Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Pós-graduação Botânica Unesp - Botucatu

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- ginogametogenese; 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 *Nymphaea amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum* e *N. caerulea* Savigny (Nymphaeaceae)..... 25

Resumo..... 26

Abstract..... 27

Introdução..... 28

Material e Métodos..... 29

Resultados..... 30

Ontogenia das anteras e androsporogênese..... 30

Androgametogenênese..... 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 *Nymphaea amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum*, *N. caerulea* Savigny e *N. lotus* 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 *Nymphaea* 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 BIOCIÊNCIAS, 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 ginosporângio 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, bitegumentados, 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 BIOCIÊNCIAS, 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 µm 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 citoplasmically 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 celulose 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 morfologicamente 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 (*Anecphya*, *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 *Anecphya* 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 (*Anecphya* 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* (*Anecphya* [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).

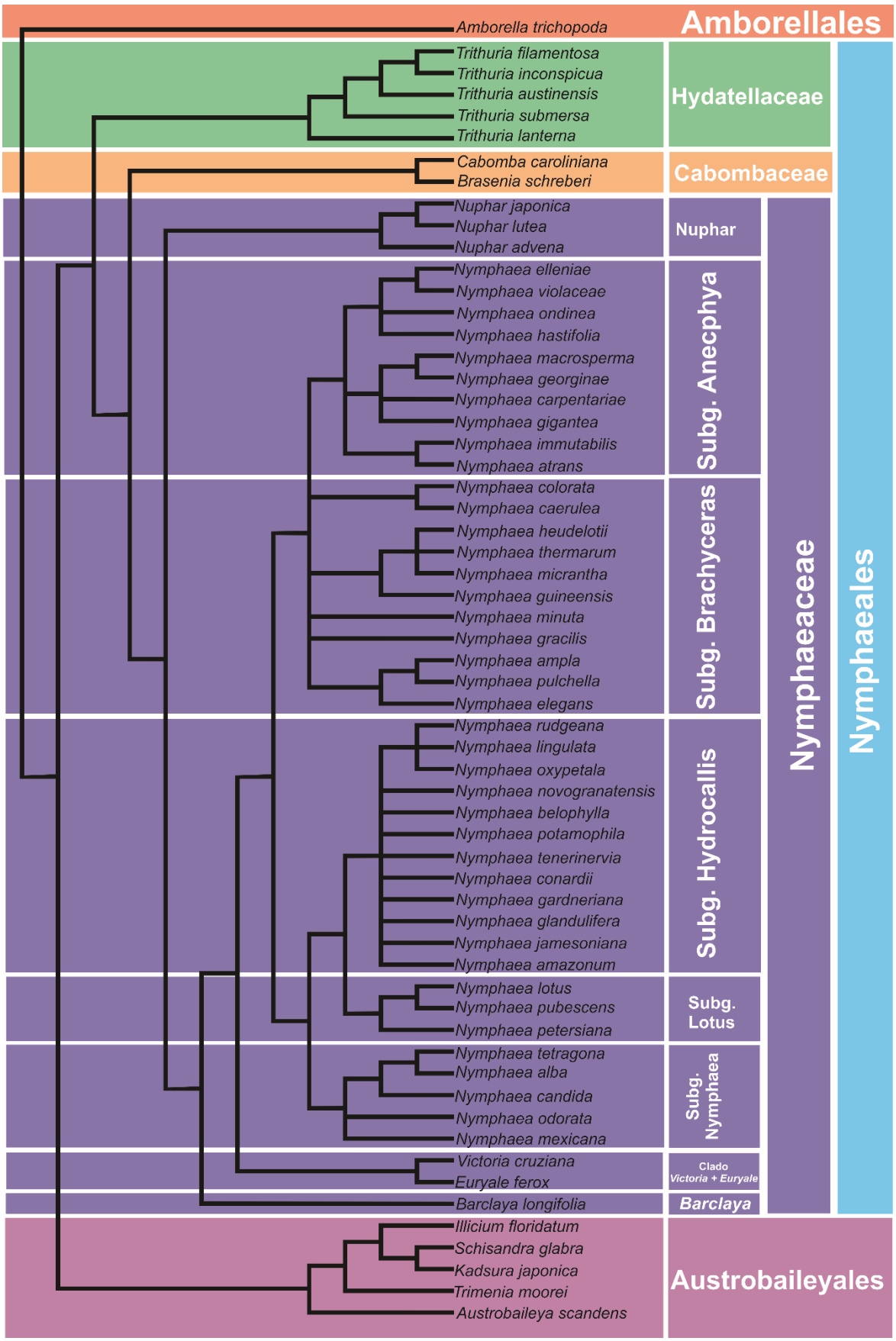


Figura 01. Filogenia do grado ANA, com destaque para Nymphaeaceae, sobretudo para os subgêneros de *Nymphaea* (baseado em Qiu et al., 2006; Saarela et al., 2007; Morris et al., 2007; Borsch et al., 2011; Biswal et al., 2012).

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 (Sargant, 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 tapede 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 estádio 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). Portando, 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 estádio 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 corrobor a hipótese de que este estado de caráter (saco embrionário com quatro células e quatro núcleos) seria plesiomórfico para as angiospermas.

Desenvolvimento do Endosperma e do Embrião

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 participar 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 igualitariamente 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 estádio 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 estádio 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 estádio 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 (Sargant, 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 monocotiledônes 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*.

2. Descrever a ginosporogênese, ginogametogênese e o desenvolvimento dos tegumentos e nucelo em espécies do gênero *Nymphaea*.

3. Analisar de maneira integrada e detalhada ontogenia da semente, com ênfase na endospermogênese e embriogênese em espécies do gênero Nymphaea.

Objetivos Específicos

1. Contribuir no entendimento sobre o desenvolvimento inicial dos tecidos do primórdio da antera, tipo de formação da parede do androsporângio, a existência de ciclos invasivos do tapete e particularidades sobre dissociação das tétrades.

2. Verificar se o ginófito monospórico do tipo *Nuphar*/*Schisandra* está presente nos gêneros de *Nymphaea* estudados, com o propósito de contribuir com o debate sobre a possível plesiomorfia deste estado de caráter em relação ao ginófito do tipo *Polygonum*, bem como suas implicações sobre a evolução inicial das angiospermas.

3. Analisar o padrão de divisões iniciais do domínio micropilar do endosperma, a dinâmica de produção e armazenamento de amiloplastos nos diversos tecidos durante a ontogenia da semente, a natureza das inclusões citoplasmáticas presente nas células cotiledonares e endospérmicas e, a natureza das paredes periclinais internas da porção micropilar da epiderme nucelar.

Capítulo I

Ontogenia do Antera e dos Andrófitos de *Nymphaea amazonum* Mart. & Zucc. *subsp*. *amazonum* e *N*. *caerulea* Savigny (Nymphaeaceae)

Eduardo João Pereira Junior[1,2] & Nelson Sabino Bittencourt Júnior[2]

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Biociências, IBB/UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Caixa Postal 510, Rubião Junior, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

[2]Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência: eduardojpjr@yahoo.com.br

Resumo

Compreender a diversidade das Nymphaeales é de considerável interesse como modelo da evolução inicial das angiospermas. Este trabalho objetivou investigar a ontogenia da antera em espécies de *Nymphaea*. 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. Ocorrem amiloplastos nas células-mãe dos andrósporos e, após a meiose, a citocinese simultânea dá origem a tétrades tetraédricas de andrósporos, nas quais os amiloplastos estão ausentes e onde se inicia a formação da primexina e intina. Há um atraso na liberação dos andrósporos das tétrades em *N. caerulea*, devido à persistência de um envelope celulósico, o que pode consistir em uma etapa inicial na evolução de tétrades permanentes. Amiloplastos são novamente observados nos andrósporos livres, nos quais é discernível uma abertura anelar equatorial com exina menos espessa. Surge grande número de vacúolos no citoplasma dos andrósporos e pequenas gotículas (‘pollenkitt’) são observadas na superfície da esporoderme. Não há amiloplastos durante a mitose do andrósporo e a intina, que se torna visível ainda no estádio de tétrade inicial em *N. amazonum* e tétrade intermediária em *N. caerulea*, se espessa, principalmente abaixo da abertura, onde há a contribuição da endexina para a formação do oncus. Na deiscência são liberadas andrófitos bicelulares com uma diminuta célula generativa falciforme associada ao núcleo da célula vegetativa, em *N. caerulea* surgem novamente amiloplastos neste estádio. O tapete de *N. amazonum* e *N. caerulea* é secretor e não apresenta ciclos invasivo como relatado para *N. colorata*, uma vez que a análise estatística da área ocupada pelo tapete não demonstrou variações significativas que corroborem a existência de movimentos cíclicos. 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 pode indicar um padrão no grado ANA, embora sejam necessários estudos adicionais. Dentro das angiospermas basais os caracteres referentes à ontogenia da antera se mostraram lábeis, sobretudo quanto ao tipo de tapete, com a presença de tapete secretores, invasivos e ciclicamente invasivos. Quanto à geometria das tétrades há relatos de tétrades tetraédricas, tetragonais e decussadas.

Palavras-chave: androsporogênese, androgametogênese, atraso na dissociação das tétrades, geometria das tétrades, ontogenia do tapete, grado ANA

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 ontogeny in species of *Nymphaea*. 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 µm thick were stained with toluidine blue O or submitted to histochemical tests. The androsporangium wall follows the basic type of development. Amyloplasts occurs in the androspores mother cells and, after meiosis, a simultaneous cytokinesis give rise to tetrahedral tetrads of androspores, in which the amyloplasts is absent and where the formation of primexine and intine starts. There are a delay in the release of androspores from the tetrads in *N. caerulea*, due to a persistent cellulosic envelope, which may consist in an initial step in the evolution of permanent tetrads. We observe amyloplasts again in the free androspores and, in this stage an equatorial ring-like aperture is present. In vacuolated androspores stage, the 'pollenkitt' is visualized in the sporoderm surface. Amyloplasts do not occurs during the mitosis of the androspores and, the intine that initiates in the early tetrad stage in *N. amazonum* and in the intermediate tetrads in *N. caerulea* becomes thick, mainly beneath of the aperture, where it contributes with the endexine to form the oncus. The anther dehiscence releases bicellular androphytes with a small falciform generative cell associated with the nucleus of the vegetative cell. *Nymphaea caerulea* shows amyloplasts in this stage. The tapetum of *Nymphaea amazonum* and *N. caerulea* are secretor and do not show invasive cycles as reported to *N. colorata*, once the statistical analyzes not shows significant changes of the area occupied by the tapetum to support the existence of cyclical movements. 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, although additional studies are needed. The characters observed in anther ontogeny is labile in basal angiosperms especially the tapetum type, with reports of secretory, invasive and cyclic invasive tapetum. Regarding the tetrad geometry there are reports of tetrahedral, tetragonal and decussate tetrads.

Keywords: androsporogenesis, androgametogenesis, delay in the tetrad dissolution, tetrad geometry, tapetum ontogeny, ANA grade.

Introdução

Nymphaeales consiste no segundo ramo, depois de *Amborella*, na filogenia das angiospermas, é composta por Cabombaceae, Nymphaeaceae e, recentemente, houve a inclusão de Hydatellaceae, uma família de diminutas plantas aquáticas anteriormente inseridas na ordem Poales (Borsch et al., 2003; Hilu et al., 2003; Moore et al., 2007; Borsch et al., 2008; Saarela et al., 2007). Nymphaeaceae apresenta cinco gêneros (*Barclaya*, *Euryale*, *Nuphar*, *Nymphaea* e *Victoria*), sendo que *Nymphaea* representa o maior e mais heterogêneo dentro da ordem, com cerca de 45-50 espécies divididas em cinco subgêneros (*Anecphya*, *Brachyceras*, *Hydrocallis, Lotus* e *Nymphaea*) (Conard, 1905; Warner et al., 2008; Borsch et al., 2007; Borsch et al., 2008; Borsch et al., 2011).

As espécies de *Nymphaea* com florescimento diurno são comumente polinizadas por abelhas e moscas, enquanto as espécies de *Nymphaea* tropicais que apresentam florescimento noturno geralmente são perfumadas, termogênicas e são polinizadas por coleópteros (Wiersema, 1988; Valla & Cirino, 1972; Prance & Arias, 1975; Prance, 1980). As Nymphaeales tiveram origem no Cretáceo Inferior, e características como flores grandes, com muitas peças florais e polinizadas por coleópteros evoluíram secundariamente na ordem (Friis et al., 2001). Devido ao posicionamento filogenético de Nymphaeales como grupo-irmão de todo o restante das angiospermas, Nymphaeaceae tem atraído grande atenção para o estudo dos mais diversos aspectos da família, visto que cada um dos estados de caracteres neste táxon assume maior importância potencial (Schneider et al., 2003).

Embora o estudo morfológico das angiospermas basais por si só não consiga dissolver problemas filogenéticos, ele pode ser útil para dar suporte a filogenias com topologias alternativas (Lu et al., 2015). Portanto, o estudo da morfologia de órgãos reprodutivos tem relevância para o conhecimento das relações filogenéticas e a origem e evolução inicial das angiospermas basais (Friedman & Williams, 2004). Mesmo assim, os caracteres polínicos são pouco compreendidos em Nymphaeales (Taylor & Osborn, 2006). Do ponto de vista histológico, a pouca atenção dispensada aos estádios iniciais do desenvolvimento do primórdio estaminal acarreta a perda de dados preciosos na compreensão da evolução de estádios iniciais da formação do androceu nas angiospermas. A formação das paredes do androsporângio, por exemplo, é pouco abordada em estudos sobre a ontogenia das anteras nas angiospermas de maneira geral (García, 2002), sendo descrito apenas em poucos táxons dentro do grado ANA (Tobe et al., 2000; Zhou & Fu, 2008) não havendo nenhuma tentativa de contextualizar filogeneticamente este tipo de arranjo tecidual do primórdio da antera.

Devido à grande diversidade ontogenética do tapete, Nymphaeales torna-se um grupo chave no qual é necessário concentrar esforços nas investigações embriológicas (Taylor et al. 2012). Há grande diversidade de tipos de tapete em Nymphaeales, com relatos de tapete secretor, ciclicamente invasivo e invasivo (Rowley et al., 1992; Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997; Gabarayeva et al., 2003; Taylor & Osborn, 2006; Taylor et al., 2008; Taylor et al., 2012), além de uma ampla gama de estados intermediários, o que dificulta um enquadramento perfeito dentro da tipificação de Davis (1966). Fica claro a importância de descrever a ontogenia do tapete além dos esquemas típicos de classificação, uma vez que caracterizações mais completas podem de fato revelar a verdadeira extensão da complexidade exibida pelos diferentes táxons (Taylor et al., 2012).

O objetivo deste estudo é descrever a androsporogênese, a androgametogênese e desenvolvimento do tapete e das camadas parietais do androsporângio, contextualizando-os com as hipóteses filogenéticas vigentes e com os demais dados disponíveis na literatura para outras espécies do grado ANA, com o propósito de contribuir no entendimento sobre o desenvolvimento inicial dos tecidos do primórdio da antera, o tipo de formação da parede do androsporângio, a existência de ciclos invasivos do tapete e particularidades sobre dissociação das tétrades.

Material e Métodos

Flores e botões florais em diversos estádios de desenvolvimento foram coletados entre 2012 e 2015 de espécimes de *Nymphaea caerulea* Savigny (subg. *Brachyceras*) provenientes de uma população subespontânea localizada em Uchoa (21° 02’ 53,15” S, 49° 08’ 22,70” O) e de uma população natural de *Nymphaea amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum* (subg. *Hydrocallis*) localizada em Onda verde (20° 38’ 28,12” S, 49° 19’ 53,01” O), todos municípios do Estado de São Paulo, Brasil. As exsicatas de *N. amazonum* e *N. caerulea* foram depositadas no Herbário do Campus da UNESP de São José do Rio Preto, respectivamente, sob os números de registro: SJRP 31878 e SJRP 31879. Após dissecção, as anteras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 1% em tampão fosfato pH 7,2 0,1 M (McDowell e Trump 1976) e desidratadas em série etílica até a graduação de 70%, na qual as anteras foram estocadas. Após a desidratação completa, as amostras foram infiltradas e incluídas em historesina e os blocos resultantes foram seccionados em micrótomo de rotação Leica RM2255. As secções semi-seriadas de 1 a 4 μm de espessura, foram aderidas a lâminas histológicas e submetidas a testes histoquímicos ou coradas com azul de toluidina O (O'Brien e McCully 1981) e montadas com Permount®.

Os testes histoquímicos empregados foram o Ácido Periódico - Schiff (PAS) para detecção de polissacarídios insolúveis precedido pelo tratamento das secções com o bloqueador de aldeídos 2,4-dinitrofenilhidrazina (O'Brien & McCully 1981). Para a detecção de calose foi utilizado o método fluorocromático com azul de anilina (Eschrich & Currier 1964), Auramina O para visualização da esporopolenina (Heslop-Harrison, 1977), Calcofluor White M2R para detecção de celulose (O'Brien & McCully, 1981), e o vermelho de rutênio para a verificação de compostos ácidos, incluindo ácidos pécticos (Southworth 1973). Todo o material foi examinado em um microscópio Zeiss Axioskop e fotografado com um fotomicroscópio Olympus BX51 equipado com epi-fluorescência (lâmpada de mercúrio USH-103OL, modelo do cubo U-MWU2, filtro de excitação BP330-385, espelho dicróico DM400 e filtro de barreira BA420) e com uma câmera digital Olympus Q-Colour 5.

Para a análise da variação da área do tapete, verificou-se, em secções transversais medianas da antera, a porcentagem da área ocupada pelo tapete em relação à área total da circunferência que engloba o tapete mais o lóculo, com o intuito de padronizar os dados para comparação entre os consecutivos estádios de desenvolvimento. Para isso utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem da área ocupada pelo Tapete} = \frac{\text{Área do Tapete}}{\text{Área Lóculo+Área do Tapete}} \text{ x } 100.$$

Foram estabelecidos oito estádios de desenvolvimento (baseados em Rowley et al., 1992), sendo eles: células-mãe do andrósporos iniciais e tardias, meiócitos, tétrades iniciais e tardias, andrósporos livres, andrósporos vacuolados e andrófitos jovens. Foram analisadas assistematicamente 10 androsporângios de anteras distintas, para cada um dos estádios de desenvolvimento, sendo provenientes do maior número de botões florais/flores possível. Então foi efetuada a medição da área, em secção transversal, do lóculo e do tapete com o auxílio do *software* ImageJ 1.48 (http://imagej.nih.gov/ij/). Utilizou-se o *software* BioEstat 5.3 (http://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads/programas/bioestat-versao-53/) para a análise de variância e a comparação pelo teste de Tukey com o nível de significância $\alpha = 5\%$. Todos os dados observados foram discutidos com base nas hipóteses filogenéticas vigentes para Nymphaeales e o grado ANA.

