e apresentam diminutos grão de amido em seu citoplasma (Figuras 29, 32, 33, 34 - porção superior e 36). O núcleo polar originado no polo calazal, do SE começa a migrar em direção ao centro do sincício antes da celularização das antípodas se completar (Figura 29 e 32).

Tão logo a celularização se completa no aparelho oosférico, a oosfera pode ser discernida das sinérgides uma vez que a primeira não estabelece contato direto com o canal micropilar (Figura 33). Cada uma das sinérgides desenvolve um conspícuo vacúolo na região do citoplasma voltada para a célula central, e seus núcleos posicionam-se na região mediana da célula (Figuras 32, 33 e 34). O padrão de vacuolização se mostrou variável na oosfera, sendo que o vacúolo foi observado tanto voltado para o polo micropilar do citoplasma da oosfera (Figura 33) quanto em ambos os polos da célula (Figura 34). A organização tridimensional das células do aparelho oosférico é variável, de modo que em algumas secções a oosfera aparece ao lado de uma das sinérgides (Figuras 29-31), enquanto em outras secções observam-se as duas sinérgides lado a lado (Figura

32). Tanto as sinérgides como a oosfera, no ginófito maduro, são células piriformes, com a porção dilatada voltada para o polo calazal e a porção estreitada voltada para abertura interna do canal micropilar (Figura 33, 34 - porção inferior e 35).

No óvulo maduro, a célula central binucleada é ampla, ocupando a maior parte do SE e apresenta amiloplastos em seu citoplasma (sobretudo na região compreendida entre os núcleos polares). E exibe um vacuoma amplo e com conteúdo fibrogranular que se cora de magenta pelo azul de toluidina O e é tenuemente PAS-positivo (Figuras 33, 35 e 36). O aparelho oosférico expande-se durante a maturação do ginófito celularizado, invadindo a região micropilar da célula central, de tal modo que um estreito espaço preenchido pelo citoplasma da célula central interpõe-se entre o envoltório do SE e as laterais do aparelho oosférico. Assim, o aparelho oosférico se mantém em contato direto com o envoltório do SE apenas na sua extremidade micropilar. No saco embrionário tardio, os núcleos polares se fundem formando o núcleo secundário (dados não apresentados). As antípodas persistem até os estádios iniciais do desenvolvimento do endosperma, Entre elas se constitui o aparelho filiforme, que se cora de roxo pelo azul de toluidina O e é ligeiramente PAS-positivo (Figuras 34 - porção inferior e 35). Não se verificou sincronia entre os eventos da ginosporogênese e da ginogametogênese, entre os óvulos de um mesmo ovário.

Discussão

As placentas nos estádios iniciais do desenvolvimento do ovário, bem como os primórdios dos óvulos em *C. antisyphilitica* apresentam organização histológica do tipo túnica e corpo, na qual a túnica é constituída pelas camadas dérmica (zona I), com divisões celulares apenas anticlinais e subdérmica (zona II), onde predominam divisões anticlinais, mas ocorrem também eventuais divisões oblíquas e periclinais. O corpo corresponde à região central (zona III) sem um padrão regular de divisões celulares. Esta classificação dos primórdios ovulares segundo sua zonação

histológica tem por base o paralelo feito por Bouman (1974, 1984) entre a organização celular dos meristemas apicais e dos primórdios ovulares.

Os únicos trabalhos realizados em Bignoniaceae, que relatam a organização histológica do primórdio ovular em zonas são os realizados por Galati & Strittmatter (1999) em *J. mimosifolia*, a qual apresentou óvulos bizonados – i.e., iniciados por divisões periclinais na camada subdérmica da placenta. Conseqüentemente, são menores e recobertos apenas pela camada dérmica que se divide apenas anticlinalmente (Bouman 1984). Bittencourt & Mariath (2002a) relatam para *H. pulcherrimus* a presença de primórdios ovulares trizonados. Segundo Bouman (1984), a ampla ocorrência de óvulos trizonados em famílias de angiospermas primitivas bem como nas derivadas sugere que primórdios ovulares trizonados são basais dentro das plantas com flores. Portanto, a ocorrência de primórdios ovulares bizonados em *J. mimosifolia*, uma espécie pertencente a um gênero mais basal dentro de Bignoniaceae (Grose & Olmstead, 2007), revela que este estado de caráter foi adquirido independentemente dentro do táxon; contudo, são necessárias análises em outros gêneros e espécies quanto a este caráter, as quais poderão corroborar ou não tal proposição.

O óvulo em *C. antisiphilitica* é anátropo, unitegmentado e tenuinucelado. O tegumento é iniciado a partir da camada dérmica por divisões periclinais de suas células. Divisões periclinais também ocorrem na camada subdérmica e são responsáveis por impelir as células da camada dérmica em direção à extremidade distal do nucelo. Este mesmo padrão de desenvolvimento inicial do tegumento foi também verificado em *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath, 2002a). Bouman & Schier (1979) relataram que em plantas simpétalas e unitégmicas o tegumento nem sempre se origina exclusivamente da camada dérmica, mas também parcial ou totalmente da camada subdérmica. Galati & Strittmatter (1999), descreveram um padrão diferente para *J. mimosifolia* no qual apenas a camada dérmica toma parte do desenvolvimento do tegumento.

A micrópila se organiza no estágio de CMSE para *C. antisiphilitica* e este mesmo padrão foi observado por Merha & Kulkarni (1985) em *T. rosea*, *S. chelonoides* e *D. falcata*; contudo, segundo os mesmos autores, para *M. hortensis* e *F. adenophylla* a organização da micrópila é concluída no

estádio de tetrade linear de ginósporos. Bittencourt & Mariath (2002a) reportaram para *Handroanthus pulcherrimus* que a micrópila também se organiza, geralmente, no estágio de tetrade linear de ginósporos.

A formação da hipóstase também é um traço característico em Bignoniaceae (Gonvidu 1950, Ghatak 1956, Mehra & Kulkarni 1985, Galati & Strittmatter 1999), sendo que este tecido pode estar envolvido na inibição do crescimento agressivo do haustório calazal no tecido calazal da semente em desenvolvimento (Mehra & Kulkarni 1985). Galati & Strittmatter (1999) relataram em *J. mimosifolia* a presença abundante de polissacarídeos insolúveis nas paredes das células da hipóstase, sugerindo que este tecido também possa atuar como reserva de carboidratos para o desenvolvimento do endosperma. De fato, muitos autores consideram que a principal função da hipóstase é suprir o ginófito com nutrientes, embora os mecanismos sugeridos difiram para cada autor (Tilton 1980, Boesewinkel & Bouman 1984, Batygina & Shamrov 1999). A hipóstase, em algumas espécies de Bignoniaceae, persiste até estádios avançados do desenvolvimento do saco embrionário e, posteriormente, durante os estádios iniciais do desenvolvimento do endosperma (Bittencourt *et al.* 2011), também pode originar células precursoras de embriões adventícios (Costa *et al.* 2004, Souza *et al.* 2005), embora estudos prévios em *C. antisiphilitica* (Bittencourt *et al.* 2011, Ortolani *et al.* 2008) não tenham indicado a ocorrência de tal fenômeno.

A meiose da CMG origina uma tetrade linear de ginósporos, dos quais apenas o ginósporo calazal se desenvolve, dando origem a um saco embrionário monospórico e do tipo *Polygonum*, em concordância com as espécies de Bignoniaceae estudadas previamente (Davis 1966, Johri *et al.* 1992, Swamy 1941, Gonvidu 1950, Ghatak 1956, Mehra & Kulkarni 1985, Galati & Strittmatter 1999, Bittencourt & Mariath 2002a e 2002b, Souza *et al.* 2005, Sampaio 2007, Renó *et al.* 2007, Souza *et al.* 2008). Na espécie presentemente estudada, a face micropilar da parede celular do ginósporo calazal encurva-se em direção ao centro da célula até formar uma pequena depressão, no lado voltado para a micrópila, no fundo da qual a parede celular se torna mais espessada. Tal

estrutura parece constituir um caráter autapomórfico de *C. antisiphilitica*, pois não foi relatado para nenhuma outra espécie da família.

Durante a meiose foi observada a deposição de calose nas paredes transversais das díades e das tétrades. Provavelmente, tal deposição favorece o desenvolvimento do ginósporo calazal, uma vez que dificulta a translocação de nutrientes para os ginósporos micropilares (Kapil & Tiwari 1978). No óvulo, a calose pode funcionar como um filtro molecular ou nutricional diminuindo a permeabilidade da parede celular, portanto permitindo que cada ginósporo siga uma via independente de desenvolvimento (Bouman 1984). O posicionamento privilegiado da CMG em relação à calaza também seria um fator positivo para esse desenvolvimento, devido à função de nutrição da hipóstase e o fato desta estar contígua à CMG, como proposto por Bittencourt & Mariath (2002a) para *H. pulcherrimus*.

Kapil & Tiwari (1978) definem como endotélio a epiderme interna do tegumento interno nos óvulos bitegmentados ou epiderme interna do tegumento único, nos óvulos unitegmentados. Endress (2010) relata que os óvulos de Lamiales, de maneira geral, possuem tal estrutura. As células deste tecido são, via de regra, alongadas radial ou tangencialmente, possuem citoplasma denso e núcleos proeminentes, muitas vezes poliploides (Kapil & Tiwari 1978). Em *C. antisiphilitica*, as células do endotélio apresentaram núcleos volumosos com nucléolos evidentes e citoplasma denso, possuem um formato radialmente alongado, sobretudo, em estádios mais adiantados do desenvolvimento do SE, apresentando mais de uma camada celular. O endotélio canaliza nutrientes para o SE em desenvolvimento (Kapil & Tiwari 1978). A presença de grande número de amiloplastos no endotélio de *C. antisiphilitica*, portanto, estaria de acordo com a função de suprir o ginófito nutricionalmente.

A partir do estágio bicelular, progressivamente, o SE se torna claviforme devido à expansão tanto em diâmetro quanto em comprimento da sua porção distal, invadindo regiões originalmente ocupadas por células das camadas mais internas do endotélio. A apoptose das células do endotélio provavelmente é, de algum modo, induzida pela expansão da porção micropilar do SE. A apoptose

das células deste tecido assim como da epiderme nucelar, apenas na região micropilar do óvulo, é observada por diversos autores em espécies de Bignoniaceae (Mauritzon 1935, Swamy 1941, Govindu 1950, Ghatak 1956, Mehra & Kulkarni 1985, Galati & Strittmatter 1999). As células da epiderme nucelar de *C. antisiphilitica*, parecem estar envolvidas em num processo de secreção holócrina, pois uma substância de aspecto granular se acumula entre o protoplasto e a parede voltada para o ginófito, nos estádios iniciais da ginogametogênese. As células endoteliais em contato com a porção micropilar do ginófito em expansão também se degeneram e parecem estar envolvidas num processo de secreção, o que pode estar relacionado tanto com o fornecimento de nutrientes para o SE como com a ampliação do espaço requerido para o desenvolvimento normal do ginófito. Próximo à maturidade do ginófito, ocorre o acúmulo de secreção em sua porção média, na altura em que se localizam os remanescentes da epiderme nucelar colapsada. A substância acumulada parece ser a mesma secretada pela epiderme nucelar em estádios precedentes, bem como a que se cora de magenta pelo azul de toluidina O e é tenuemente PAS-positiva, estando presente em praticamente todos os estádios de desenvolvimento nos vacúolos da maioria das células do SE e mesmo nas células dos tecidos esporofíticos que o envolvem. Esta substância se deposita entre o endotélio e a parede do ginófito fazendo com que o SE apresente um característico afunilamento mediano. Esta conformação não foi descrita pra nenhuma outra espécie já estudada de Bignoniaceae, consistindo em outra possível característica autapomórfica de *C. antisiphilitica*.

Após três ciclos mitóticos sucessivos, forma-se um SE com oito núcleos e sete células. A unidade reprodutiva feminina, definida como “o número mínimo de células necessário para receber o conteúdo do tubo polínico e realizar a dupla fecundação” (HIGASHIYAMA *et al.* 2001) é, portanto, constituída da célula central, da oosfera e das duas sinérgides. O fato da parede das sinérgides e a oosfera só se aderirem ao envoltório do SE pela porção micropilar caracteriza o aparelho oosférico como do tipo pendente (“hooked”). Tal característica foi relatada para as demais Bignoniaceae estudadas (Mauritzon 1935, Swamy 1941, Govindu 1950, Ghatak 1956, Davis 1966,

Mehra & Kulkarni 1985, Johri *et al.* 1992; Bittencourt & Mariath, 2002b) e parece ser característica da família.

As características embriológicas referentes à ontogenia do SE em *C. antisiphilitica*, em linhas gerais, se assemelham àquelas publicadas para outras espécies pertencentes ao grupo “*Tabebuia alliance*” do qual a espécie estudada faz parte. Contudo, a configuração da parede distal do ginósporo calazal e o acúmulo de secreção na porção mediana do saco embrionário são características não relatadas para outras espécies da família e muito menos em “*Tabebuia alliance*”, podendo constituir caracteres autapomórficos para *C. antisiphilitica*.

Agradecimentos

À FAPESP pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho e à CAPES pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor.

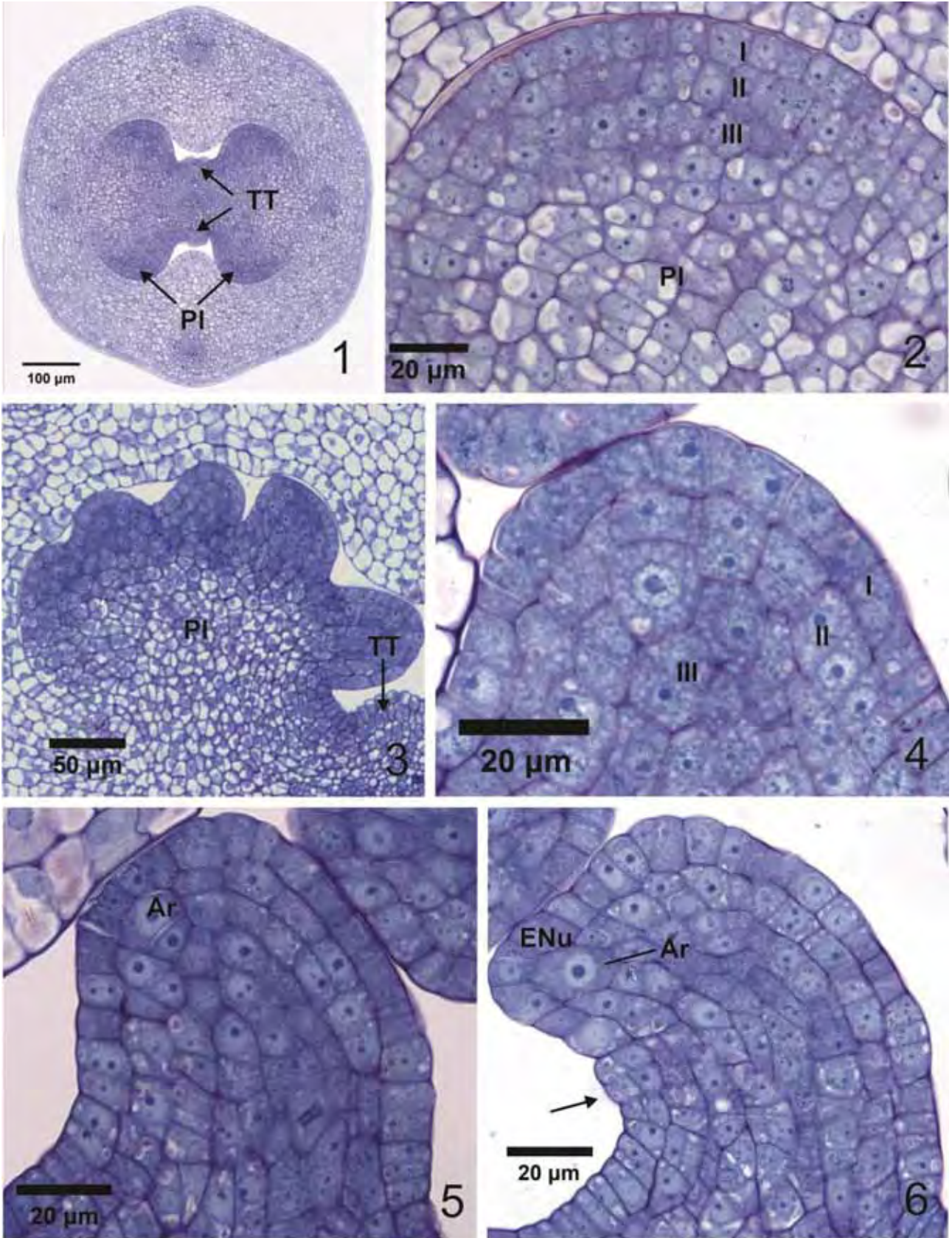
Referências

- BITTENCOURT JR., N. S.; MARIATH, J. E. A. 2002a. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): Megasporogenesis and integument development. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 103-115.
- BITTENCOURT JR., N. S. & MARIATH, J. E. A. 2002b. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): Embryo Sac Development. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 117-127.
- BITTENCOURT JR., N. S. ; PEREIRA JR., E. J. ; São Thiago, P. S. ; SEMIR, J. 2011. The reproductive biology of *Cybistax antisyphilitica* (Bignoniaceae), a characteristic tree of the South American savannah-like “Cerrado” vegetation. *Flora* (2011), doi:10.1016/j.flora.2011.05.004.
- BOESEWINKEL, F. D. & BOUMAN, F. 1984. The seed: structure. In: JOHRI, B.M. *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag, p. 567-610.
- BOUMAN, F. 1974. Developmental studies of the ovule integuments and seed in some angiosperms. PhD thesis, University of Amsterdam, Naarden.
- BOUMAN, F. & SCHIER, S. 1979. Ovule ontogeny and seed coat development in *Gentiana*, with a discussion on the evolutionary origin of the single integument. *Acta Botanica Neerlandica*, v. 28, p. 467-478.
- BOUMAN, F. 1984. The ovule. In *Embryology of Angiosperms* (B.M. Johri, ed.). Springer-Verlag, Berlin, p.123-157.
- COSTA, M. E.; SAMPAIO, D. S.; PAOLI, A. A. S.; LEITE, S. C. A. L. Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 27, n. 2, p.395-406.
- DAVIS, O. L. 1966. *Systematic embryology of the Angiosperms*. Nova Iorque: John Wiley & Sons, Inc., 528 p.

