

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 16/02/2018.

# Embriologia de *Nymphaea* L. (Nymphaeales - Nymphaeaceae): implicações para a evolução inicial das angiospermas

**Eduardo João Pereira Junior**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal.

**Botucatu – SP**

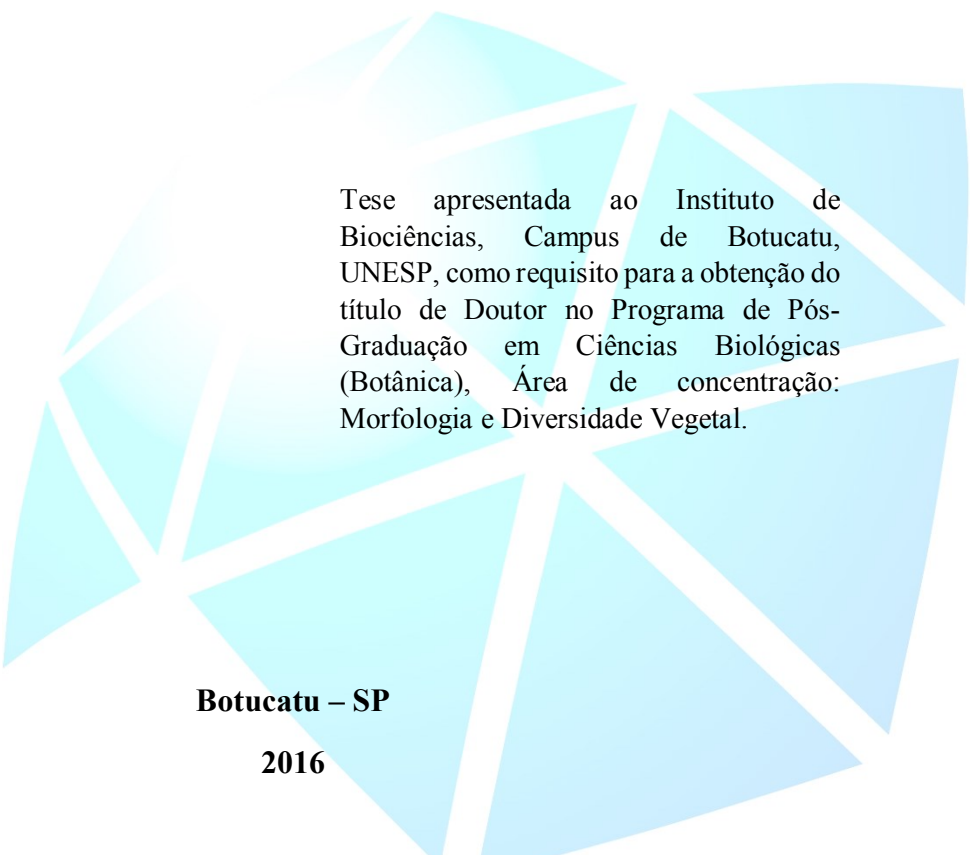
**2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Embriologia de *Nymphaea* L. (Nymphaeales - Nymphaeaceae):  
implicações para a evolução inicial das angiospermas

**Eduardo João Pereira Junior**

**Orientador: Prof. Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior**



Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal.

**Botucatu – SP**

**2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pereira Junior, Eduardo João.

Embriologia de *Nymphaea* L. (Nymphaeales -  
Nymphaeaceae) : implicações para a evolução inicial das  
angiospermas / Eduardo João Pereira Junior. - Botucatu,  
2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: Nelson Sabino Bittencourt Júnior  
Capes: 20302037

1. Plantas - Ontogenia. 2. Plantas - Desenvolvimento.  
3. *Nymphaea*. 4. Angiosperma.

Palavras-chave: Andro- ginogametogênese; Andro-  
ginosporogênese; Ginófito do tipo *Nuphar*/*Schisandra*;  
Homologia embrião-endosperma; Ontogenia do tapete.

## Sumário

Resumo Geral.....	9
Abstract.....	12
Introdução Geral.....	15
Ontogenia dos Andrófitos e Camadas Parietais do Androsporângio.....	17
Ontogenia do Ginófito.....	18
Desenvolvimento do Endosperma e do Embrião.....	19
Objetivos Gerais.....	22
Objetivos Específicos.....	23
Capítulo I.....	24
Ontogenia da Antera e dos Andrófitos de <i>Nymphaea amazonum</i> Mart. & Zucc. subsp. <i>amazonum</i> e <i>N. caerulea</i> Savigny (Nymphaeaceae).....	25
Resumo.....	26
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	29
Resultados.....	30
Ontogenia das anteras e androsporogênese.....	30
Androgametogênese.....	38
Variação Ontogenética da Área do Tapete.....	48
Discussão.....	55
Conclusões.....	63
Agradecimento.....	64
Referências Bibliográficas.....	65
Capítulo II.....	71
Ontogenia do Óvulo e do Ginófito em <i>Nymphaea amazonum</i> Mart. & Zucc. subsp. <i>amazonum</i> , <i>N. caerulea</i> Savigny e <i>N. lotus</i> L. (Nymphaeaceae): Implicações para a Evolução Inicial das Angiospermas.....	72
Resumo.....	73
Abstract.....	74
Introdução.....	75
Material e Métodos.....	76
Preparações para Epifluorescência e Microscopia de Luz.....	76
Reconstrução tridimensional.....	77
Resultados.....	77

Ginosporogênese.....	77
Ginogametogênese.....	86
Discussão.....	104
Conclusões.....	110
Agradecimentos.....	111
Referências Bibliográficas.....	112
Capítulo III.....	120
Desenvolvimento Comparado da Semente de Espécies do Gênero <i>Nymphaea</i> L. (Nymphaeales: Nymphaeaceae) com ênfase na Endospermogênese e Embriogênese.....	121
Resumo.....	122
Abstract.....	123
Introdução.....	124
Material e Métodos.....	126
Preparações para Epifluorescência e Microscopia de Luz.....	126
Resultados.....	127
Discussão.....	153
Endospermogênese.....	153
Perisperma, Tegumentos e Complexo Micrópila – Hilo.....	166
Embriogênese.....	168
Conclusões.....	171
Agradecimentos.....	172
Referências Bibliográficas.....	173
Considerações finais.....	184
Referências Bibliográficas.....	187

“Olhamos as montanhas e  
dizemos que são eternas,  
e é o que parece ser...  
Mas, no correr do tempo,  
montanhas erguem-se e ruem,  
rios mudam de curso, estrelas  
caem do céu, e grandes cidades  
afundam-se no mar. Pensamos  
que até os deuses morrem.  
Tudo muda”.

GEORGE R. R. MARTIN

Dedico este trabalho a todos meus familiares e amigos

## *Agradecimentos*

A Deus pela vida, pelas oportunidades e experiências que me proporcionou.

Ao Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas – IBILCE/ UNESP, Campus de São José do Rio Preto, por proporcionar a infraestrutura necessária para a realização do presente trabalho.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu – IBB/UNESP, Campus de Botucatu, sede do programa de pós-graduação do qual faço parte.

À CAPES pela bolsa de estudos e à FAPESP (processo nº 2014/01529-8) pelo apoio financeiro que possibilitaram a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior, meu orientador desde a iniciação científica, por aceitar e possibilitar que eu pusesse em práticas as ideias que culminaram nesta tese.

À toda a minha família por ter me proporcionado um ambiente saudável de convivência, amor, respeito e compreensão. Especialmente ao meu pai Eduardo, por ser uma companhia constante nas coletas de campo.

Aos senhores Humberto (*in memorian*) e a seu filho Renato, ambos administradores da Fazenda São Sebastião dos Castores, por permitirem as coletas de *Nymphaea amazonum*.

Ao senhor João por dar livre acesso ao corpo d'água no qual foram realizadas as coletas de *Nymphaea caerulea* em seu sítio, no município de Uchoa-SP.

Ao senhor Antônio Carlos, administrador do Clube Náutico de Araraquara por permitir a coleta de *Nymphaea lotus* nas dependências da instituição e, ao chefe de jardinagem Edson Proença por auxiliar nas coletas.

À técnica de laboratório Maria Helena Carabolante pela ajuda constante durante o desenrolar desta tese, pela amizade, incentivo, boa vontade e conselhos.