Resultados

Ontogenia das anteras e androsporogênese

Os primórdios das anteras em *N. amazonum* e *N. caerulea* emergem, entre os primórdios dos processos estilares e as pétalas mais internas, como protuberâncias na superfície receptacular (fig. 1B, 2B). Inicialmente, as anteras em secções transversais apresentam um formato aproximadamente elíptico, com a camada dérmica recobrindo o meristema fundamental (fig. 1A, 2A). Em *N. amazonum* ocorre mais de uma centena de anteras por flor, enquanto em *N. caerulea* há aproximadamente 64 anteras. Ambas as espécies têm filotaxia espiral e as anteras se organizam ao longo de ortósticas e parásticas (fig. 1B, E, 2B). Cada célula do meristema fundamental possui um núcleo central com várias regiões heterocromáticas e citoplasma denso (fig. 1A, 2A). Em um estádio precoce de desenvolvimento, as células abaxiais do meristema fundamental passam a apresentar vacuolação mais pronunciada do que as células adaxiais (fig. 1A, 2A). Em *N. amazonum* e *N. caerulea* há uma leve assincronia entre os estádios de desenvolvimento das anteras de um mesmo botão floral, sendo que as anteras mais externas apresentam estádios mais adiantados do que aquelas anteras mais centrais (fig. 1B, 2A-B); tal padrão permanece até estádios ontogenéticos avançados.

Durante o desenvolvimento inicial da antera de *N. caerulea*, no centro do meristema fundamental, um grupo de células passa a apresentar pequenas dimensões quando comparadas com as células em seu entorno, originando o tecido provascular (fig. 1C-D, 2A, C). Em secções transversais de *N. amazonum* foi possível observar a formação de dois feixes provasculares de menor calibre posicionados paralelamente a um terceiro feixe abaxial mediano (fig. 1D, 3A). Neste estádio é possível notar o aparecimento de espaços intercelulares esquizóginos, predominantemente na região abaxial vacuolada da antera. Tais espaços irão contribuir para a formação do aerênquima nos estádios subsequentes, sendo este processo mais evidente em *N. amazonum* (fig.1D, 2C). Inclusive, nesta espécie, o processo de formação dos espaços intercelulares não se restringe à porção abaxial, alcançando a região central das anteras em estádios mais avançados (fig. 3A). Também se observou numerosos amiloplastos na região abaxial, sobretudo nas células posicionadas entre o tecido vascular, agora com elementos traqueais diferenciados, e a protoderme/epiderme abaxial (fig. 2G, 3A).

Após a vacuolação que diferencia as células do meristema fundamental das procambiais, na região adaxial da antera, em secções transversais, as células das camadas dérmica e as inicias subdérmicas são anticlinalmente alongadas, enquanto as células pertencentes ao meristema fundamental apresentam formato poligonal (fig. 1C, 2A, C). Um cordão de tecido esporogênico se diferencia em dois sítios em cada lado da antera (fig. 1D, 2D), logo abaixo da camada parietal primária. Em ambas as espécies, o tecido esporogênico em secção

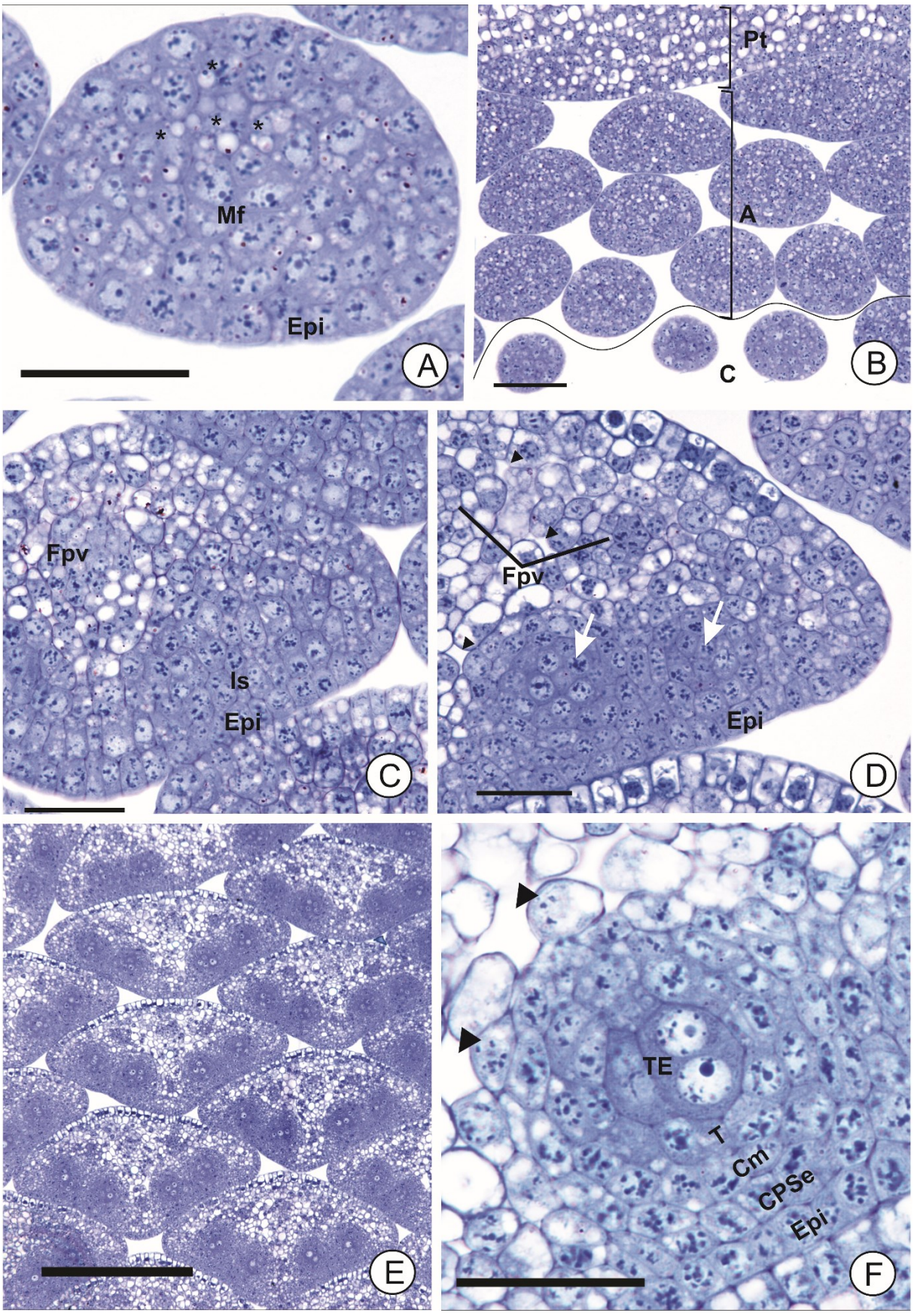

Mf
Epi
A
Pt
A
c
B
Fpv
Is
Epi
C
Fpv
Epi
D
E
TE
T
Cm
CPSe
Epi
F

Figura 1. Secções transversais dos estames de *Nymphaea amazonum* em sucessivos estágios de desenvolvimento. (A) Estrutura do primórdio estaminal logo após sua emergência, células abaxiais do meristema fundamental iniciam o processo de vacuolação (asteriscos). (B) Posicionamento dos primórdios estaminais entre os demais verticilos florais. (C) Diferenciação da camada parietal. (D) Início da diferenciação do tecido esporogênico (setas brancas). (E) Organização dos estames durante o estágio inicial do desenvolvimento do tecido esporogênico em ortósticas e parásticas. (F) Diferenciação inicial das camadas parietais da antera, conectivo apresenta espaços intercelulares esquizogênicos (pontas de seta). Colorações: A-F – azul de toluidina O. A – anteras, C – carpelos, Cm – camada média, CPSe – camada parietal secundária externa, Epi – camada epidérmica, Fpv – feixes provasculares, Is – iniciais subepidérmicas, Mf – meristema fundamental, Pt – pétalas, T – tapete, TE – tecido esporogênico, Escala: A, C, D, F – 30 µm; B – 50 µm; E – 200 µm.

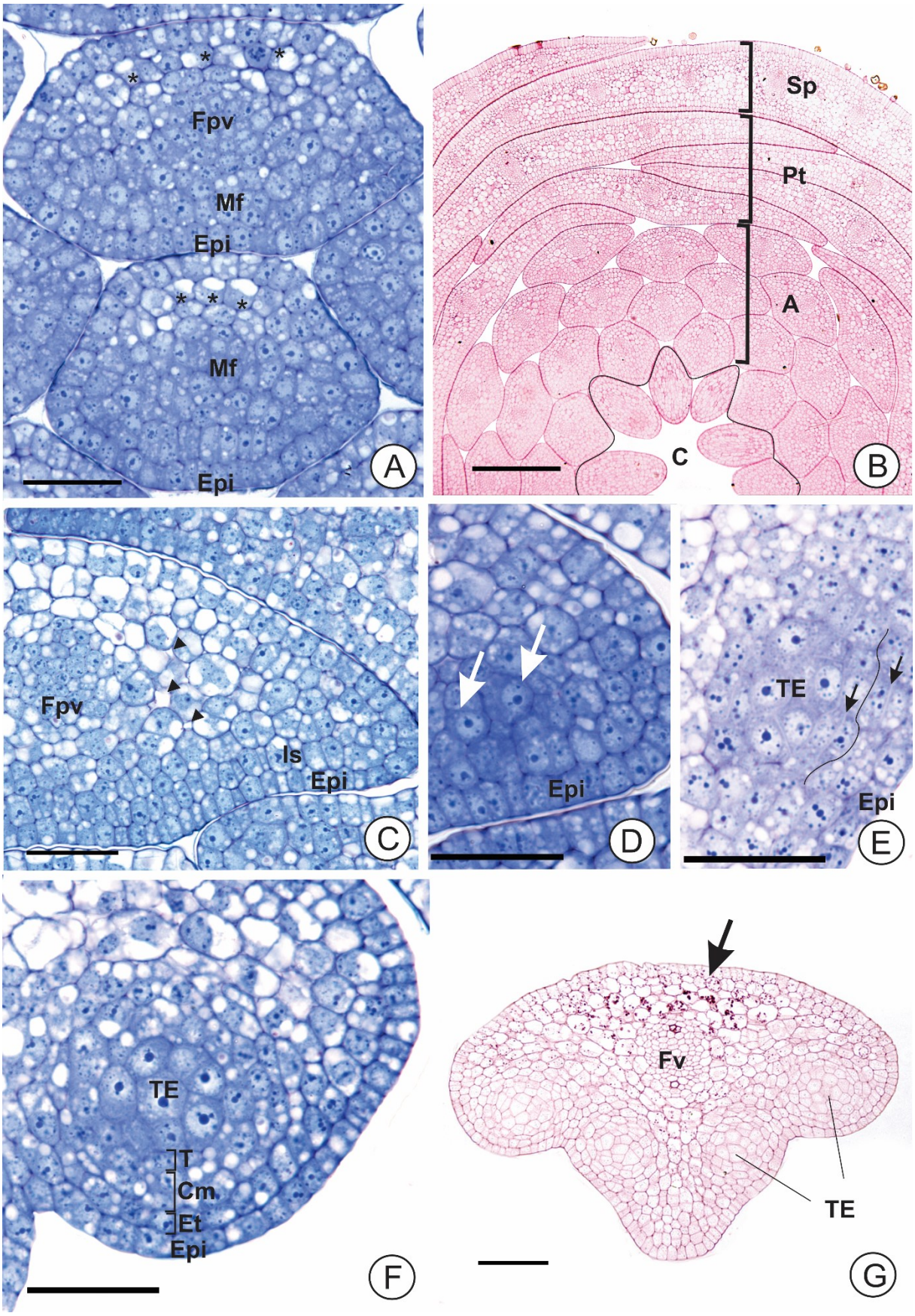

Fpv
Mf
Epi
Mf
Epi
A
Sp
Pt
A
C
B
Fpv
Is
Epi
C
Epi
D
TE
Epi
E
TE
T
Cm
Et
Epi
F
Fv
TE
G

Figura 2. Secções transversais dos estames de *Nymphaea caerulea* em sucessivos estágios de desenvolvimento. (A) Estrutura dos primórdios estaminais logo após sua emergência, células abaxiais do meristema fundamental iniciam o processo de vacuolação (asteriscos). (B) Posicionamento dos primórdios estaminais entre os demais verticilos florais e organização em ortósticas e parásticas. (C) Diferenciação da camada parietal, pontas de seta indicam espaços intercelulares esquizogênicos. (D) Início da diferenciação do tecido esporogênico (setas brancas). (E) Tipo de formação da parede do androsporogângio, setas pretas indicam locais das divisões periclinais da CPS_i e CPS_e que originam, respectivamente, tapete camada média interna, camada média externa e endotécio. (F) Diferenciação inicial das camadas parietais da antera. (G) Visão geral do estame durante o estágio de células esporogênicas, seta indica acúmulo de amiloplastos na região abaxial, entre a camada epidérmica e os feixes vasculares. Colorações: A, C-F – azul de toluidina O; B, G – PAS. A – anteras, C – carpelos, Cm – camadas médias, CPSe – camada parietal secundária externa, Epi – camada epidérmica, Et – endotécio, Fpv – feixes provasculares, Fv – feixes vasculares, Is – iniciais subepidérmicas, Mf – meristema fundamental, Pt – pétalas, Sp – sépalas, T – tapete, TE – tecido esporogênico. Escala: A, C- F – 30 μm; G – 50 μm; B- 100 μm.

transversal é multiestratificado e de contorno circular, inicialmente com apenas 3-6 células que apresentam núcleo e nucléolo conspícuos e densidade citoplasmática superior à apresentada pelas células adjacentes; o tecido esporogênico também apresenta células menos vacuoladas do que os demais tecidos da antera (fig. 1D, 2D).

A camada parietal primária origina a camada parietal secundária externa (CPS_e) e a camada parietal secundária interna (CPS_i); a CPS_i divide-se periclinalmente, originando internamente a parte do tapete localizada na face epidérmica do androsporângio, e externamente a camada média interna (fig. 1F, 2E, F). A CPS_e dá origem internamente à camada média externa e externamente ao endotécio. Os limites entre as camadas da parede do androsporângio não são sempre precisos e as camadas médias se dividem periclinalmente, especialmente nos flancos dos androsporângios, originando de três a quatro camadas, como pode ser observado nos estádios posteriores (fig. 3D, 4F). Neste momento, as anteras de *N. amazonum* passam a apresentar formato losangular, em secção transversal (fig. 1E), enquanto *N. caerulea* tem anteras aproximadamente triangulares (fig. 2G). Embora uma fração do tapete origine-se da divisão periclinal da CPS_i, a maior parte das células tapetais, incluindo as que contornam a face interna do tecido esporogênico, diferenciam-se preponderantemente do meristema do conectivo. Inicialmente, as células tapetais têm dimensões reduzidas (relativamente às do tecido esporogênico), possuem formato poligonal e são discretamente vacuoladas (fig. 2F, 3B).

Subsequentemente, devido à proliferação de suas células o tecido esporogênico passa a apresentar 5-9 e 8-16 células por secção transversal em *N. amazonum* e *N. caerulea*, respectivamente, e a parede celular primária cora-se intensamente de roxo pelo azul de toluidina; ao mesmo tempo, diminutos vacúolos esféricos são observados dispersos pelo citoplasma (fig. 3B, 4B). A parede primária das células esporogênicas e suas derivadas persiste até o estádio de tétrade inicial (fig. 5A, 6B). Durante todo os estádios, esta parede celular primária é PAS-positiva (fig. 3A, C, 4C, F, 5A, 6B). Durante os estádios em que se proliferam, as células do tecido esporogênico se expandem, apresentam cromatina menos condensada que a de células do conectivo, permanecem com núcleo e nucléolo proeminentes e citoplasma denso (fig. 3B, 4B). Em *N. amazonum* as células do tapete tornam-se pavimentosas (i.e., ligeiramente alongadas no sentido tangencial) devido ao aumento de volume do tecido esporogênico (fig. 3B).

A expansão do tecido esporogênico é acompanhada pelo aumento no volume das células do tapete, o que causa distensão das células das camadas médias, tornando-as tangencialmente alongadas (fig. 3C-D, 4C-D). A formação de um vacúolo no nucleoplasma preenchido por um conteúdo que se cora de magenta pelo azul de toluidina e é PAS-positivo, além do aumento adicional do volume celular e nuclear, caracterizam a diferenciação das células esporogênicas

em células-mãe dos andrósporos (CMA), e nesse estádio é possível observar grande número de diminutos amiloplastos dispersos pelo citoplasma destas células (fig. 3C e 4C).

A formação de um vacúolo no nucleoplasma é seguida da característica condensação cromossômica que marca a entrada das CMA na prófase I da meiose. Nesse estádio vários vacúolos esféricos se formam no citoplasma das células do tapete, e muitas delas se mostraram binucleadas (fig. 3D, 4D-E). As células do tapete adquirem alta densidade citoplasmática e seus vacúolos progressivamente aumentam em volume e confluem (fig. 3D, 4E). Neste ponto, inicia-se a expansão do lóculo, acarretando no surgimento de espaços entre as CMA.

Os protoplastos das CMA passam por um decréscimo em sua densidade, apresentando um aspecto granulado com uma profusão de amiloplastos posicionados na porção central do citoplasma (fig. 3E, 4F). Em *N. amazonum*, frequentemente os amiloplastos se coram tenuemente pelo azul de toluidina (fig. 3D-F). Uma discreta camada de calose se desenvolve entre a membrana plasmática e a cobertura dos meiócitos (fig. 3E, 6A). Nos estádios subsequentes, o núcleo das CMA usualmente torna-se excêntrico e a região citoplasmática central, ocupada pelos amiloplastos, agora maiores e mais numerosos, é circundada por região vacuolada, que por sua vez é delimitada por uma região citoplasmática densa, na periferia das células (fig. 3E, 4F). O fluído locular por vezes se corou de magenta pelo azul de toluidina (fig. 4F) e, ao final da prófase I, o nucléolo se desorganiza, reconstituindo-se temporariamente na intercinese. Na metáfase I, a placa metafásica tem uma posição excêntrica (fig.3E, 6A). Na intercinese o complexo formado pelas organelas mais o vacuoma se interpõem entre os núcleos do meiócito e, posteriormentre, entre as placas cromossômicas da metáfase II (fig. 3F). Durante a meiose, as células do tapete continuam a aumentar em volume e seus vacúolos, que confluíram em estádios anteriores, passam a se tornar, progressivamente, menos evidentes (3F, 4E-F, 5B-C, 6A-C). Neste estádio, foram observados pontos nos quais as CMA periféricas apresentavam uma associação íntima com as células do tapete (fig. 3F, 4E-F, 5A).