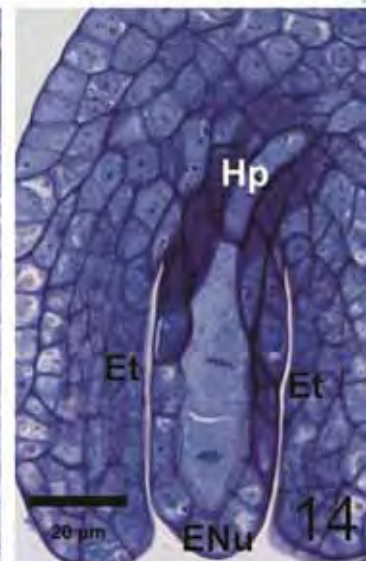
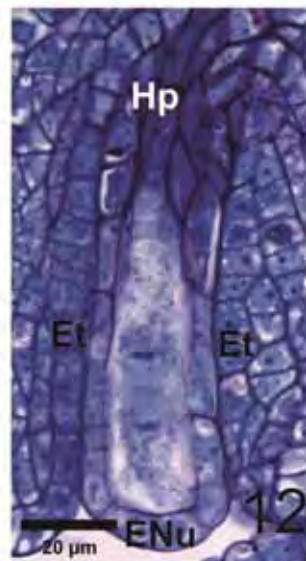
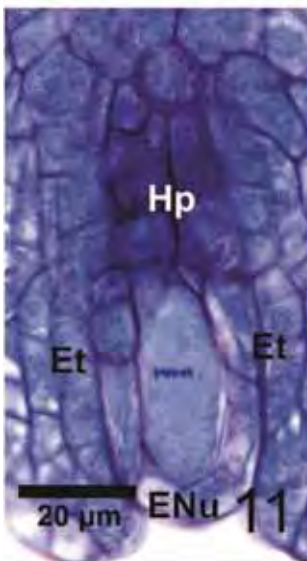
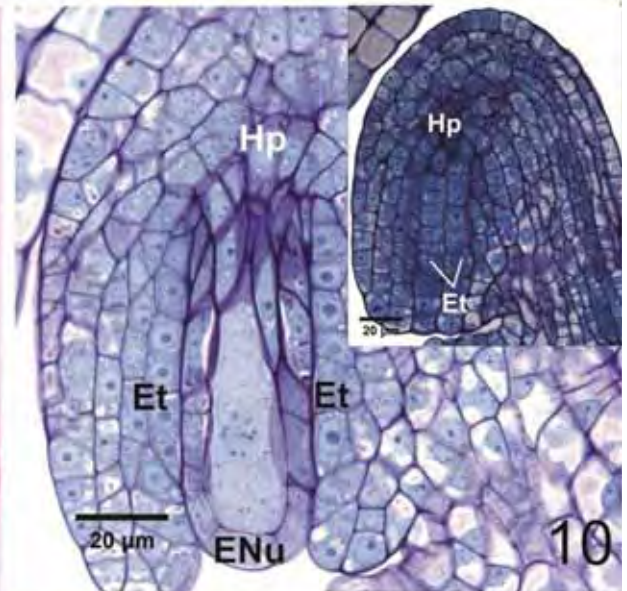
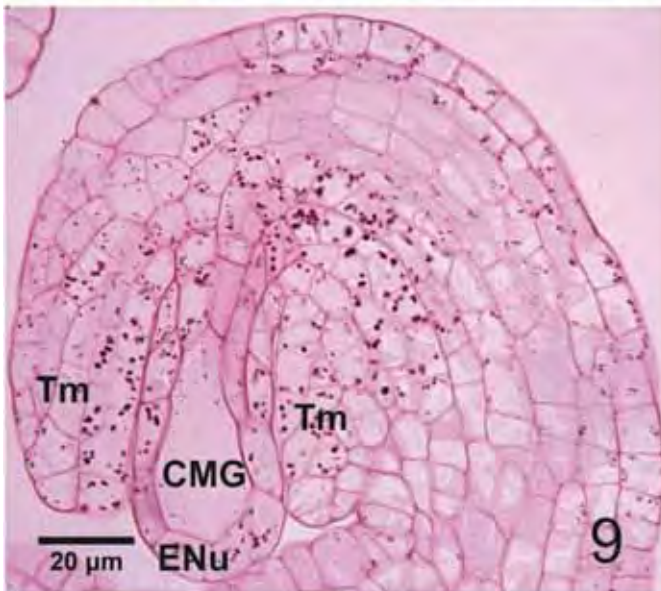
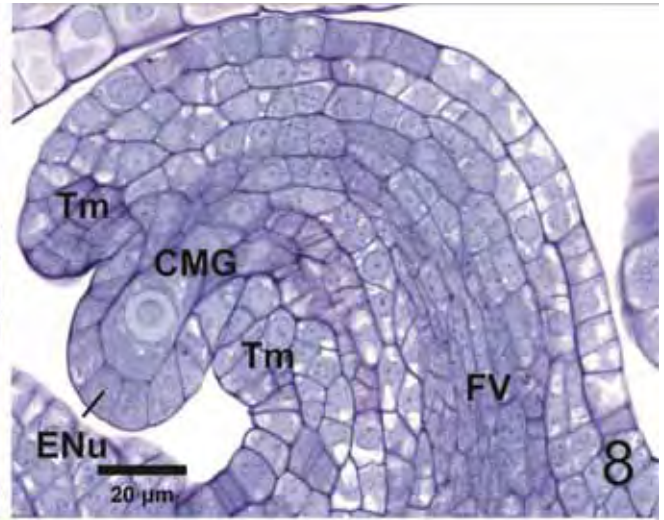
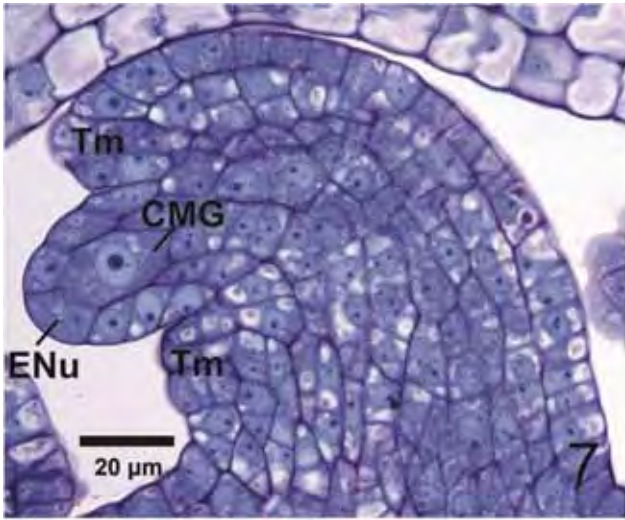
- ENDRESS, P. K. 2010. Flower Structure and Trends of Evolution in Eudicots and Their Major Subclades. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 97, n. 4, p.541-583.
- ENDRESS, P. K. 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany*, v.107, n. 9, p. 1465-1489.
- ESCHRICH, W. & CURRIER, H. B. 1964. Identification of callose by its dichrome and fluorochrome reactions. *Stain Technology*, Baltimore, v. 39, p. 303-307.
- GALATI, B. G.; ROSENFELDT, S.; TOURN, G. M. 2006. Embryological studies in *Lotus glaber* (Fabaceae). *Annales Botanici Fennici* v. 43, p. 97–106.
- GALATI, B. G. & STRITTMATTER, L. I. 1999. Ovule Ontogeny and Megasporogenesis in *Jacaranda mimosifolia* D. Don. (Bignoniaceae). *Phytomorphology*, Jodhpur, v. 49, n. 1, p.67-74.
- GENTRY A. H. 1992. Bignoniaceae - Part II (Tribe Tecomeae). *Flora Neotropica: Monograph 25* (II). Organization for Flora Neotropica, Nova Iorque.
- GHATAK, J. 1956. A contribution to the life history of *Oroxylum indicum* Vent. *Proceedings of the Indian Academy of Science B*, v.43, p. 72-87.
- GOVINDU, H. C. 1950. Studies in the embryology of some members of Bignoniaceae. *Proceedings of the Indian Academy of Science B*, v. 32, p. 164-178.
- GROSE, S. O. & OLMSTEAD, R. G. 2007. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). *Systematic Botany*, Laramie, v. 32, p. 660-670.
- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B.; SRIVASTAVA, P. S. 1992. Comparative embryology of Angiosperms. Berlin: Springer, 1221 p.
- KAPIL, R. N. & TIWARI, S. C. 1978. The integumentary tapetum. *The Botanical Review* 44:457-490.
- LORENZI, H. 2002. Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 4^a edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

- MAURITZON, J. 1935. Etwas über die Embryologie der Bignoniaceen. *Botaniska Notiser*, Lund, v. 1935, p. 60-77.
- McDOWELL, E. M. & TRUMP, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, Chicago, v. 100, p. 405-414.
- MEHRA, K. R. & KULKARNI, A. R. 1985. Embryological studies in Bignoniaceae. *Phytomorphology*, v. 35, p. 239-251.
- O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M. E. 1981. *The Study of Plant Structure Principles and Selected Methods*. Melbourne: Termarcarphi Pty.
- OLMSTEAD, R. G.; ZJHRA, M. L.; LOHMANN, L. G.; GROSE, S. O.; ECKERT, A. J. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *American Journal of Botany*, Baltimore, v. 96, p. 1731- 1743.
- ORTOLANI, F. A.; MATAQUEIRO, M. F.; MORO, J. R.; MORO, F. V.; DAMIÃO FILHO, C. F. 2008. Morfo-anatomia de plântulas e número cromossômico de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae). *Acta Botânica Brasílica*, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 345-353.
- RENÓ, L. R.; MOSCHETA, I. S.; BRACCINI, A. L. 2007. Morfo-anatomia do fruto e semente de amarelinho (*Tecoma stans* (L.) Kunth - Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, Pelotas, v. 29, n. 3, p. 18-30.
- RUDALL, P. J. 2006. How many nuclei make an embryo sac in flowering plants? *Bioessays*, Cambridge, v. 28, n. 11, p. 1067-1071.
- SAMPAIO, D. S.; COSTA, M. E.; PAOLI, A. A. S. 2007. Ontogenia da semente de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 289-302.
- SCHNARF, K. 1931. *Vergleichende Embryologie der Angiospermen*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Baltimore, v. 21, p. 73-80.

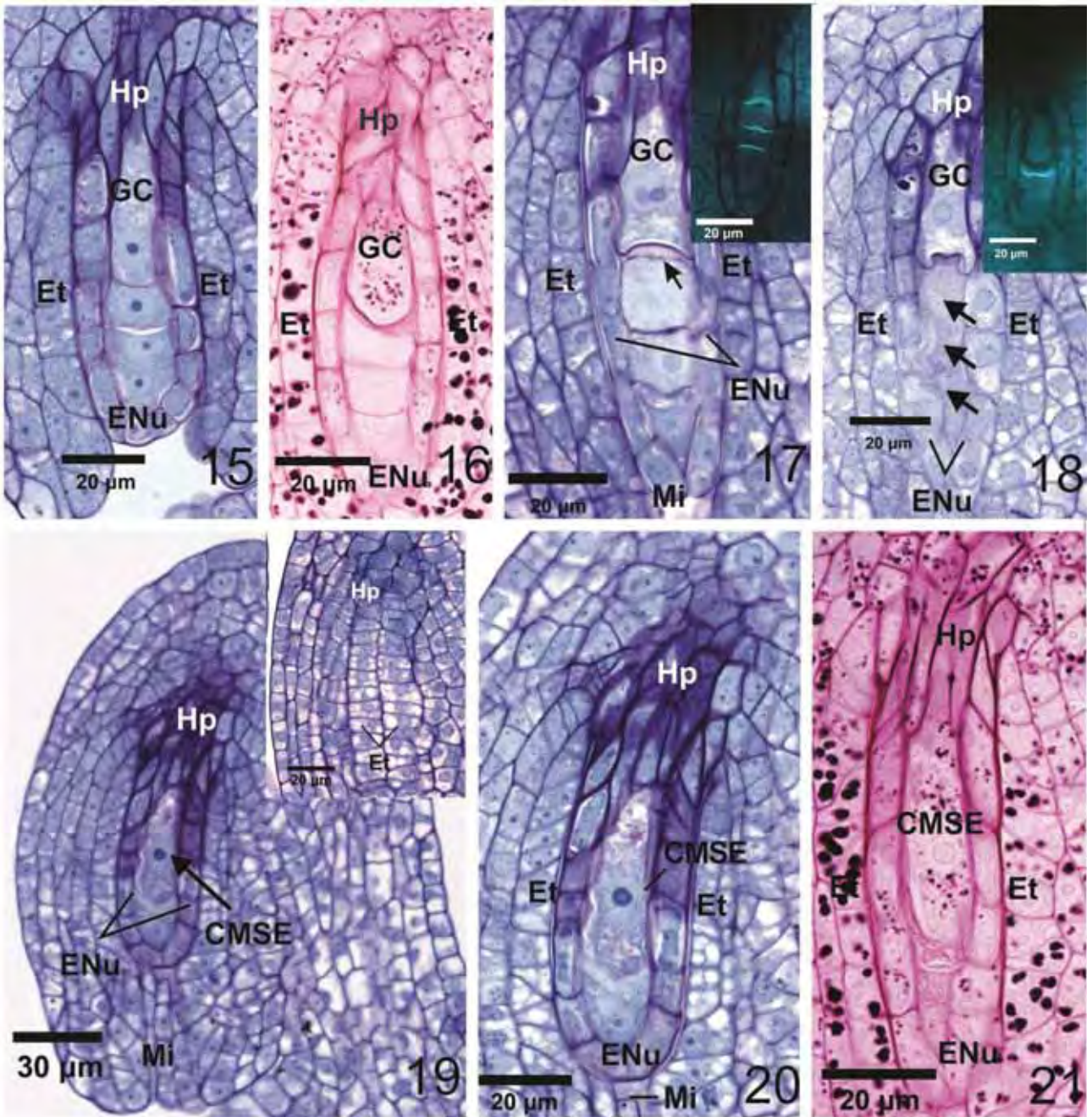
- SOUZA, L. A.; IWAZAKI, M. C.; MOSCHETA, I. S. 2005. Morphology of the pericarp and seed of *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. (Bignoniaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 48, n. 3, p. 407-418.
- SOUZA, L. A.; DE OLIVEIRA OYAMA, S.; MUNERATTO, J. C. 2008. Morfología y anatomía del fruto en desarrollo de *Macfadyena unguis-cati* (L.) A. H. Gentry, Bignoniaceae. Acta Botanica Venezuelica, Caracas, v.31, n.1, p. 1-14.
- HIGASHIYAMA, T.; YABE, S.; SASAKI N.; NISHIMURA, Y.; MIYAGISHIMA, S.; KUROIWA, H.; KUROIWA, T. 2001. Pollen Tube Attraction by the Synergid Cell. Science, v. 293, p. 1480-1483.
- TILTON, V.R. 1980. Hypostase development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae), and notes on the other types of modifications in chalaza of Angiosperm ovules. Canadian Journal of Botany, Ontário, v. 58, p. 2059-2066.



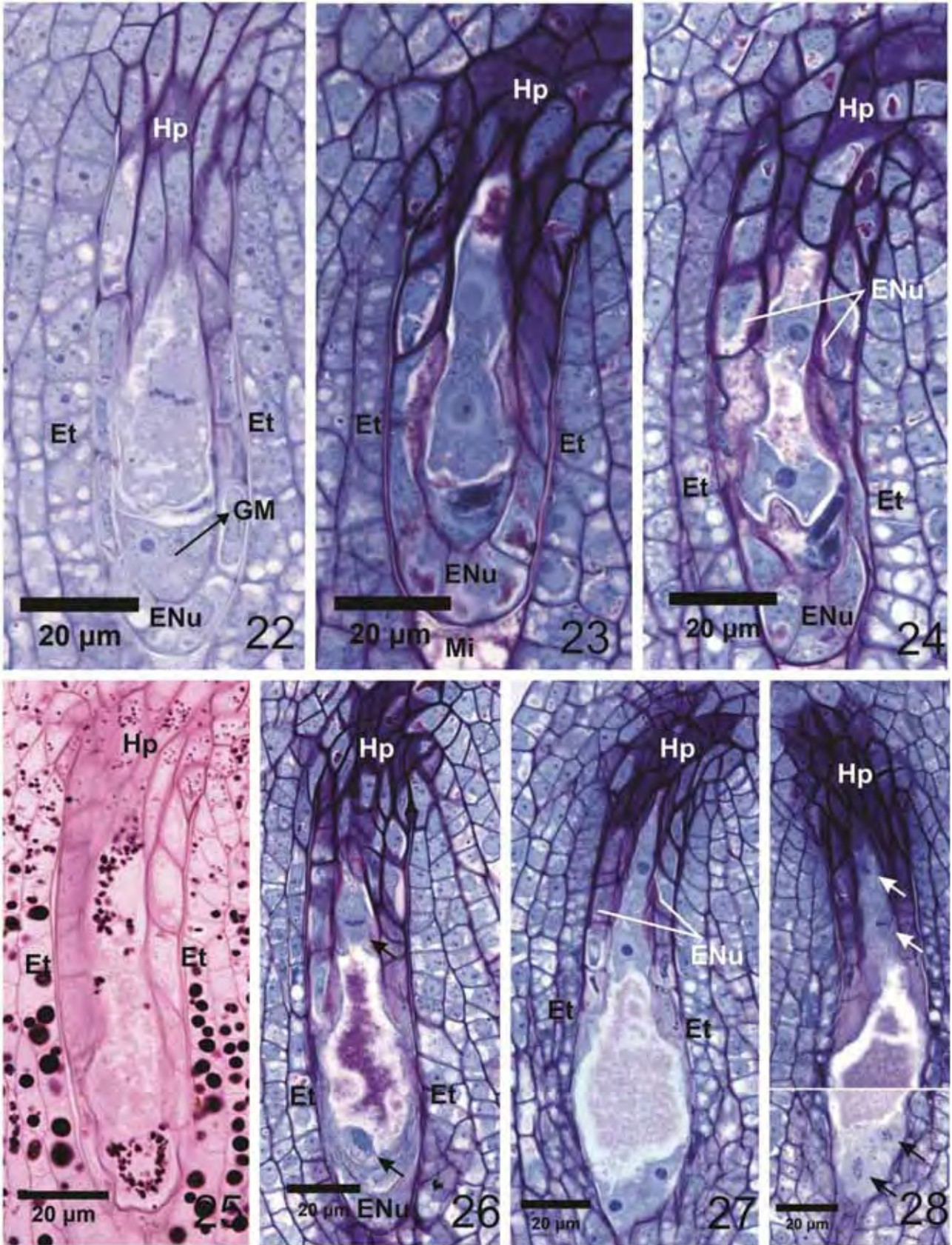
Figuras 1-6: Secções longitudinais de óvulos de *C. antisiphilitica* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (1) Visão geral do ovário. (2) Detalhe de uma das placentas evidenciando sua estrutura trizonada, antes da emergência dos óvulos. (3) Placenta com primórdios ovulares emergentes. (4) nucelo com estrutura trizonada I, II, III. (5) Nucelo com célula arquespórica recém diferenciada. (6) Óvulo com célula arquespórica recém-diferenciada, setas indicam divisões na camada dérmica que iniciam o desenvolvimento do tegumento. Colorações: azul de toluidina O. Ar – arquespório; ENu – epiderme nucelar; Pl – placenta e TT – tecido transmissor.