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

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

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) pelos escassos, mas bons momentos.

Aos companheiros do Rotaract Club São José do Rio Preto – Norte, meus amigos, por fazer com que exercitasse o melhor que há em mim, me ensinando a fazer o bem sem olhar a quem.

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

Meu muito obrigado !!!

*Resumo Geral*

---

Pereira Junior, E. J. **Embriologia de *Nymphaea* L. (Nymphaeales - Nymphaeaceae): implicações para evolução inicial das angiospermas.** 2016. 196 F. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Resumo Geral** - Compreender a diversidade das Nymphaeales, considerado como o segundo ramo da filogenia das angiospermas, é de considerável interesse como modelo da evolução inicial das angiospermas. Este trabalho objetivou investigar a ontogenia da antera, dos óvulos e sementes em espécies de *Nymphaea*. Ovários e sementes de *N. amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum*, *N. caerulea* Savigny e *N. lotus* L. e, anteras de *N. amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum* e *N. caerulea* Savigny, em diversos estádios de desenvolvimento, foram fixados, infiltrados em historesina e as secções obtidas com 1-4 µm foram coradas com azul-de-toluidina O ou submetidas a testes histoquímicos. O desenvolvimento da parede do androsporângio é do tipo básico. Após a meiose, a citocinese simultânea dá origem a tétrades tetraédricas de andrósporos nas quais já são detectáveis a intina e a primexina, há um atraso na liberação dos andrósporos das tétrades em *N. caerulea*. A partir do estádio de andrósporos livres observa-se uma abertura anelar equatorial e, no estádio de andrósporos vacuolados observa-se o ‘pollenkitt’ na superfície da esporoderme. A mitose do andrósporo ocorre perpendicularmente à esporoderme e, a intina se espessa, principalmente abaixo da abertura, onde há a contribuição da endexina para a formação do oncus. O tapete de *N. amazonum* e *N. caerulea* é secretor e não apresenta ciclos invasivo como relatado para *N. colorata*. O tipo básico de desenvolvimento do androsporângio também foi relatado para *Amborella trichopoda*, *Nuphar pumila* e para as duas espécies de *Nymphaea* estudadas, o que sugere ser um padrão comum no grado ANA. Dentro das angiospermas basais os caracteres referentes à ontogenia da antera se mostraram lábeis, sobretudo quanto ao tipo de tapete, à geometria e à dissociação das tétrades e à deposição de ‘pollenkitt’. Nos estádios iniciais da formação do ginósporângio em *N. caerulea* e *N. lotus*, apenas uma em até 3 iniciais subepidérmicas passa pelos eventos que levam a formação do arquespório e da célula parietal, sendo que apenas uma destas células chega a se diferenciar em célula-mãe dos ginósporos (CMG). *Nymphaea amazonum* eventualmente apresenta duas CMG, embora nunca tenham sido observados óvulos com dois ginófitos. Os óvulos das três espécies são trizonados, crassinucelados, bitegmentados, anátropos e a micrópila é endostômica. Todas as espécies apresentam uma zona citoplasmática densa na CMG que é tenuemente positiva para DNA, além de organelas DAPI-positivas dispersas pelo citoplasma. A meiose origina uma tríade linear na qual apenas o ginósporo calazal prossegue seu desenvolvimento, embora as tétrades lineares predominem, tríades lineares foram observadas em várias espécies o que leva a crer que esta organização dos ginósporos evoluiu diversas vezes dentro do grado ANA. No

estádio de ginósporo binuclear observou-se a migração conjunta dos núcleos em direção ao polo micropilar do ginófito, o que traz algumas implicações à conceituação de módulo básico de desenvolvimento do ginófito presente na literatura. Contudo, a presença do ginófito do tipo *Nuphar/Schisandra* em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus*, conjuntamente com as implicações levantadas pelo conflito interparental e o aumento no valor adaptativo do endosperma triploide para as angiospermas corroboram a plesiomorfia deste tipo de ginófito. O desenvolvimento do endosperma em *Nymphaea* é *ab initio* celular, e a primeira divisão da célula endospérmica primária estabelece os domínios micropilar e calazal do endosperma, sendo que o padrão de divisões iniciais do endosperma variou para cada uma das espécies. As paredes periclinais internas e parte das anticlinais das células da porção micropilar da epiderme nucelar apresentaram espessamentos positivos para celulose em todas as espécies e, em *N. amazonum* também houve a deposição de calose, o que pode indicar que consistem em células de transferência. Na semente madura o endosperma é restrito a uma camada celular que envolve o embrião, este último é composto por um epicótilo com dois primórdios foliares assimétricos de filotaxia decussada em relação aos dois cotilédones. Os cotilédones são hemisféricos e envolvem completamente o epicótilo. Acima da radícula, o cilindro procambial se ramifica para suprir cada um dos órgãos apendiculares. Tanto as células embrionárias (sobretudo as cotiledonares) como as endospérmicas exibem amiloplastos e inclusões de natureza glicoproteica (provavelmente grânulos de aleurona), o que favorece a teoria sobre a homologia entre o embrião e o endosperma em *Nymphaea*.

*Palavras-chave:* andro- ginosporogênese, andro- ginogametogênese, atraso na dissociação das tétrades, geometria das tétrades, ontogenia do tapete, migração nuclear, ginófito do tipo *Nuphar/Schisandra*, homologia embrião-endosperma, epiderme nucelar, grado ANA.

*Abstract*

---

Pereira Junior, E. J. **Embryology of *Nymphaea* L. (Nymphaeales - Nymphaeaceae): implications for the early evolution of angiosperms.** 2016. 196 F. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Abstract** - Understanding the diversification of Nymphaeales, the second branch in the angiosperm phylogenetic tree, has a considerable interest to propose models of early evolution of the angiosperms. This work aims to analyze the anther and ovule ontogeny in species of *Nymphaea*. Ovaries and seeds of *N. amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum*, *N. caerulea* Savigny and *N. lotus* L. and, anthers of *N. amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum* and *N. caerulea* Savigny, in several development stages, were fixed infiltrated in historesin and the sections with 1-4  $\mu\text{m}$  were stained with toluidine blue O or submitted to histochemical tests. The androsporangium wall follows the basic type of development. After meiosis, a simultaneous cytokinesis give rise a tetrahedral tetrad of androspores, the intine and primexine is detectable in this stage and, in *N. caerulea* occurs a delay in the release of androspores from the tetrads. We observe an equatorial ring-like aperture in the free androspores stage and, in vacuolated androspores the ‘pollenkitt’ is visualized in the sporoderm surface. The mitosis of the androspore occurs perpendicularly to sporoderm and, the intine begins to thicken beneath the aperture and, together with the endexine originate the oncus. The tapetum of *Nymphaea amazonum* and *N. caerulea* are secretor and do not show invasive cycles as reported to *N. colorata*. The basic type of androsporangium wall development also are reported to *Amborella trichopoda*, *Nuphar pumila* and for the species of *Nymphaea* studied, suggesting that it is a common pattern in ANA grade. The characters observed in anther ontogeny is labile in basal angiosperms specially the tapetum type, the geometry and the dissociation of tetrads and the ‘pollenkitt’ deposition. In the early stages of gynosporangium in *N. caerulea* and *N. lotus*, only one of up to three subepidermic initial cells divides and originates the archesporium and the parietal cells and, only one of the archesporial cells differentiates in gynospore mother cell (GMC). In *N. amazonum*, eventually occurs ovules with two GMC, although we never observe ovules with two gynophytes at maturity. The ovules of the three species are trizonate, crassinucellate, anatropous and the micropyle is endostomic. All species show a cytoplasmically dense zone in the GMC slightly labeled to DNA, and there are organelles DAPI-positive spread in the cytoplasm. The meiosis originates a linear triad and just the chalazal gynospore proceeds the development. Although the linear tetrads predominates, the presence of triads spread in the group, suggest that this organization of the gynospores evolved several times in ANA grade. The binucleated gynospores exhibit a conjunct migration of the nuclei toward the micropylar pole of the gynophyte, which brings some implications for the concept of basic module of the

gynophyte development present in the literature. Nevertheless, the presence of *Nuphar/Schisandra* type of gynophyte in *N. amazonum*, *N. caerulea* and *N. lotus* together with the implications indicated to interparental conflict theory and the increase of the fitness caused by triploid endosperm in the angiosperms corroborate the plesiomorphy of this type of gynophyte. The endosperm development in *Nymphaea* is *ab initio* cellular, and the first division of the primary endospermic cell establishes a micropylar and a chalazal domain in the endosperm. The pattern of the initial divisions of the endosperm varies between species. The inner periclinal and part of the anticlinal walls of the cells of the micropilar portion of the nucellar epidermis exhibit thickenings that were positive for cellulose in all species; in *N. amazonum* these walls also were positive to callose, which indicates that they consist in transfer cells. In the mature seed, the endosperm is restricted to a cell layer that surrounds the embryo; the latter consists of an epicotyl with two asymmetric leaf primordia with decussate phyllotaxis in relation to the cotyledons. The cotyledons are hemispheric and surrounds the epicotyl. Above radicle, the procambial cylinder branches to supply each of the embryo appendages. Both embryonic cells (especially those of the cotyledons) and endosperm cells exhibit amyloplasts and inclusions with glycoproteic nature that, probably, consist of aleurone grains. These findings support the theory of homology between the embryo and the endosperm in *Nymphaea*.