A citocinese é simultânea e origina uma tétrade tetraédrica de andrósporos, os quais são mantidos juntos por uma espessa parede de calose (fig. 5A, 6B). Cada andrósporo possui um núcleo central com um nucléolo evidente. Em *N. caerulea*, geralmente, ocorrem vacúolos adjacentes à parede distal[1] dos andrósporos (fig. 6C). Em *N. amazonum*, no estádio de tétrade precoce, a primexina se origina entre a membrana plasmática e a parede de calose, corando-se de verde azulado pelo azul de toluidina (fig. 5A). Abaixo da primexina distal existe uma camada que se cora de roxo pelo azul de toluidina, é PAS-positiva e se cora pelo vermelho de rutênio,

[1] Os termos distal e proximal são utilizados neste artigo de acordo com a terminologia proposta por Hesse et al. (2009), segundo a qual "o eixo polar de cada micrósporo parte do polo proximal, posicionado no centro da tétrade, para o polo distal, do lado externo da tétrade. "

possivelmente constituindo a matriz péctica (fig. 5A). Neste estádio, apenas com a utilização de microscopia de luz, não é possível detectar a formação da primexina em *N. caerulea*; contudo, observou-se no estádio de tétrade intermediária a formação de uma fina primexina ao redor de cada um dos andrósporo que originará a futura esporoderme, assim como de uma delgada matriz péctica logo abaixo (fig. 6C). Nas duas espécies, seja no estádio de tétrade inicial em *N. amazonum* ou tétrade tardia em *N. caerulea*, se encerra o primeiro ciclo de amilogênese, não sendo mais possível distinguir amiloplastos no citoplasma dos andrósporos (fig. 5A, 6C). Observou-se a formação de espaços intercelulares entre as paredes radiais das células do tapete no estádio de tétrade tardio ou intermediária (fig. 5B-E, 6C), as paredes das células do tapete não são positivas para celulose pelo Calcoflúor White M2R nem para polissacarídeos pelo PAS (dados não mostrados). Entre os estádios de meiócitos e tétrade inicial o tapete se expande perpendicularmente às camadas médias em *N. caerulea* (fig. 4F, 6A), este mesmo evento ocorre em *N. amazonum* entre os estádios de tétrade tardio e andrósporos livres (fig. 5B-E), em ambos os casos a porcentagem da área ocupada pelo tapete atinge os maiores valores durante estes períodos.

Em *N. amazonum* e *N. caerulea* são observados orbículos a partir do estádio de tétrade intermediário, tanto nas paredes tangenciais internas quanto nas paredes radiais das células do tapete (fig. 5C, 6C). Em *N. amazonum* os orbículos são diminutos e são observados quase que exclusivamente associados às paredes das células tapetais (fig. 5C-F, 7A). Por outro lado, *N. caerulea* apresenta orbículos relativamente maiores e esféricos e, embora estes não sofram fusão, geralmente são observados em agrupamentos adentrando o fluído locular (6C-F, 8E-G).

No estádio de tétrade tardio, ocorre a progressiva dissolução da parede de calose. Neste momento já é possível discernir uma exina ao redor de todo o andrósporo em *N. amazonum*, com uma delgada intina abaixo da porção distal da exina (fig.5C). Em *N. caeruela* a exina já está bem espessa neste estádio (fig. 6D). A liberação dos andrósporos ocorre neste estádio devido a completa dissolução da parede de calose; contudo, em *N. caerulea*, uma conexão residual pode persistir no início do estádio de andrósporos livres, corando-se pelo Calcofluor White M2R (fig. 6E).

Androgametogenênese

Em *N. amazonum*, os andrósporos são liberados da parede de calose com um formato falciforme em secção transversal, i.e., os andrósporos possuem uma forma discoide com a parede proximal convexa separada da parede distal côncava por uma abertura equatorial anelar (fig. 5D). Rapidamente os andrósporos de *N. amazonum* passam por uma expansão celular (fig.

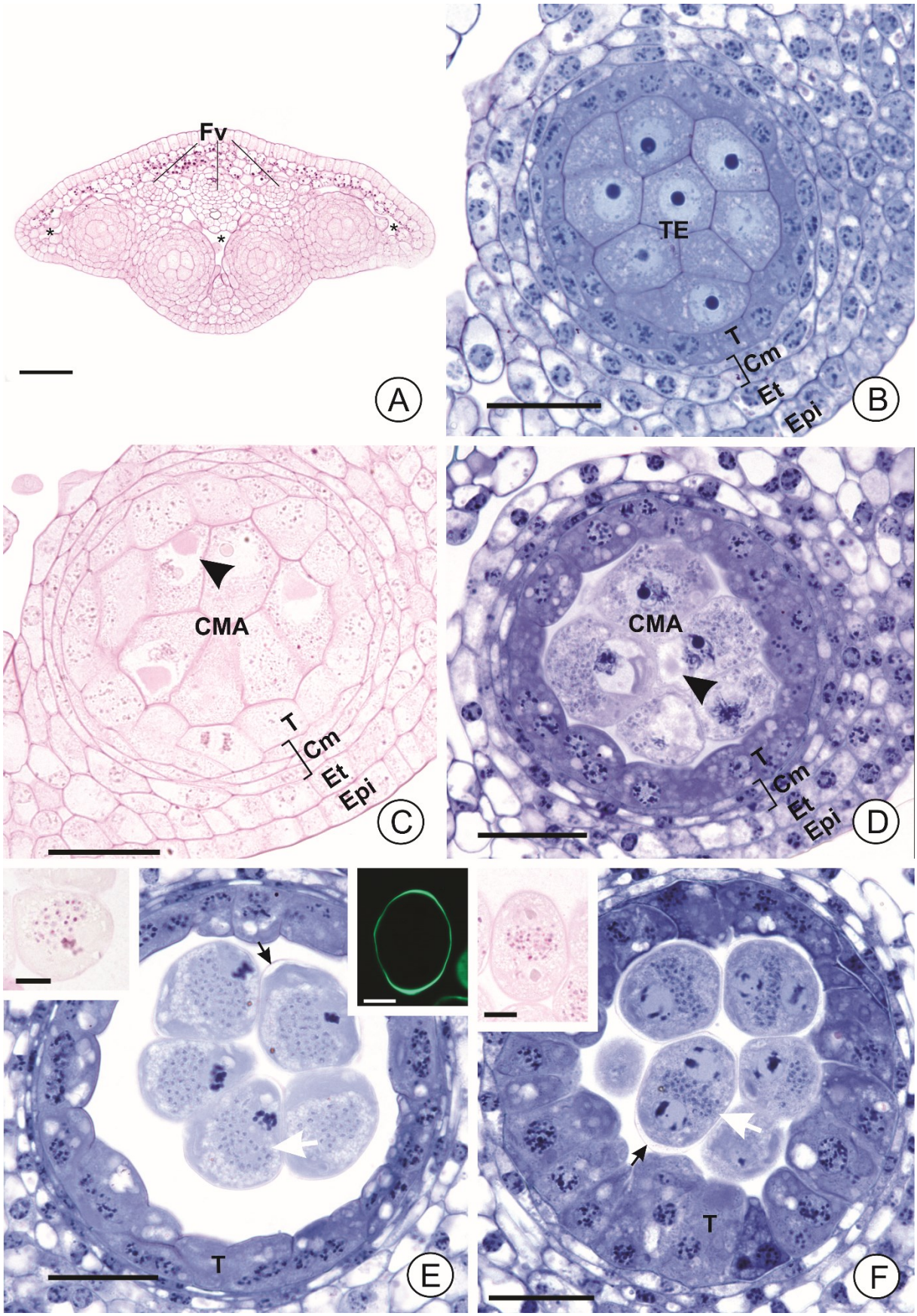

Fv
A
TE
T
Cm
Et
Epi
B
CMA
C
D
E
F

Figura 3. Secções transversais dos estames de *Nymphaea amazonum* em sucessivos estágios de desenvolvimento. (A) Visão geral do estame durante o estágio de células esporogênicas, asteriscos indicam espaços intercelulares esquizogênicos. (B) Células esporogênicas apresentando paredes primárias coradas. (C-D) Células-mãe dos andrósporos com vacúolos nucleares (ponta de seta). (E-F) Meiócitos/Intercinese mostrando amiloplastos dispersos pelo citoplasma (setas brancas) e início da deposição da camada de calose entre a parede celular primária e plasmalema (setas pretas), inserção superior esquerda E e F apresentam amiloplastos e inserção superior direita E mostra deposição de calose. Colorações: B, D-F – azul de toluidina O; inserção direita E – azul de anilina; A, C, inserção esquerda E, inserção F – PAS. Cm – camadas médias, CMA – células-mãe dos andrósporos, Epi – camada epidérmica, Et – endotécio, Fv – feixes vasculares, T – tapete, TE – tecido esporogênico. Escala: inserções – 10 μm; B-F – 30 μm; A – 50 μm.

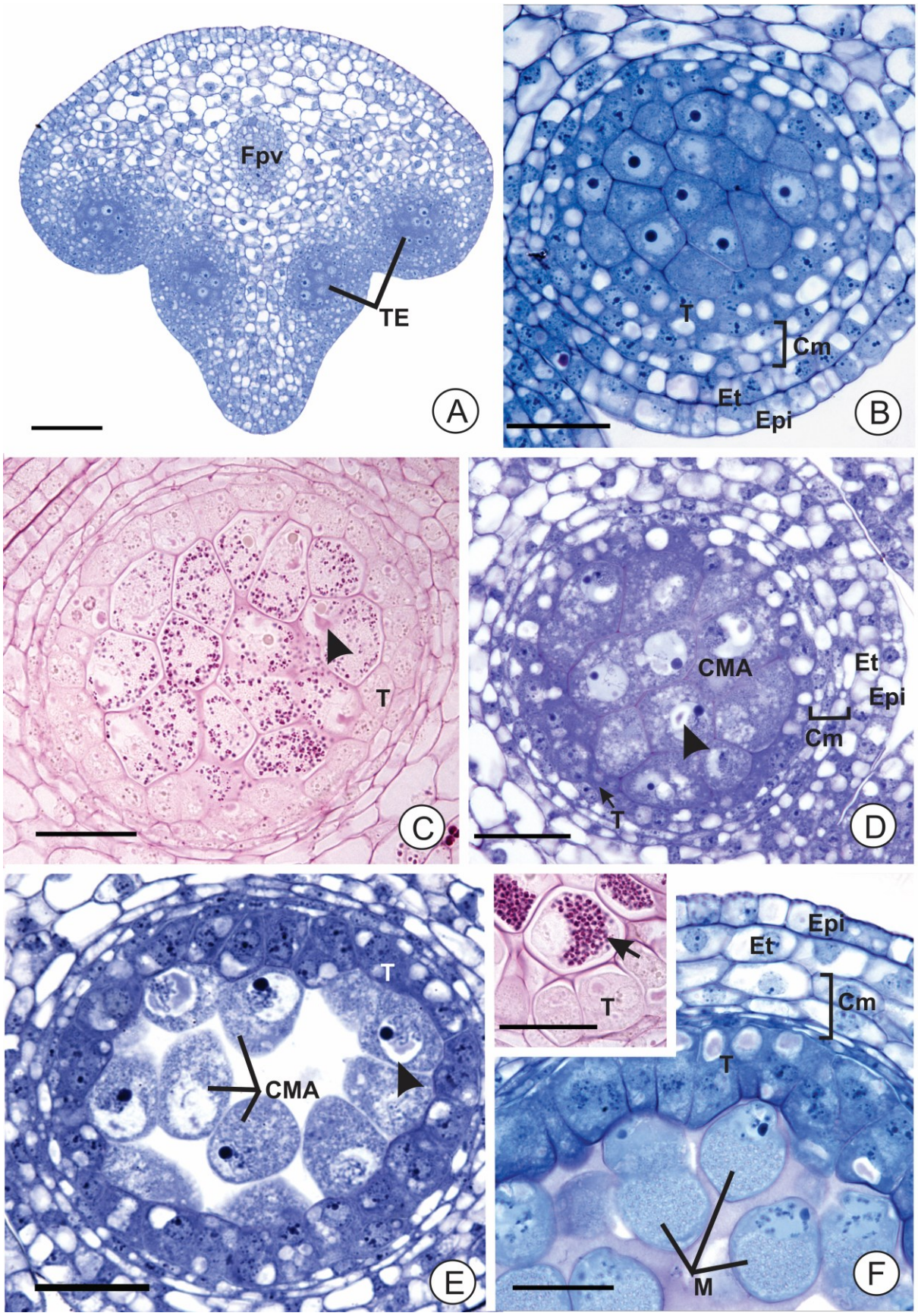

Fpv
TE
A
T
Cm
Et
Epi
B
T
C
CMA
Et
Epi
Cm
T
D
T
CMA
E
T
Epi
Et
Cm
T
M
F

Figura 4. Secções transversais dos estames de *Nymphaea caerulea* em sucessivos estágios de desenvolvimento. (A) Visão geral do estame durante o estágio de células esporogênicas. (B) Células esporogênicas apresentando paredes primárias coradas. (C-D) CMA com vacúolos nucleares (ponta de seta). (E) CMA em prófase I. (F) Meiócitos com amiloplastos dispersos pelo citoplasma (setas pretas). M - meiócitos Colorações: A-B, D-F – azul de toluidina O; C, inserção F –PAS. Cm – camadas médias, CMA – células-mãe dos andrósporos, Epi – camada epidérmica, Et – endotécio, Fpv – feixes provasculares, M – meiócitos, T – tapete, TE – tecido esporogênico. Escala: inserções F – 30 μm; B-F – 30 μm; A – 100 μm.

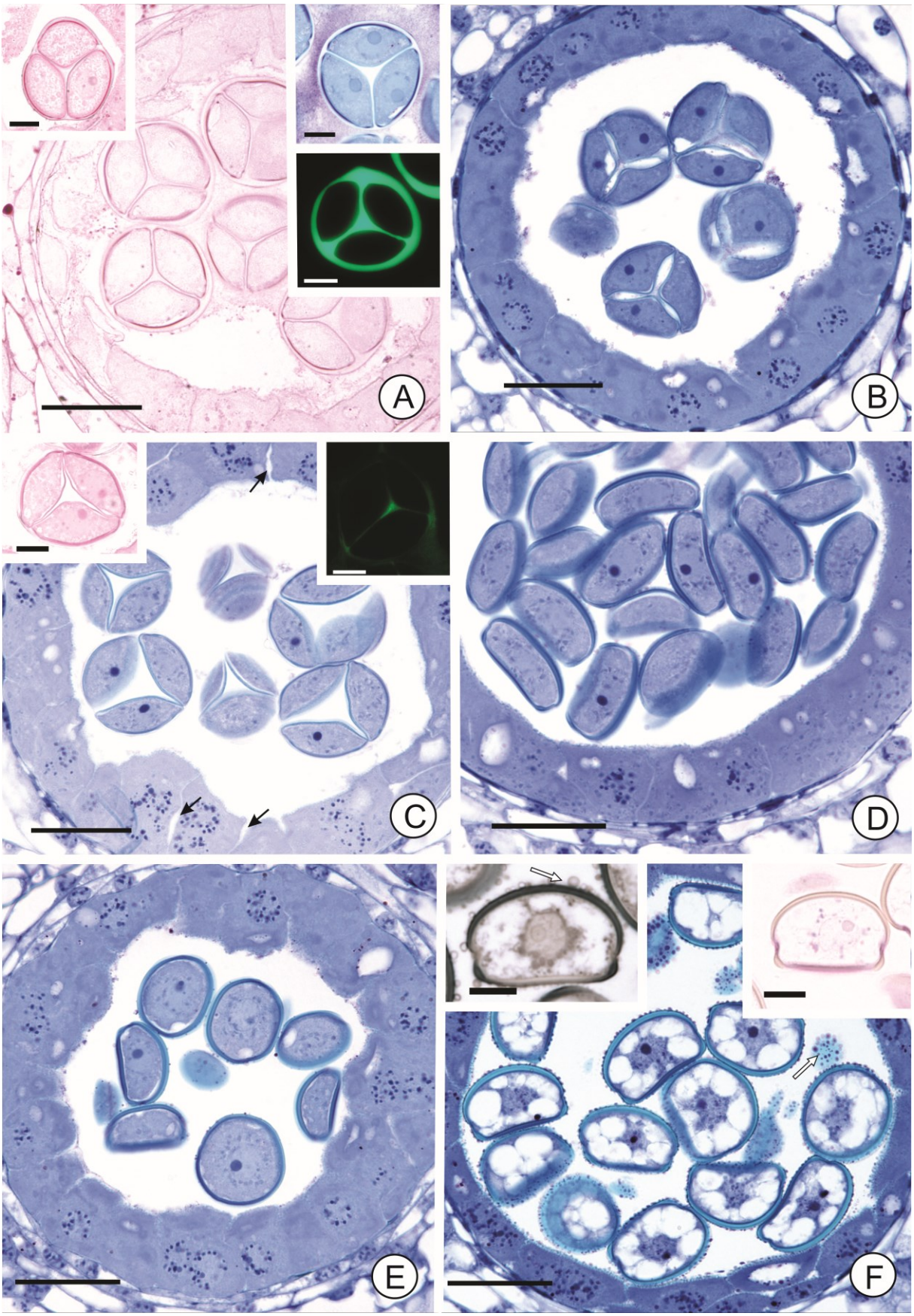

A
B
C
D
E
F

Figura 5. Secções transversais dos estames de *Nymphaea amazonum* em sucessivos estágios de desenvolvimento. (A) Tétrades iniciais, com primexina nas paredes distais fortemente coradas e início da formação da exina nas paredes proximais, inserção superior direita apresenta detalhes da tétrade e, inserção inferior direita evidencia calose. (B) Tétrades intermediárias. (C) Tétrades tardias, inserção evidenciam resquícios da camada de calose. (D) Andrósporos livres achatados. (E) Andrósporos livres tardios. (F) Andrósporos vacuolados, inserção superior direita mostra distribuição perinuclear dos amiloplastos e, inserção inferior direita apresenta o 'polenkitt' como gotículas sobre a esporoderme, observar o 'pollenkitt' em cortes tangencias da esporoderme (setas brancas). Colorações: inserção inferior à direita A, inserção C – azul de anilina; inserção superior à direita A, B-F – azul de toluidina O; inserção superior esquerda F – Sudan black B; inserção superior direita F – PAS; inserção superior esquerda A, C – vermelho de rutênio. Escala: inserções – 10 μm; A-F – 30 μm.