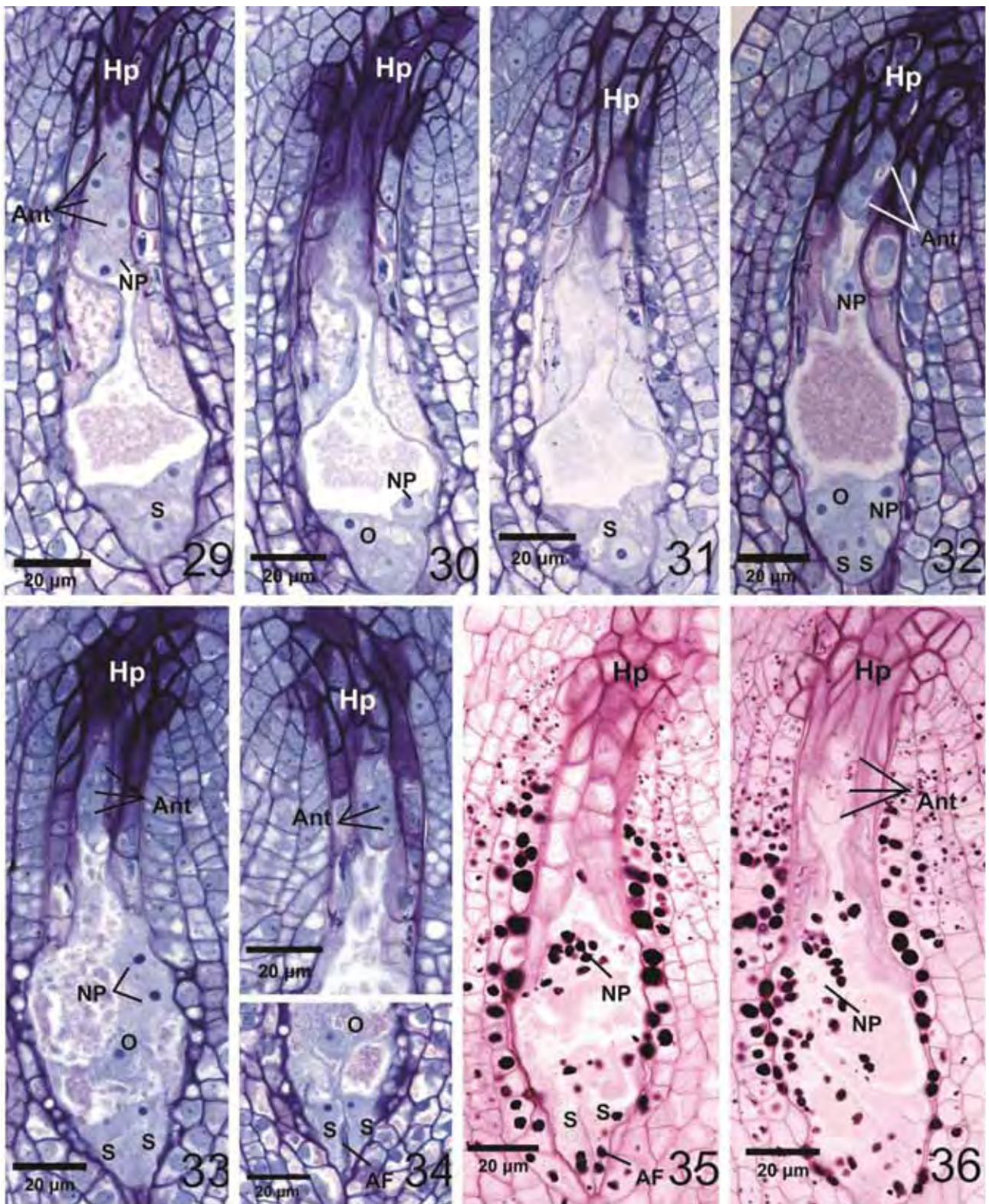
Figuras 7-14: Secções longitudinais de óvulos de *C. antisyphilitica* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (7-8) Diferenciação da célula arquespórica em CMG, células originadas da camada subdérmica passam a contribuir na formação do tegumento. (9) Estádio subsequente (amiloplastos). (10) Prófase I da CMG; inserção na porção superior direita mostra formato tangencialmente alongado das células do endotélio. (11) Metáfase I da CMG. (12) Telófase I da CMG, com formação de fragmoplasto. (13) Díade com núcleos em prófase II da CMG. (14) Metáfase II da CMG. Colorações: 7,8 e 10-14 – azul de toluidina O; 9 – PAS. CMG – célula-mãe dos ginósporos; Et – endotélio; FV – feixe vascular; Hp – hipóstase; Tm – tegumento.



Figuras 15-21: Secções longitudinais de óvulos de *C. antisyphilitica* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (15) Tétrade de ginósporos em estágio inicial de desenvolvimento. (16) Tétrade de ginósporos evidenciando distribuição dos amiloplastos. (17) Tétrade de ginósporos, seta mostra deposição de calose; inserção no canto superior direito destaca a deposição de calose numa tétrade no mesmo estágio de desenvolvimento. (18) Ginósporo calazal apresentando depressão em sua face micropilar, setas indicam resquícios dos ginósporos micropilares degenerados; inserção no canto superior direito demonstra a deposição de calose na parede distal do ginósporo calazal num estágio posterior de desenvolvimento. (19) Célula-mãe do saco embrionário diferenciada em menor aumento, bordas do tegumento se encontram no topo do nucelo formando a micrópila. Inserção na porção superior direita mostra formato tangencialmente alongado das células do endotélio. (20-21) Célula mãe do saco embrionário em maior aumento. Colorações: 15, 17-20 – azul de toluidina O; 17 e 18-inserção – azul de anilina; 16 e 21 - PAS. CMSE – célula-mãe do saco embrionário; GC – ginósporo calazal; Mi – micrópila;



Figuras 22-28: Secções longitudinais de óvulos de *C. antisyphilitica* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (22) Célula-mãe do saco embrionário (CMSE) no primeiro ciclo de duplicação mitótico. (23-25) Saco embrionário binucleado no estádio inicial e tardio. (26) segunda cariocinese do saco embrionário, setas apontam placas metafásicas. (27) Saco embrionário em estádio tetranucleado. (28) Secções seriadas de um mesmo óvulo no terceiro e último ciclo de duplicação mitótica do saco embrionário, setas apontam placas metafásicas. Colorações: 22-24 e 26-28 – azul de toluidina O; 25- PAS.



Figuras 29-36: Secções longitudinais de óvulos de *C. antisyphilitica* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (29-31) Secções seriadas de um mesmo óvulo octanucleado em processo de celularização; (32) Óvulo no estádio octanucleado no qual se iniciou o processo de celularização na porção micropilar do saco embrionário. (33) Saco embrionário (do tipo *Polygonum*) celularizado próximo à maturidade (34) Secções de óvulos diferentes demonstrando: Porção superior: organização triangular das antípodas, porção inferior: aparelho oosférico pertencente a um saco embrionário maduro, aparelho filiforme se torna evidente. (35-36) Saco embrionário maduro. Colorações: 29-34 – azul de toluidina O; 35 e 36 – PAS. AF – aparelho filiforme; Ant – antípodas; NP – núcleo polar; O - oosfera; S – sinérgide.

VI. Capítulo II

Ontogenia da Antera de *Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae)

EDUARDO JOÃO PEREIRA JUNIOR^{1,3}; NELSON SABINO BITTENCOURT JÚNIOR²

¹ Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo, 2265.
Bairro: Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo, 2265.
Bairro: Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, Departamento de Zoologia e Botânica, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
nesbitte@ibilce.unesp.br

³ Autor para correspondência: eduardojpjr@yahoo.com.br

Abstract

In this study, microsporogenesis, microgametogenesis and development of the tapetum and other anther parietal layers were investigated in *Cybistax antisiphilitica* to provide embryological data for the Bignoniaceae taxonomy. The formation of the microsporangium wall follows a modified Dicotyledoneous type, and sporogenous tissue is organized in a row of horseshoe outlined cells. The tapetum is secretory and shows dual origin, with the inner tapetal layer originating from the connective meristem, and the outer layer differentiating directly from the inner secondary parietal layer. The tapetal layers are dimorphic, although becoming similar at the late pre-meiotic stage. The inner tapetal layer differentiates earlier than the outer one, and all the developmental events showed by the former, including cycles of nuclear duplication and fusion, are also displayed by the later after a short delay. After meiosis, the dimorphism is accentuated between the two tapetal layers, because the inner tapetal become anticlinally elongated. In the sporogenous tissue, after a period of reduction in cell division frequency, there is an increase in cell volume that marks their differentiation in microspore mother-cells, followed by deposition of a callose secondary wall and the formation of amyloplasts in the cytoplasm. The meiocytes undergo meiosis and simultaneous cytokinesis results tetrahedral tetrads of microspores. After the release of microspores from the callose wall, the sporoderm consists of a pecto- cellulose intine and a reticulate exine. The microspore mother cell amyloplasts are inherited by the microspores and the resulting pollen grains. The pollen grain amyloplasts gradually increasing in number and size in a single amylogenesis/amylolyse cycle. Mature pollen no more shows starch grains, and the generative cell becomes elongated and associates with the vegetative cell nucleus. *Cybistax antisiphilitica* showed a multistratified fibrous endothecium restricted to four sites within the anther and a period in which there was attenuation of dimorphism between the tapetal layers, like reported for *Handroanthus* genera.

Key Words: Embryology, tapetum, endothecium, sporoderm, pollen.

Resumo

Neste estudo, foi investigada a androsporogênese, a androgametogênese e o desenvolvimento do tapete e das demais camadas parietais da antera em *Cybistax antisiphilitica* com o propósito de fornecer subsídios à taxonomia de Bignoniaceae. A formação da parede do androsporângio é uma variação do tipo Dicotiledôneo e o tecido esporogênico se organiza numa fileira de células em formato de ferradura. O tapete é secretor, possui origem dual, com a camada tapetal interna se originando do meristema do conectivo e a camada externa se diferenciando diretamente da camada parietal secundária interna. As camadas tapetais são dimórficas, embora ao final do estágio pré-meiótico se tornem similares. A camada tapetal interna diferencia-se precocemente em relação à externa, e todos os eventos observados, incluindo os ciclos de duplicação e fusão nucleares, são exibidos com atraso pela camada parietal externa, caracterizando um lapso ontogenético. Depois da meiose, o dimorfismo se acentua novamente nas camadas tapetais. No tecido esporogênico, após a diminuição da frequência de divisões celulares, ocorre o aumento volumétrico de suas células que caracteriza a sua diferenciação em células mãe dos andrósporos, seguido da deposição da parede de calose e formação amiloplastos no citoplasma. Os meiócitos sofrem meiose e a citocinese simultânea origina tétrades de andrósporos. Após liberação dos andrósporos da parede de calose, a esporoderme é constituída por intina de natureza pectocelulósica e exina reticulada. Os amiloplastos das células-mãe dos andrósporos são herdados pelos andrósporos e grãos de pólen deles resultantes. Os amiloplastos dos grãos de pólen gradualmente aumentam em número e tamanho em um único ciclo de amilogênese/amilólise. No grão de pólen maduro, a célula generativa torna-se alongada associa-se ao núcleo da célula vegetativa, não apresentando mais grãos de amido no citoplasma. *Cybistax antisiphilitica* apresentou endotécio fibroso multiestratificado restrito a quatro sítios dentro da antera e um período no qual houve atenuação do dimorfismo entre as camadas tapetais, assim como reportado para o gênero *Handroanthus*.

Palavras-chave: Embriologia, tapete, endotécio, esporoderme, pólen.

Introdução

Caracteres embriológicos possuem valor sistemático e sua utilidade foi demonstrada por diversos autores para elucidar o posicionamento filogenético de certas famílias de angiospermas (Tobe 1989). Juntamente com dados moleculares e paleontológicos, caracteres embriológicos podem ser usados para reconstruir a história evolutiva das angiospermas. Por isso, são necessários amplos estudos embriológicos que, por sua vez, demandam muito tempo (Płachno & Świątek 2009).

Contudo, o conhecimento sobre características embriológicas básicas ainda é quase nulo em muitas famílias de angiospermas e estudos comparativos são realmente necessários, pois a maior parte da produção do conhecimento em Embriologia Vegetal concentrou-se, entre as décadas de 1930 e 1970, tendo sido obtida em universidades indianas (Endress 2005). Após este período, embora haja um acréscimo lento do conhecimento nesse ramo da ciência, nunca mais houve desenvolvimento concentrado de investigações em embriologia de plantas em nenhum lugar do mundo, assim como não mais houve intensa produção na área (Endress 2005).

A família Bignoniaceae é composta por aproximadamente 827 espécies distribuídas em 82 gêneros, constituindo um importante componente das florestas neotropicais (Lohmann & Ulloa 2007). Estudos ontogenético em anteras de espécies de Bignoniaceae tiveram início no final do século XIX com o trabalho de Duggar (1899) sobre a androsporogênese e alguns outros aspectos do desenvolvimento do grão de pólen de *Pyrostegia venusta* (= *Bignonia venusta*). Na maioria das espécies analisadas o desenvolvimento da parede da antera é classificado como do tipo Dicotiledôneo, segundo a classificação proposta por Davis (1966). Em secção transversal, o tecido esporogênico em cada androsporângio possui um formato de ferradura e o tapete possui origem dual, derivando-se parcialmente da camada parietal secundária interna e parcialmente do meristema do conectivo (Gupta & Nanda 1978 a-c, Mehra & Kulkarni 1985, Bittencourt 1996; Bittencourt & Mariath 1997, Galati & Strittmatter 1999b). Tal como em outras angiospermas, durante a

diferenciação das células-mãe dos andrósporos (CMA) ocorre a deposição de uma espessa parede de calose entre a plasmalema e a parede celular primária destas células, o que as tornam isoladas umas das outras e em relação ao tapete (Gupta & Nanda 1978 a-c, Mehra & Kulkarni 1985, Bittencourt 1996; Bittencourt & Mariath 1997, Galati & Strittmatter 1999b). Após a meiose, a citocinese é simultânea, geralmente dando origem a tétrades com organização tetraédrica (Gupta & Nanda 1978 a-c, Mehra & Kulkarni 1985, Bittencourt 1996; Bittencourt & Mariath 1997, Galati & Strittmatter 1999b).

A primexina se diferencia antes da dissolução da parede de calose e da exposição dos andrósporos às secreções provenientes das células do tapete, com exceção dos locais nos quais haverá a formação dos colpos do grão de pólen. Em estádios posteriores, quando a calose começa a se dissolver, inicia-se a deposição da exina. Na maturidade do andrófito o citoplasma da célula vegetativa está repleto de grãos de amido e a célula generativa se torna fusiforme (Gupta & Nanda 1978 a-c, Galati & Strittmatter 1999b, Mehra & Kulkarni 1985, Bittencourt 1996, Bittencourt & Mariath 2002).

A despeito do alto grau de conservação dos padrões de desenvolvimento revelados em estudos embriológicos de Bignoniaceae, existem aspectos da androsporogênese, da androgametogênese e do desenvolvimento das camadas parietais da antera que diferem entre as espécies. Por exemplo, ciclos de síntese e degradação de grãos de amido foram observados para muitas angiospermas durante o desenvolvimento do andrófito, existindo dois ciclos de amilogênese/amilólise, após a meiose, para várias dicotiledôneas (Pacini & Franchi 1988, Clement & Pacini 2001). Contudo, em *Handroanthus pulcherrimus*, há apenas um ciclo (Bittencourt & Mariath 2002), em *P. venusta*, *Tecoma stans* e *Spathodea campanulata* os grãos de amido são encontrados em todos os estádios de desenvolvimento do grão de pólen (Gupta & Nanda 1978 a-c, Rudramuniyappa & Mahajan 1991), embora nenhuma menção a critérios de verificação do montante de amiloplastos, em diferentes estádios de desenvolvimento do grão de pólen, tenha sido feita nos últimos trabalhos citados.

Outro aspecto estrutural variável é o dimorfismo entre as camadas tapetais interna e externa. Tal fenômeno foi relatado para *P. venusta* (Gupta & Nanda, 1978b), *T. stans* (Gupta & Nanda 1978c), *Jacaranda mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999b), *S. campanulata* (Rudramuniyappa & Mahajan, 1991) e *H. ochraceus* (Bittencourt 1996); porém, nesta última, as camadas tapetais se tornam idênticas após a maturidade das células-mãe dos andrósporos. Já em *H. pulcherrimus* houve relato apenas de um dimorfismo discreto (Bittencourt & Mariath 1997).