*Keywords:* andro- gynosporogenesis, andro- gynogametogenesis, delay in the tetrad dissociation, tetrad geometry, tapetum ontogeny, nuclear migration, gynophyte of *Nuphar/Schisandra* type, embryo-endosperm homology, nucellar epidermis, ANA grade.

## *Introdução Geral*

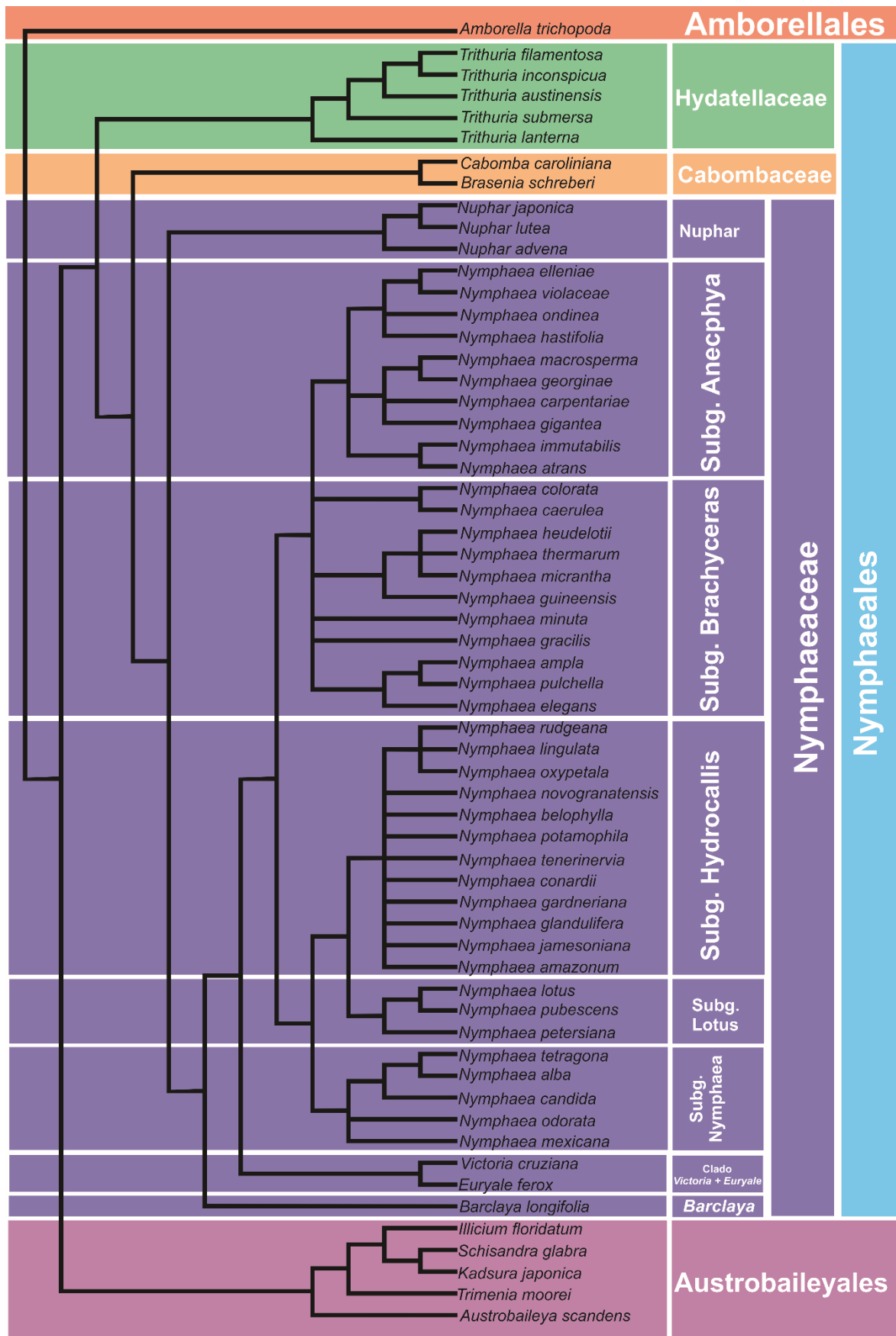
---

## Introdução Geral

Durante o século XX assumiu-se que os grupos de divergência mais antiga dentro das angiospermas consistiriam nas Magnoliales, Laurales e Winterales (Canellales) (Friedman & Williams, 2003; Friedman & Ryerson, 2009). Contudo, recentemente, com o emprego de técnicas moleculares, foram delineadas novas relações filogenéticas para as angiospermas e o grado ANA (*Amborella*, Nymphaeales [Hydatellaceae, Cabombaceae, Nymphaeaceae] e Austrobaileyales [Austrobaileyaceae, Trimeniaceae, Illiciaceae, Schisandraceae]) foi apontado como basal para todas as angiospermas (Mathews & Donoghue 1999; Soltis et al. 1999; APG III, 2009 ; Kim et al., 2004; Soltis & Soltis, 2004; Hansen et al., 2007; Saarela et al., 2007; Qiu & Estabrook, 2008).

A maioria dos estudos filogenéticos baseados em sequências de diversas regiões genômicas tem concordado em inferir Nymphaeales como o “segundo” ramo (fig. 01), depois de *Amborella*, na filogenia das angiospermas (Qiu et al., 1999, 2005; Soltis et al., 1999, 2000; Zanis et al., 2002; Borsch et al., 2003, 2008; Hilu et al., 2003). Esta ordem é constituída por ervas morfológicamente complexas com flores conspícuas e sistemas de polinização especializados, estando presente nas zonas climáticas temperadas e tropicais ao redor do globo, em ecossistemas de água doce com pouca ou nenhuma corrente (Borsch et al., 2008). Compreender a diversificação das Nymphaeales é de considerável interesse como um modelo da evolução inicial das angiospermas (Borsch et al., 2008).

Nymphaeaceae apresenta cinco gêneros após a inclusão de *Ondinea* em *Nymphaea* por Löhne et al. (2009) (*Barclaya*, *Euryale*, *Nuphar*, *Nymphaea* e *Victoria*), por sua vez o gênero *Nymphaea* divide-se em cinco subgêneros (*Anecphyta*, *Brachyceras*, *Hydrocallis*, *Lotus* e *Nymphaea* – fig. 01) (Conard, 1905; Warner et al., 2008; Borsch et al., 2008; Borsch et al., 2011). Jacobs & Porter (2007), com base na transição gradual entre pétalas e estames e na ausência de processos estilares, propuseram um sexto subgênero a partir de algumas espécies de *Anecphyta* e nomearam-no de *Confluentes*. Conard (1905), com relação à fusão carpelar, divide ainda os subgêneros de *Nymphaea* em dois grupos que seriam as principais linhagens dentro do gênero e consistiriam em Apocarpiae (*Anecphyta* e *Brachyceras* com fusão incompleta entre os carpelos) e Syncarpiae (*Hydrocallis*, *Lotus* e *Nymphaea* com fusão completa entre os carpelos). As Nymphaeaceae possuem cerca de 70 espécies sendo que de 45 a 50 espécies são compreendidas pelo gênero *Nymphaea* (*Anecphyta* [de 7 a 10 espécies], *Brachyceras* [de 14 a 16 espécies], *Hydrocallis* [14 espécies], *Lotus* [de 2 a três espécies] e *Nymphaea* [8 espécies]), consistindo no único gênero globalmente diversificado dentro das angiospermas basais (Borsch et al., 2007).