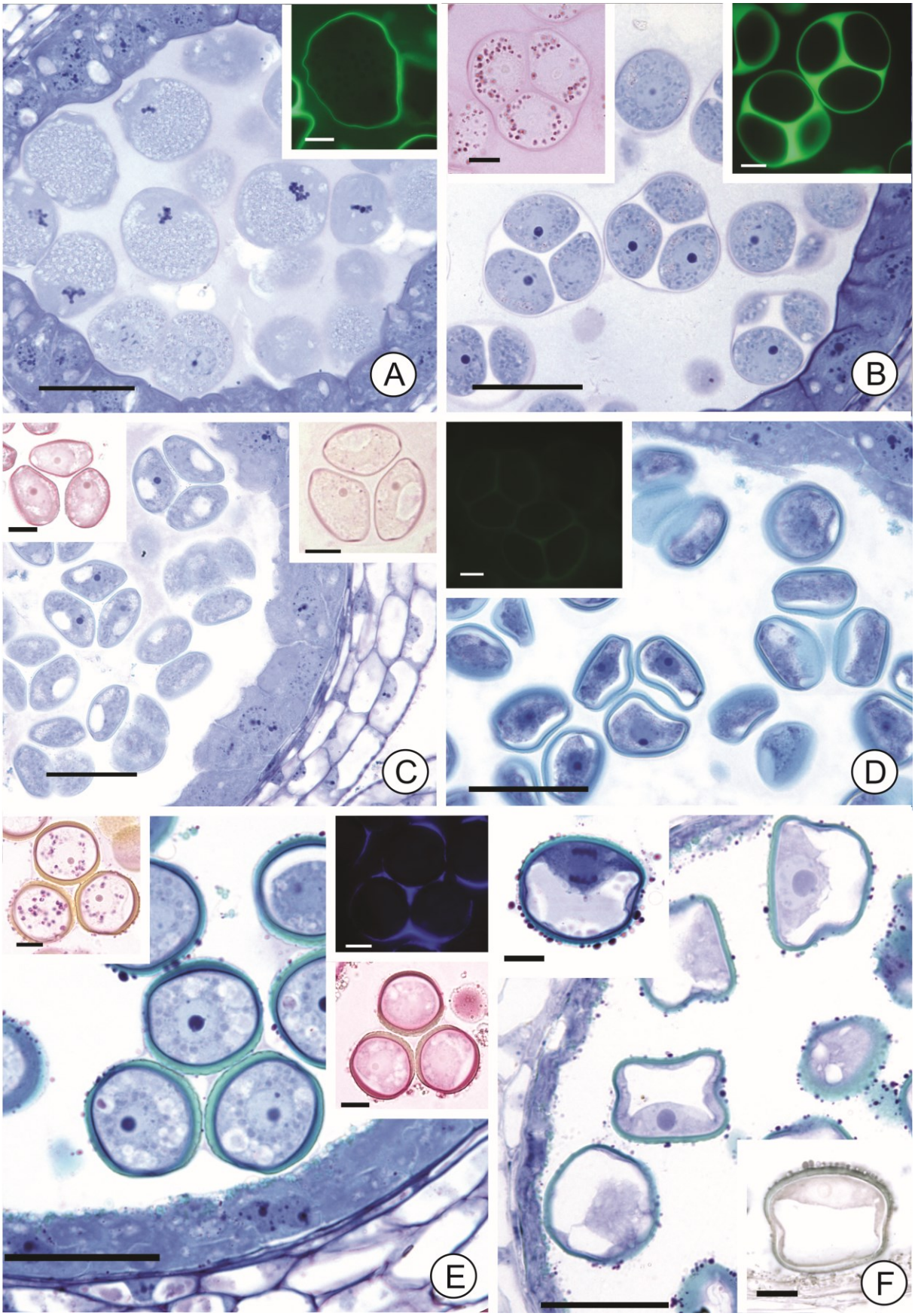

A
B
C
D
E
F

Figura 6. Secções transversais dos estames de *Nymphaea caerulea* em sucessivos estágios de desenvolvimento. (A) Meiócitos, inserção indica deposição inicial da parede de calose. (B) Tétrades iniciais, inserção superior esquerda apresenta amiloplastos no citoplasma dos andrósporos, inserção superior direita evidencia calose. (C) Tétrades intermediárias. (D) Tétrades tardias, inserção evidencia resquícios da camada de calose. (E) Andrósporos "livres" tardios apresentam atraso na dissociação da parede da tétrade, inserção superior esquerda apresenta amiloplastos no interior dos andrósporos e, inserção superior direita mostra que resquícios da parede que unia a tétrade é positiva para celulose. (F) Andrósporos vacuolados, inserção superior esquerda expõe mitose do andrófito com eixo perpendicular à esporoderme proximal, inserção inferior direita apresenta o 'polenkitt' como gotículas sobre a esporoderme. Colorações: inserção superior direita A e B, inserção superior esquerda D – azul de anilina; inserção superior esquerda F – azul de toluidina O; inserção superior direita E – Calcoflúor Withe M2R inserção superior esquerda B, inserção superior direita C, inserção superior esquerda E – PAS; inserção inferior direita F – Sudan Black B; inserção superior esquerda C e inferior direita E – vermelho de rutênio. Escala: inserções – 10 μm; A-F – 30 μm.

5E) e, em seguida, sofrem um amplo processo de vacuolação, ao passo que o lado distal da esporoderme torna se plano e o proximal permanece convexo e mais espesso (fig. 5F). Nesse estádio o núcleo é central e possui um nucléolo evidente; há diminutos amiloplastos no citoplasma, especialmente ao redor do núcleo (fig. 5F). A exina de ambas as paredes é psilada em *N. amazonum* (fig.5F), sendo levemente verrucada na esporoderme proximal de *N. caeruela* (fig. 6E). Neste estádio, grânulos contendo polissacarídeos e lipídios que se coram pelo Sudan Black B e são PAS positivos, recobrem a superfície da esporoderme em *N. amazonum* ou a superfície dos remanescentes da parede de calose em *N. caerulea* (fig. 6E) e constituem o 'pollenkitt'. Em *N. caerulea*, no estádio de andrósporos "livres" ocorre um núcleo central com um nucléolo evidente, o citoplasma exibe amiloplastos que se coram de azul escuro pelo azul de toluidina e são PAS-positivos; há também pequenos vacúolos esféricos dispersos pelo citosol (fig. 6E). Nesta espécie tanto a esporoderme distal quanto a proximal tendem a ser convexas e, o tapete apresenta claras evidências de apoptose, como picnose nuclear, plasmólise e coagulação citoplasmática (fig. 6E). Neste momento, em *N. amazonum* e *N. caerulea* a intina pode ser claramente distinguida abaixo de toda a extensão da esporoderme, sendo que se cora mais intensamente abaixo da esporoderme distal, em ambas as espécies se corando pelo vermelho de rutênio (fig. 6E).

Em *N. amazonum* e *N. caerulea*, os vacúolos dispersos no citoplasma do andrósporo se expandem e coalescem, resultando em um único vacúolo que ocupa a porção central da célula e promove o deslocamento do núcleo em direção à parede proximal da esporoderme (fig. 6F, 7A). Em *N. caerulea*, os andrósporos liberados tardiamente da tétrade tem formato irregular em secção transversal (fig. 6F). Em *N. amazonum* ocorre um espessamento na borda da exina pertencente à parede distal da esporoderme, adjacente à abertura anelar (fig. 7A-E). Em ambas as espécies, a mitose do andrósporo se processa rapidamente, durante a qual a placa metafásica se posiciona paralelamente à esporoderme, não havendo sincronismo entre andrófitos de um mesmo androsporângio (fig.6F, 7A).

Neste estádio, apenas os andrósporos de *N. caerulea* ainda apresentam 'pollenkitt' na superfície da esporoderme (fig.8A-C); *N. amazonum* perde seus grânulos no estádio de andrósporos vacuolados (fig.5F). Após o término da mitose, para ambas as espécies, a citocinese origina uma célula generativa com dimensões reduzidas e uma ampla célula vegetativa, a qual herda todo o vacuoma do andrósporo e ocupa cerca de 65% do espaço interno do andrófito recém-formado (fig. 7B, 8A). A célula generativa, inicialmente possui um formato lenticular e se encontra contígua à parede proximal da esporoderme (fig. 7B, 8A); já em *N. amazonum* esta célula apresenta um diminuto vacúolo lateral em seu citoplasma (fig. 7B). Na célula vegetativa, o núcleo é adjacente à parede proximal da esporoderme e posiciona-se

lateralmente à célula generativa (fig. 7B, 8A); a intina em *N. amazonum* e *N. caerulea* está muito espessa neste momento, sobretudo abaixo da esporoderme distal e no oncus (fig. 7B-E, 7G). A intina em ambas as espécies é positiva para polissacarídeos (PAS – fig. 7C, E, 8B, D), apresenta celulose (calcoflúor – fig. 7F, 8E) e substâncias pécticas (vermelho de rutênio – fig. 7G, I, 8F, I) em sua constituição.

Em *N. caerulea*, uma substância corada de magenta pelo azul de toluidina e PAS-positiva preenche o vacúolo da célula vegetativa (fig. 8A-D). Este amplo vacúolo progressivamente se fragmenta nos estádios de desenvolvimento seguintes e, o citossol da célula vegetativa passa por um incremento em sua densidade (fig. 7D, 8C). O núcleo vegetativo migra para uma posição central dentro do andrófito, embora a célula generativa permaneça unida à parede proximal da esporoderme apresentando, neste momento, um formato campanular (fig. 7D-E, 8D). Gradualmente, a célula generativa se desprende da esporoderme e imerge no citoplasma da célula vegetativa, adquirindo um formato esférico (figs. 7D-E, G, 8F). Neste momento o endotécio passa a exibir espessamentos (fig. 7G, 8E). Apenas neste estádio o 'pollenkitt' desaparecem da superfície da esporoderme em *N. caerulea* (fig. 7G, 8G). Os vacúolos da célula vegetativa progressivamente diminuem em volume e desaparecem no andrófito, pouco antes da maturidade. A célula generativa, agora fusiforme, desloca-se em direção ao núcleo da célula vegetativa (fig. 7H, 8H), em *N. amazonum* o tapete é completamente degradado apenas neste estádio (fig. 7H). Em *N. caerulea*, pouco antes da maturidade do andrófito, é possível observar novamente amiloplastos na célula vegetativa (fig. 8G).

As anteras que apresentam deiscência, geralmente, são observadas em flores em segundo dia de antese. As células do sítio de ruptura do estômio, tanto em *N. amazonum* quanto em *N. caerulea*, possuem pequenas dimensões e são degradadas neste momento (fig. 8I), o que possibilita a liberação dos andrófitos. Uma degradação muito mais pronunciada ocorre em *N. amazonum* com a degradação de boa parte das células estomiais e do septo intersporângial (fig. 7I). Não foi observada qualquer alteração substancial na conformação das paredes da antera no sentido de ampliar o estômio para facilitar a liberação dos grãos-de-pólen.

Variação Ontogenética da Área do Tapete

Em ambas as espécies a análise de variância demonstrou que há diferenças significativas em relação à área, em secção transversal, ocupada pelo tapete entre os diferentes estádios de desenvolvimento ($p < 0{,}0001$). As duas espécies apresentaram apenas um ciclo de expansão do tapete (fig. 9). Embora a comparação das médias de *N. amazonum* (tabela 1, fig. 9) sugira que possa ocorrer uma retração da área do tapete entre os estádios de tétrade inicial e tétrade tardia,

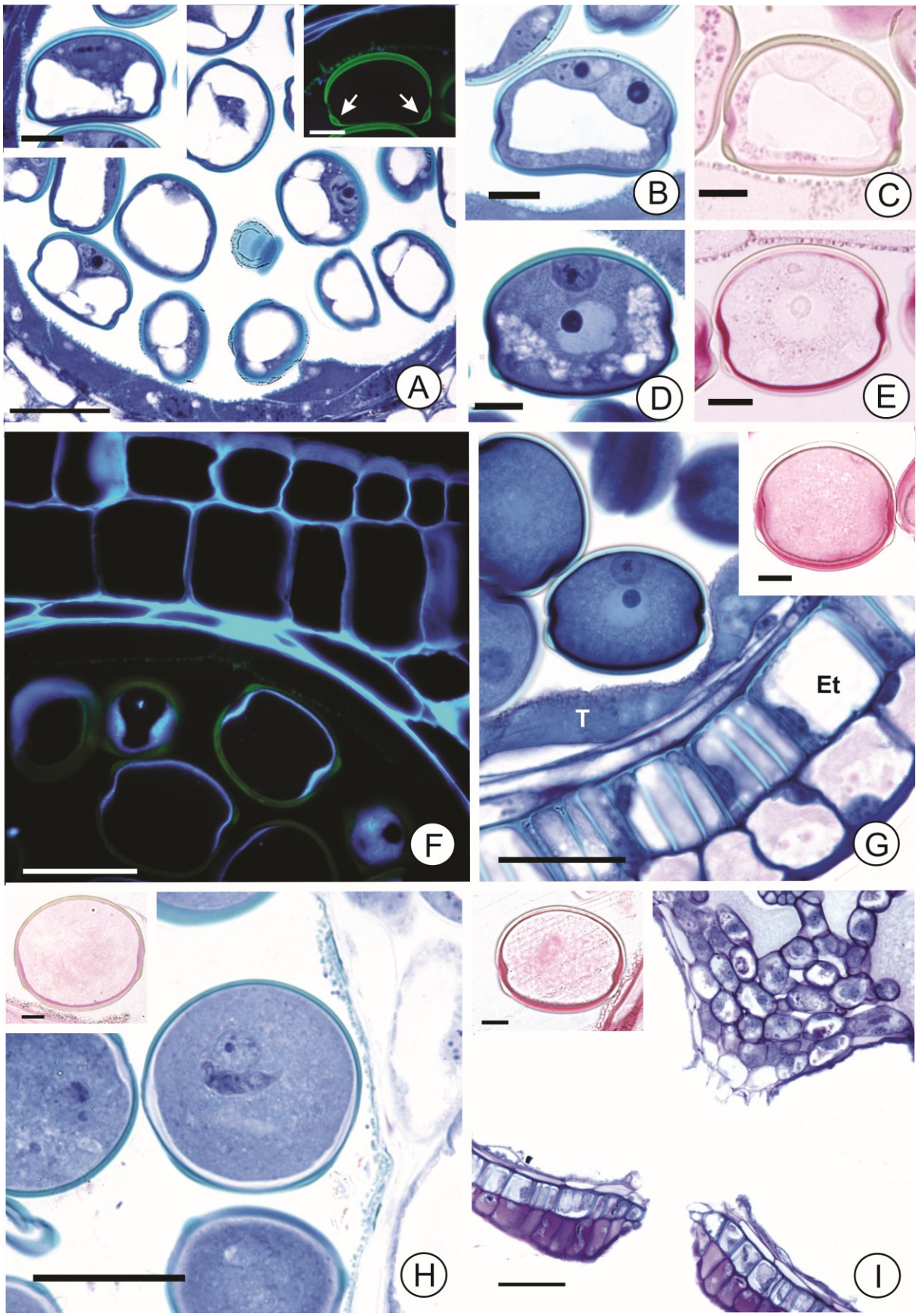

A
B
C
D
E
F
G
T
Et
H
I

Figura 7. Secções transversais dos estames de *Nymphae amazonum* em sucessivos estágios de desenvolvimento. (A) Estágio de andrósporos vacuolado tardio com migração do núcleo profásico em direção à esporoderme proximal, inserção superior esquerda evidencia placa metafásica, inserção superior direita indica borda da esporoderme distal espessada (seta branca). (B-C) Andrófito com célula generativa lenticular com vacúolo lateral. (D-E) Andrófito com célula generativa campanular e redução do vacuoma, notar intina intensamente corada abaixo da abertura e na esporoderme distal. (F) Andrófito jovem. (G) Mesmo estágio da figura anterior mostrando espessamento anelares do endotécio. (H) Andrófito maduro, inserção superior esquerda indica ausência de amiloplastos. (I) Corte transversal no sítio de deiscência da antera, inserção superior esquerda evidencia a espessura da intina durante a liberação dos andrófitos. Colorações: A, inserção superior esquerda A, B, D, G-I – azul de toluidina O; inserção superior direita A, F – auramina O e calcoflúor withe M2R; C, E, Inserção H – PAS; inserção G, I – vermelho de rutênio. Et- endotécio, T – tapete. Escala: B-E, inserções – 10 μm; A, F-I – 30 μm.

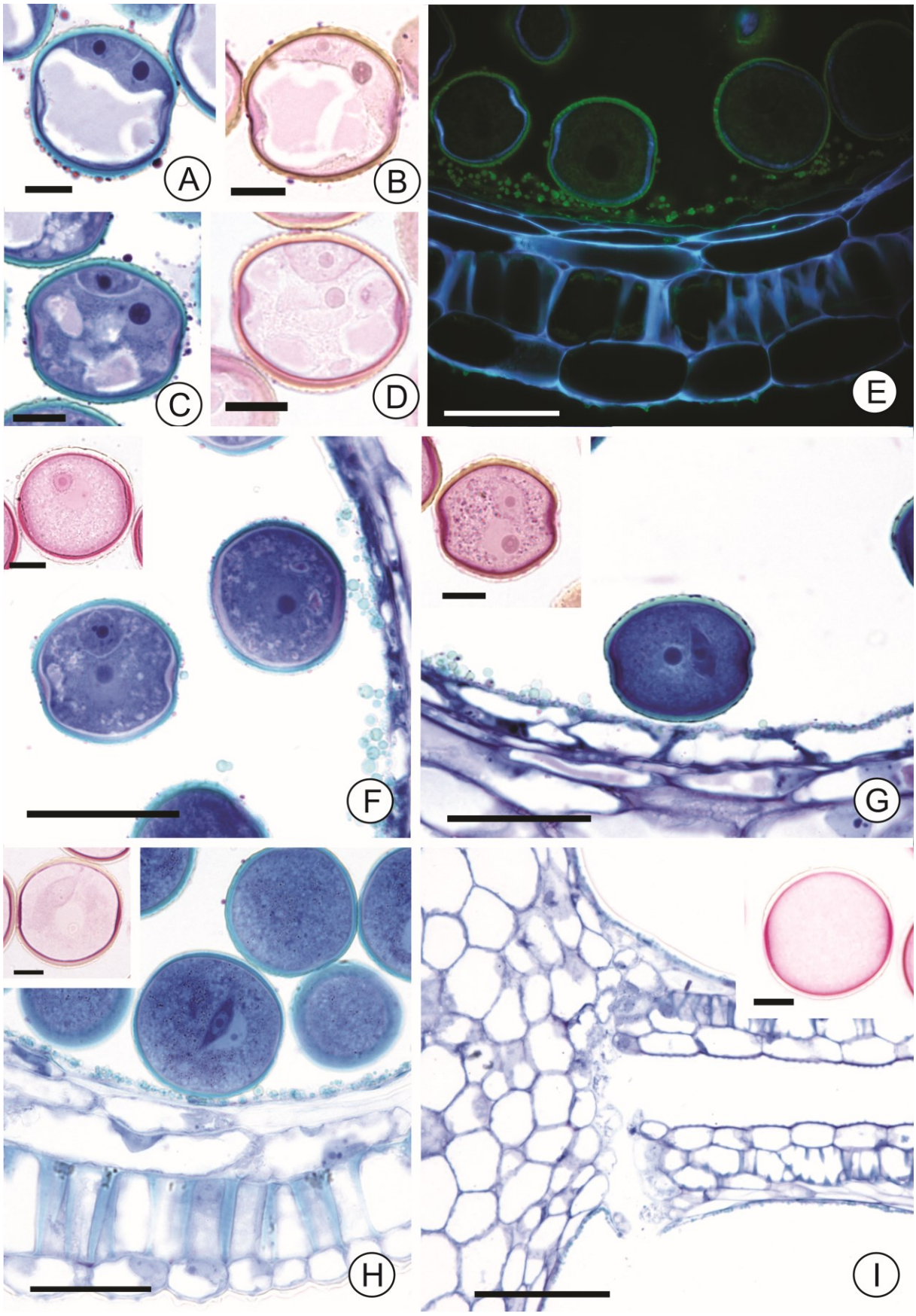
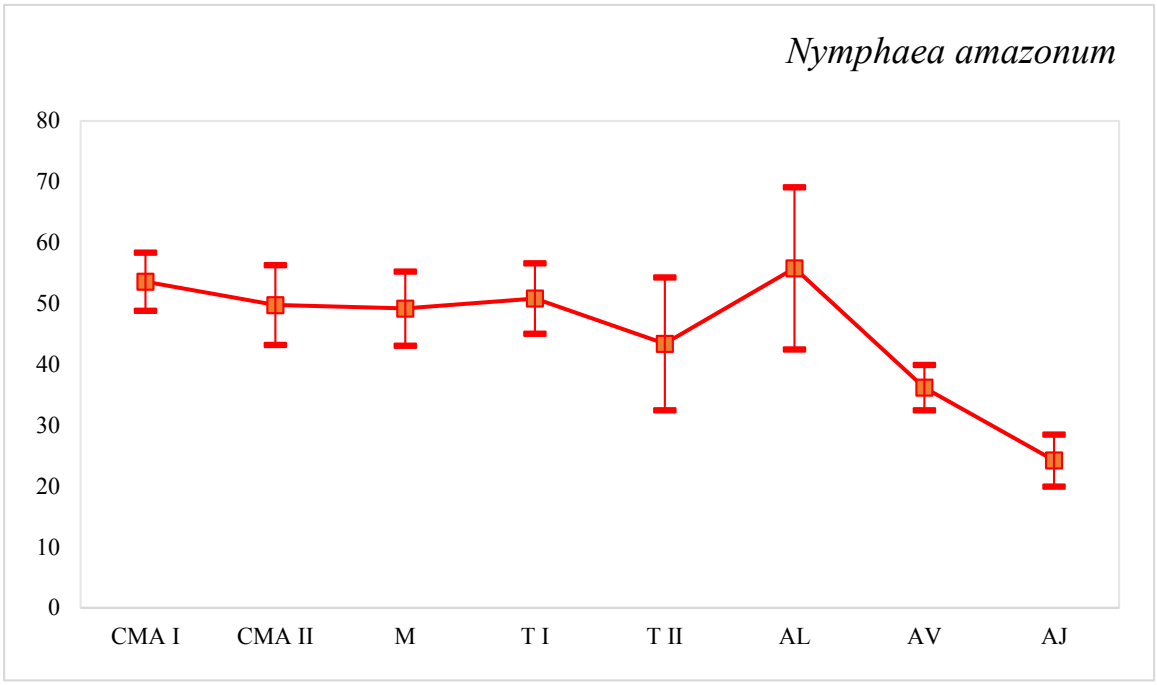