Entre as espécies de Bignoniaceae também ocorre variação estrutural no endotécio: em *H. ochraceus* (Bittencourt 1996), *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath 1997), *P. venusta* (Gupta & Nanda 1978b) e *T. stans* (Gupta & Nanda 1978c) o endotécio ocorre em quatro regiões entre o tapete externo e a epiderme, nos flancos de cada teca dentro da parede da antera, é multiestratificado, com espessamentos de parede celular helicoidais. Por outro lado, espessamentos em banda, restritos à parede tangencial interna das células do endotécio foram relatados em *J. mimosifolia* e nesta espécie o endotécio não está restrito a apenas quatro sítios na antera, mas sim a uma camada contínua subdérmica (Galati & Strittmatter 1999b).

A despeito de possíveis artefatos advindos de diferentes métodos de fixação e processamento do material botânico (Vasil 1967), as diferenças no desenvolvimento do andrófito, do tapete e das demais camadas parietais da antera podem ser elucidativas na compreensão da taxonomia do grupo. Todavia, são necessários mais estudos sobre ontogenia da antera, em diversas espécies da família Bignoniaceae, sem prescindir de descrições detalhadas sobre as metodologias utilizadas no preparo do material, bem como de uma postura crítica na comparação de dados obtidos em estudos realizados com o emprego de diferentes fixadores e meios de inclusão.

O propósito deste artigo é descrever a ontogenia da antera de *C. antisiphilitica* com atenção especial ao desenvolvimento do tapete e das demais camadas parietais, à androsporogênese e à androgametogênese, visando fornecer subsídios à taxonomia e contribuir para a compreensão do desenvolvimento das estruturas reprodutivas na família Bignoniaceae.

Material e Métodos

Cybistax Martius ex Meisner é um gênero monotípico e *C. antisiphilitica* (Figura 1) tem uma ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo naturalmente no território extra-amazônico do Brasil (exceto pelo nordeste) e nas áreas mais secas da vertente amazônica dos Andes peruanos, apresentando ainda uma população disjunta no extremo sul do Suriname (Gentry 1992). Trata-se de uma árvore decídua, muito comum no cerrado, sendo no Brasil utilizada na arborização urbana (Lorenzi 1992). Caracteriza-se por atingir de 1,5 a 20 m de altura e apresentar ramos prolépticos e decussados. Possui folhas palmadas com cinco a sete folíolos e inflorescências terminais do tipo tirso. As flores são verde-claras e tubulares, não possuem odor e permanecem semi-ocultas durante a floração devido ao desenvolvimento das inflorescências ser precedido pela formação de folhas jovens nos nós subjacentes, com coloração similar às flores (Figura 2). Os frutos dessa espécie são cápsulas loculicidas que liberam sementes aladas após a deiscência. *C. antisiphilitica* pertence a um clado monofilético interno em Bignoniaceae, constituído de árvores e arbustos de folhas palmadas (exceto por poucas espécies que provavelmente sofreram reversão à condição de folhas simples por redução no número de folíolos), denominada “*Tabebuia* alliance” (Grose & Olmstead 2007, Olmstead *et al.* 2009).

Flores e botões florais em vários estádios de desenvolvimento foram coletados em setembro e outubro, nos anos de 2009 e 2010, de quatro indivíduos localizados no município de São José do Rio Preto, SP, Brasil. Após a dissecação, as anteras foram fixadas em solução composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 1% e tampão fosfato pH 7,2, 0,1M (McDowell & Trump, 1976) e estocadas em álcool etílico 70%. Posteriormente, as peças foram infiltradas e emblocadas em historesina e seccionadas transversalmente em micrótomo rotatório Leica RM2255. As secções histológicas semisseriadas de 1-4 µm foram aderidas a lâminas de vidro e submetidas a testes histoquímicos e a coloração com azul de toluidina O (O’Brien & McCully, 1981) e montadas utilizando-se resina Permount®.

Os testes histoquímicos empregados foram o Ácido Periódico - Schiff (PAS) para detecção de polissacarídios insolúveis, precedido pelo tratamento das secções com bloqueador de aldeídos e o “Sudan black B” (O’Brien & McCully 1981) para detecção de substâncias apolares (lipídios insolúveis). Para a detecção de calose foi utilizado o método fluorocromático com azul de anilina (Eschrich & Currier 1964), e o vermelho de rutênio para a verificação de compostos ácidos, incluindo ácidos pécticos (Southworth 1973). Elementos do endotécio foram dissociados através do método de Jeffrey (Johansen 1940). Todo o material foi analisado em um microscópio óptico Zeiss Axioskop e fotografado em fotomicroscópio Olympus BX51, equipado com câmera digital Olympus Q-Color 5.

Resultados

Ontogenia das Camadas Parietais da Antera

Os estames surgem como protuberâncias elípticas da superfície receptacular entre os lobos da corola e uma estrutura central que irá originar o gineceu (Figura 3). Desde o início do desenvolvimento do androceu, o primórdio do estaminódio, em secção transversal, é menor que os primórdios de estames férteis (Figuras 3 e 4).

Em secção transversal, o emergente primórdio da antera exibe um contorno aproximadamente elíptico e é constituído de protoderme uniestratificada, meristema fundamental apresentando um gradiente de vacuolização crescente em direção a suas camadas celulares mais profundas, e um único cordão procambial centralmente posicionado (Figura 3). As células da protoderme passam apenas por divisões anticlinais, enquanto as células do meristema fundamental se multiplicam por divisões anticlinais, periclinais e oblíquas. A expansão vacuolar é iniciada em células da porção dorsal do meristema fundamental, progredindo para as células ao redor do procâmbio, sendo tal processo inerente à diferenciação do conectivo (Figuras 5-7). Após sua

emergência, a antera adquire um formato bilobular e a vacuolação passa a se processar em todo o meristema fundamental, com exceção da camada subdérmica e das células subjacentes em cada um dos lobos, as quais permanecem com alta densidade citoplasmática, núcleos centrais conspícuos e nucléolos evidentes (Figuras 5-6).

Com o desenvolvimento de um sulco em cada um dos lobos da antera (futuro estômio de cada teca) configura-se o estágio tetralobado (Figura 7). A camada subdérmica continua a apresentar as mesmas características histológicas descritas para o estágio anterior, salvo pelo fato desta ter se expandido lateralmente por meio de divisões anticlinais e pelas células localizadas junto ao futuro estômio que se apresentam mais vacuoladas que as situadas nos lobos (Figura 7). Esta camada continua a adicionar células também aos estratos mais profundos por divisões periclinais e oblíquas. É possível observar um gradiente crescente de vacuolação no meristema do conectivo em direção ao cordão procambial (Figura 7).

Nos estádios seguintes, os quatro lobos da antera tornam-se proeminentes e as tecas se individualizam por meio de reentrâncias nas superfícies dorsal e ventral da antera (Figura 9). As células da camada subdérmica, em cada um dos lobos, que retiveram as características próprias de células promeristemáticas, passam por divisões periclinais dando origem à camada parietal primária (CPP), voltada para a epiderme em diferenciação, e à camada esporogênica (CE), do lado interno (Figura 8). De maneira rápida e descontínua, as células da CPP sofrem divisão periclinal originando a camada parietal secundária externa (CPS_e), voltada para a epiderme, e a camada parietal secundária interna (CPS_i) adjacente à CE (Figura 10).

Posteriormente, a camada tapetal interna surge a partir da camada mais externa de células do meristema do tecido placentóide (conectivo), subjacente à CE. Estas células apresentam núcleos centralmente posicionados, tendem a se tornar anticlinalmente alongadas, apresentam vacúolos com formatos irregulares e citoplasma denso (Figura 11).

Na maior parte de sua extensão, a CPS_e sofre nova divisão periclinal originando duas camadas parietais com células retangulares, em secção transversal. Porém, em cada teca, nas

regiões compreendidas entre a epiderme e as extremidades das CEs opostas à reentrância estomial, a CPS_e origina múltiplas camadas celulares por divisões periclinais (Figura 11). Já as células da CPS_i não se dividem periclinamente e passam a apresentar citoplasma denso e vacúolos com formatos variáveis; esta camada se diferencia em camada tapetal externa (Figuras 11 e 12). Desde o seu surgimento, a camada tapetal externa difere morfológicamente da camada tapetal interna, devido à última possuir células anticlinalmente alongadas e algumas células binucleadas desde estádios bem precoces (Figura 11). Posteriormente, os vacúolos de cada célula, em ambas as camadas tapetais, coalescem-se formando um grande vacúolo no polo celular voltado para a CE (Figura 12). Conseqüentemente, os núcleos das células tapetais tornam-se excêntricos. Neste estágio, o dimorfismo entre as camadas tapetais externa e interna se expressa não apenas pelo formato anticlinalmente alongado e duplicação nuclear verificados nas células da última, mas também pelo fato do citoplasma das células da primeira apresentar polaridade invertida com relação ao citoplasma das células da última (Figura 12).

O dimorfismo entre as duas camadas tapetais se atenua no final do estágio pré-meiótico, uma vez que estas passam a apresentar proliferação nuclear, sendo possível observar, em ambas, células bi- e tetranucleadas (Figura 15). Fusões nucleares são comumente observadas nas células tapetais durante a meiose. Posteriormente, o tecido placentóide se degenera e sofre colapso (Figura 21), estágio em que o dimorfismo entre as camadas tapetais volta a se acentuar rapidamente. Conforme os sacos polínicos são preenchidos pelo fluido locular, a camada tapetal interna passa a apresentar células anticlinalmente alongadas, núcleos volumosos e de formato irregular decorrentes das fusões nucleares (Figura 21 - inserção). Os vacúolos revertem sua polaridade voltando-se para o tecido placentóide e formam-se coágulos no citoplasma destas células, indicando o início do processo degenerativo (Figura 21 - inserção). Logo, ambas as camadas tapetais começam a exibir outros sinais de degeneração de suas células, tais como cromatólise nuclear e degradação parcial de paredes celulares. Corpos esféricos, possivelmente de natureza lipo-proteica e relacionados com a formação do *Pollenkitt*, são visíveis ocupando grande parte do lume das células tapetais

degeneradas (Figura 28). Com a degeneração deste tecido formam-se orbículos em suas paredes tangenciais internas, originando a membrana tapetal (Figuras 22 e 28). Ao mesmo tempo em que os androsporângios são preenchidos pelo fluido locular, as camadas parietais entre a camada tapetal externa e a epiderme se degeneram e a membrana tapetal adere-se a tais tecidos (Figura 28).

Nos botões florais com cerca de 15-18 mm de comprimento, diferenciam-se, nas regiões multiestratificadas entre o tapete externo e epiderme, nos flancos de cada teca, espessamentos lignificados (coloração azul-esverdeada pelo azul de toluidina O) helicoidais nas paredes celulares, caracterizando um endotécio fibroso multiestratificado (Figura 38).

Nas células estomiais ocorre espessamento pectocelulósico e cutinização das paredes periclinais externas e, em menor grau, das anticlinais (Figuras 37, 39 e 41). A cutícula e a camada cuticular tornam-se espessas, apresentando estrias epicuticulares (Figura 41). Já no sítio de ruptura do estômio, as células epidérmicas permanecem pequenas, com paredes e cutícula delgadas (Figuras 37 e 39). As células epidérmicas de cada teca tornam-se papilosas, com exceção das células estomiais, das células do sítio de ruptura do estômio e da porção dorsal da teca (Figuras 43 e 44).

Com o aumento do volume locular, o septo interesporangial desintegra-se, formando em cada teca uma única cavidade contendo os grãos de pólen (Figura 42). O estômio permanece ocluso apenas pelas células epidérmicas do sítio de ruptura (Figura 42). Próximo à antese, inicia-se um processo de desidratação das células estomiais, ocasionando retração das paredes celulares no polo voltado para os sacos polínicos, o que não acontece no polo voltado para o lado externo devido aos espessamentos de paredes (Figura 41). Como resultado, as duas fileiras de células estomiais curvam-se para dentro, forçando a ruptura do estômio (Figura 43). Em anteras deiscentes verificou-se o colapso das células do conectivo adjacentes ao endotécio (Figura 44).

Androsporogênese e Androgametogênese

Logo após sua diferenciação, o tecido esporogênico se organiza em uma camada celular em formato de ferradura (Figura 16), quando visualizado em secção transversal da antera. Suas células possuem grandes dimensões, relativamente às dos tecidos circundantes, núcleos volumosos com nucléolos conspícuos, citoplasma denso e grande número de pequenos vacúolos esféricos, dispersos no citoplasma (Figura 11). Os vacúolos se coalescem em vacúolos maiores que apresentam conteúdo granular corado de magenta pelo azul de toluidina O (Figura 12). Neste estágio, as células da CE diminuem sua frequência de divisões, mas continuam a apresentar um incremento no volume e seu vacuoma gradualmente desaparece, na medida em que estas células diferenciam-se em células-mãe dos andrósporos (CMA) (Figuras 13 e 14). Pouco antes do início da meiose, as CMA passam a exibir espessamento secundário de calose em suas paredes (entre a membrana plasmática e a parede pectocelulósica) e pequenos amiloplastos no citoplasma (Figura 14), os quais estão presentes durante a meiose e até próximo da maturidade do grão de pólen, embora variando em quantidade e dimensões ao longo do processo ontogenético da antera. As CMA no início da prófase I apresentam núcleos volumosos com nucléolos evidentes (Figuras 13 e 15).

As CMA atingem seu volume máximo no início da meiose e tendem a se tornar esféricas. Há uma grande sincronia no que se refere aos estádios da meiose dentro de cada um dos androsporângios (Figura 17), embora diferentes androsporângios da mesma antera possam encontrar-se em estádios distintos. A meiose transcorre sem alterações no volume dos meiócitos, sendo que grãos de amido estão presentes durante o processo e permanecem nos andrósporos resultantes (Figuras 14, 19 – inserção, 24).

As tétrades tetraédricas de andrósporos são geradas por meio de citocinese simultânea (Figuras 18, 19 e 20). Em seguida as paredes pectocelulósicas originais das CMA começam a se dissolver (Figuras 19). Nesse estágio, cada um dos andrósporos apresenta uma primexina que se cora de púrpura pelo azul de toluidina O e é discretamente PAS-positiva, mesmo antes de

completar-se dissolução da parede de calose (Figura 19). Em secções tangenciais de andrósporos recém-formados, a primexina apresenta um padrão reticulado semelhante ao da exina dos andrósporos e andrófitos em estágio subsequentes (Figura 19).

Assim que as paredes de calose se dissolvem, a exina começa a se desenvolver na esporoderme de cada andrósporo, corando-se de azul esverdeado pelo azul de toluidina O (Figuras 22) e de preto pelo Sudan Black B (dados não apresentados). Tão logo os andrósporos entram em contato com o fluido locular, ocorre uma redução da sua densidade citoplasmática e um aumento no espessamento da exina (Figuras 22 e 23). A exina passa a apresentar duas camadas claramente discerníveis (Figura 23): uma ectexina (externa) e uma endexina (interna) (segundo a terminologia de Punt *et al.* 2007). Nas margens das aberturas dos grãos de pólen, em secção transversal, observa-se uma redução na altura das columelas (Figuras 22-36). Os mesocolpos exibem uma ectexina reticulada ao passo que, nas aberturas, esta estrutura está ausente, permanecendo evidente apenas uma endexina notavelmente espessa, que possui uma superfície externa psilada (Figuras 25, 27, 28 e 30). Da mesma forma, a intina nos colpos é conspícua, por vezes com sua espessura se igualando ou superando a da endexina (Figuras 22, 23, 24 e 27).

Nos estádios iniciais de desenvolvimento, os andrósporos exibem abundantes organelas citoplasmáticas esféricas que se coram intensamente de azul pelo azul de toluidina O, bem como diminutos grânulos PAS-positivos (Figuras 22, 23 e 24). Posteriormente, os colpos da esporoderme flexionam-se em direção ao centro do andrósporo (Figuras 23-25). Pouco antes da mitose, evento que sinaliza o início da androgametogênese, as organelas esféricas e intensamente coradas do citoplasma desaparecem e há o surgimento de vacúolos numerosos e de formatos irregulares, portando substância granular que se cora de magenta pelo azul de toluidina O (Figura 25). O núcleo se desloca em direção à periferia do andrósporo onde será o sítio da mitose (Figuras 25 e 26). Em um mesmo esporângio, não há sincronismo quanto à mitose dos andrósporos. Nos colpos a intina pectinizada apresenta-se espessada e é PAS-positiva (Figura 24).

Assim que o tapete começa a apresentar sinais de degeneração, o fluido locular passa a apresentar conteúdo granular que se cora de púrpura pelo azul de toluidina O (Figura 19 e 21). A mitose do andrósporo resulta na formação de uma célula vegetativa, de tamanho maior e ocupando a maior parte do espaço interno do grão de pólen, e de uma célula generativa com formato lenticular, adjacente à esporoderme, junto a um dos mesocolpos (Figura 27). Os grãos de amido se tornam progressivamente maiores e mais numerosos, e estão presentes apenas no citoplasma da célula vegetativa (Figuras 24, 32 e 34).

O núcleo da célula vegetativa é bem mais volumoso do que o da célula generativa, posicionando-se no centro do andrófito e apresentando nucléolo conspícuo (Figuras 29, 30 e 31) com pequenos vacúolos nucleolares. A célula generativa aos poucos se expande e adquire um formato campanular (Figura 29), desprendendo-se em seguida da esporoderme e sendo englobada pelo citoplasma da célula vegetativa (Figura 30). Nos estádios posteriores ao engolfamento da célula generativa, após um breve período apresentando um formato esférico (Figura 30), esta célula se torna fusiforme e alongada, com tênue curvatura nas extremidades, e se associa ao núcleo da célula vegetativa constituindo a unidade germinativa masculina (Figuras 31 e 35). É possível observar uma alta densidade citoplasmática na célula generativa, em relação à célula vegetativa (Figuras 31 e 35), e a parede da célula generativa se cora pelo vermelho de rutênio (dados não apresentados). Os amiloplastos, nesse momento, alcançam o seu volume máximo (Figura 34). Neste estágio, há uma ligeira redução na espessura da exina, bem como da intina sob as aberturas, concomitantemente ao aumento do volume dos andrófitos, que se tornam esféricos (Figuras 33 e 35). Logo após a célula generativa se tornar fusiforme, surgem, no citoplasma da célula vegetativa, corpúsculos relativamente grandes e esféricos que se coram de azul-esverdeado pelo azul de toluidina O, apresentando cada um, em seu interior, uma estrutura também esférica apenas ligeiramente corada. Estes orgânulos citoplasmáticos foram observados tanto isoladamente como em agrupamentos (Figura 33).