**Figura 01.** Filogenia do grado ANA, com destaque para Nymphaeaceae, sobretudo para os subgêneros de *Nymphaea* (baseado em Qiu et al., 2006; Saarela et al., 2007; Morris et al., 2007; Borsch et al., 2011; Biswal et al., 2012).

Levando-se em conta que os aspectos reprodutivos constituem a maioria das características que separam as angiospermas de outras plantas com sementes, o conhecimento a respeito da biologia reprodutiva das linhagens basais das angiospermas é crítico para reconstruir os estados de caracteres ancestrais e chave para a compreensão da origem e evolução inicial deste clado (Sargent, 1908; Crane et al., 1995).

### *Ontogenia dos Andrófitos e Camadas Parietais do Androsporângio*

Embora Gabarayeva & Rowley (1994) e Gabarayeva et al. (2001) afirmem que vários estudos acerca da morfologia polínica tenham sido realizados para a família Nymphaeaceae, as referências bibliográficas indicadas pelos autores evidenciam uma série de trabalhos antigos que possuem uma perspectiva, predominantemente, tipológica. Tais aspectos são apontados por Furness et al. (2002) que afirmam que a literatura referente à androsporogênese nas angiospermas basais demonstra tanto a existência de uma grande diversidade morfológica quanto a ocorrência de dados conflituosos. Muitos desses dados são resultados da ausência de técnicas mais sofisticadas de microscopia quando da realização dos referidos estudos, assim como da não utilização de uma abordagem filogenética na interpretação das informações obtidas (ver Gabarayeva & Rowley, 1994; Gabarayeva et al., 2001 e Furness et al., 2002).

Em Nymphaeaceae a maioria dos estudos realizados sobre a morfologia polínica se ocupa da estrutura da esporoderme, sobretudo da exina (ver Jones & Clarke, 1981), e mesmo os trabalhos ontogenéticos dão ênfase ao desenvolvimento desta estrutura (Takahashi, 1992; Gabarayeva & Rowley, 1994; Gabarayeva et al., 2001 e Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997). Em Nymphaeaceae, durante a diferenciação das células-mãe dos andrósporos, 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, e a presença de citocinese simultânea é um padrão para a família, (Guignard, 1897; Schnarf, 1931; Rowley et al., 1992; Takahashi, 1992; Gabarayeva & Rowley, 1994; Roland, 1965). Em *N. colorata* e *Nuphar* originam-se tétrades tetraédricas de andrósporos (Rowley et al., 1992; Zhou & Fu, 2008). Khanna (1967) e Taylor et al. (2013) relataram para *Victoria cruziana*, *V. amazonica* e seus híbridos que os grãos de pólen são liberados como tétrades permanentes. Em Nymphaeales além do gênero *Victoria*, há relatos de tétrades permanentes em *N. tetragona* (Ueno, 1962) e *Trithuria inconspicua* (Remizowa et al., 2008).

O tapete em *Brasenia*, *Euryale*, *Nuphar*, *Nymphaea* e *Victoria* foi referido como do tipo secretor (Khanna, 1965 e 1967; Wunderlich, 1954; Clausen, 1927; Schnarf, 1931; Rowley et al., 1992; Taylor & Osborn, 2006; Taylor et al., 2012). Também há um relato de tapete invasivo

em *Cabomba caroliniana*, (Taylor et al., 2008). Rowley et al. (1992) relataram para *N. colorata* a ocorrência de pulsos de aumento e diminuição do volume nas células da camada tapetal, as quais alongam-se em direção ao centro do lóculo e logo depois retrocedem. Pacini (1990, 2010) também relata, para outras angiospermas, um possível mecanismo de movimentação do fluido locular por meio da pulsação das camadas tapetais durante o estágio de andrósporos livres. Tal movimentação, causaria a rotação e mistura dos andrósporos/grãos de pólen e poderia maximizar o contato entre estes e o tapete (Pacini et al., 1985). Portanto, é provável que as espécies de *Nymphaea* empregadas neste trabalho, possam apresentar eventos de expansão e retração do tapete, relacionados à circulação do fluido locular durante estádios consecutivos de desenvolvimento dos andrósporos/grãos de pólen.

Os estudos presentes na literatura evidenciam a grande variação no desenvolvimento do andrófito e das camadas parietais da antera dentro da família Nymphaeaceae. Dado o número de trabalhos existentes e seu enfoque concentrado, sobretudo em aspectos palinológicos e no desenvolvimento da esporoderme, fica explícita a necessidade de estudos ontogenéticos mais abrangentes que certamente serão elucidativos na compreensão da evolução e taxonomia do grupo; contudo, para que isso seja possível um número maior de espécies dentro da família deve ser investigado para obtenção de dados relevantes.

### *Ontogenia do Ginófito*

Tendo em vista o paradigma vigente sobre a filogenia das angiospermas durante o século XX, e a ampla ocorrência do ginófito monospórico do tipo *Polygonum* (sete células e oito núcleos) nos táxons até então considerados basais na filogenia das angiospermas (Magnoliales, Laurales e Winterales (Canellales)), tal estado de caráter foi considerado plesiomórfico para as angiospermas (Friedman & Williams, 2003). Contudo, Friedman & Williams (2003) apontam que vários estudos embriológicos relataram a presença do ginófito com quatro núcleos e quatro células (também denominado de tipo *Nuphar/Schisandra* por Friedman & Ryerson, 2009) e não o suposto ginófito do tipo *Polygonum* dentro do grupo que hoje se conhece como o grado ANA. Até o final do século passado, o ginófito do tipo *Nuphar/Schisandra* tinha sido observado em quatro dos seis gêneros estudados em Nymphaeaceae, um dos dois gêneros de Cabombaceae e dois dos três gêneros de Illiciales (Yoshida 1962; Swamy, 1964; Solntseva, 1981; Batygina et al., 1982; Galati, 1985; Winter, 1987, 1993; Titova 1990; Winter & Shamrov 1991a, b; Van Miegroet & Dujardin, 1992; Orban & Bouharmont, 1998; Shamrov, 1998). Alguns desses trabalhos entram em conflito uns com os outros, pois reportam para o mesmo táxon o ginófito do tipo *Polygonum* e o do tipo *Nuphar/Schisandra* e ainda, muitos deles não trazem ao menos

um único desenho para documentação, enquanto outros oferecem interpretações inconsistentes com as figuras (Cook, 1902, 1906; Conard, 1905; Seaton, 1908; Kapil, 1962; Hayashi, 1963a,b; Kapil & Jalan, 1964; Khanna, 1964, 1965, 1967; Ramji & Padmanabhan, 1965; Schneider, 1978; Batygina et al. 1980; Schneider & Jeter 1982). Maheshwari (1947, 1950) julgou que todas as observações de ginófitos com quatro células e quatro núcleos fora da família Onagraceae são errôneas ou carecem de fundamentação, caso seu desenvolvimento não tenha sido adequadamente estudado.

Uma das dificuldades em determinar se um ginófito porta originalmente quatro células e quatro núcleos se deve ao fato de que, durante a ontogenia, os ginófitos do tipo *Polygonum* podem adquirir a configuração de quatro células e quatro núcleos pela degeneração das antípodas seguida da fusão dos dois núcleos polares formando um núcleo secundário diploide, ou seja, um ginófito do tipo *Polygonum* críptico (Friedman & Williams, 2003). Portanto, o simples relato de um ginófito do tipo *Nuphar/Schisandra* na maturidade do primórdio seminal é altamente questionável caso não tenha sido efetuado um estudo ontogenético minucioso, além do que, a maioria dos estudos embriológicos comparativos realizados nas angiospermas basais, excetuando-se Nymphaeales e Austrobaileyales, relata a natureza efêmera das antípodas bem como uma rápida fusão entre os núcleos polares (Friedman & Williams, 2003). Desta maneira a constatação inequívoca da presença de um ginófito com quatro células e quatro núcleos do tipo *Nuphar/Schisandra* está condicionada ao estudo detalhado da ontogenia do gametófito feminino e, adicionalmente, à quantificação da ploidia da célula central na maturidade (Friedman & Williams, 2003). Outras características que podem ser utilizadas para discernir o ginófito do tipo *Nuphar/Schisandra* de um do tipo *Polygonum* críptico é a não migração dos núcleos aos polos opostos do ginófito no estágio binucleado e a ausência de núcleos no domínio calazal do saco embrionário (Friedman & Williams, 2003).