A
B
C
D
E
F
G
H
I

Figura 8. Secções transversais dos estames de *Nymphaea caerulea* em sucessivos estágios de desenvolvimento. (A-B) Andrófito com célula generativa lenticular. (C-D) Andrófito com célula generativa campanular e redução do vacuoma. (E) Andrófito jovem, endotécio com espessamento anelares. (F) Andrófito jovem com vacúolos diminutos, os orbículos esféricos se localizam próximos aos restos das células colapsadas do tapete, inserção mostra intina. (G) Andrófito jovem sem vacúolos, inserção superior esquerda evidencia presença de amiloplastos no citoplasma da célula vegetativa. (H) Andrófito maduro, inserção mostra ausência de amiloplastos durante deiscência da antera. (I) Corte transversal no sítio de deiscência da antera. Colorações: A, C, F-I – azul de toluidina O; E – auramina O e calcoflúor withe M2R; B, D, Inserções G e H – PAS; inserção F, I – vermelho de rutênio. Et – endotécio. A-D, inserções – 10 μm; E-I – 30 μm.



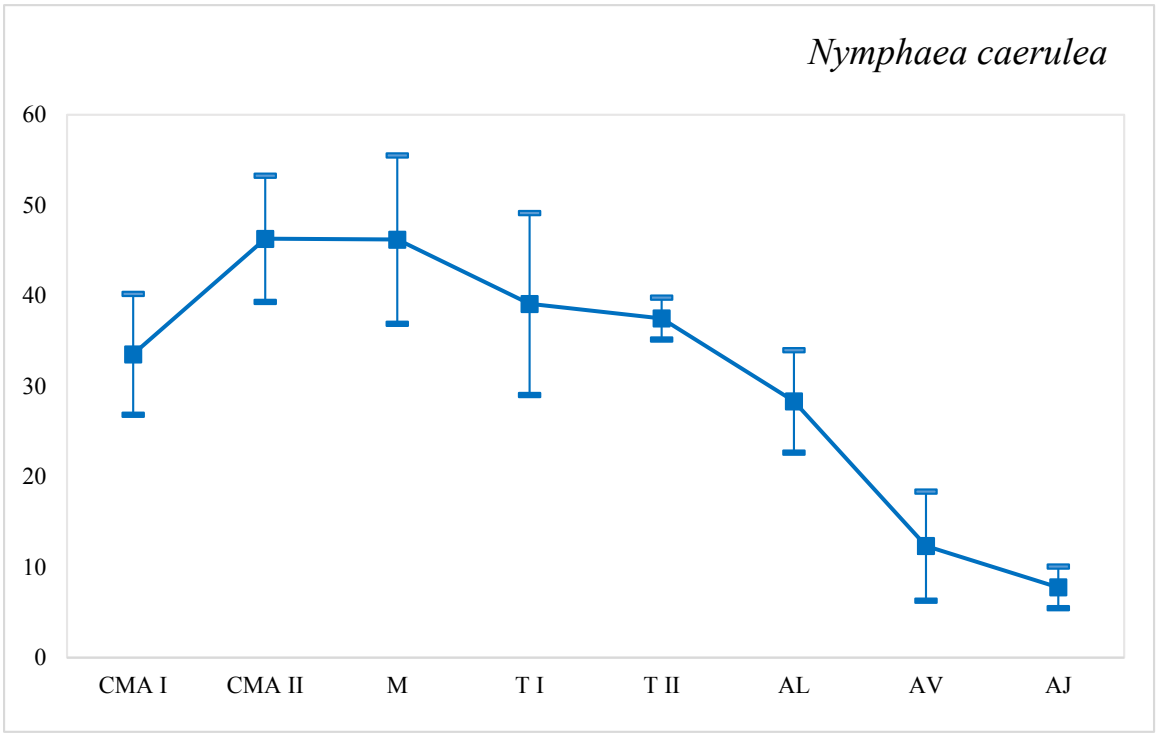


Figura 9. Porcentagem média da área ocupada pelo tapete, em secção transversal e, seus respectivos desvios padrão durante os consecutivos estádios de desenvolvimento para *Nymphaea amazonum* e *Nymphaea caerulea*. CMA I – células-mãe dos andrófitos inicial; CMA II – células-mãe dos andrófitos final; M – meiócitos; T I – tétrades iniciais; TII – tétrades finais; AL – andrósporos livres; AV – andrósporos vacuolados; AJ – andrófito jovem.

Tabela 1. Porcentagem média do tapete sobre a área total da circunferência que engloba o tapete mais o lóculo para cada um dos estádios de desenvolvimento e comparação pelo teste de Tukey

Nymphaea amazonum			*Nymphaea caerulea*		
Estádio	Média[1] (%)	Desvio Padrão	Estádio	Média[1] (%)	Desvio Padrão
CMA I	53,61 [a,b]	4,79	CMA I	33,54 [b,c]	6,67
CMA II	49,77 [a,b]	6,56	CMA II	46,31 [a]	6,97
M	49,19 [a,b]	6,08	M	46,22 [a]	9,31
T I	50,85 [a,b]	5,80	T I	39,11 [a,b]	10,05
T II	43,41 [b,c]	10,93	T II	37,50 [a,b,c]	2,32
AL	55,81 [a]	13,33	AL	28,34 [c]	5,66
AV	36,21 [c]	3,72	AV	12,34 [d]	6,02
AJ	24,23 [d]	4,27	AJ	7,78 [d]	2,31

[1]Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (α=5%)

não houve diferença estatisticamente significativa. Em *N. amazonum*, o tapete atingiu a maior área no estádio de andrósporos livres (tabela 1, fig. 9), enquanto *N. caerulea* atingiu sua área máxima durante os estádios de CMA tardio e meiócitos (tabela 1, fig. 9). Os maiores desvios padrão em *N. amazonum* foram encontrados nos estádios de tétrade tardio e andrósporos livres, já em *N. caerulea* os maiores desvios padrão foram encontrados nos estádios de meiócitos e tétrade inicial (tabela 1).

Discussão

A organização das anteras em ortostícas e parastícas é relatada para *Nuphar*, *Nymphaea*, *Ondinea* e *Victoria*, aparentando ser uma característica compartilhada pela família Nymphaeaceae (Schneider et al., 2003, Hu et al., 2009). O número de anteras é altamente variável dentre as angiospermas basais, podendo apresentar desde apenas uma única antera em Hydatellaceae, até mais de 200 como no caso de algumas Nymphaeaceae (Endress, 2011).

No grado ANA pouca atenção foi dada, do ponto de vista histológico, à emergência das anteras a partir da superfície receptacular, sendo que a maioria dos trabalhos começam a descrição da ontogenia após a diferenciação do tecido esporogênico. Estes estudos se detêm, quase que exclusivamente, na ontogenia da esporoderme sem prestar a devida atenção a eventos histológicos do primórdio da antera, da parede do androsporângio e até mesmo de alguns aspectos dos andrósporos (Gabarayeva & Rowley, 1994; Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997; Gabarayeva et al., 2001; Taylor & Osborn, 2006; Taylor et al., 2008, Taylor et al. 2013), o que provavelmente causou a perda de informações sobre vários caracteres potencialmente utilizáveis no entendimento da evolução dos padrões de desenvolvimento teciduais das anteras do grado ANA e, consequentemente, informações valiosas que poderiam contribuir com a taxonomia do grupo. A análise histológica detalhada da ontogenia inicial do primórdio estaminal e da parede do androsporângio em *N. caerulea* e *N. amazonum*, consiste em um dos poucos trabalhos do gênero que exploram estes aspectos da ontogenia no grado ANA.

Bhandari (1984) afirma que o tipo de desenvolvimento do androsporângio (*sensu* Davis, 1966) é próprio de uma determinada família, sendo que, em alguns casos, pode ocorrer mais de um tipo. A parede do androsporângio em *N. amazonum* e *N. caerulea* é do tipo básico (Davis, 1966), visto que a CPS_i origina parte do tapete e uma das camadas médias, e a CPS_e origina outra camada média e o endotécio. As camadas médias passam ainda por divisões periclinais adicionais, formando de três a quatro camadas na antera madura. Dentro do grado ANA relatou-se apenas para *Amborella trichopoda* (Tobe et al., 2000), e para membros da família Nymphaeaceae como *Nuphar pumila* (Zhou & Fu, 2008), *N. amazonum* e *N. caeruela* (neste

trabalho) que o desenvolvimento da parede do androsporângio segue o tipo básico (Davis, 1966). Portanto, a despeito da exígua literatura a respeito do tema, este padrão de desenvolvimento está presente tanto no primeiro, quanto em membros do segundo táxon mais basal na filogenia das angiospermas (Borsch et al., 2003; Borsch et al., 2008; Hilu et al., 2003; Moore et al., 2007). Mesmo que haja limitações presentes neste sistema de classificação (García, 2002), este é o único sistema vigente que permite o cruzamento de informações presentes entre os táxons já estudados.

Uma parede primária delgada, por vezes denominada na literatura como envoltório (*coat*), ocorre no estádio tardio das células esporogênicas e persiste até o estádio de tétrade inicial em *N. amazonum* e *N. caerulea*, é PAS-positiva e se cora de roxo pelo azul de toluidina. O mesmo é relatado para o gênero *Victoria*, *Cabomba caroliniana* e *Brasenia*. *schreberi*, embora apenas a partir do estádio de CMA, visto que a descrição da ontogenia nestas espécies se inicia apenas neste estádio (Taylor & Osborn, 2006; Taylor et al., 2008, Taylor et al. 2013). Embora não seja descrito pelos autores, uma micrografia eletrônica de transmissão apresentada para *N. mexicana*, no estádio de células esporogênicas, evidencia a presença de uma parede primária que se mostra como uma camada elétron-densa entre células adjacentes (Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997). Em *Austrobaileya maculata* também se observa uma parede primária nas células esporogênicas que persiste até o estádio de tétrade inicial, apresentando as mesmas propriedades ultraestruturais observadas em *N. mexicana* (Zavada, 1984). Em *N. amazonum* e *N. caerulea,* a deposição da parede de calose ocorre entre a parede primária e a plasmalema a partir do estádio de CMA tardio tal como observado em *Austrobaileya maculata* (Zavada, 1984), *N. mexicana* (Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997), *B. schreberi* (Taylor & Osborn, 2006), *C. caroliniana* (Taylor et al., 2008) e o gênero *Victoria* (Taylor et al., 2013).

Assim como em *N. amazonum* e *N. caerulea*, o tapete em *Victoria* e *B. schreberi* se diferencia a partir de células do meristema fundamental (conectivo) durante o estádio de tecido esporogênico precoce, embora em *C. caroliniana* o tapete só seja discernível a partir do estádio de CMA (Taylor & Osborn, 2006; Taylor et al., 2008; Taylor et al., 2012). Assim como relatado para *Victoria* (Taylor et al., 2012), após a formação do lóculo o tapete se torna binucleado, sendo possível observar pontos de contato entre o tapete e as CMA; contudo, este contato não é restrito a apenas este estádio de desenvolvimento em *N. amazonum* e *N. caerulea*. Em *N. colorata*, este evento foi observado durante o estádio de tétrade intermediário (Rowley et al., 1992). O contato íntimo entre CMA/tétrades/andrósporos com o tapete pode indicar um mecanismo facilitador do intercâmbio de metabólitos entre as partes envolvidas.

No gênero *Victoria* o tapete se expande no estádio de CMA tardio, apresentando um aspecto de paliçada e há um aumento no número de vacúolos em cada uma das células tapetais

binucleadas (Taylor et al., 2012). Neste estádio, *N. caerulea* apresenta uma organização similar a observada em *Victoria* quanto ao arranjo das células do tapete. Por outro lado, em *N. amazonum,* as células tapetais possuem seu maior eixo paralelo ao das células da camada média (i.e., são tangencialmente alongadas). Em *N. amazonum* e *N. caerulea* já é possível observar células binucleadas no tapete durante o estádio de CMA, e estas possuem alguns vacúolos esféricos dispersos pelo citoplasma. Zhou & Fu (2008), embora não indiquem com precisão o estádio, relatam que há células binucleadas no tapete de *Nuphar pumila*. Também existem células tapetais binucleadas em *C. caroliniana* (Taylor et al., 2008), ao passo que em *Brasenia* ocorrem células multinucleadas (Taylor & Osborn, 2006).

A meiose é simultânea nas duas espécies de *Nymphaea* analisadas resultando, predominantemente, em tétrades tetraédricas de andrósporos. *Victoria* exibe a mesma organização geométrica em suas tétrades (Taylor et al. 2013), assim como o gênero *Trithuria* (Remizowa et al., 2008), *Nuphar pumila*, (Zhou & Fu, 2008) e *N. colorata* (Rowley et al., 1992). Por outro lado, *Amborella trichopoda* possui tétrades tetraédricas, tetragonais, decussadas ou isobilaterais (Tobe et al., 2000; Hesse, 2001), *C. caroliniana* e *B. schreberi* por sua vez possuem tétrades tetragonais ou decussadas (Taylor & Osborn, 2006; Taylor et al., 2008); portanto, apresentam citocinese sucessiva (Furness et al., 2002). Existe discordância quanto a polarização do estado de caráter, enquanto existem autores que aceitam que a citocinese do tipo simultânea seja plesiomórfica (Furness et al., 2002), outros defendem que a citocinese sucessiva seja o estado ancestral (Sampson, 1970; Blackmore & Crane, 1988; Tobe et al., 2000).

No estádio de tétrades foi possível observar a dissolução entre as paredes radiais das células do tapete em *N. amazonum* e *N. caerulea*. Micrografias do estádio de tétrade, presentes no trabalho de Rowley et al. (1992), revelam esta separação no tapete em *N. colorata* e também há relatos para *Victoria* (Taylor et al., 2012). Em *C. caroliniana* a separação entre as paredes radiais é seguida pelo destacamento destas células da camada média interna, resultando na invasão do lóculo pelas células do tapete (Taylor et al., 2008). Taylor et al. (2012) propõem que é necessário que o estudo sobre a ontogenia do tapete vá além da classificação típica em tapete secretor/glandular, plasmodial ou invasivo, fornecendo descrições mais completas, pois tal esquema não comporta toda a complexidade exibida pelos diferentes táxons. Em *N. amazonum* e *N. caerulea* o tapete apresentou características do tipo secretor, embora possua certas particularidades como a dissolução das paredes celulares radiais que também podem ser encontradas em tapetes do tipo invasivo, visto que apenas os protoplastos invadem o interior do lóculo neste tipo de tapete (Furness & Rudall, 2001). Contudo, mesmo com escassos dados a respeito do tema, fica claro que existe uma grande variação na ontogenia do tapete dentro das angiospermas basais, sobretudo dentro da ordem Nymphaeales.

Taylor et al. (2012) relatam invaginações na membrana plasmática das células do tapete em *Victoria* nas quais se formam pró-orbículos e orbículos, durante o estádio de andrósporos livres. O tapete de *N. caerulea* assim como o de *Victoria* iniciam a apoptose durante o estádio tardio de andrósporos livres; contudo, em *N. amazonum* as células do tapete passam a apresentar sinais claros de apoptose somente após o processo de vacuolação do andrófito. A morte completa das células do tapete ocorre apenas após no estádio de andrósporos livres tardio em *Victoria* (Taylor et al., 2012), assim como em *N. caerulea*, já em *N. amazonum* as células do tapete são completamente consumidas no estádio de andrófito jovem. Há relatos que em *Brasenia* o tapete começa a se degenerar durante o estádio intermediário de andrósporos livres (Taylor & Osborn 2006).

São observadas gotículas recobrindo a superfície da exina nos andrósporos livres, nas duas espécies analisadas, contudo em *N. caerulea*, estas persistem até as fases iniciais da androgametogênse. Estas gotículas são originadas pelas células tapetais e possuem natureza glicolipídica. Zavada (1984) relata a liberação de substâncias tapetais no estádio de andrósporos livres em *Austrobaileya maculata* que se inserem nos interstícios da esporoderme. O autor interpreta tais substâncias como sendo o 'pollenkitt'. *Cabomba caroliniana* exibiu 'pollenkitt' nos grãos de pólen maduros somente quando estes não foram quimicamente fixados em soluções baseadas em álcool. Foi sugerido para *Victoria* e *C. caroliniana* que microcanais que surgem na exina, concomitantemente a degeneração das células do tapete, podem estar envolvidos no armazenamento do 'pollenkitt' (Taylor et al., 2008; Taylor et al., 2012). Portanto, é possível que as gotículas observadas na superfície da esporoderme nas espécies de *Nymphaea* analisadas neste estudo consistam no 'pollenkitt' e que seu desaparecimento nos estádios ontogenéticos seguintes pode ser atribuído à sua incorporação à esporoderme, como foi sugerido para *C. caroliniana* e *Victoria*, visto que o processo de desidratação em série etílica não parece ter sido suficiente para extrair o 'pollenkitt' da superfície polínica, pelo menos durante o estádio de andrósporos livres e estádios iniciais da androgametogênese.