Nos grãos de pólen maduros, os amiloplastos estão completamente ausentes; entretanto, com a dissolução dos amiloplastos, o citoplasma da célula vegetativa se torna suavemente PAS-positivo (Figuras 35 e 36). Na antese, os grãos de pólen de *C. antisiphilitica* são bicelulares, com superfície revestida por uma exina finamente reticulada.

Discussão

Ontogenia das Camadas Parietais da Antera

Segundo a classificação de Davis (1966), o tipo Dicotiledôneo de desenvolvimento da parede da antera é caracterizado pela diferenciação da CPS_i diretamente em camada tapetal externa, ao passo que a CPS_e, por divisão periclinal, origina duas camadas, sendo que a mais interna se diferencia em camada média e, a mais externa, no endotécio. A mesma autora também define endotécio como a camada parietal mais externa, que se torna “fibrosa”, i.e., apresentando bandas de espessamento nas paredes celulares. Contudo, em *C. antisiphilitica*, bem como em outras espécies de Bignoniaceae estudadas - *H. ocraceus* (Bittencourt 1996), *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath 1997), *P. venusta* e *T. stans*, (Gupta & Nanda 1978a e b) – a camada parietal mais externa não apresenta espessamentos secundários de parede, salvo em quatro sítios da antera nos quais há a formação de um endotécio fibroso multiestratificado. Em *J. mimosifolia*, por outro lado, o endotécio se caracteriza pela formação de bandas de espessamento apenas na parede periclinal interna da camada subdérmica (Galati & Strittmatter, 1999a).

Portanto, constata-se que, em Bignoniaceae, ocorre uma variação do tipo Dicotiledôneo. É interessante salientar que *J. mimosifolia*, espécie pertencente a um gênero mais basal dentro de Bignoniaceae (Grose & Olmstead, 2007), enquadra-se dentro do tipo Dicotiledôneo *sensu* Davis, pois desenvolve espessamentos de paredes celulares ao longo de toda a camada subdérmica que envolve a face externa dos androsporângios (Galati & Strittmatter, 1999a). Isto indica ser o

endotécio multiestratificado e restrito às regiões laterais das tecas (Gupta & Nanda 1978b, Gupta & Nanda 1978c, Bittencourt 1996, Bittencourt & Mariath 1997) uma característica derivada dentro da família.

A origem das camadas tapetais é dual, pois a camada tapetal interna se origina de células subjacentes à CE, pertencentes ao meristema do tecido placentóide (conectivo), enquanto a camada tapetal externa se origina diretamente da CPS_i. Os estudos publicados que assumem a origem da camada tapetal interna a partir do conectivo já diferenciado (Periasamy & Swamy 1964, 1966; Vijayaraghavan & Ratnaparkhi 1973; Gupta & Nanda 1978 a, b e c; Mehra & Kulkarni 1985; Chapman 1987; Bittencourt 1996), são contrapostos por Bittencourt & Mariath (1997) que propõem a diferenciação da camada tapetal interna diretamente de remanescentes tardios do meristema fundamental. Visto que as células entre a CE e a porção claramente diferenciada do conectivo permanecem com aspecto meristemático, pode-se assumir o mesmo para *C. antisiphilitica*.

A camada tapetal interna se diferencia precocemente à externa em *C. antisiphilitica*, padrão semelhante ao observado em *T. stans* (Gupta & Nanda 1978a), *P. venusta* (Gupta & Nanda 1978a), *Fernandoa adenophylla* (= *Heterophragma adenophyllum*) (Mehra & Kulkarni 1985), *H. ohcraceus* (Bittencourt 1996) e *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath 1997). Contudo, também foram relatados casos em que a camada tapetal externa se origina primeiramente em relação à camada interna, ou ainda simultaneamente (Mehra & Kulkarni, 1985), embora as características histológicas deste tecido sejam suscetíveis a variações dependendo dos métodos de fixação e infiltração empregados (Vasil, 1967) e os métodos utilizados nos diferentes estudos citados não sejam os mesmos.

Em *C. antisiphilitica*, o dimorfismo entre as camadas tapetais expressa-se pela camada interna inicialmente apresentar células anticlinalmente alongadas, caráter ausente nas células da camada externa, pelo vacuoma das células da camada externa apresentar polaridade invertida em relação ao das células da camada interna (uma vez que os vacúolos estão voltados para a CE em ambas as camadas tapetais) e, pela camada tapetal interna apresentar o primeiro ciclo de duplicação

nuclear antes da camada tapetal externa. Embora esse dimorfismo diminua no final do estágio pré-meiótico, ele volta a se acentuar no final da meiose. A camada tapetal interna, logo após a dissolução da parede de calose das tétrades e liberação dos andrósporos, passa a apresentar células anticlinalmente alongadas, núcleos volumosos e vacúolos voltados para o tecido placentóide. Bittencourt (1996) relatou um fenômeno semelhante para *H. ochraceus*, e atribuiu este realce do dimorfismo à retração das células do tecido placentóide, o que de fato também ocorre em *C. antisiphilitica*. Bittencourt (1996) e Bittencourt & Mariath (1997) atribuíram o dimorfismo entre as camadas tapetais de *H. ochraceus* e *H. pulcherrimus* há um lapso ontogenético, pois os eventos que se expressam na camada tapetal interna, ocorrem com atraso na camada tapetal externa. Fenômeno similar foi observado em *C. antisiphilitica*.

A contração do tecido placentóide pode movimentar o fluido locular causando o deslocamento dos andrósporos dentro de cada androsporângio, o que poderia facilitar a deposição dos constituintes da esporoderme que são secretados pelas camadas tapetais, bem como do *Pollenkit*. Pacini (1990, 2010) também relata um possível mecanismo de movimentação do fluido locular por meio do que ele descreveu como pulsação das camadas tapetais durante o estágio de andrósporos livres. Rowley *et al.*(1992) e Rowley 1993 demonstraram que em *Nymphaeae colorata*, a camada tapetal apresenta pulsos, nos quais suas células aumentam e diminuem de volume, alongando-se em direção ao centro do lóculo e logo depois se retraíndo.

O tapete em *C. antisiphilitica*, é do tipo secretor, o que até agora tem se mostrado um padrão para a família (Ghatak 1956; Gupta & Nanda 1972, 1978 a, b e c; Mehra & Kulkarni 1985; Bittencourt 1996; Bittencourt & Mariath 1997; Galati & Strittmatter 1999a). Verificou-se a formação de uma distinta membrana tapetal, derivada de remanescentes das paredes tangenciais internas das células tapetais, junto às quais são depositados os orbículos, durante a degeneração do tecido. O mesmo fenômeno foi verificado em *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath 1997) e *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999 b). Foi possível observar em vários cortes, em estágio tardio da degeneração das camadas tapetais, a presença de corpos esferoidais relativamente grandes,

tenuemente corados pelo azul de toluidina O, no espaço antes ocupado pelo citoplasma das células destas camadas. Tais estruturas provavelmente correspondem ao *Pollenkitt*, uma vez que este componente é formado em esferossomos ou elaioplastos, cujos conteúdos se fundem durante o processo de degeneração das células tapetais (Heslop-Harrison 1968b; Pacini & Hesse 2005), embora não seja possível afirmar com certeza que tais estruturas são realmente compostas pelo *Pollenkit*, uma vez que não foram empregados os métodos de fixação adequados à observação de tais componentes.

Androsporoênese e Androgametogênese

Logo após a meiose e a citocinese simultânea que originam as tétrades tetraédricas de andrósporos, desenvolve-se a primexina entre a membrana plasmática de cada andrósporo e a parede de calose. A primexina é composta de material fibrilar, polissacarídico, semelhante a um glicocálice, que forma um molde sobre o qual a esporopolenina se deposita (Blackmore *et al.* 2007). Isto fundamenta o fato da primexina ser levemente PAS positiva nas tétrades em *C. antisiphilitica*. Rowley & Morbelli (2009) defendem que o transporte de substâncias da camada tapetal até o lóculo e daí através da exina é comparável ao transporte por um sistema de plasmodesmos entre as células vegetais. Logo, se assume que a exina não é apenas uma parede inerte, mas sim uma estrutura complexa da superfície celular implicada em mecanismos de reconhecimento e trocas de substâncias.

O aumento em volume dos andrósporos acarreta um aumento significativo da área de superfície dos mesmos, o que, conseqüentemente, poderia promover um estreitamento da primexina. Porém, tal estreitamento não se observa, e este fenômeno tem sido interpretado como o resultado de uma rápida deposição de esporopolenina sobre a esporoderme, o que mantém a espessura da mesma (Heslop-Harrison 1968a, 1971). O mesmo processo foi relatado para *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath 2002). Entretanto, em *C. antisiphilitica*, assim que se forma a

unidade reprodutiva masculina, ocorre um decréscimo na espessura da esporoderme, o que pode ser claramente observado no grão de pólen maduro.

Nos andrósporos, logo abaixo da exina, sobretudo nos colpos, observa-se uma fina camada basal na esporoderme, que se cora pelo vermelho de rutênio, correspondendo à intina, de natureza pectocelulósica, sendo mais proeminente sob as aberturas do andrófito (*oncus*). Um estudo com o emprego de microscopia eletrônica de transmissão permitirá a verificação da estratificação do *oncus* no grão de pólen de *C. antisiphilitica*, podendo revelar ou não a existência de camadas intermediárias nesta região.

Segundo Pacini (1988), nas angiospermas, dependendo da espécie, pode haver uma ou duas fases de armazenamento de grãos de amido durante o desenvolvimento dos andrófitos. Em Bignoniaceae, o único estudo no qual os ciclos de síntese e a degradação do amido durante a esporo-gametogênese foram verificados com certo rigor é o de Bittencourt & Mariath (2002), sobre o desenvolvimento do pólen de *H. pulcherrimus*. Nesse estudo constatou-se que os grãos de amido presentes na CMA são consumidos até o estágio de tetrade, havendo apenas um ciclo de amilogênese/amilólise na androgametogênese. Contudo, em *C. antisiphilitica*, a partir do estágio de CMA, os grãos de amido estão presentes até o momento em que a célula generativa submerge no citoplasma da célula vegetativa; os mesmos tornam-se mais numerosos e alcançam o seu maior volume neste estágio. Na maturidade do grão de pólen, não há mais grãos de amido em seu citoplasma; contudo, este se torna PAS positivo, provavelmente pela presença de outros tipos de polissacarídeos dissolvidos no citossol nesse estágio de desenvolvimento. Admite-se que a hidrólise dos grãos de amido, durante a maturação do grão de pólen, está relacionada à deposição da intina e à germinação do andrófito (Pacini & Franchi 1988). Contudo em *C. antisiphilitica* a intina já esta depositada muito antes da dissolução dos grãos de amido, em andrósporos que ainda não entraram mitose, como também relatado para *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath 2002). Em *C. antisiphilitica* os grãos de pólen são dispersos no estágio bicelular, como relatado para a maioria das Bignoniaceae até agora estudadas (Ghatak 1956; Davis 1966; Gupta & Nanda 1978a, b e c;

Mehra & Kulkarni 1985; Bittencourt 1996; Bittencourt & Mariath 1997; Bittencourt & Mariath 2002; Galati & Strittmatter 1999a).

Dentre os caracteres embriológicos com relevância sistemática observáveis na antera, *C. antisiphilitica* apresentou certa similaridade com os gêneros *Handroanthus*, *Pyrostegia* e *Tecoma* (Gupta & Nanda 1978a, b e c; Bittencourt 1996; Bittencourt & Mariath 1997, 2002), sobretudo no que diz respeito à presença de um endotécio fibroso multiestratificado, restrito a quatro regiões dentro da antera (laterais das tecas).

Uma proximidade filogenética de *C. antisiphilitica* com o gênero *Handroanthus* é esperada visto que, segundo o estudo de Olmstead e colaboradores (2009), estes gêneros pertencem ao mesmo agrupamento denominado “*Tabebuia* alliance”, sendo que *C.antisiphilitica* pertence a um grupo-irmão àquele do qual os gêneros *Handroanthus* e *Tabebuia* fazem parte. Outra característica embriológica comum à *C.antisiphilitica* e às espécies do gênero *Handroanthus* já estudadas, consiste na redução do dimorfismo tapetal em um determinado estágio ontogenético, o que também indica que há congruência entre os dados embriológicos e os dados filogenéticos propostos pela literatura com base na análise de sequências de DNA de cloroplastos - *rbcL*, *ndhF* e *trnL-F* (Olmstead *et al.* 2009).

Embora os gêneros *Tecoma* e *Pyrostegia* compartilhem com *C. antisiphilitica* as características referentes ao endotécio, não há mais caracteres embriológicos compartilhados. Portanto, fica evidente a necessidade de um maior número de estudos embriológicos dentro de Bignoniaceae para que haja um conjunto mais abrangente de dados que possam ser cruzados com os dados filogenéticos existentes, para verificar se as características morfológicas do endotécio possuem relevância taxonômica dentro da família.

As características embriológicas observadas em *C. antisiphilitica* demonstraram similaridade com espécies pertencentes à “*Tabebuia* alliance” cuja embriologia já foi investigada. O presente estudo voltou a relatar a presença de um endotécio multiestratificado e restrito às regiões laterais das tecas, como observados para outros taxa dentro de Bignoniaceae, o que sugere que tal

caráter seja derivado dentro da família. Uma série de eventos observados durante a ontogenia da antera indica a existência de um possível processo de contração do tecido placentóide que pode causar a movimentação do fluído locular, embora tal fenômeno deva ser melhor investigado para a obtenção de dados conclusivos.

Agradecimentos

À FAPESP pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho e à CAPES pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor.

Referências

- BITTENCOURT JR., N. S. 1996. Microsporogênese e etapas da ontogenia do gametófito masculino de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). Acta Botanica Brasilica, São Paulo - Brasil, v. 9, n. 2, p. 9-23.
- BITTENCOURT JR., N. S. & MARIATH, J. E. A. 1997. Ontogenia dos estratos parietais da antera de *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae). Acta Botânica Brasileira, São Paulo, v. 11, n.1, p. 9-30.
- BITTENCOURT JR., N. S.; MARIATH, J. E. A. 2002. Pollen Ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae) from Meiosis to Anthesis. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, v. 20, n. 1, p. 17-29.
- BLACKMORE, S.; WORTLEY, A. H.; SKVARLA, J. J.; ROWLEY, J. R. 2007. Pollen wall development in flowering plants. New Phytologist, Oxford, n. 174, p.483-498.
- CHAPMAN, G. P. 1987. The tapetum. International Review of Cytology, San Diego, v.107, p. 111-125.
- CLEMENT, C.; PACINI, E. 2001. Anther plastids in angiosperms. Botanical Reviews, v. 67, p. 54-73.
- DAVIS, O. L. 1966. Systematic embryology of the Angiosperms. Nova Iorque: John Wiley & Sons, Inc., 528 p.
- DUGGAR, B.M. 1899. On the development of the pollen grain and embryo-sac in *Bignonia venusta*. Bulletin of the Torrey Botanical Club, Nova Iorque, v.26, p. 89-105.
- ENDRESS, P. K. 2005. Links between embryology and evolutionary floral morphology. Current Science, Bangalore, v. 89, n. 5, p.749-754.
- ESCHRICH, W. & CURRIER, H.B. 1964. Identification of callose by its dichrome and fluorochrome reactions. Stain Technology, Baltimore, v. 39, p. 303-307.

- GALATI, B.G.; STRITTMATTER, L. I. 1999a. Microsporogenesis and microgametogenesis in *Jacaranda mimosifolia* (Bignoniaceae). *Phytomorphology*, Jodhpur, v. 49, n. 1, p.147-155.
- GALATI, B.G.; STRITTMATTER, L. I. 1999b. Correlation between pollen development and Ubish bodies ontogeny in *Jacaranda mimosifolia* (Bignoniaceae). *Beitr. Biol. Pflanzen*, Berlin, v. 71, p. 249-260.
- GENTRY A. H. 1992. Bignoniaceae - Part II (Tribe Tecomeae). *Flora Neotropica: Monograph 25* (II). Organization for Flora Neotropica, Nova Iorque.
- GHATAK, J. 1956. A contribution to the life-history of *Oroxylum indicum* Vent. *Proceedings of the Indian Academy of Science*, Bangalore, v. 43, p.72-87.
- GROSE, S. O., OLMSTEAD, R.G. 2007. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). *Systematic Botany*, Laramie, v. 32, p. 660-670.
- GUPTA, S.C. & NANDA, K. 1972. Occurrence and histochemistry of the anther tapetal membrane. *Grana*, v. 12, p. 99-104.
- GUPTA, S.C. & NANDA, K. 1978a. Ontogeny and histochemistry of dimorphic tapetum in *Tecoma stans* anthers. *Bulletin de la Societé Botanique de France*, Paris, v. 12, p. 129-134.
- GUPTA, S.C. & NANDA, K. 1978b. Studies in the Bignoniaceae I. Ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Pyrostegia*. *American Journal of Botany*, Baltimore, v. 65, n. 4, p. 395-399.
- GUPTA, S.C. & NANDA, K. 1978c. Studies in the Bignoniaceae II. Ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Pyrostegia*. *American Journal of Botany*, Baltimore, v. 65, n. 4, p. 400-405.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company. 523p.
- JOHRI, B.M., AMBEGAOKAR, K.B. & SRIVASTAVA, P.S. 1992. *Comparative embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer, 1221 p.
- HESLOP-HARRISON, J. 1968a. Pollen wall development. *Science*, v.161, p. 230-237.
- HESLOP-HARRISON, J. 1968b. The tapetal origin of pollen coat substances in *Lilium*. *New Phytologist*, v.67, p. 779-786.
- HESLOP-HARRISON, J. 1971. *Pollen: Development and Physiology*. London: Butterworth. 338 p.