O ginófito do tipo *Nuphar/Schisandra* consistiria na unidade modular básica na evolução do gametófito feminino das angiospermas, sendo que o ginófito do tipo *Polygonum* seria o produto da duplicação ectópica deste módulo, conforme proposto por Friedman & Williams (2003) e Friedman & Williams (2004). Uma série de trabalhos recentes tem demonstrado que nenhum dos táxons do grado ANA analisados até o momento possui um ginófito do tipo *Polygonum* (ver Friedman & Ryerson, 2009). A presença do ginófito do tipo *Nuphar/Schisandra* nas espécies da família Nymphaeaceae empregadas em nosso estudo, pode corroborar a hipótese de que este estado de caráter (saco embrionário com quatro células e quatro núcleos) seria plesiomórfico para as angiospermas.

A dupla fecundação é um caráter único das angiospermas que as possibilita produzir sementes sob condições ambientais desfavoráveis (Hamamura et al., 2012). Este fenômeno se encontra na intersecção entre as vias ontogenéticas do andrófito, ginófito, esporófito materno, embrião e endosperma (Friedman & Williams, 2003), sendo que o endosperma consiste em um tecido que não participa da nova geração esporofítica e está relacionado à nutrição do embrião em desenvolvimento (Berger, 2011). Até o final do século XX, dada a presença de um endosperma triploide na maioria das angiospermas, assim como o reconhecimento equivocado de táxons derivados na base da filogenia das angiospermas, considerou-se este estado de caráter como plesiomórfico; contudo, com o delineamento de novas relações filogenéticas foi possível discernir os táxons que de fato constituíam as linhagens basais dentro das plantas com flores (Friedman & Williams, 2003). Estudos recentes sobre o desenvolvimento do endosperma nesses táxons têm demonstrado que a condição ancestral das angiospermas é o endosperma diploide, produto da fecundação do núcleo haploide da célula central do ginófito do tipo *Nuphar/Schisandra* por uma das células espermáticas (Williams & Friedman, 2002; Friedman & Williams, 2004; Friedman, 2008; Friedman & Ryerson, 2009).

A presença de um endosperma diploide nas angiospermas basais possui implicações sobre o investimento de cada indivíduo da geração parental na nutrição embrionária, fenômeno denominado conflito intersexual, que é ocasionado pela interação entre os genomas paterno e materno, assim como pela razão entre eles e que, teoricamente, poderia ser mensurado pela agressividade do endosperma na alocação de recursos maternos para a nutrição do embrião. Essa agressividade promovida pelo genoma paterno seria uma vantagem para sua prole, em detrimento da prole da mesma planta-mãe, proveniente do pólen de outros indivíduos (Wu et al., 2013). A condição triploide do endosperma poderia ser uma resposta materna ao conflito intersexual no sentido de distribuir igualmente recursos à sua prole (Haig & Westoby, 1989).

O aumento da ploidia também pode ser interpretado como uma vantagem evolutiva, pois uma ploidia elevada, em tese, aumentaria os níveis de transcrição gênica, suportando uma alta atividade fisiológica do endosperma (Friedman et al., 2008). Em última instância, um endosperma diploide, resultado da fecundação da célula central haploide nas angiospermas basais, e um endosperma triploide, resultado da fecundação da célula central haploide, porém binucleada nas angiospermas derivadas, está em consonância com a teoria que propõe que o ginófito do tipo *Polygonum* é resultado da duplicação ectópica da unidade modular básica do saco embrionário, e que esta seria representada pelo ginófito do tipo *Nuphar/Schisandra* (Friedman & Williams, 2003).

O endosperma *ab initio* celular é considerado padrão dentro da família Nymphaeaceae (Floyd & Friedman, 2000, 2001). Em *Cabomba caroliniana*, *Nuphar polysepala*, e *N. thermarum*, o domínio calazal do endosperma permanece unicelular e se diferencia em uma estrutura haustorial, embora o domínio calazal do endosperma não tenha sido observado em *Trithuria submersa* (Floyd & Friedman, 2000, 2001; Friedman et al., 2012, Povilus et al., 2015), salvo o relato de uma lacuna entre o domínio micropilar do endosperma e o perisperma apontado por Rudall et al. (2009) e interpretado como uma região previamente ocupada pela célula haustorial do domínio calazal do endosperma. Em *Nuphar polysepala*, *N. thermarum* e *Trithuria submersa* o domínio micropilar do endosperma é *ab initio* celular (Floyd & Friedman, 2001; Friedman et al., 2012; Povilus et al., 2015) e, em *Cabomba caroliniana* passa por uma fase de núcleos livres, portanto se caracterizando com o um endosperma helobial (Floyd & Friedman, 2000). Khanna (1964, 1967) relatou a presença do endosperma nuclear (cariocineses não acompanhadas de citocinese) no gênero *Euryale* e de um endosperma helobial (cariocinese não acompanhada de citocinese em pelo menos um dos dois domínios do endosperma) em *N. stellata*.

Poucos foram os trabalhos que se ocuparam em analisar o desenvolvimento do endosperma em Nymphaeaceae (*Nymphaea* – Cook, 1906; *Euryale* – Khanna, 1964; *Nymphaea* e *Victoria* – Khanna, 1967; *Nuphar* – Floyd & Friedman, 2001; *Nymphaea* – Povilus et al., 2015), sendo que apenas em *Nuphar polysepala* (Floyd & Friedman, 2001) há uma descrição completa do processo ontogenético, sendo que os demais trabalhos trazem apenas informações fragmentadas, além de que conclusões equivocadas podem ter sido geradas pelo emprego de diferentes protocolos de fixação e processamento do material botânico. Qualquer proposição que procure atribuir padrões embriológicos a uma família em particular deve ser baseada numa amostra de espécies representativa da mesma (Just, 1946), ainda mais quando tais padrões podem e serão utilizados para polarizar estados de caracteres, implicando no entendimento de uma estrutura evolutivamente tão importante como o endosperma, sobretudo no contexto das angiospermas basais. Portanto, a análise ontogenética do endosperma em *Nymphaea* L. contribuirá para verificar se o endosperma do tipo celular de fato predomina dentre as Nymphaeaceae, e permitirá uma compreensão das particularidades do padrão inicial de divisões celulares no domínio micropilar do endosperma.

Pouca atenção foi dada ao desenvolvimento do embrião de Nymphaeaceae, sobretudo a aspectos da histogênese e organogênese. Cook (1906), a partir do estudo das espécies de *N. odorata* (= *Castalia odorata*) e *N. advena* verificou que no momento em que o embrião esférico com oito células emite o suspensor ligando-o ao nucelo há a passagem para o estágio no qual o embrião se mostra piriforme. Schneider (1978) e Schneider & Ford (1978) relataram para

*Barclaya longifolia* e *N. ondinea* (= *Ondinea purpurea*) que o embrião apresenta um suspensor curto, portando apenas três células e, a partir do desenvolvimento do meristema apical caulinar no embrião maduro, os cotilédones passam a apresentar um formato semiesférico e envolvem o epicótilo. Dois primórdios foliares são formados em arranjo decussado em relação aos cotilédones, e o primeiro desses primórdios tem um desenvolvimento acelerado em relação ao segundo, o que dá a impressão de que este último consiste em um apêndice lateral. Neste estágio do desenvolvimento o meristema apical se localiza na junção entre os dois primórdios. Ainda segundo Schneider (1978) e Schneider & Ford (1978), na semente madura, os cotilédones, os primórdios foliares e o meristema apical caulinar são supridos por apenas um cordão procambial não ramificado. Baskin & Baskin (2007) propõe que, dentre as angiospermas basais, apenas as Nymphaeales apresentam um embrião completamente desenvolvido na maturidade da semente, isto é, que tenha alcançado o estágio imediatamente anterior à emergência da radícula. Ou seja, dada a escassez de trabalhos voltados à embriogênese da família e os padrões singulares de desenvolvimento em Nymphaeaceae, fica claro o grande número de caracteres negligenciados que são potencialmente empregáveis no entendimento da evolução do embrião e taxonomia de Nymphaeaceae, assim como a importância da prospecção de tais dados.