É necessário frisar que tanto para *N. amazonum* quanto para *N. caerulea*, as gotículas foram depositadas contemporaneamente ao início da degradação tapetal e ao aparecimento dos orbículos, o que segundo Pacini & Hesse (2005) é uma característica que distingue o 'pollenkitt' do trifino, visto que este nunca é visualizado conjuntamente com os orbículos. Embora os mesmos autores indiquem que o 'pollenkitt' seja formado predominantemente por lipídios (Pacini & Hesse, 2005), os testes histoquímicos demostraram que as gotículas observadas em *N. amazonum* e *N. caerulea* é constituído por polissacarídeos e lipídios. Contudo, o 'pollenkitt' em certas monocotiledôneas marinhas hipo-hidrófilas é constituído por um substância viscosa ou gelatinosa composta de uma mistura de polissacarídeos, proteínas e lipídeos, (Pettitt, 1976

e 1980; Pettitt et al., 1984) o que mostra que a composição polissacarídica do 'pollenkitt' de *Nymphaea* não é um fato isolado.

Em *N. amazonum* e *N. caerulea* há uma leve assincronia entre os estádios de desenvolvimento dos grãos de pólen encontrado em cada uma das anteras de um mesmo botão floral, sendo que as anteras mais externas apresentam estádios mais adiantados do que aquelas anteras mais centrais. Taylor et al. (2013) relataram um fenômeno similar para *Victoria amazonica*, *V. cruziana* e seu híbridos. Tal evento é algo inesperado, uma vez que todas as anteras sofrem deiscência no decorrer de uma única noite (Prance & Arias, 1975). Em *C. caroliniana* e *B. schreberi* não foi relatada assincronia entre as anteras (Taylor & Osborn, 2006; Taylor et al., 2008). A assincronia no desenvolvimento das anteras em Nymphaeaceae pode ter relação com o elevado número de anteras característico da família e as estratégias que surgiram para equacionar o suprimento nutricional das mesmas, visto que há diferenças na distância entre cada uma das anteras e os feixes vasculares provenientes do pedicelo floral.

Houve um retardo na dissociação das tétrades em *N. caerulea*, fazendo com que no estádio de andrósporos livres os mesmos permanecessem agrupados por um envelope de natureza celulósica. O mesmo atraso na dissociação das tétrades foi relatado também em *N. capensis* (Gabarayeva et al., 2001). Em *Annona cherimola* foi documentado que os andrósporos foram mantidos juntos por um envelope celulósico, após a dissolução da calose (Lora et al., 2009). Mutantes de *Arabdopsis thaliana* que liberam o pólen em agregados geralmente deixam de possuir algumas das enzimas envolvidas no processo de dissolução dos polissacarídeos de parede que mantem os andrósporos unidos, tais enzimas estão envolvidas na dissolução de outros componentes que não a calose (Rhee & Somerville, 1998; Rhee et al., 2003), o que pode explicar a inexistência de calose no envelope que mantem os andrósporos de *N. caerulea* unidos. É possível que este retardo na liberação dos andrósporos da tétrade seja um passo intermediário na evolução de tétrades permanentes, visto que a proximidade entre esporodermes de andrósporos que permanecem contíguos pode contribuir para manutenção da unidade de dispersão dos gametófitos masculinos (Lora et al., 2009). Uma vez que o pólen de *Victoria* é liberado como tétrades permanentes (Taylor et al., 2013), é aceitável que táxons proximamente aparentados possam apresentar certo grau de coesão entre os andrósporos em alguma fase do desenvolvimento.

Há relatos de que em *N. colorata* o tapete expande em direção ao interior do lóculo pela primeira vez entre o estádio de tétrade intermediário e o tardio, e no estádio de micrósporos vacuolados este evento ocorre pela segunda vez (Rowley et al. 1992). Para ambas as espécies de *Nymphaea* estudadas ocorre evento de expansão das células do tapete, sendo que em *N. amazonum* o tapete atinge a maior porcentagem do lóculo no estádio de andrósporos livres,

enquanto em *N. caerulea* esta condição é atingida entre o estádio de CMA tardio e de meiócitos. Mesmo que a simples observação das médias da área do tapete sugiram que possa haver dois ciclos de expansão do tapete em *N. amazonum*, não houve diferenças estatisticamente significativas. Desta forma, embora haja variação temporal no volume alcançado pelas células do tapete em cada uma das fases de desenvolvimento e para cada uma das espécies de *Nymphaea* estudadas neste trabalho, fica claro que o tapete é do tipo secretor; contudo, apresentando algumas características próprias do tapete do tipo invasivo. Assim sendo, as espécies analisadas neste trabalho têm a ontogenia de seus tapetes muito similares àquela apresentada por *Victoria* (Taylor et al. 2012). Logo, o tapete invasivo cíclico relatado para *N. colorata* e *N. mexicana* (Rowley et al., 1992; Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997), não parece ser uma característica amplamente distribuída no gênero, sendo necessários estudos quantitativos mais criteriosos para cada uma das espécies no qual este tipo de tapete foi observado, para confirmar se ocorrem alterações significativas do volume das células tapetais durante a ontogenia das anteras.

É interessante notar que há altos valores de desvio padrão nos estádios no qual o tapete atinge sua maior área, o que poderia ser resultado do agrupamento dos dados da área do tapete em um número limitado de estádios de desenvolvimento que não reflitam as modificações contínuas observadas durante a ontogenia. A concentração desta variação em poucos estádios explicaria os valores do desvio padrão. Talvez, se a ontogenia fosse dividida em um número superior de estádios de desenvolvimento, fosse possível observar movimentos de expansão e retração do tapete tal como consta na literatura. Contudo, um número similar de estádios de desenvolvimento foi empregado por Rowley et al. (1992) em *N. colorata* e foi possível observar tais variações na forma e volume das células do tapete levando-o a defini-lo como um tapete invasivo cíclico.

Gabarayeva & El-Ghazaly (1997) reportaram para *N. mexicana* dois ciclos invasivos do tapete, o primeiro deles ocorre durante o estádio de tétrades intermediárias, sendo seguido por um período de retração; o segundo, durante o estádio de andrósporos livres, seguido de retração definitiva. Neste momento é possível observar orbículos recobrindo as paredes periclinais internas das células do tapete. Segundo Taylor et al. (2012), Nymphaeales pode apresentar tipos intermediários de tapete, sendo que o tipo invasivo cíclico pode ser um estádio intermediário entre o tapete do tipo secretor e o tipo invasivo (Taylor et al. 2012; Tiwari & Gunning 1986; Furness & Rudall 2001). O tapete do tipo secretor é considerado um estado de carácter plesiomórfico para as plantas com sementes, visto que este tipo de tapete é observado entre as gimnospermas (Tobe et al., 2000; Furness & Rudall, 2001).

Os orbículos são estruturas acelulares de esporopolenina, amplamente encontrados associados às células do tapete nas angiospermas. Ainda existem dúvidas se os orbículos possuem uma função ativa no lóculo das anteras, ou se são apenas um subproduto do tapete (Verstraete et al., 2014). Em *Kadsura coccinea* foram relatados orbículos que podem se fundir e originar agregados com formato irregular (Furness & Rudall 2001). Rowley et al. (1992) relatam que ocorrem orbículos complexos com formato irregular em *N. colorata*; contudo, em *N. caerulea* também uma espécie pertence ao subgênero *Brachyceras* os orbículos são esféricos, assim como *N. amazonum* (subg. *Hydrocallis*), embora esta espécie exiba orbículos com dimensões muito reduzidas. Um dado interessante ocorre em *C. caroliniana*, na qual existem orbículos associados a um tapete do tipo invasivo, visto que tais estruturas eram quase que exclusivamente relacionadas a tapetes secretores (Furness & Rudall 2001), muito embora existam relatos da presença de orbículos em espécies com tapete plasmodial como é o caso de *Gentiana acaulis* (Lombardo & Carraro, 1976) e *Modiolastrum malvifolium* (Galati et al., 2007).

Em *N. amazonum* a primexina já pode ser identificada em estádios iniciais da tétrade; contudo, no lado distal da esporoderme não é possível observar a primexina, uma vez que esta parede se cora intensamente de roxo pelo azul de toluidina, é PAS positiva e se cora pelo vermelho de rutênio constituindo a matriz péctica. Neste momento já é possível identificar, nos ângulos distais dos andrósporos da tétrade, descontinuidades na primexina na região que futuramente originará a abertura. Em *N. caerulea*, é possível discernir uma primexina delgada durante o estádio de tétrade intermediário, assim como as descontinuidades na região da abertura, sendo que a primexina também é moderadamente PAS-positiva. Em *N. mexicana* também houve a deposição de substâncias polissacarídicas sobre a plasmalema, tal deposição foi denominada de glicocálice e, provavelmente, equivale à primexina, os autores relatam que a primexina seria mais espessa abaixo da porção proximal da esporoderme (Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997).

Em *N. mexicana* e *Austrobaileya maculata*, na região da futura abertura também houve uma descontinuidade na deposição da primexina sobre a plasmalema (Zavada, 1984; Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997). Em *N. capensis* a descontinuidade da primexina na região que originará a abertura, assim como em *N. amazonum,* é contornada por uma primexina mais espessa (Gabarayeva et al., 2001). Há relatos da existência de polissacarídeos PAS-positivos na exina inicial de *N. colorata*, provavelmente derivada de resquícios da primexina (Gabarayeva & Rowley, 1994). A formação tanto da primexina quanto da exina é muito rápida em *Victoria*, *C. caroliniana* e *Brasenia* (Taylor & Osborn, 2006; Taylor et al., 2008, Taylor et al., 2013), e o presente estudo estende esta afirmação à *Nymphaea*, visto que a primexina é visualizada logo

que as tétrades são formadas e, assim que os andrósporos são liberados ou a calose é dissolvida (como no caso de *N. caerulea*), já é possível identificar uma exina bem espessa.

A exina dos andrófitos de *N. amazonum* e *N. caerulea* é psilada, embora em *N. caerulea*, durante o estádio de andrósporos livres, a exina aparente ser levemente verrucada na esporoderme proximal. A borda do lado distal da esporoderme em *N. amazonum* apresentou um espessamento pronunciado da exina, sendo que tal característica também foi observada durante o estádio de tétrade tardia, na borda proximal da abertura anelar de *N. mexicana* (Gabarayeva & El-Ghazaly 1997). A exina acima da abertura em *N. amazonum* e *N. caerulea* se mostrou extremamente delgada, em *N. caerulea* esta característica é atribuída a uma ectexina altamente reduzida (Coiro & Lumaga, 2013); em *C. caroliniana,* a um teto que não exibe espessamentos (Taylor et al., 2008), em *Victoria* à ausência de teto (Taylor et al., 2013) e, em *B. schreberi*, a exina está completamente ausente na abertura e, a esporoderme é representada apenas pela intina (Taylor & Osborn, 2006).

Nos andrófitos de *N. caerulea* e *N. amazonum*, é possível observar que a intina é mais espessa na esporoderme distal e, principalmente, na abertura, onde contribui na formação do oncus. Contudo, Coiro & Lumaga (2013) relatam que a intina de *N. caerulea* é delgada na esporoderme distal e mais espessa na proximal e abaixo da abertura o que contraria os dados do nosso trabalho. Tal confusão deve ser decorrente do fato de Coiro & Lumaga (2013) utilizar apenas andrófitos completamente maduros, o que pode explicar a inversão de perspectiva, visto que a abertura é aproximadamente equatorial em *N.caerulea* e apenas uma análise ontogenética completa poderia distinguir a esporoderme proximal da distal (Hesse, 2001). Em *Victoria*, por exemplo, na qual as tétrades são permanentes, a intina é mais espessa na esporoderme distal do que na proximal (Taylor et al., 2013). Não obstante, todos os estudos concordam que o espessamento da esporoderme na abertura anelar (oncus) é resultado da combinação de intina e endexina (Taylor & Osborn, 2006; Taylor et al., 2008; Coiro & Lumaga, 2013; Taylor et al., 2013).

Embora a presença de amiloplastos durante a ontogenia do pólen tenha sido relatada para diversas espécies dentro do grado ANA, não houve a preocupação de observar a dinâmica de amilogênese e amilólise. Em *N. mexicana*, grãos de amido são observados já nas células esporogênicas e persistem até o estádio de tétrade tardio (Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997), em *N. colorata* observou-se grãos de amido nas tétrades iniciais (Gabarayeva & Rowley, 1994) e, em *B. schreberi,* embora não haja referência textual, é possível observar amiloplastos nas micrografias contendo CMA e tétrades (Taylor & Osborn, 2006). Em *Austrobaileya maculata*, *Victoria* e *C. caroliniana* foram observados amiloplastos nas CMA, sendo que em *Cabomba* estes persistem no pólen maduro (Zavada, 1984; Remizowa et al., 2008; Taylor et al., 2008;

Taylor et al., 2013). A presença de amiloplastos em *N. capensis* está compreendida entre o estádio de CMA e tétrade tardia e, ao final do intervalo, os plastídios perdem seu conteúdo amilífero (Gabarayeva et al., 2001).

Segundo Pacini & Franchi (1988) entre o estádio de andrósporos iniciais e a maturidade do pólen, pode haver armazenamento de grãos de amido uma ou duas vezes. Em *N. amazonum*, ocorre um ciclo de amilogênese/amilólise durante o estádio de andrósporo vacuolado, no qual observa-se diminutos amiloplastos ao redor do núcleo. Não é mais possível identificar amiloplastos no andrófito após a mitose, mais precisamente após o estádio de célula generativa campanular. Já em *N. caerulea* ocorrem dois ciclos de amilogênese/amilólise, um durante o estádio de andrósporo livre, havendo um hiato no qual não são visualizados amiloplastos entre a mitose do andrósporo e os estádios iniciais da androgametogênese. Contudo, amiloplastos são novamente observados em *N. caerulea* após a célula generativa ser englobada pelo citoplasma da célula vegetativa, embora não haja amiloplastos no andrófito maduro.

Segundo Pacini (1996), quando há dois ciclos de amilogênese/amilólise o primeiro deles ocorre durante o estádio de andrósporo e o segundo durante o estádio bicelular intermediário do andrófito, o que está completamente de acordo com o observado para *N. caerulea*. Pacini (1996) afirma que em espécies nas quais ocorre apenas um ciclo de armazenagem de grãos de amido, este se inicia durante o estádio bicelular intermediário do grão de pólen; contudo, em *N. amazonum,* amiloplastos são observados durante o estádio de andrósporo vacuolado. É importante salientar que, para ambas as espécies, houve um ciclo adicional de amilogênese/amilólise, que ocorre nas CMA, ou seja, anteriormente aos estádios apontados por (Pacini 1996).

Conclusões

Nymphaea tem grande relevância para o entendimento da evolução inicial das anteras e andrófitos das angiospermas basais, visto que a ordem Nymphaeales consiste no grupo-irmão de todas as angiospermas. O fato do gênero consistir no grupo mais diversificado dentro das angiospermas basais, comportando o maior número de espécies, só aumenta sua importância. Pouco foi estudado sobre a formação da parede do androsporângio nas angiospermas basais, o que obscurece uma visão mais geral dos padrões de desenvolvimento iniciais dos primórdios estaminais no grupo. Os sistemas de classificação existentes tanto para a formação da parede do androsporângio, quanto do tipo de tapete apresentam dificuldades em comportar toda a diversidade existente, e novas formas de representa-la são necessárias.

Este trabalho foi o primeiro a utilizar uma abordagem estatística para verificar a existência de movimentos invasivos cíclicos em *Nymphaea*, demonstrando que não há eventos consecutivos de expansão e retração das células do tapete no interior do lóculo durante os sucessivos estádios de desenvolvimento, sendo que, nos tapetes de *N. amazonum* e *N. caerulea*, apesar de ocorrer uma expansão máxima de suas células em algum momento durante a meiose, só retraem em decorrência do processo apoptótico normal, se enquadrando, portanto, como tapetes do tipo secretor.

Os caracteres embriológicos descritos para *N. amazonum* e *N. caerulea* confirmam a acentuada variação presente no grado ANA em relação ao tipo de tapete, à geometria e à dissociação das tétrades, aos ciclos de amilogênese/amilólise e à deposição de 'pollenkitt' (Rowley et al., 1992; Taylor & Osborn, 2006; Taylor et al., 2008; Taylor et al., 2012). Devido ao posicionamento filogeneticamente basal do grupo, a compreensão desta variação deve ser extensivamente investigada dada sua importância na compreensão das estratégias desenvolvidas pelo grado ANA no transcurso da sua história evolutiva, e sua aplicabilidade na compreensão da evolução inicial das angiospermas.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor e a FAPESP pelo auxílio financeiro (processo nº 2014/01529-8).

Referências Bibliográficas

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. of 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 lignt on subg. *Brachyceras* and its relationships to the Australian water-lilies. Telopea 13(1-2): 193–217.

BHANDARI, N. N. 1984. The Microsporangium. In: Johri BM (ed) Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, p.p. 53–121.

BLACKMORE , S. & CRANE, P. R. 1988. The systematic implications of pollen and spore ontogeny. In: C. J. Humphries [ed.], Ontogeny and systematics, 83 – 115. Columbia University Press, New York, New York, USA.

COIRO, M. & LUMAGA, M. R. B. 2013. Aperture evolution in Nymphaeaceae: insights from a micromorphological and ultrastructural investigation. Grana 52(3): 192–201.

CONARD, H. S. 1905. The water lilies: a monograph of the genus *Nymphaea*. Washington: Carnegie Institution of Washington.

DAVIS, O. L. 1966. Systematic Embryology of the Angiosperms. John Wiley & Sons, New York

ENDRESS, P. K. 2011. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperm. Am. J. Bot. 98(3): 370–396.

ESCHRICH, W. & CURRIER, H.B. 1964. Identification of callose by its dichrome and fluorochrome reactions. Stain Technology, 39: 303–307.

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

FRIIS, K. R.; PEDERSEN, K. R.; CRANE, P. R. 2001. Fossil evidence of water lilies (Nymphaeales) in the Early Cretaceous. Nature 410: 357–360.

FURNESS, C. A. & RUDALL, P. J. 2001. The tapetum in basal angiosperm: early diversity. Int. J. Plant Sci. 162(2): 375–392.

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

GABARAYEVA, N. I. & ROWLEY, J. R. 1994. Exine development in *Nymphaea colorata* (Nymphaeaceae). Nord. J. Bot. 14(6): 671–691.

GABARAYEVA, N. I., GRIGORJEVA, V. V.; ROWLEY, J. R. 2003. Sporoderm ontogeny in *Cabomba aquatica* (Cabombaceae). Rev. Palaeobot. Palyno. 127: 147–173.

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

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

GALATI, B. G.; MONACCI, F.; GOTELLI, M. M.; ROSENFELDT, S. 2007. Pollen, tapetum and orbicule development in *Modiolastrum malvifolium* (Malvaceae). Ann. Bot. 99: 755–763.

GARCÍA, C. C. 2002. Anther wall formation in Solanaceae Species. Ann. Bot. 90: 701–706.

HESLOP-HARRISON, Y. 1977. The pollen–stigma interaction: pollen tube penetration in *Crocus*. Ann. Bot. 41: 913–922.