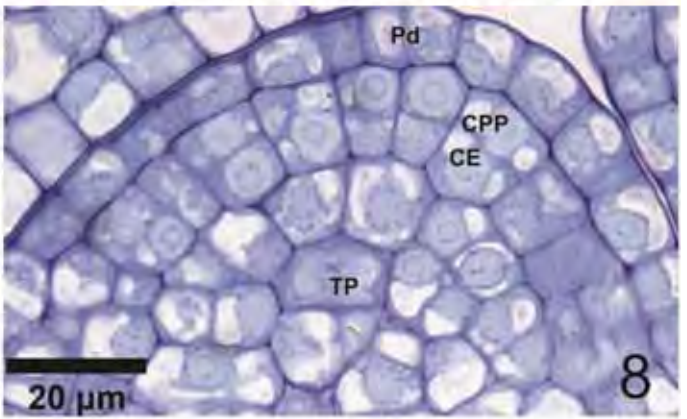
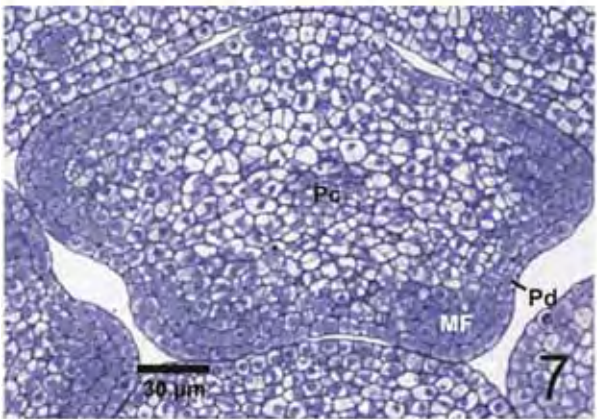
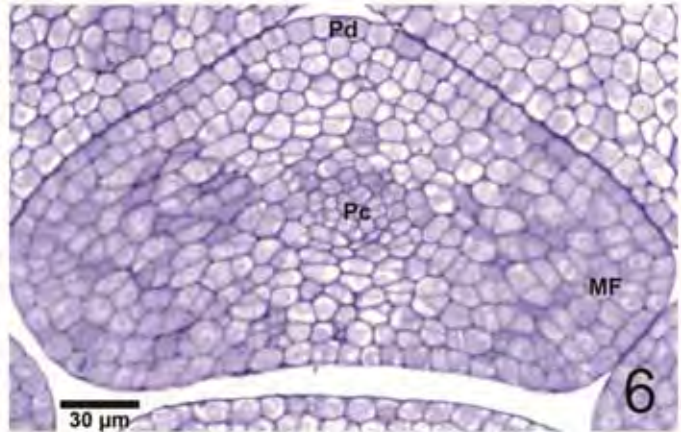
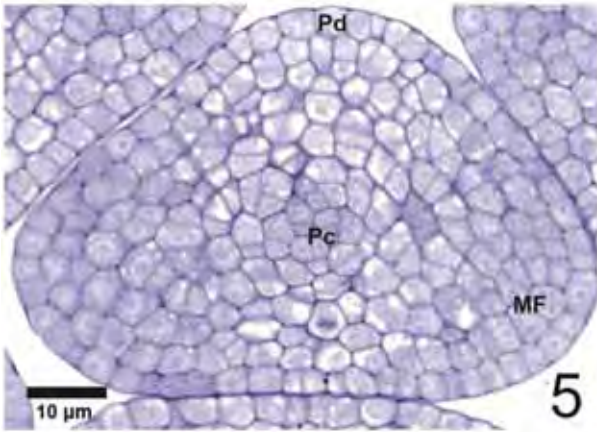
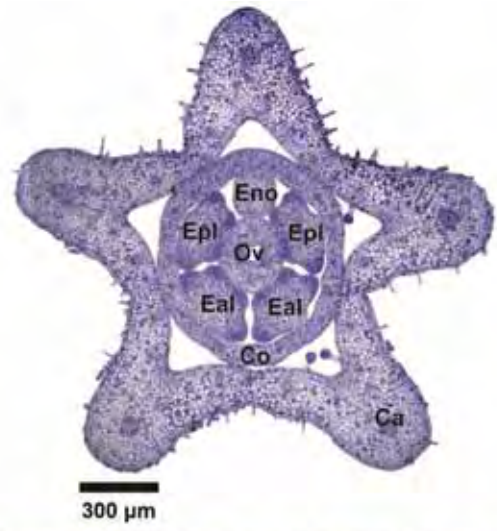
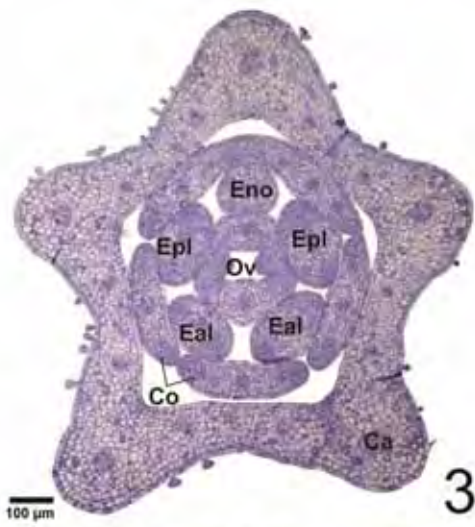
- LOHMANN, L. G. & ULLOA. 2007. Bignoniaceae. *In* iPlants prototype Checklist. www.iplants.org (acesso em 21/07/2011).
- LORENZI, H. 1992. Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 4^a edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- McDOWELL, E. M.; TRUMP, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, Chicago, v. 100, p. 405-414.
- MEHRA, K. R.; KULKARNI, A. R. 1985. Embryological studies in Bignoniaceae. *Phytomorphology*, Jodhpur, v. 35, n. 3-4, p.239-251.
- MELO, P. R. B. 2009. Qualidade Fisiológica e Armazenamento de Sementes de Ipê-Verde (*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.). Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. 1981. *The Study of Plant Structure Principles and Selected Methods*. Melbourne: Termarcarphi Pty.
- OLMSTEAD, R. G.; ZJHRA, M. L.; LOHMANN, L. G.; GROSE, S. O.; ECKERT, A. J. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *American Journal of Botany*, Baltimore, v. 96, p. 1731- 1743.
- PACINI, E. FRANCHI, G.G. 1988. Amilogenesis and amylolysis during pollen grain development. *In* CRESTI, M.; GORI, P. & PACINI, E. *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Berlin: Springer-Verlag. p. 181-186.
- PACINI, E. 1990. Tapetum and microspore function. *In* BLACKMORE, S.; KNOX, R.B. eds. *Microspores: evolution and ontogeny*. Londres: Academic Press. p. 213-237.
- PACINI, E. & HESSE, M. 2005. Pollenkitt – its composition, forms and functions. *FLORA*, Jena, v. 200, p. 399-415.
- PACINI, E. 2010. Relationships between tapetum, loculus, and pollen during development. *International Journal of Plant Science*, Chicago, v. 171, p. 1-11.

- PERIASAMY, K.; SWAMY, B. G. L. 1964. Is the microsporangium of angiosperms wall-less?
Current Science, Bangalore, v. 33, p.735-738.
- PERIASAMY, K.; SWAMY, B. G. L. 1966. Morphology of the anther tapetum of angiosperms.
Current Science, Bangalore, v. 35, p.427-430.
- PLACHNO, B. J.; ŚWIĄTEK, P. 2009. Functional anatomy of the ovule in *Genlisea* with remarks
on ovule evolution in Lentibulariaceae. Protoplasma, Viena, v. 236, n. 1-4, p.39-48.
- POZNER, R. 2001. Approach to the early sporangial development in angiosperms considering
meiosis control and cellular differentiation. Plants Systematics And Evolution, v. 230, n. 1-2,
p.25-42.
- PUNT, W.; HOEN, P.P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. 2007. Glossary of
pollen and spore terminology. Review of Palaeobotany and Palynology, Amsterdam, v. 143,
p. 1–81.
- ROWLEY, J.R.; GABARAYEVA, N.I.; WALLEES, B. 1992. Cyclic invasion of tapetal cells into
loculi during microspore development in *Nymphaea colorata* (Nymphaeaceae). American
Journal of Botany, v.79, p. 801–808.
- ROWLEY, J.R. 1993. Cycles of hyperactivity in tapetal cells. Plant Systematics and Evolution, v.7,
p. 23–37.
- ROWLEY, J. R.; MORBELLI, M. A. 2009. Connective structures between tapetal cells and spores
in Lycophyta and pollen grains in angiosperms — A review. Review Of Palaeobotany And
Palynology, Amsterdam, v. 156, p.157-164.
- RUDRAMUNIYAPPA, C. K.; MAHAJAN, P. B. 1991. Histochemical and fluorescence
microscopic study of anther development in *Spathodea campanulata* BEUV.
Phytomorphology, Jodhpur, v. 41, p.175-188.
- SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. The Journal of Histochemistry
and Cytochemistry, Baltimore, v. 21, p. 73-80.

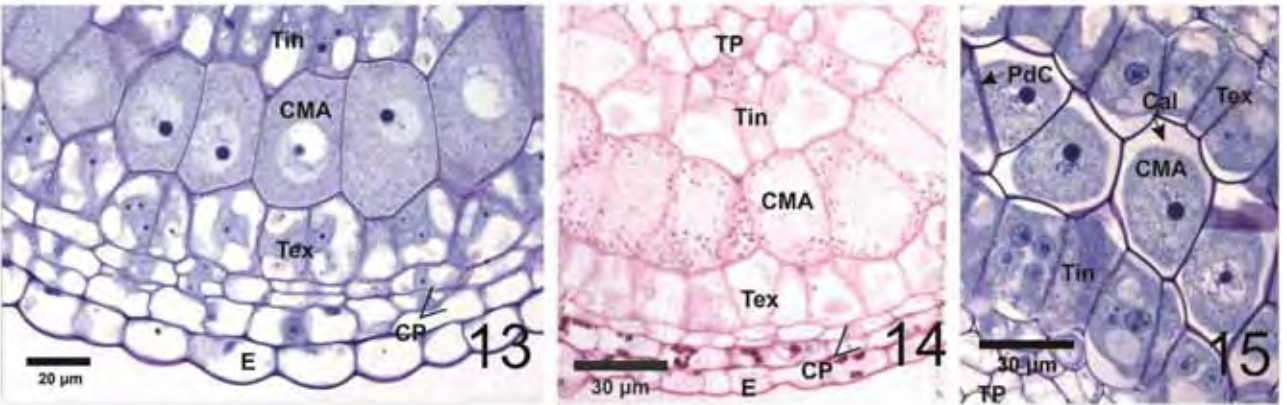
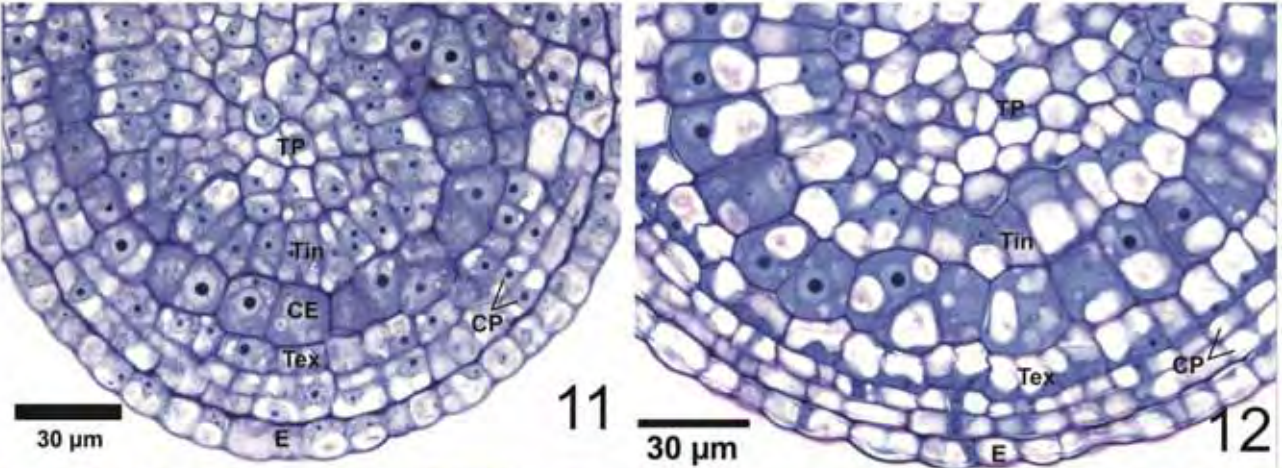
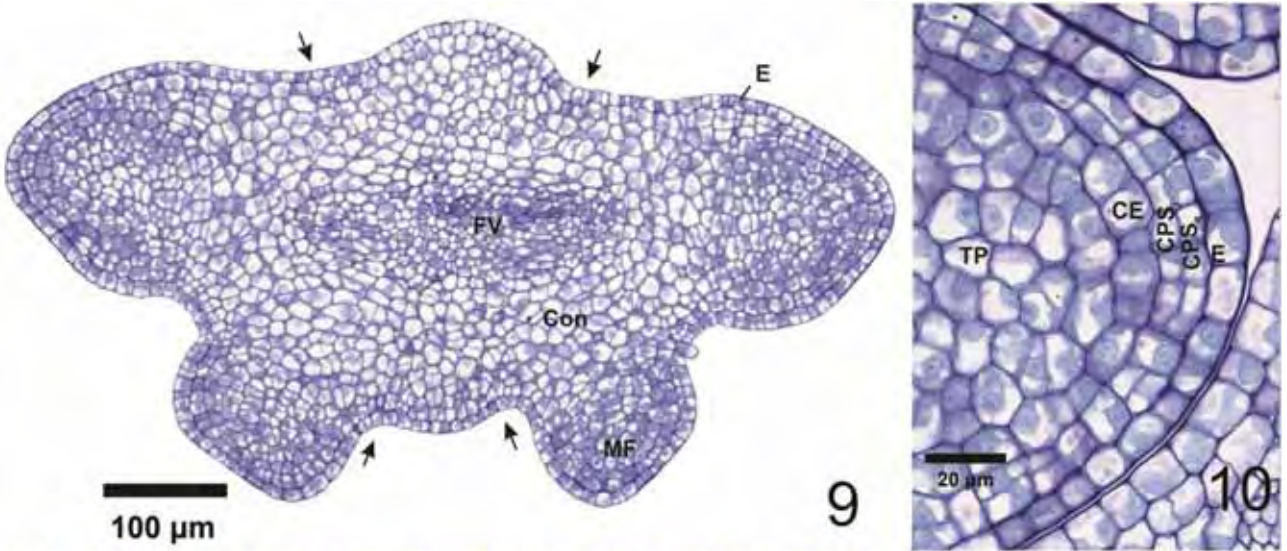
- TOBE, H. 1989. The Embryology of Angiosperms: Its Broad Application to the Systematic and Evolutionary Study. *The Botanical Magazine, Tóquio*, v. 102, p. 351-367.
- VASIL, I. K. 1967. Physiology and Cytology of anther development. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 42, p. 327-373.



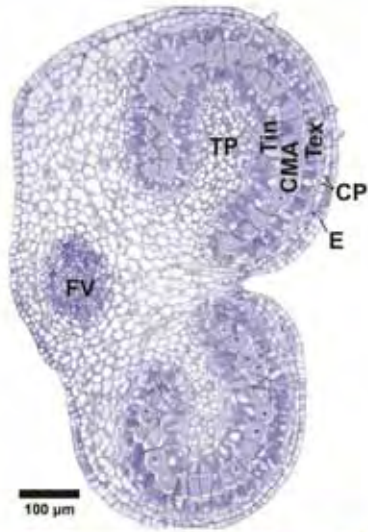
Figuras 1 e 2: Aspectos gerais da morfologia externa de *C. antisiphilitica*. (1) Esporófito (fonte: Melo 2009) (2) Inflorescência (Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/32/Cybistax_antisiphilitica.jpg).



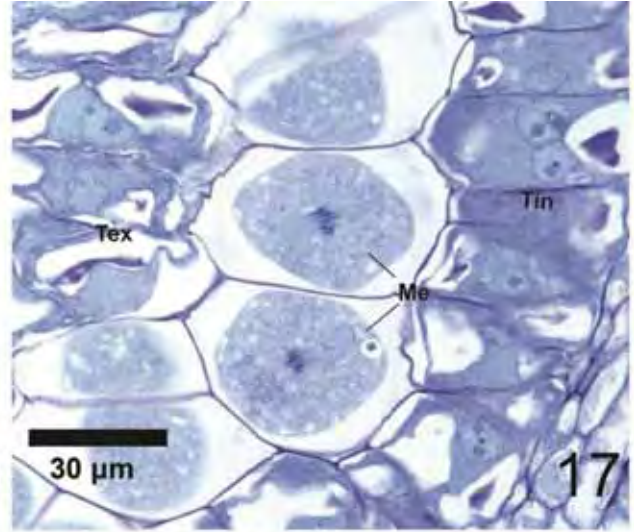
Figuras 3-4: Secções transversais de botões florais de *C. antisiphilitica* mostrando a disposição dos verticilos florais nos estádios iniciais de desenvolvimento. (5-8) Secções transversais de primórdios de anteras. (5) Antera imediatamente após sua emergência do receptáculo. (6) Estádio bilobado da antera. (7) Estádio tetralobado, mesmo estádio da figura 4. (8) Camada subdérmica originando a camada parietal primária e a camada esporogênica. Coloração: azul de toluidina O. Ca – cálice, CE – camada esporogênica; Co – corola; CPP – Camada parietal primária; Eal – Estame ântero-lateral; Eno – estaminódio; Epl – estames póstero-laterais; MF – meristema fundamental; Ov – ovário; Pc – Procâmbio; Pd – protoderme; TP – tecido placentóide.