A partir da investigação do desenvolvimento do endosperma e do embrião será possível, por meio da comparação de dados morfológicos e histoquímicos verificar se há embasamento para sustentar a hipótese da homologia entre endosperma e embrião (Sargent, 1900; Friedman, 1995). Este estudo também contribuirá para o aumento do número de espécies analisadas dentro da família, o que permitirá sustentar com maior segurança que o desenvolvimento do endosperma do tipo *ab initio* celular é padrão dentro de Nymphaeaceae. Também será possível contribuir com a discussão a respeito da presença de um ou dois cotilédones em Nymphaeaceae, assim como a homologia entre o cotilédone das monocotiledôneas e os cotilédones das “dicotiledôneas” (grado ANA, das Magnoliídeas, das Chloranthales e das eudicotiledôneas), também será possível fornecer subsídios ao debate sobre a homologia entre os cotilédones e os primórdios foliares das angiospermas (Kaplan & Cooke, 1997; Burger, 1998; Chandler, 2008).

### *Objetivos Gerais*

1. Descrever a androsporogênese, a androgametogênese e desenvolvimento do tapete e das camadas parietais do androsporângio em *N. amazonum* e *N. caerulea*.

*Considerações Finais*

---

### *Considerações Finais*

A análise histológica da embriologia de *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* agrega mais dados que suportam a grande diversidade relatada para o grado ANA. Apesar das dificuldades referentes a terminologia, as fases de desenvolvimento empregadas e a falta de padronização em estudos embriológicos que comprometem uma análise mais ampla dos caracteres reprodutivos numa perspectiva filogenética, fica evidente a necessidade de centrar esforço no estudo da embriologia dos grupos basais para compreendermos melhor a evolução inicial das angiospermas.

Este estudo apontou relevantes aspectos do gênero *Nymphaea*, tais com o atraso na dissociação das tétrades em *N. caerulea*, assim como a ausência de um tapete cíclico invasivo relatado para outras espécies de *Nymphaea*. Também descreveu a migração conjunta dos núcleos para o domínio micropilar, durante o estágio bicelular do ginófito, fato nunca antes relatado para outra espécie do grado ANA, além da confirmação da presença do ginófito do tipo *Nuphar/Schisandra* nos táxons estudados. Em relação à ontogenia da semente, foi possível evidenciar a presença de um endosperma *ab initio* celular que não é unisseriado como relatado na literatura, exibindo variação intraespecífica quanto ao padrão inicial de divisões celulares. A presença massiva de grânulos de aleurona nas células do endosperma e embrião, sobretudo nas cotiledonares, além da presença de uma quantidade moderada de amiloplastos simples, fornece indícios que demonstram similaridade entre estas duas entidades evolutivas, consistindo em argumentos favoráveis à homologia entre endosperma e embrião. A presença de uma sinérgide que persiste até estádios avançados de desenvolvimento em *N. caerulea*, também é uma novidade nunca antes relatada.

A embriologia dos grupos basais de angiospermas fornece um intrigante e fértil campo de estudo que ainda possui muitas lacunas a serem preenchidas, sobretudo referentes a eventos envolvidos numa possível duplicação ectópica do módulo básico de desenvolvimento do ginófito, onde, por exemplo, nenhum estudo comparativo foi realizado para levantar as alterações citoesqueléticas necessárias para originar um ginófito com sete células e oito núcleos a partir de um ginófito com quatro células e quatro núcleos, tais informações não só explicariam um evento evolutivo muito intrigante, como poderiam fornecer dados que corroborariam a referida teoria. Um estudo proteômico e ultraestrutural das células do endosperma e embrião poderiam trazer mais argumentos a favor da hipótese da homologia endosperma-embrião, e um estudo ultraestrutural da porção micropilar da epiderme nucelar também poderiam confirmar as suspeitas de que tal tecido consistiria em células de transferência em *Nymphaea*.

## ***Referências Bibliográficas***

---

*Referências Bibliográficas*

- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 161: 105-121.
- BASKIN, C. C. & BASKIN, J. M. 2007. Nymphaeaceae: A basal angiosperm family (ANITA grade) with a fully developed embryo. Seed Sci. Res. 17: 293–296.
- BATYGINA, T. B.; KRAVTSOVA, T. I.; SHAMROV, I. I. 1980. The comparative embryology of some representatives of the orders Nymphaeales and Nelumbonales. Bot. Zh. 165: 1071–1087.
- BATYGINA, T. B.; SHAMROV, I. I.; KOLESOVA, G. E. 1982. Embryology of the Nymphaeales and Nelumbonales. II. The development of the female embryonic structures. Bot. Zh. 67: 1179–1195.
- BERGER, F. 2003. Endosperm: the crossroad of seed development. Curr. Op. Plant Biol. 6: 42–50.
- BISWAL, D. K.; DEBNATH, M.; KUMAR, S.; TANDON, P. 2012. Phylogenetic reconstruction in the order Nymphaeales: ITS2 secondary structure analysis and *in silico* testing of maturase k (*matK*) as a potential marker for DNA barcoding. BMC Bioinformatics 13(Suppl 17): S26.
- BORSCH, T.; HILU, K.W.; QUANDT, D.; WILDE, V.; NEINHUIS, C.; BARTHLOTT, W. 2003. Non-coding plastid trnT-trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. J. Evolution Biol. 16: 558–576.
- BORSCH, T.; HILU, K.W.; WIERSEMA, J.H.; LÖHNE, C.; BARTHLOTT, W.; WILDE, V. 2007. Phylogeny of *Nymphaea* (Nymphaeaceae): evidence from substitutions and microstructural changes of the chloroplast trnT-F region. Int. J. Plant Sci. 168: 639–671.
- BORSCH, T.; LÖHNE, C.; WIERSEMA, J. 2008. Phylogeny and evolutionary patterns in Nymphaeales: integrating genes, genomes and morphology. Taxon 57(4): 1052–1081.

- BORSH, T.; LÖHNE, C.; MBAYE, M. S.; WIERSEMA, J. 2011. Towards a complete species tree of *Nymphaea*: shedding further light on subg. *Brachyceras* and its relationships to the Australian water-lilies. *Telopea* 13(1-2): 193–217.
- BURGER, C. W. 1998. The question of cotyledon homology in angiosperm. *Bot. Rev.* 64(4): 357–371.
- CHANDLER, J. W. 2008. Cotyledon organogenesis. *J. Exp. Bot.* 59(11): 2917–2931.
- CLAUSEN, P. 1927. Ueber das Verhalten des Antheren-Tapetums bei einigen Monokotylen und Ranales. *Bot. Archiv.* 18: 1–2.
- CONARD, H. S. 1905. The water lilies: a monograph of the genus *Nymphaea*. 4. ed. Baltimore: The Carnegie Institution of Washington.
- COOK, M. T. 1902. Development of the embryo sac and embryos of *Castalia odorata* and *Nymphaea advena*. *Bull. Tor. Bot. Club* 29: 211–220.
- COOK, M. T. 1906. The embryogeny of some Cuban Nymphaeaceae. *Bot. Gaz.* 42: 376–395.
- CRANE, P. R. 1995. The origin and early diversification of angiosperms. *Nature* 374: 27–33.
- FLOYD, S. K. & FRIEDMAN W. E. 2000. Evolution of endosperm developmental patterns among basal flowering plants. *Int. J. Plant Sci.* 16: S57–S81.
- FLOYD, S.K. & FRIEDMAN, W. E. 2001. Developmental evolution of endosperm in basal angiosperms: evidence from *Amborella* (Amborellaceae), *Nuphar* (Nymphaeaceae), and *Illicium* (Illiciaceae). *Plant Syst. Evol.* 228: 153–169.
- FRIEDMAN, W. E. 1995. Organismal duplication, inclusive fitness theory, and altruism understanding the evolution of endosperm and the angiosperm reproductive syndrome. *PNAS* 92: 3913–3917.