HESSE, M. 2001. Pollen Characters of *Amborella trichopoda* (Amborellaceae): A Reinvestigation. Int. J. Plant Sci. 162(1): 201–208.

HESSE, M.; HALBRITTER, H.; ZETTER, R.; WEBER, M.; BUCHNER, R.; FROSCH-RADIVO, A.; ULRICH, S. 2009. Pollen Terminology: An illustrated handbook. Wien, New York: Springer.

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.

HU, G. W.; LEI, L. G.; LIU, L. G.; LONG, C. L. 2009. Floral development in *Nymphaea tetragona* (Nymphaeaceae). Biol. J. Linn. Soc. 159: 211–221.

LOMBARDO, G. & CARRARO L. 1976. Tapetal ultrastructural changes during pollen development. III. Studies on *Gentiana acaulis*. Caryologia 29: 345–349.

LORA, J.; TESTILLANO, P.S.; RISUEÑO, M. C. HORMAZA, J. I.; HERRERO, M. 2009. Pollen development in *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). Implications for the evolution of aggregated pollen. BMC Plant Biology 9:129.

LU, L; WORTLEY, A. H.; LI, D.; WANG, H.; BLACKMORE, S. 2015. Evolution of Angiosperm Pollen. 2. The Basal Angiosperms. Ann. Mo. Bot. Gard. 100(3): 227-269.

McDOWELL, E. M. & TRUMP, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med. 100: 405–414.

MOORE, M. J.; BELL, C. D.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. 2007. Using plastid genome-scale data to resolve enigmatic relationships among basal angiosperms. PNAS 104(49): 19363–19368.

O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. 1981. The Study of Plant Structure Principles and Selected Methods. Melbourne: Termarcarphi Pty.

PACINI, E. 1996. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. Sex. Plant Reprod. 9(6): 362–366.

PACINI E.; FRANCHI, G.G. 1988. Amylogenesis and amylolysis during pollen grain development. In: Cresti M, Gori P, Pacini E (eds) Sexual reproduction in higher plants. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 181–186.

PACINI, E. & HESSE, M. 2005. Pollenkitt – its composition, forms and functions. Flora 200(5): 399–415.

PETTITT, J.M. 1976. Pollen wall and stigma surface in the marine angiosperms *Thalassia* and *Thalassodendron*. Micron7: 21–32.

PETTITT, J.M. 1980. Reproduction in seagrasses: nature of the pollen and receptive surface of the stigma in the Hydrocharitaceae. Ann. Bot. 45: 257–271.

PETTITT, J.M.; MCCONCHIE, C.A.; DUCKER, S.C.; KNOX, R.B. 1984. Reproduction in seagrasses: pollen wall morphogenesis in *Amphibolis antarctica* and wall structure in filiform grains. Nordic J. Bot. 4: 199–216.

PRANCE, G.T. & ARIAS, J.R. 1975. A study of the floral biology of *Victoria amazonica* (Poepp.) Sowerby (Nymphaeaceae). Acta Amazon. 5: 109–139.

PRANCE, G. T. 1980. A note on the pollination of *Nymphaea amazonum* Mart. & Zucc. (Nymphaeaceae). Brittonia 32:505–507.

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 infraspecidic level. Grana 47: 81–100.

RHEE, S.Y.; OSBORNE, E.; POINDEXTER, P.D.; SOMERVILLE, C.R. 2003. Microsporeseparation in thequartet 3 mutants of *Arabidopsis* is impaired by a defect in a

developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell wall degradation. Plant Physiol. 133: 1170–1180.

RHEE, S. Y.; SOMERVILLE, C. R. 1998. Tetrad pollen formation in *quartet* mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. 5(1): 79–88.

ROWLEY, J. R.; GABARAYEVA, N. I.; WALLES, B. 1992. Cyclic invasion of tapetal cells into loculi during microspore development in *Nymphaea colorata* (Nymphaeaceae). Am. J. Bot. 79(7): 801–808.

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, v. 446: 312–315.

SAMPSON, F. B. 1970. Unusual features of cytokinesis in meiosis of pollen mother cells of *Pseudowintera traversii* (Buchan.) Dandy (Winteraceae). Beit. Biol. Pfl. 47 : 71–77.

SCHNEIDER, E. L.; TUCKER, S. C.; WILLIAMSON, P. S. 2003. Floral development in the Nymphaeales. Int. J. Plant Sci. 164(5 Suppl.): S279–S292.

SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. J. Histochem. Cytochem. 21: 73–80.

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. 2012. Tapetum structure and ontogeny in *Victoria* (Nymphaeaceae). Grana 51, 107–118.

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.

TIWARI, S. C. & GUNNING, B. E. S. 1986. An ultrastructural, cytochemical and immunofluorescence study of postmeiotic development of plasmodial tapetum in *Tradescantia virginiana* L. and its relevance to the pathway of sporopollenin secretion. Protoplasma 133(2-3): 100–114.

TOBE, H.; JAFFRÉ, T.; RAVEN, P. H. 2000. Embryology of *Amborella* (Amborellaceae): Descriptions and Polarity of Character States. J. Plant Res. 113: 271–280.

VALLA, J.J. & CIRINO, D.R. 1972. Biología floral del irrupé, *Victoria cruziana* D'Orb. (Nymphaeaceae). Darwiniana 17:477–500.

VERSTRAETE, B.; MOON, H. K.; SMETS, E.; HUYSMANS, S. 2014. Orbicules in Flowering Plants: A Phylogenetic Perspective on their Form and Function. Bot. Rev. 80:107–134.

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

WIERSEMA, J.H.1988 Reproductive biology of Nymphaea (Nymphaeaceae). Ann. Mo. Bot. Gard. 75: 795–804.

ZAVADA, M. S. 1984. Pollen wall development of *Austrobaileya maculata*. Bot. Gaz. 145(1): 11–21.

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

Capítulo II

Ontogenia do Óvulo e do Ginófito em *Nymphaea amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum*, *N. caerulea* Savigny e *N. lotus* L. (Nymphaeaceae): Implicações para a Evolução Inicial das Angiospermas

Eduardo João Pereira Junior[1,2] & Nelson Sabino Bittencourt Júnior[2]

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Biociências, IBB/UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Caixa Postal 510, Rubião Junior, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

[2]Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência: eduardojpjr@yahoo.com.br

Resumo

Até o momento, todas as espécies com embriologia estudada pertencentes às ordens Nymphaeales e Austrobaileyales, respectivamente, o segundo e o terceiro ramos na filogenia das angiospermas, apresentam ginófito monospórico com quatro células e quatro núcleos, reconhecido como tipo *Nuphar*/*Schisandra*. Contudo, o ginófito monospórico com oito células e nove núcleos, muito similar ao tipo *Polygonum* foi relatado para *Amborella trichopoda*, o táxon mais basal dentre as angiospermas, o que gera grande discussão sobre qual tipo de ginófito representa a condição plesiomórfica. Ovários provenientes de espécimes de *Nymphaea amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum*, *N. caerulea* Savigny e *N. lotus* L. foram fixados, desidratados, infiltrados em historesina e as secções semi-seriadas de 1-4 μm foram coradas com azul-de-toluidina O, ou submetidas a testes histoquímicos com o intuito de verificar a presença de um ginófito do tipo *Nuphar*/*Schisandra* em *Nymphaea*. Nos estádios iniciais da formação do ginosporângio 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). Embora nenhum primórdio de óvulo com mais de uma célula arquespórica tenha sido verificado em *N. amazonum*, alguns óvulos com duas CMG foram vistos, ainda que todos os óvulos em estádios finais de desenvolvimento tenham apresentado apenas um ginófito. Os óvulos das três espécies são trizonados, crassinucelados, bitegumentados e, quanto a formação da micrópila, são endostômicos. Em linhas gerais, tais características são similares ao relatado para as demais espécies do grado ANA. Todas as espécies apresentam uma zona citoplasmática densa tenuemente DAPI-positiva na CMG, a qual também apresenta 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 nos membros do grado ANA, tríades lineares foram observadas em várias espécies, o que leva a crer que esta organização dos ginósporos evoluiu diversas vezes dentro do grupo. No estádio de ginósporo binuclear observou-se a migração conjunta dos núcleos em direção ao domínio micropilar do ginófito, o que traz algumas implicações à conceituação de módulo básico de desenvolvimento do gametófito feminino nas angiospermas. Contudo, a presença do ginófito do tipo *Nuphar*/*Schisandra* em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* corrobora este estado de caráter como plesiomórfico, levando-se em conta as implicações do conflito interparental que favorece um maior número de cópias do genoma materno em relação ao paterno, assim como o aumento no valor adaptativo do endosperma triploide para as angiospermas.

Palavras-chave: ginosporogênese, ginogametogênese, condição plesiomórfica do ginófito, grado ANA

Abstract

All species with embryological studies conducted to date, belonging to the orders Nymphaeales and Austrobaileyales, respectively, the second and the third branches of the angiosperm phylogenetic tree, present the four celled and four nucleated monosporic gynophyte of the *Nuphar*/*Schisandra* type. However, an eight celled and nine nucleated monosporic gynophyte, very similar to *Polygonum* type, have been reported for *Amborella trichopoda*, the basalmost taxon in the angiosperm phylogeny, which generates much discussion about what type of gynophyte is plesiomorphic. Ovaries from *Nymphaea amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum, N. caerulea* Savigny and *N. lotus* L. were fixed, dehydrated, infiltrated in historesin and the semi-seriated sections with 1-4 μm thick were stained with toluidine blue O or submitted to histochemical tests in order to verify the presence of a gynophyte of the *Nuphar*/*Schisandra* type in *Nymphaea*. In the early stages of gynosporangium in *N. caerulea* and *N. lotus*, only one of up to three subepidermal 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* ovules with two GMC eventually occurs, although we never observe ovules with two gynophytes at maturity. The three species possess ovules trizonate, crassinucellate, anatropous, bitegmic and with an endostomic micropyle. These characteristics are similar to those reported for other species of ANA grade. All species have a cytoplasmically dense zone slightly labeled to DNA, and there are DAPI-positive organelles spread in the cytoplasm. The meiosis originates a linear triad and just the chalazal gynospore proceeds the development. Although the linear tetrads predominate in the ANA grade, linear triads were observed in many species, which indicates that this gynospore organization evolved several times in the group. The binucleated gynospores exhibit a concerted 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* corroborates the plesiomorphy of this chacarter state, taking into account the implications concerning the interparental conflict which favors a greater number of copies of the maternal genome relative to the parental, as well as the fitness increase of the triploid endosperm to angiosperms.

Keywords: gynosporogenesis, gynogametogenesis, plesiomorphic condition of gynophyte, ANA grade

Introdução

Até o final do século XX, não se sabia ao certo o posicionamento filogenético de Nymphaeaceae relativamente às demais angiospermas (Orban & Bouharmont, 1998). Contudo, diversos estudos filogenéticos baseados em várias sequências genômicas confirmaram a condição basal de Nymphaeales como o segundo ramo na filogenia das angiospermas (Borsch et al., 2003; Hilu et al., 2003; Moore et al., 2007; Borsch et al., 2008). O conhecimento a respeito da biologia reprodutiva das linhagens basais é crítico para se reconstruir os estados de caracteres ancestrais e chave para a compreensão da origem e evolução inicial das angiospermas (Sargant, 1908; Crane et al., 1995).

Nymphaeaceae apresenta cinco gêneros (*Barclaya*, *Euryale*, *Nuphar*, *Nymphaea* e *Victoria*), sendo que o gênero *Nymphaea* é dividido em cinco subgêneros (*Anecphya*, *Brachyceras*, *Hydrocallis, Lotus* e *Nymphaea* [= subg. *Castalia*]) (Conard, 1905; Warner et al., 2008; Borsch et al., 2007; 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, criaram um sexto subgênero a partir de algumas espécies de *Anecphya* e nomearam-no de *Confluentes*. O gênero *Nymphaea* consiste no maior e mais diversificado da família, com 45-50 espécies (Borsch et al., 2007), sendo que grande parte desta diversidade está presente no Brasil, que contem cerca de 18 espécies (Sousa & Matias, 2012).

Embora tenham sido realizados estudos embriológicos em diversas espécies do grado ANA até o final do último século (Cook, 1902, 1906; Conard, 1950; Ramji & Padmanabhan, 1965; Schneider, 1978; Galati, 1985; Van Miegroet & Dujardin, 1992; Orban & Bouharmont, 1998) relatando, frequentemente, ginófitos monospóricos com quatro células e quatro núcleos, muitas vezes os pesquisadores atribuíam esta conformação ao fato de muitas angiospermas basais apresentarem ginófitos monospóricos do tipo *Polygonum* com antípodas efêmeras e fusão precoce dos núcleos polares, exibindo somente na maturidade quatro células e quatro núcleos, condição do ginófito designada como do tipo *Polygonum* críptico (Friedman & Williams, 2004; Friedman et al., 2003; Friedman & Williams, 2003).

Contudo, estes trabalhos iniciais também traziam muitas informações fragmentadas e dados conflituosos (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). Até o final do século passado, o paradigma vigente sobre a filogenia das angiospermas considerava Magnoliales, Laurales e Winterales (Canellales) como as linhagens mais basais e, uma vez que estas exibiam ginófitos

monospóricos do tipo *Polygonum*, assumiu-se que este estado de caráter era plesiomórfico para as angiospermas (Friedman & Williams, 2004; Friedman, 2006; Friedman & Ryerson, 2009).

Maheshwari (1947, 1950) julgou que todos os relatos de ginófitos com quatro células e quatro núcleos sem uma análise ontogenética adequada deviam ser errôneos, ou careciam de fundamentação. O ginófito monospórico com quatro células e quatro núcleos, foi designado de diversas formas ao longo do tempo: tipo *Schisandra* (Battaglia, 1986; Tobe et al., 2007) variação *Schisandra* do tipo *Oenothera* (Batygina & Vasilyeva, 2002) e tipo *Nuphar* ou *Nuphar*/*Schisandra* (Friedman & Williams, 2003; Friedman & Ryerson, 2009). Esta última designação será a adotada neste trabalho, devido à ênfase dada ao estudo completo da ontogenia na classificação do ginófito.

O ginófito do tipo *Nuphar*/*Schisandra* parece consistir 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). Portanto, o presente estudo tem como objetivo descrever a ginosporogênese, ginogametogênese e o desenvolvimento dos tegumentos em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* que consistem em representantes do grado ANA ocorrentes na flora brasileira, assim como verificar se a presença do ginófito monospórico do tipo *Nuphar*/*Schisandra* pode ser estendida para outras espécies de *Nymphaea*. Buscamos, portanto, agregar contributos ao debate sobre a possível plesiomorfia deste estado de caráter em relação ao ginófito do tipo *Polygonum*, bem como suas implicações sobre a evolução inicial das angiospermas.

Material e Métodos

Preparações para Epifluorescência e Microscopia de Luz

Flores e botões florais em sucessivos estádios de desenvolvimento foram coletados entre 2012 e 2014, provenientes de espécimes de *Nymphaea caerulea* Savigny (subg. *Brachyceras*) pertencentes a uma população subespontânea localizada em Uchoa (21° 02’ 53,15” S, 49° 08’ 22,70” O), de uma população natural de *N. amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum* (subg. *Hydrocallis*) localizada em Onda Verde (20° 38’ 28,12” S, 49° 19’ 53,01” O) e de uma população cultivada de *N. lotus* L. (subg. *Lotus*) localizada em Américo Brasiliense (21° 42’ 48,52” S, 48° 01’ 34,37” O), todos municípios do Estado de São Paulo, Brasil. As exsicatas de

N. amazonum, *N. caerulea* e *N. lotus* foram depositadas no Herbário do Campus da UNESP de São José do Rio Preto, respectivamente, sob os números de registro: SJRP 31878, SJRP 31879 e SJRP 31880. Após a dissecção, os ovários foram fixados em solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976) e desidratados em série etílica até etanol 70%, no qual foram armazenados. Completada a desidratação, as amostras foram incluídas em historesina Leica®. Secções semi-seriadas de 1-4 µm foram obtidas com navalhas de vidro, utilizando-se um micrótomo de rotação Leica RM2255. As secções foram aderidas em lâminas de vidro e submetidas à testes histoquímicos ou a coloração com azul de toluidina O (O'Brien & McCully 1981) e montadas com Permount®.

Foram realizados diversos testes histoquímicos. Para a detecção de polissacarídios insolúveis o Ácido Periódico - Schiff (PAS), precedido pelo tratamento das secções com o bloqueador de aldeídos 2,4-dinitrofenilhidrazina (O'Brien & McCully 1981). Para a detecção de calose foi utilizado o método fluorocromático com azul de anilina (Eschrich & Currier 1964). Para a visualização dos eventos nucleares durante a ontogenia do ginófito, as secções foram submetidas à solução Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0,25µg/mL em tampão Tris 0,05 M pH 7,2 em temperatura ambiente e sem a presença de luz por 15 minutos (Williams & Friedman, 2002 modificado). Todo o material foi examinado em um microscópio Zeiss Axioskop e fotografado com um fotomicroscópio Olympus BX51 equipado com um sistema de epifluorescência (lâmpada de mercúrio USH-103OL, modelo do cubo U-MWU2, filtro de excitação BP330-385, espelho dicróico DM400 e filtro de barreira BA420) e câmera digital Olympus Q-Colour 5.

Reconstrução tridimensional

Secções seriadas do ginófito maduro com 2 µm de espessura, corados com azul de toluidina, foram alinhadas com o *software* Reconstruct® versão 1.1.0.0 (Fiala, 2005), por meio da seleção de pontos congruentes em imagens consecutivas. Posteriormente, as imagens foram contornadas manualmente utilizando a ferramenta "*draw closed point by point"* e, o arquivo referente à reconstrução tridimensional foi exportado para o *software* Blender® versão 2.72a (http://www.blender.org/), no qual a edição final foi realizada.

Resultados

Ginosporogenêse

O primórdio ovular emerge de uma placenta laminar difusa e ambas as estruturas possuem organização trizonada (fig. 1A-C, 2A-C, 3A). Na camada epidérmica (zona I) ocorrem apenas divisões anticlinais, na camada subepidérmica (zona II) predominam divisões anticlinais, embora eventualmente divisões oblíquas tenham sido observadas; na terceira camada e nas subjacentes (zona III) não houve um padrão regular de divisões celulares (fig. 1A-C, 2A-C, 3A). Divisões periclinais na zona III são responsáveis pela protrusão do primórdio ovular e, após o mesmo passar por ligeiro alongamento, uma coluna central de células da zona III inicia sua diferenciação no feixe provascular, permanecendo com citoplasma mais denso e menos vacuolado (relativamente às camadas mais periféricas) e tornando-se progressivamente alongadas no plano longitudinal (fig. 1D-F, J, M, 2D-F, J, M, 3B, H).

A proliferação assimétrica de células no funículo causa o início da curvatura anátropa (fig. 1 D-F, 2D-F, 3B-D). Neste estádio, usualmente uma, algumas vezes duas ou mais iniciais subepidérmicas se diferenciam na zona II, na porção distal do nucelo em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* (fig. 1D-E, G, 2D, G, 3B-E). A(s) inicial(is) subepidérmica(s) possui(em) formato poliédrico, apresenta(m) uma alta densidade citoplasmática e um amplo núcleo central com um nucléolo conspícuo e várias regiões heterocromáticas no nucleoplasma (fig. 1D, 2D-E, 3B-D).