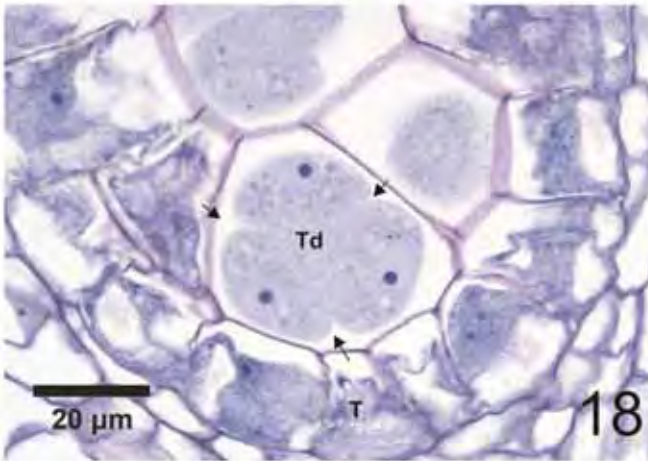
Figuras 9-15: Secções transversais da antera de *C. antisyphilitica*. (9) Estádio tetralobado tardio – setas apontam reentrâncias que demarcam os futuros limites entre as tecas e o filete. (10) Camada parietal primária (CPP) dando origem às camadas parietais secundárias interna (CPS_i) e externa (CPS_e). (11) Camadas parietais (CP) derivadas da CPS_e; notar diferenciação inicial da camada tapetal externa, originada diretamente da CPS_i. (12) Camadas tapetais com característica polarização do citoplasma, cujos vacúolos estão voltados para as células-mãe dos andrósporos. (13) Células-mãe dos andrósporos iniciando a prófase I. (14) Secção do mesmo estágio de desenvolvimento da figura 13 submetida à reação de PAS, evidenciando os amiloplastos. (15) Células tapetais bi- e tetranucleadas. Colorações: 9-13 e 15 – azul toluidina O; 14 – PAS. Cal – parede de calose; CE – camada esporogênica; CMA - células-mãe dos andrósporos; Con - conectivo; E – epiderme; FV– feixe vascular; MF – meristema fundamental; PdC – parede celular da CMA; Tin – camada tapetal interna; Tex – camada tapetal externa; TP – tecido placentóide.



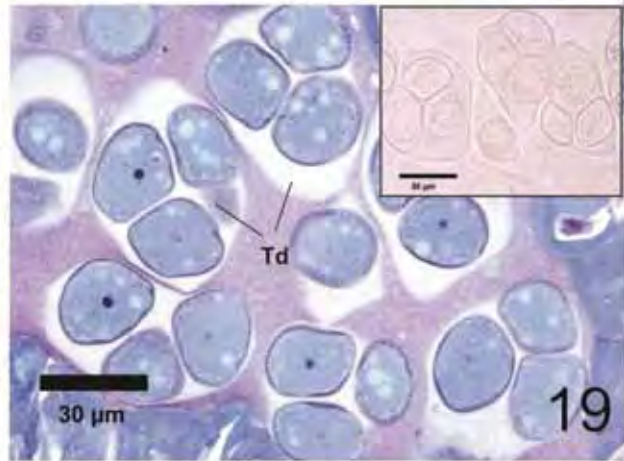
16



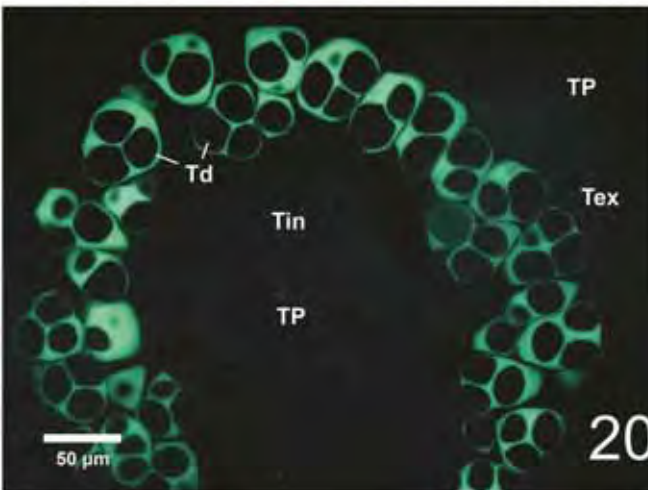
17



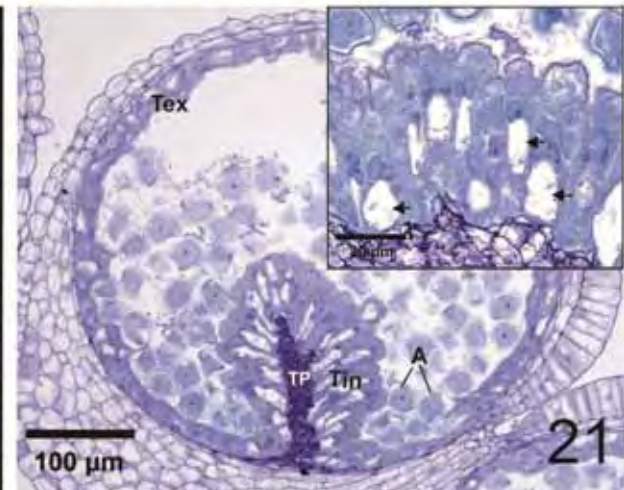
18



19

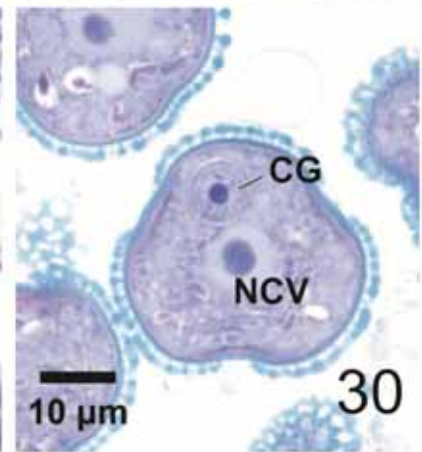
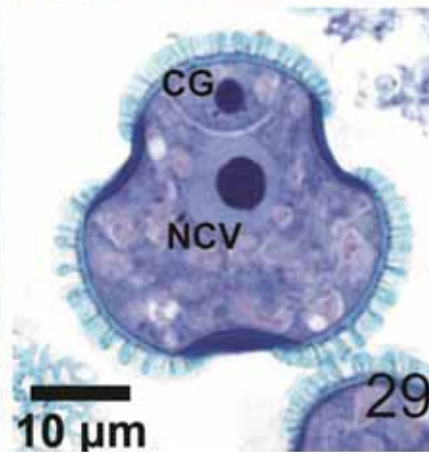
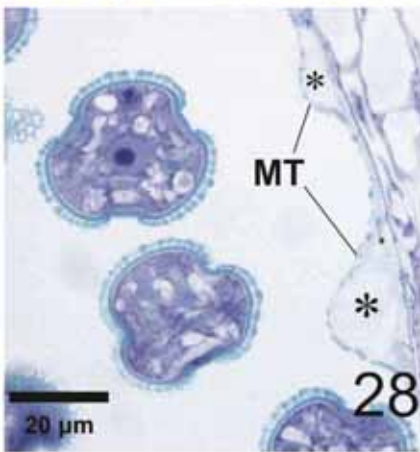
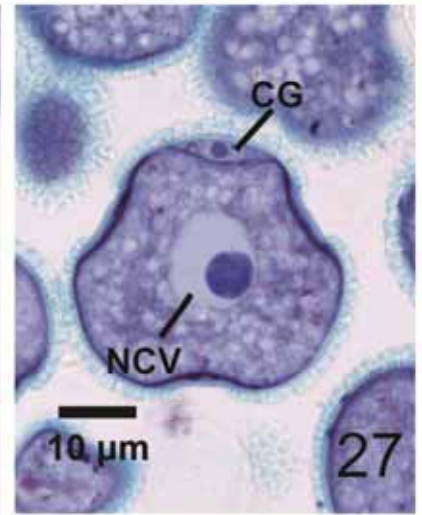
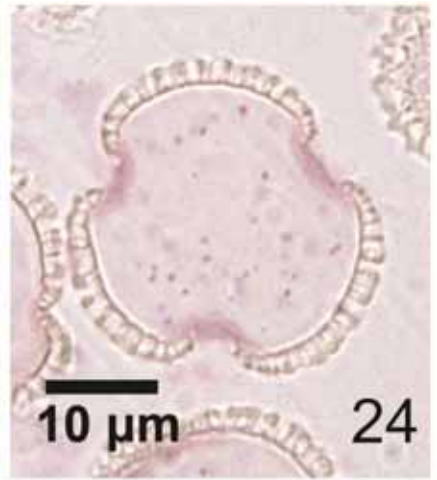
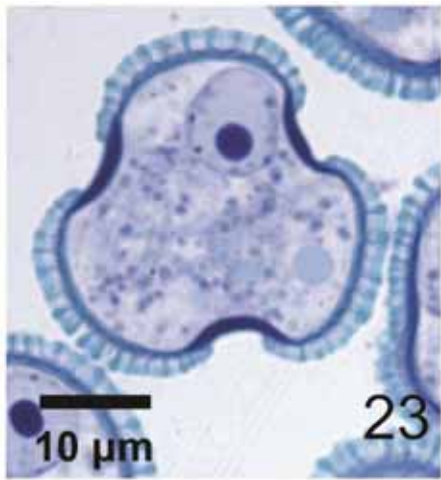
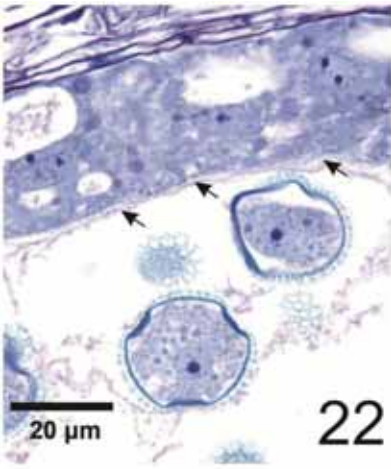


20

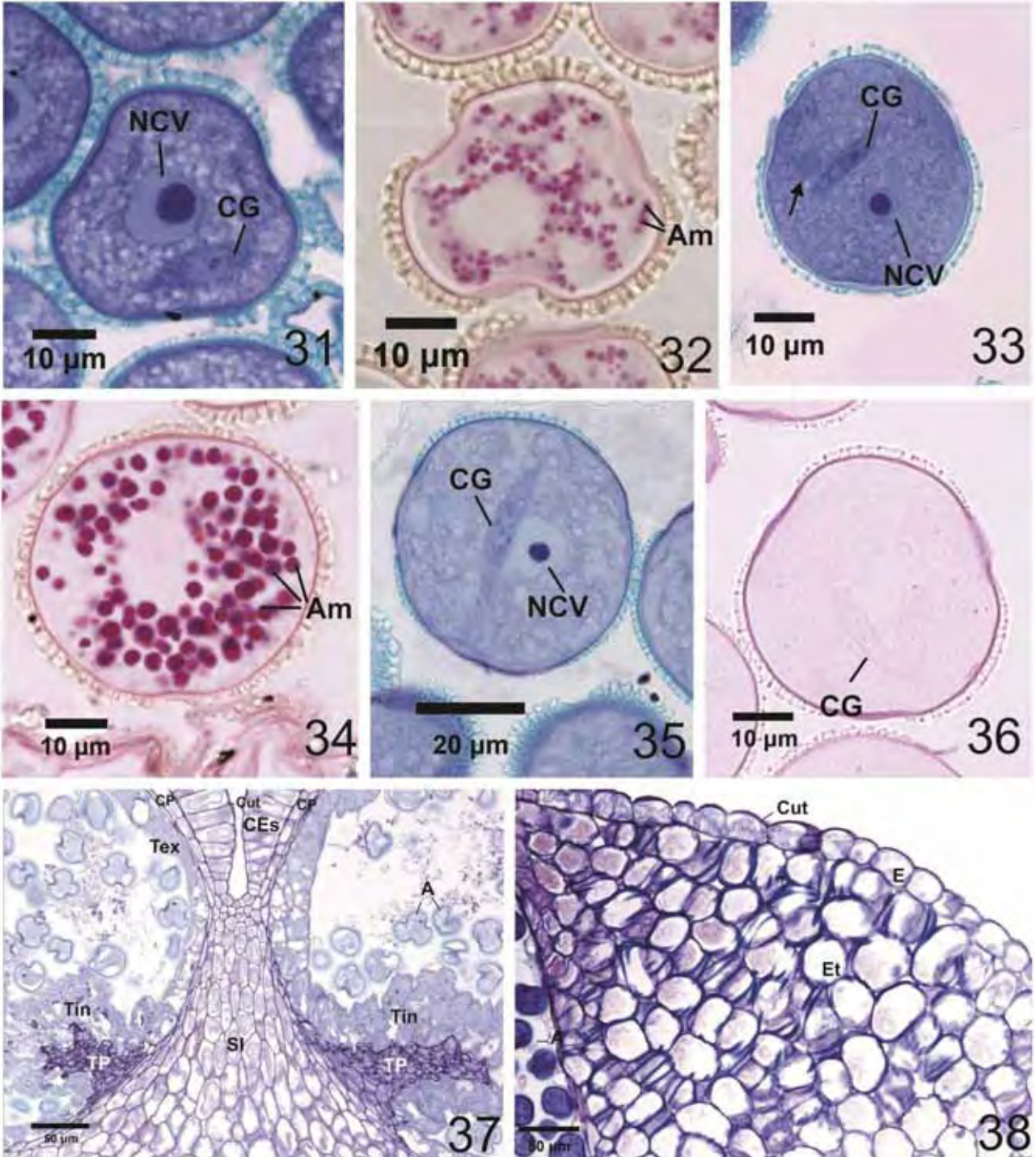


21

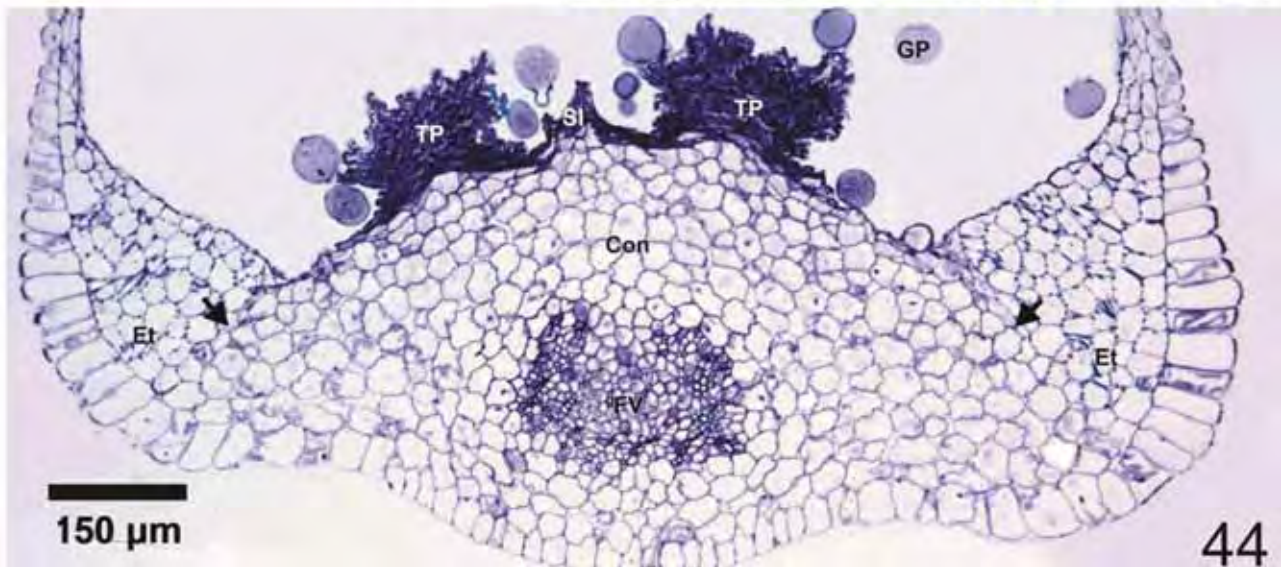
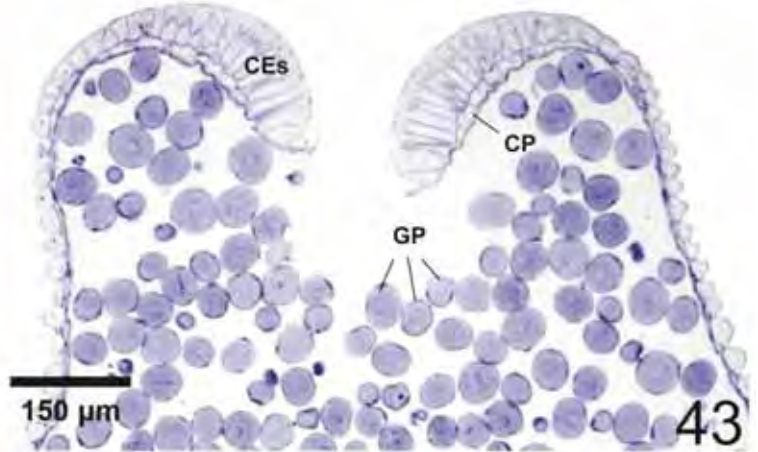
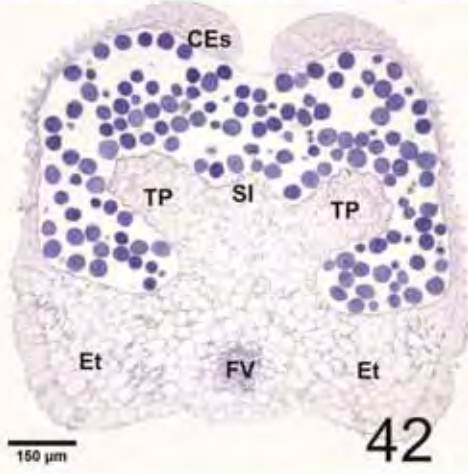
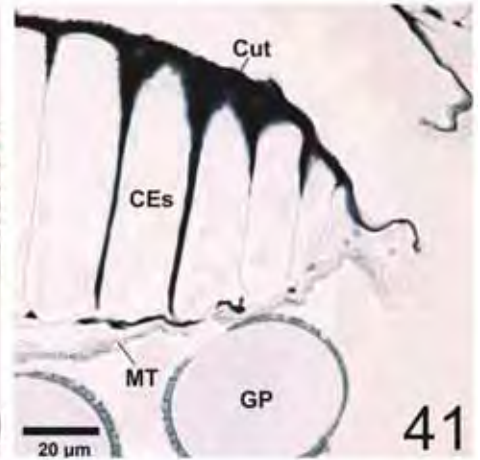
Figuras 16-21: Secções transversais da antera de *C. antisiphilitica*. (16) Teca, mesmo estágio da figura 13, porém em menor aumento, evidenciando o formato de ferradura do androsporângio. (17) Meiócitos em metáfase I; (18) Telófase II tardia, citocinese simultânea – setas indicam parede de calose em formação; (19) Tétrades (Td) tetraédricas de andrósporos; inserção no canto superior direito (mesmo estágio de desenvolvimento) evidenciando grânulos PAS positivos no citoplasma. (20) Secção submetida ao método fluorocromático com azul-de-anilina destacando as paredes de calose das tétrades. (21) Visão geral de um dos androsporângios evidenciando o tecido placentóide colapsado e o dimorfismo entre tapete interno (Tin) e externo (Tex), tecido placentóide em degeneração (TP); inserção no canto superior direito mostrando células do Tin em maior aumento; setas indicam vacúolos voltados para o TP. Colorações: 16-19 e 21 – Azul de toluidina O; 19 (inserção) – PAS; 20 – Azul de anilina. A - andrósporos; CMA – células-mãe dos andrósporos; CP – camadas parietais; E – epiderme; FV – feixe vascular; Me – meiócito; Td – tétrades.