FRIEDMAN, W.E. 2008. Hydatellaceae are water lilies with gymnospermous tendencies. *Nature* 453: 94-97.

FRIEDMAN, W. E.; BACHELIER, J. B.; HORMAZA, J. I. 2012. Embryology in *Trithuria submersa* (Hydatellaceae) and relationships between embryo, endosperm, and perisperm in early diverging flowering plants. *Am. J. Bot.* 99: 1083–1095.

FRIEDMAN, W. E.; MADRID, E. N.; WILLIAMS, J. H. 2008. Origin of the Fittest and Survival of the Fittest: Relating Female Gametophyte Development to Endosperm Genetics. *Int. J. Plant Sci.* 169(1): 79–92.

FRIEDMAN, W. E. & WILLIAMS, J. H. 2003. Modularity of the angiosperm female gametophyte and its bearing on the early evolution of endosperm in flowering plants. *Evolution* 57(2): 216-230.

FRIEDMAN, W.E. & WILLIAMS, J.H. 2004. Developmental Evolution of the Sexual Process in Ancient Flowering Plant Lineages. *The Plant Cell* 16: S119–S132.

FRIEDMAN, W. E. & RYERSON, K. C. 2009. Reconstructing the ancestral female gametophyte of angiosperms: insights from *Amborella* and other ancient lineages of flowering plants. *Am. J. Bot.* 96: 129-143.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J.; SAMPSON, F. B. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *Int. J. Plant Sci.* 163(2): 235–260.

GALATI, B. G. 1985. Estudios embriológicos en *Cabomba australis* (Nymphaeaceae). I. La esporogenesis y las generaciones sexuadas. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 24: 29 – 47.

GABARAYEVA, N. I. & ROWLEY, J. R. 1994. Exine development in *Nymphaea colorata* (Nymphaeaceae). *Nord. J. Bot.* 14: 671-691.

GABARAYEVA, N. & EL-GHAZALY, G. 1997. Sporoderm development in *Nymphaea mexicana* (Nymphaeaceae). *Plant Syst. Evol.* 204: 1–19.

GABARAYEVA, N.; WALLES, B.; EL-GHAZALY, G.; ROWLEY, J. R. 2001. Exine and tapetum development in *Nymphaea capensis* (Nymphaeaceae): a comparative study. Nord. J. Bot. 21(5): 529-548.

GUIGNARD, L. 1897. Les centres cinétiques chez les végétaux. Ann. Sci. Nat. Bot. ser. 9 6: 177–220.

HAIG, D. & WESTOBY, M. 1989. Parent-specific gene expression and the triploid endosperm. Am. Nat. 134(1): 147–155.

HAMAMURA, Y. Y.; NAGAHARA, S. S.; HIGASHIYAMA, T. T. 2012. Double fertilization on the move. Curr. Op. Plant Biol. 15(1): 70–77.

HANSEN, D. R.; DASTIDAR, S. G.; CAI, Z.; PENAFLORES, C.; KUEHL, J. V.; BOORE, J. L.; JANSEN, R. K. 2007. Phylogenetic and evolutionary implications of complete chloroplast genome sequences of four early-diverging angiosperms: *Buxus* (Buxaceae), *Chloranthus* (Chloranthaceae), *Dioscorea* (Dioscoreaceae), and *Illicium* (Schisandraceae). Mol. Phylog. Evol. 45: 547 – 563.

HAYASHI, Y. 1963a. The embryology of the family Magnoliaceae sens. lat. I. Megasporogenesis, female gametophyte and embryogeny of *Illicium anisatum* L. Sci. Rep. Tohoku Biol. 29: 27–33.

HAYASHI, Y. 1963b. The embryology of the family Magnoliaceae sens. lat. II. Megasporogenesis, female gametophyte and embryogeny of *Schisandra repanda* Radlkofler and *Kadsura japonica* Dunal. Sci. Rep. Tohoku Biol. 29: 403–411.

HILU, K.W.; BORSCH, T.; MÜLLER, K.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; SAVOLAINEN, V.; CHASE, M.W.; POWELL, M.P.; ALICE, L.A.; EVANS, R.; SAUQUET, H.; NEINHUIS, C.; SLOTTA, T.A.B.; ROHWER, J.G.; CAMPBELL, C.S.; CHATROU, L.W. 2003. Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. Am. J. Bot. 90: 1758–1776.

JACOBS, S.W.L.; PORTER, C.L. 2007. Nymphaeaceae. In: Wilson, A.J.G. (ed.). Flora of Australia. Australian Government Publishing Service, Canberra. Pp. 233–243.

- JONES, M. R. & CLARKE, G.C.S. 1981. NYMPHAEACEAE. Rev. Palaeobot. Palyno. 33: 57–67.
- JUST, T. 1946. The Use of Embryological Formulas in Plant Taxonomy. B. Torrey Bot. Club 73(4): 351-355.
- KAPIL, R. N. 1962. Some recent examples of the value of embryology in relation to taxonomy. Bull. Bot. Surv. 4: 57–66.
- KAPIL, R. N. & JALAN, S. 1964. *Schisandra michaux* - its embryological and systematic position. Bot. Not. 117: 285–306.
- KHANNA, P. 1964. Morphological and embryological studies in Nymphaeaceae I: *Euryale ferox* Salisb. Proc. Indian Acad. Sci. 59B: 237–243.
- KHANNA, P. 1965. Morphological and embryological studies in Nymphaeaceae II. *Brasenia schreberei* Gmel. and *Nelumbo nucifera* Gaertn. Aust. J. Bot. 13: 379–387.
- KHANNA, P. 1967. Morphological and embryological studies in Nymphaeaceae III. *Victoria cruziana* D'Orb. and *Nymphaea stellata* Wildl. Bot. Mag. 80: 305–312.
- KIM, S.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; ZANIS, M. J.; SUH, Y. 2004. Phylogenetic relationships among early-diverging eudicots based on four genes: Were the eudicots ancestrally woody? Mol. Phylog. Evol. 31: 16 – 30.
- MAHESHWARI, P. 1947. Tetranucleate embryo sacs in angiosperms. Lloydia 10: 1–18.
- MAHESHWARI, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. New York: McGraw-Hill.
- MATHEWS, S. & DONOGHUE, M. J. 1999. The root of angiosperm phylogeny inferred from duplicate phytochrome genes. Science 286: 947–950.

MORRIS, A. B.; BELL, C. D.; CLAYTON, J. D.; JUDD, W. S.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Phylogeny and divergence time estimation in *Illicium* with implications for New World biogeography. *Syst. Bot.* 32(2): 236–249.

ORBAN, I. & BOUHARMONT J. 1998. Megagametophyte development of *Nymphaea nouchali* Burm. f. (Nymphaeaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 126(4): 339–348.

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. 2010. Relationships between tapetum, loculus, and pollen during development. *Int. J. Plant Sci.* 171: 1-11.

PACINI, E.; FRANCHI, G. G.; HESSE, M. 1985. The tapetum: its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Syst. Evol.* 149: 155–185.

5, R. A.; LOSADA, J. M.; FRIEDMAN, W. E. 2014. Floral biology and ovule and seed ontogeny of *Nymphaea thermarum*, a water lily at the brink of extinction with potential as a model system for basal angiosperms. *Ann. Bot.* 115 (2): 211–226.

QIU, Y.L.; LEE, J.; BERNASCONI-QUADRONI, F.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; ZANI, M.; ZIMMER, E.A.; CHEN, Z.; SAVOLAINEN, V.; CHASE, M.W. 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402: 404–407.

QIU Y.-L.; DOMBROVSKA, O.; LEE, J.; LI, L.; WHITLOCK, B.A.; BERNASCONI-QUADRONI, F.; REST, J.S.; BORSCH, T.; HILU, K.W.; RENNER, S.S.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; ZANIS, M.J.; GUTELL, J.C.R.; POWELL, M.; SAVOLAINEN, V.; CHATROU, L.W.; CHASE, M.W. 2005. Phylogenetic analyses of basal angiosperms based on nine plastid, mitochondrial, and nuclear genes. *Int. J. Plant Sci.* 166: 815–842.

QIU, Y. L. & ESTABROOK, G. F. 2008. Inference of phylogenetic relationships among key angiosperm lineages using a compatibility method on a molecular data set. *J. Syst. Evol.* 46: 130 – 141.