Figuras 22-30: Secções transversais da antera de *C. antisiphilitica* mostrando andrósporos e grãos de pólen em sucessivos estádios de desenvolvimento. (22) Setas indicam orbículos nas paredes tangenciais internas das células da camada tapetal. (23) Andróspro na fase final de espessamento da exina. (24) Secção do mesmo estádio de desenvolvimento que a figura 23 submetida à reação de PAS. (25) Andróspero com núcleo em prófase mitótica. (26) Andróspero em metáfase mitótica. (27) Andrófito com célula generativa lenticular. (28) membrana tapetal com orbículos (MT); asteriscos indicam corpos esféricos, possivelmente de natureza lipo-proteica, relacionados com a formação do *Pollenkitt*. (29) Andrófito com célula generativa campanular. (30) Grão de pólen com célula generativa (CG) esférica totalmente englobada pelo citoplasma da célula vegetativa. Coloração: 22, 23, 25-29 – Azul de toluidina O; 24 – PAS. NCV – núcleo da célula vegetativa.



Figuras 31-38: Secções transversais da antera de *C. antisiphilitica* mostrando grãos de pólen em sucessivos estádios de desenvolvimento. (31-32) Andrófitos no estádio em que a célula generativa torna-se fusiforme, apresentando amiloplastos no citoplasma da célula vegetativa. (33) Andrófito com célula generativa fusiforme/alongada, ligeiramente distanciada do núcleo da célula vegetativa, seta indica organela esférica no citoplasma da célula vegetativa. (34) Andrófito durante o pico da amilogênese, mesmo estádio mostrado na figura 33. (35) Andrófito maduro apresentando célula generativa (CG) fusiforme/alongada associada ao núcleo da célula vegetativa (unidade germinativa masculina). (36) Andrófito maduro com célula vegetativa destituída de amiloplastos; (37) Região interesporangial de uma teca, durante a expansão das cavidades do androsporângio, mostrando o estômio e o septo interesporangial. (38) Endotécio (Et). Colorações: 31, 33, 35, 37 e 38 – azul de toluidina O; 32, 34 e 36 – PAS. A – andrósporos; Am – amiloplastos; CE – células estomiais; CG – célula generativa; CP – camadas parietais; Cut – cutícula; E – epiderme; NCV – núcleo da célula vegetativa; SI – septo interesporangial; Tex – camada tapetal externa; Tin – camada tapetal interna; TP – tecido placentóide.



Figuras 39 – 44: Secções transversais da antera de *C. antisiphilitica*. (39) Região estomial, em maior aumento, num estágio de desenvolvimento posterior a figura 37 – iminência da ruptura do SI. (40) Células dissociadas do endotécio com bandas de espessamentos helicoidais nas paredes celulares; (41) Estômio rompido e células estomiais apresentando cutícula e camada cuticular das paredes periclinais externas e parte das paredes anticlinais e periclinais internas coradas pelo Sudan Black B. Esporoderme e membrana tapetal também estão coradas. (42) Teca logo após a ruptura do septo interesporangial. (43) rompimento do estômio. (44) Porção dorsal da teca após a deiscência; as setas indicam células colapsadas nos limites entre o conectivo e o endotécio. Colorações: 39, 42, 43 e 44 – azul de toluidina O; 41 – Sudan Black B. CEs – células estomiais; CP– camadas parietais; Cut – cutícula; CP – camadas parietais; E – epiderme; Et – endotécio; FV – feixe vascular; GP – grão de pólen; MT – membrana tapetal; SI – septo interesporangial; Tex – camada tapetal externa; Tin – camada tapetal interna; TP – tecido placentóide.

VII. Discussão Geral

VII. Discussão Geral

Em organismos com reprodução sexual, características associadas com o processo reprodutivo estão sob forte seleção, pois afetam diretamente o sucesso reprodutivo de uma espécie em particular (Darwin 1871, Lloyd & Webb 1992). Já é de longa data a constatação de que biologia reprodutiva e a sistemática estão intimamente relacionadas, sendo que os caracteres reprodutivos constituem uma grande parcela dos dados que possuem importância taxonômica (Anderson *et al.* 2002). Por esse motivo caracteres reprodutivos e, por conseguinte, os embriológicos possuem utilidade filogenética, sendo empregados no posicionamento de certas famílias de angiospermas (Tobe 1989).

Atualmente com o advento da Sistemática Molecular, a busca metódica de caracteres morfológicos para o embasamento de filogenias foi ofuscada pelas tecnologias moleculares que oferecem um volume de dados muito maior em um tempo reduzido e com maior praticidade (Endress 2003). Contudo, a busca por similaridades estruturais é necessária e útil. Esta pode ajudar em áreas ou níveis da árvore da vida na qual os dados moleculares, por alguma razão, têm dificuldade em produzir informações conclusivas (Endress 2003). Dados embriológicos, como caracteres filogenéticos são mais utilizados, geralmente, em níveis taxonômicos elevados como na caracterização de famílias vegetais. Contudo, estes dados podem ser utilizados em qualquer nível taxonômico (Simpson 2006).

A utilização do conhecimento embriológico na classificação das angiospermas não pode ser baseada apenas em poucos caracteres, isto é, em apenas uma característica embriológica, mas sim na avaliação simultânea de todos os padrões embriológicos significantivos (Just 1946). Portanto, para obter uma inferência filogenética robusta, em Bignoniaceae, a partir de dados embriológicos, é necessário um conjunto de dados mais abrangente, valendo-se de espécies pertencentes a todos os taxa representativos dentro da família, assim como da compilação do maior conjunto possível de dados que possam ser observados.

Na literatura que se dedica à ontogenia da antera e óvulo de Bignoniaceae é possível encontrar representante da maioria dos clados relevantes dentro da família, segundo a classificação de Olmstead *et al.* (2009). Ou seja, há representantes de Bignonieae, Catalpeae, Oroxyleae, “*Tabebuia* alliance” (com representantes de Crescentieae), Clado Paleotropical, Tecomeae e Jacarandae (Duggar 1899, Mauritson 1935, Govindu 1950, Ghatak 1956, Gupta & Nanda 1978a, b e c, Mehra & Kulkarni 1985, Bittencourt 1996, Bittencourt & Mariath 1997, 2002a, b e c, Galati & Strittmatter 1999a, b e c De Souza *et al.* 2010). Contudo, ainda não foram realizados estudos embriológicos em Coleeae, um subgrupo dentro do Clado Paleotropical com distribuição geográfica restrita à ilha de Madagascar e regiões circunvizinhas (Olmstead *et al.* 2009). *Tourrettia*, o clado mais basal dentro do “Core” Bignoniaceae, e o mais proximamente relacionado à tribo Jacarandae, também não possui representantes com embriologia conhecida, consistindo numa lacuna importante a ser preenchida, pois seu posicionamento é crítico dentro da filogenia de Bignoniaceae e estudos embriológicos podem contribuir, por exemplo, no esclarecimento a respeito da possível evolução do endotécio restrito a quatro sítios dentro da antera a partir de uma única camada hipodérmica contínua, característica observada para a tribo Jacarandae (Galati & Strittmatter 1999a).

A partir dos dados embriológicos obtidos com o estudo de *C. antisiphilitica*, contribuiu-se para a compreensão sobre o desenvolvimento das estruturas reprodutivas dentro de Bignoniaceae, também foi possível identificar características presentes em *C. antisiphilitica* ainda não relatadas para nenhuma outra espécie dentro da família, o que poderia sugerir possíveis autapomorfias para a espécie. Poucas generalizações puderam ser feitas com base na literatura existente, visto o número reduzido de estudos embriológicos para Bignoniaceae e a grande variação nos métodos de estudo empregados; contudo, foi possível identificar certas características que, ao que tudo indica, podem ser relevantes na compreensão da filogenia do grupo e úteis para inferir certas tendências evolutivas dentro da família.

VIII. Conclusões Gerais

VIII. Conclusões

Ontogenia do óvulo

- A face micropilar da parede celular do ginósporo calazal apresenta uma pequena depressão, no lado voltado para a micrópila, no fundo da qual a parede celular se torna mais espessada. Tal estrutura parece constituir um caráter autapomórfico de *C. antisiphilitica*, pois não foi relatado para nenhuma outra espécie da família.
- As células da epiderme nucelar de *C. antisiphilitica*, bem como as células endoteliais em contato com a porção micropilar do ginófito em expansão parecem estar envolvidas em num processo de secreção holócrina o que pode estar relacionado tanto com o fornecimento de nutrientes para o SE como com um processo apoptótico relacionado à ampliação do espaço requerido para o desenvolvimento normal do ginófito.
- O acúmulo de uma substância fibrogranular entre o endotélio e a parede do ginófito faz com que o saco embrionário apresente um característico afunilamento mediano. Esta conformação não foi descrita pra nenhuma outra espécie já estudada de Bignoniaceae, consistindo em outra possível característica autapomórfica de *C. antisiphilitica*.

Ontogenia da antera

- Em Bignoniaceae ocorre uma variação do tipo Dicotiledôneo do desenvolvimento da parede do androsporângio. Sendo o endotécio multiestratificado e restrito às regiões laterais das tecas uma característica derivada dentro da família.

- Há um lapso ontogenético, em *C. antisiphilitica*, pois os eventos que se expressam na camada tapetal interna ocorrem com atraso na camada tapetal externa.
- A contração do tecido placentóide pode movimentar o fluído locular causando o deslocamento dos andrósporos dentro de cada androsporângio, o que poderia facilitar a deposição dos constituintes da esporoderme que são secretados pelas camadas tapetais, bem como do *Pollenkit*.
- Em *C. antisiphilitica*, a partir do estágio de CMA, os grãos de amido estão presentes até o momento em que a célula generativa submerge no citoplasma da célula vegetativa. Na maturidade do grão de pólen, não há mais amiloplastos em seu citoplasma; embora este se torne PAS positivo.
- Observou-se similaridades embriológicas entre *C. antisiphilitica* e o gênero *Handroanthus* o que pode refletir a proximidade filogenética existente entre os gêneros, já demonstrada na literatura.
- Fica evidente a necessidade de um maior número de estudos embriológicos dentro de Bignoniaceae para que haja um conjunto mais abrangente de dados que possam ser cruzados com os dados filogenéticos existentes, para verificar se as características morfológicas do endotécio possuem relevância taxonômica dentro da família.

IX. Referências Bibliográficas

IX. Referências Bibliográficas

- ANDERSON, G. J.; JOHNSON, S. D.; NEAL, P. R.; BERNARDELLO, G. 2002. Reproductive biology and plant systematics: the growth of a symbiotic association. *Taxon*, v. 51, n. 4, p. 637-653.
- BITTENCOURT Jr, N. S. 1996. Microsporogênese e etapas da ontogenia do gametófito masculino de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo - Brasil, v. 9, n. 2, p. 9-23.
- BITTENCOURT JR., N. S. & MARIATH, J. E. A. 1997. Ontogenia dos estratos parietais da antera de *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae). *Acta Botânica Brasília*, São Paulo, v. 11, n.1, p. 9-30.
- BITTENCOURT JR., N. S.; MARIATH, J. E. A. 2002a. Pollen Ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae) from Meiosis to Anthesis. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, São Paulo, Brasil, v. 20, n. 1, p. 17-29.
- BITTENCOURT JR., N. S.; MARIATH, J. E. A. 2002b. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): Megasporogenesis and integument development. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 103-115.
- BITTENCOURT JR., N. S.; MARIATH, J. E. A. 2002c. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): Embryo Sac Development. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 117-127.
- BITTENCOURT JR., N. S. ; PEREIRA JUNIOR, E. J. ; SÃO THIAGO, P. S. ; SEMIR, J. 2011. The reproductive biology of *Cybistax antisyphilitica* (Bignoniaceae), a characteristic tree of the South American savannah-like “Cerrado” vegetation. *Flora*, Jena, v. 206, p. 872-886.
- DARWIN, C. R. 1871. *The descendant of man, and selection in relation to sex*. John Murray, London, UK.

- DE SOUZA, L.A., DE OLIVEIRA SANTOS, G., MOSCHETA, I.S. 2010. Morfoanatomia floral de espécies lianescentes de Bignoniaceae. *Iheringia - Série Botânica*, v. 65, n. 1, p. 5-15.
- DUGGAR, B.M. 1899. On the development of the pollen grain and embryo-sac in *Bignonia venusta*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, Nova Iorque, v.26, p. 89-105.
- ENDRESS, P. K. 2002. Morphology and Angiosperm Systematics in the Molecular Reviewed. *The Botanical Review*, v. 68, n. 4, p. 545-570.
- FISCHER, E.; THEISEN, I.; LOHMANN, L. G. 2004. Bignoniaceae. *In* KADEREIT, J. W., [ed.], *The families and genera of vascular plants*, v. 7, Lamiales, p. 9–38. Springer-Verlag, Berlin, Alemanha.
- GALATI, B.G.; STRITTMATTER, L. I. 1999a. Microsporogenesis and microgametogenesis in *Jacaranda mimosifolia* (Bignoniaceae). *Phytomorphology*, Jodhpur, v. 49, n. 1, p.147-155.
- GALATI, B.G.; STRITTMATTER, L. I. 1999b. Ovule Ontogeny and Megasporogenesis in *Jacaranda mimosifolia* D. Don. (Bignoniaceae). *Phytomorphology*, Jodhpur, v. 49, n. 1, p.67-74.
- GALATI, B.G.; STRITTMATTER, L. I. 1999c. Correlation between pollen development and Ubish bodies ontogeny in *Jacaranda mimosifolia* (Bignoniaceae). *Beitr. Biol. Pflanzen*, Berlim, v. 71, p. 249-260.
- GENTRY, A. H. 1980. Bignoniaceae – Part I. *Flora Neotropica Monographs*. v. 25, n. 1, p. 1-131.
- GENTRY, A. H. & TOMB, A. S. 1979. Taxonomic implications of Bignoniaceae palynology. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 66, p. 756 – 777.
- GHATAK, J. 1956. A contribution to the life-history of *Oroxylum indicum* Vent. *Proceedings of the Indian Academy of Science*, Bangalore, v. 43, p.72-87.
- GOVINDU, H.C. 1950. Studies in the embryology of some members of Bignoniaceae. *Proceedings of the Indian Academy of Science B*, v. 32, p. 164-178.
- GUPTA, S.C. & NANDA, K. 1978a. Ontogeny and histochemistry of dimorphic tapetum in *Tecoma stans* anthers. *Bulletin de la Societé Botanique de France*, Paris, v. 12, p. 129-134.

- GUPTA, S.C. & NANDA, K. 1978b. Studies in the Bignoniaceae I. Ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Pyrostegia*. American Journal of Botany, Baltimore, v. 65, n. 4, p. 395-399.
- GUPTA, S.C. & NANDA, K. 1978c. Studies in the Bignoniaceae II. Ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Pyrostegia*. American Journal of Botany, Baltimore, v. 65, n. 4, p. 400-405.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. 2002. Plant systematics: A phylogenetic approach. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos.
- JUST, T. 1946. The Use of Embryological Formulas in Plant Taxonomy. Bulletin of the Torrey Botanical Club, v. 73, n. 4, p. 351-355.
- LLOYD, D. G. & WEBB, C. J. 1992. The selection of heterostyly. In S. C. H. Barrett [ed.], Evolution and function of heterostyly, p. 179 – 207. Springer-Verlag, Berlin, Alemanha.
- LOHMANN, L. G. & ULLOA. 2007. Bignoniaceae. In iPlants prototype Checklist. www.iplants.org (acesso em 21/07/2011).
- MANNING S. D. 2000. The genera of Bignoniaceae in the southeastern United States. Harvard Papers in Botany, Cambridge, v. 5, p. 1-77.
- MAURITZON, J. 1935. Etwas über die Embryologie der Bignoniaceen. Botaniska Notiser, Lund, v. 1935, p. 60-77.
- MEHRA, K. R.; KULKARNI, A. R. 1985. Embryological studies in Bignoniaceae. Phytomorphology, Jodhpur, v. 35, n. 3-4, p.239-251.
- OLMSTEAD, R. G.; ZHANG, M. L.; LOHMANN, L. G.; GROSE, S. O.; ECKERT, A. J. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. American Journal of Botany, Baltimore, v. 96, p. 1731- 1743.
- PLACHNO, B. J. & ŚWIĄTEK, P. 2009. Functional anatomy of the ovule in *Genlisea* with remarks on ovule evolution in Lentibulariaceae. Protoplasma, Viena, v. 236, n. 1-4, p.39-48.

- SCHNARF, K. 1931. Vergleichende Embryologie der Angiospermen. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- SHIVARAMIAH, G. 1998. Endosperm development in Bignoniaceae. *Phytomorphology*, Jodhpur, v. 48, p. 45-50.
- SIMPSON, M.G. 2006. *Plant Systematics*. Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- TOBE, H. 1989. The Embryology of Angiosperms: Its Broad Application to the Systematic and Evolutionary Study. *The Botanical Magazine*, Tóquio, v. 102, p. 351-367.