QIU, Y. L.; LI, L.; HENDRY, T. A.; LI, R.; TAYLOR, D. W.; ISSA, M. J.; RONEN, A. J.; VEKARIA, M. L.; WHITE, A. M. 2006. Reconstructing the basal angiosperm phylogeny: evaluating information content of mitochondrial genes. *Taxon* 55 (4): 837–856.

RAMJI, M. V. & PADMANABHAN, D. 1965. Developmental studies on *Cabomba caroliniana* Gray. I. Ovule and carpel. *Proc. Indian Acad. Sci. B* 62: 215–223.

REMIZOWA, M. V.; SOKOLOFF, D. D.; MACFARLANE, T. D.; YADAV, S. R.; PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. 2008. Comparative pollen morphology in the early-divergent angiosperm family Hydatellaceae reveals variation at the infraspecific level. *Grana* 47:81–100.

ROLAND, F. 1965. Précisions sur la structure et l'ultrastructure d'une tétrade calymée. *Pollen et Spores* 7: 5–8.

ROWLEY, J.R.; GABARAYEVA, N.I.; WALLIS, B. 1992. Cyclic invasion of tapetal cells into loculi during microspore development in *Nymphaea colorata* (Nymphaeaceae). *Am. J. Bot.* 79: 801–808.

RUDALL, P. J.; ELDRIDGE, T. TRATT, J.; RAMSAY, M. M.; TUCKETT, R. E.; SMITH, S. Y.; COLLINSON, M. E.; REMIZOWA M. V.; SOKOLOFF D. D. 2009. Seed fertilization, development, and germination in Hydatellaceae (Nymphaeales): implications for endosperm evolution in early angiosperms. *Am. J. Bot.* 96: 1581–1593.

SAARELA, J. M.; RAI, H. S.; DOYLE, J. A.; ENDRESS, P. K.; MATHEWS, S.; MARCHANT, A. D.; BRIGGS, B. G.; GRAHAM, S. W. 2007. Hydatellaceae identified as a new branch near the base of the angiosperm phylogenetic tree. *Nature* 446: 312 – 315.

SARGANT, E. 1900. Recent work on the results of fertilization in angiosperms. *Ann. Bot.* 14: 689–712.

SARGANT, E. 1908. The reconstruction of a race of primitive angiosperms. *Ann. Bot.* 22: 121–186.

SCHNARF, K. 1931. *Vergleichende Embryologie der Angiospermen*. Berlin: Borntraeger, 354 p.

SCHNEIDER, E.L. 1978. Morphological studies of the Nymphaeaceae. IX. The seed of *Barclaya longifolia* Wall. Bot. Gaz. 139: 223–230.

SCHNEIDER, E. L. & FORD, E. G. 1978. Morphological studies of the Nymphaeaceae. X. The seed of *Ondinea purpurea* Den Hartog. Bull. Torrey Bot. Club 105: 192–200.

SCHNEIDER, E. L. & JETER, J. 1982. M. Morphological studies of the Nymphaeaceae. XII. The floral biology of *Cabomba caroliniana*. Am. J. Bot. 69: 1410–1490.

SEATON, S. 1908. The development of the embryo sac of the *Nymphaea*. Bull. Torr. Bot. Club 35: 283–290.

SHAMROV, I. I. 1998. Formation of hypostase, podium and postament in the ovule of *Nuphar lutea* (Nymphaeaceae) and *Ribes aureum* (Grossulariaceae). Bot. Zh. 83: 3–14.

SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; CHASE, M.W. 1999. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. Nature 402: 402–404.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; CHASE, M.W.; MORT, M.E.; ALBACH, D.C.; ZANIS, M.; SAVOLAINEN, V.; HAHN, W.H.; HOOT, S.B.; FAY, M.F.; AXTELL, M.; SWENSEN, S.M.; PRINCE, L.M.; KRESS, W.J.; NIXON, K.C.; FARRIS, J.S. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. Bot. J. Linn. Soc. 133: 381–461.

SOLTIS, P. S. & SOLTIS, D. E. 2004. The origin and diversification of angiosperms. Am. J. Bot. 91: 1614 – 1626.

SOLNTSEVA, M. P. 1981. Illiciales. In M. S. Yakovlev [ed.], Comparative embryology of flowering plants, p. 51–54. Nauka: Leningrad, Russia.

SWAMY, B. G. L. 1964. Macrogametophytic ontogeny in *Schisandra chinensis*. J. Indian Bot. Soc. 43: 391–396.

TAKAHASHI, M. 1992. Development of spinous exine in *Nuphar japonicum* De Candolle (Nymphaeaceae). *Rev. Paleobot. Palyno.* 75: 317-322.

TAYLOR, M. L.; GUTMAN, B. L.; MELROSE, N. A.; INGRAHAM, A. M.; SHWARTZ, J.A.; OSBORN, J. M. 2008. Pollen and anther ontogeny in *Cabomba caroliniana* (Cabombaceae, Nymphaeaceae). *Am. J. Bot.* 95(4): 399–413.

TAYLOR, M. L.; HUDSON, P. J.; RIGG, J. M.; STRANDQUIST, J. N.; GREE, J.S.; THIEMANN, T.C.; OSBORN, J.M. 2013. Pollen ontogeny in *Victoria* (Nymphaeales). *Int. J. Plant Sci.* 174(9): 1259–1276.

TAYLOR, M. L. & OSBORN, J. M. 2006. Pollen Ontogeny in *Brasenia* (Cabombaceae, Nymphaeales). *Am. J. Bot.* 93(3): 344–356.

TITOVA, G. E. 1990. The development of the female generative structures in *Cabomba caroliniana* A. Gray (Cabombaceae). In Batygina, T. [ed.], *Proceedings of the XI International Symposium on Embryology and Seed Reproduction, 1990, Leningrad, Russia.* Nauka, Leningrad, Russia.

UENO, J. 1962. On the fine structure of the pollen walls of angiospermae. II. *Victoria*. *J. Biol. Osaka City Univ.* 13: 99–104.

VAN MIEGROET, F. & DUJARDIN, M. 1992. Cytologie et histology de la reproduction chez le *Nymphaea heudelottii*. *Can. J. Bot.* 70: 1991 – 1996.

WARNER, K. A.; RUDALL, P.J.; FROHLICH, M.W. 2008. Differentiation of perianth organs in Nymphaeales. *Taxon* 57: 1096–1109.

WILLIAMS, J.H. & FRIEDMAN, W.E. 2002. Identification of diploid endosperm in an early angiosperm lineage. *Nature* 415: 522-526.

WINTER, A. N. 1987. Embryology of the family *Hydrostemma* (*Barclaya*) with respect to its systematic position. Institute Biological Science, Leningrad, Russia.

WINTER, A. N. 1993. Some aspects of the reproductive biology of *Hydrostemma longifolium* (*Barclaya longifolia*) (Barclayaceae). Bot. Zh. 78: 69 – 83.

WINTER, A. N. & SHAMROV, I. I. 1991a. Development of the ovule and embryo sac in *Nuphar lutea* (Nymphaeaceae). Bot. Zh. 76: 378 – 390.

WINTER, A. N. & SHAMROV, I. I. 1991b. Megasporogenesis and embryo sac development in representatives of the genera *Nymphaea* and *Victoria* (Nymphaeaceae). Bot. Zh. 76: 1716 – 1728.

WU, C. C.; DIGGLE, P. K.; FRIEDMAN, W. E. 2013. Kin recognition within a seed and the effect of genetic relatedness of an endosperm to its compatriot embryo on maize seed development. PNAS 110(6): 2217–2222.

WUNDERLICH, R. 1954. Über das Antheren tapetum mit besonderer Berücksichtigung seiner Kernzahl. Öst. Bot. Zeit. 101: 1–63.

YOSHIDA, O. 1962. Embryologische studien über *Schisandra chinensis* Bailey. J. Coll. Arts Sci. Chiba Univ. 3: 459 – 462.

ZANIS, M.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; MATHEWS, S.; DONOGHUE, M.J. 2002. The root of the angiosperms revisited. PNAS 99:6848–6853.

ZHOU, Q. & FU, D. 2008. Reproductive morphology of *Nuphar* (Nymphaeaceae), a member of basal angiosperms. Plant Syst. Evol. 272: 79–96.