Em secções longitudinais deste estádio de desenvolvimento, um grupo de células da camada epidérmica (zona I) e abaixo da(s) inicial(is) subepidérmica(s) passa a apresentar células anticlinalmente alongadas (fig. 1D, 2D, 3C), sofrendo divisões periclinais ou oblíquas que fazem emergir o tegumento interno (fig. 1E, 2E, 3D). Divisões celulares adicionais contribuem para o crescimento do tegumento interno em direção ao topo do nucelo (fig. 1E-F, 2E-F, 3D-E). Na antirrafe, células também pertencentes à camada epidérmica, próximas ao emergente tegumento interno, passam igualmente a apresentar-se anticlinalmente alongadas (fig. 1E, 2F, 3E), ao passo que as da camada subjacente (zona II) dividem-se periclinalmente (fig. 1F, 2F, 3E). Divisões posteriores das células epidérmicas dão início ao tegumento externo semianular em *N. amazonum* e *N. caerulea* (Fig. 1J, M, 2J-M) e anular em *N. lotus* (fig. 3H), que se estende em direção ao topo do nucelo, da mesma forma que o tegumento interno (fig. 1E-F; 2E-F). Em *N. caerulea* e *N. lotus* também há uma pequena contribuição da zona II durante o desenvolvimento do tegumento externo, sendo que este pode apresentar três camadas celulares em alguns pontos, apenas em estádios iniciais (fig. 2J, M, 3G-H).

Concomitantemente à emergência do tegumento interno, usualmente apenas uma das iniciais subepidérmicas, posicionada na região apical do nucelo, após expandir-se sofre divisão periclinal originando para o lado externo uma célula parietal e, logo abaixo a célula arquespórica (fig. 1G-H, 2F, H-I, inserção superior direita 3E). Esta, por sua vez, expande-se

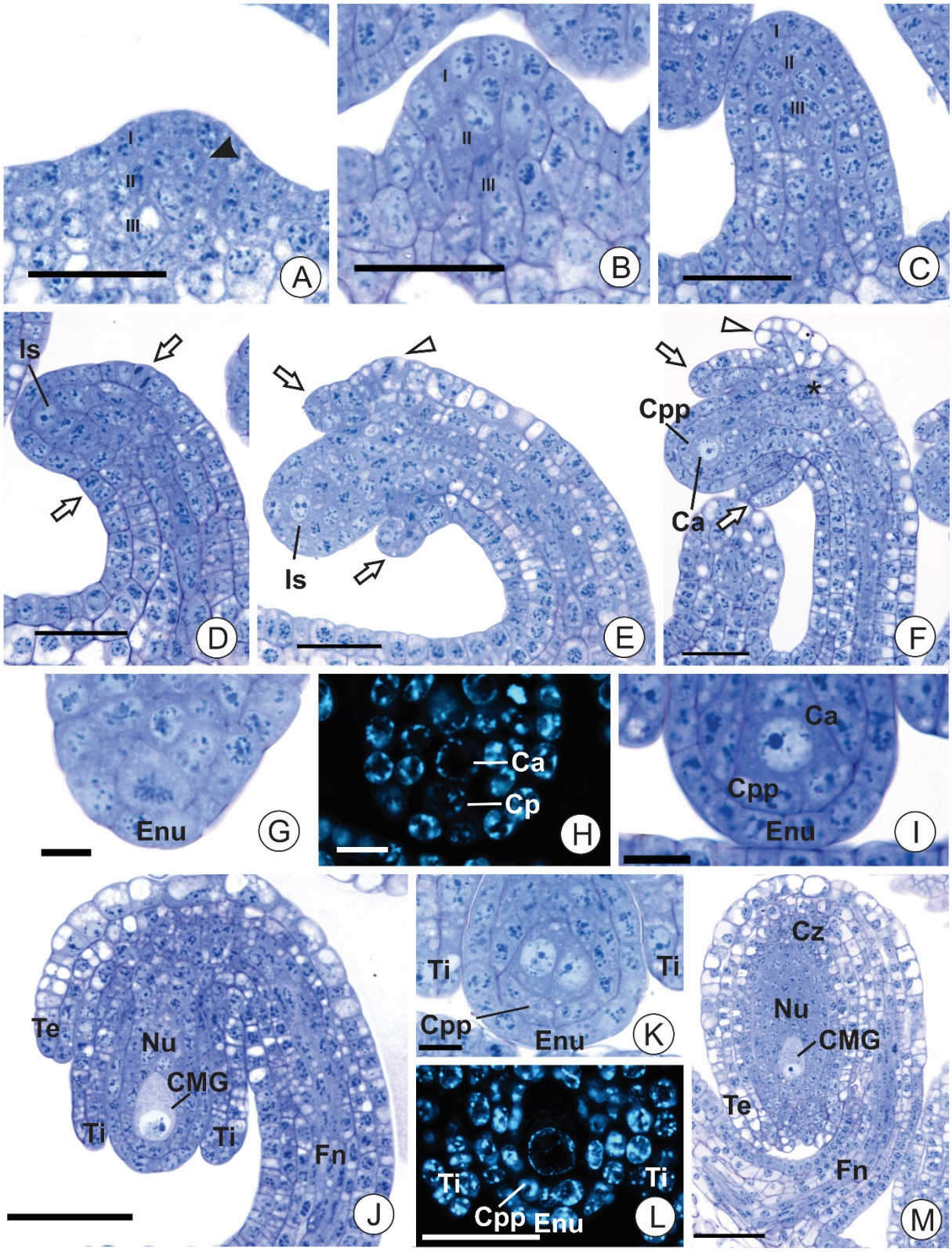

I
II
III
A
B
C
Is
D
E
Cpp
*
Ca
F
Enu
G
Ca
Cp
H
Ca
Cpp
Enu
I
Te
Nu
CMG
Ti
Ti
Fn
J
Ti
Ti
Cpp
Enu
K
Ti
Ti
Cpp Enu
L
Cz
Nu
CMG
Te
Fn
M

Figura 1. Secções longitudinais e transversais do primórdio ovular de *Nymphaea amazonum* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Primórdio ovular logo após sua emergência da placenta, evidenciando células subepidérmicas com citoplasma mais denso que as adjacentes (ponta de seta preta). (B) Proliferação celular zona III. (C) Primórdio ovular trizonado. (D) Inicial subepidérmica diferenciada, observa-se também o início da diferenciação do grupo de células epidérmicas que darão origem ao tegumento interno (setas brancas). (E) Progresso na aquisição da curvatura anátropa e início do desenvolvimento do tegumento interno (ponta de seta branca). (F) Progressão no desenvolvimento do tegumento externo e interno, observar divisões periclinais na zona II (asterisco) que contribuirá para o desenvolvimento do tegumento externo. (G) Metáfase mitótica de uma célula inicial subepidérmica. (H) Célula arquespórica e célula parietal após mitose (I) Detalhe do nucelo, célula parietal primária a partir de divisões anticlinais origina a camada parietal. (J) Aspecto de um primórdio ovular logo após a diferenciação da célula-mãe dos ginósporos a partir da célula arquespórica. (K) Óvulo com duas células-mãe dos ginósporos. (L) Célula-mãe dos ginósporos, atentar para as organelas com marcação positiva para DNA. (M) Primórdio ovular endostômico, assim que a micrópila é formada. Colorações: A-G, I-K e M – azul de toluidina O; H e L – DAPI. Escala: A-F e L – 30 μm; G-I e K – 10 μm; J e M– 50 μm. Ca – célula arquespórica, Cp – célula parietal, Cpp – camada parietal, CMG – célula-mãe dos ginósporos, Cz – calaza, Enu – epiderme nucelar, Fn – funículo, Is – iniciais subdepidérmicas, Mi – micrópila, Nu – nucelo, Te – tegumento externo, Ti – tegumento interno.

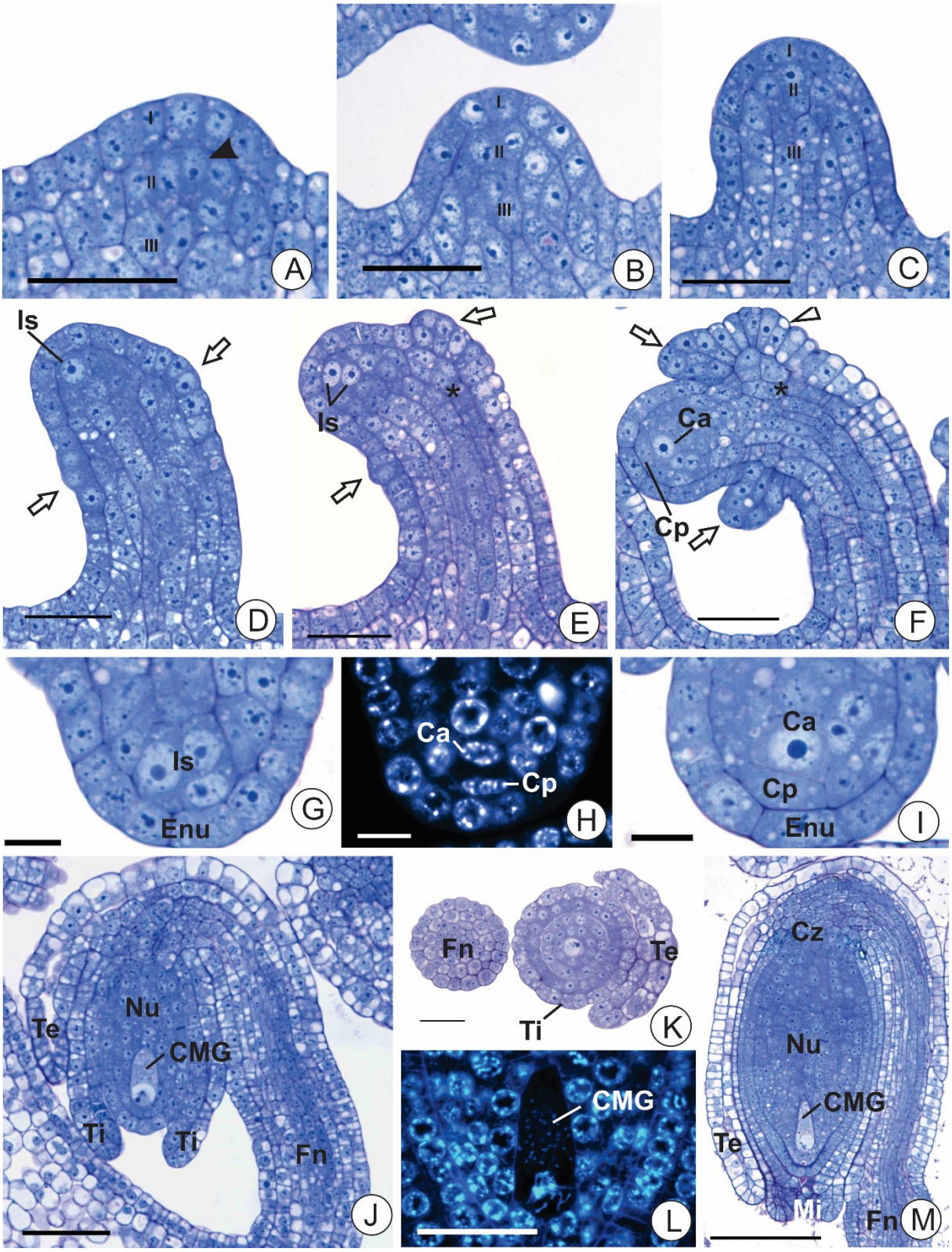

I
II
III
A
B
C
Is
Is
*
Ca
Cp
D
E
F
Is
Enu
G
Ca
Cp
H
Ca
Cp
Enu
I
Nu
Te
CMG
Ti
Ti
Fn
J
Fn
Te
Ti
K
CMG
L
Cz
Nu
CMG
Te
Mi
Fn
M

Figura 2. Secções longitudinais e transversais do primórdio ovular de *Nymphaea caerulea* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Primórdio ovular logo após sua emergência da placenta, evidenciando células subepidérmicas com citoplasma mais denso que as adjacentes (ponta de seta preta). (B) Proliferação celular da zona III. (C) Primórdio ovular trizonado. (D) Inicial subepidérmica diferenciado, observa-se também o início da diferenciação do grupo de células epidérmicas que darão origem ao tegumento interno (setas brancas). (E) Primórdio ovular com duas iniciais subepidérmicas, observar divisões periclinais na zona II (asterisco) que contribuirá para o desenvolvimento do tegumento externo. (F) Formação da camada parietal a partir da célula parietal e início do desenvolvimento do tegumento interno (ponta de seta branca), proliferação da zona II prossegue. (G) Detalhe de um primórdio ovular com três iniciais subepidérmicas. (H) Célula arquespórica e célula parietal em um estádio imediatamente posterior a cariocinese. (I) Detalhe do nucelo da figura F. (J) Aspecto de um primórdio ovular logo após a diferenciação da célula-mãe dos ginósporos a partir da célula arquespórica. (K) Secção transversal de um primórdio ovular no mesmo estádio da figura J. (L) Célula-mãe dos ginósporos em prófase I, atentar para as organelas com marcação positiva para DNA. (M) Primórdio ovular endostômico, assim que a micrópila é formada. Colorações: A-G, I-K e M – azul de toluidina O; H e L – DAPI. Escala: A-F, K e L – 30 μm; G-I – 10 μm; J – 50 μm; M – 100 μm. Ca – célula arquespórica, Cp – célula parietal, Cpp – camada parietal, CMG – célula-mãe dos ginósporos, Cz – calaza, Enu – epiderme nucelar, Fn – funículo, Is – iniciais subdepidérmicas, Mi – micrópila, Nu – nucelo, Te – tegumento externo, Ti – tegumento interno.

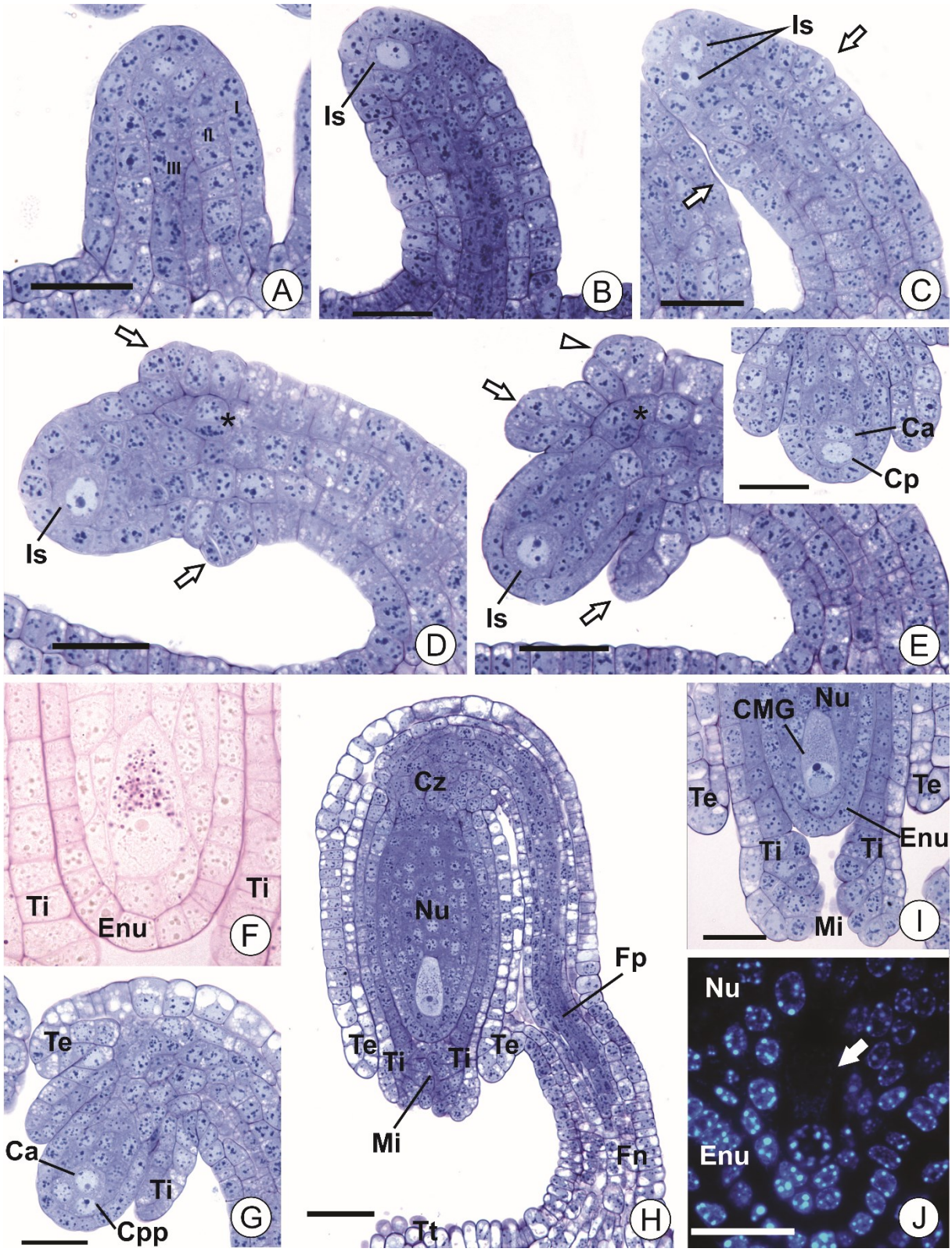

I
II
III
A
Is
B
Is
C
*
Is
D
*
Is
E
Ca
Cp
Ti
Ti
Enu
F
Cz
Nu
Fp
Te
Ti
Ti
Te
Mi
Fn
Tt
H
CMG
Nu
Te
Te
Ti
Ti
Enu
Mi
I
Te
Ca
Ti
Cpp
G
Nu
Enu
J

Figura 3. Secções longitudinais e transversais do primórdio ovular de *Nymphaea lotus* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Primórdio ovular trizonado. (B-C) Inicial(is) subepidérmica(s) diferenciada(s), observa-se também o início da diferenciação do grupo de células epidérmicas que darão origem ao tegumento interno (C – setas brancas). (D) Progresso na aquisição da curvatura anátropa e desenvolvimento do tegumento interno. (E) Início do desenvolvimento do tegumento interno (ponta de seta branca) com divisões periclinais na zona II (asterisco), na inserção superior direita é possível observar a célula arquespórica e célula parietal após mitose. (F) Distribuição de amiloplastos no citoplasma da célula-mãe dos ginósporos. (G) Detalhe do nucelo, célula parietal primária a partir de divisões anticlinais origina a camada parietal. (H) Aspecto de um primórdio ovular logo após a diferenciação da célula-mãe dos ginósporos a partir da célula arquespórica, notar micrópila endostômica. (I-J) Célula-mãe dos ginósporos em dois estádios de desenvolvimento consecutivos, atentar para as organelas com marcação positiva para DNA (J), notar zona citoplasmática densa sem marcação para DNA (seta branca). Colorações: A-E, G-I e inserção E – azul de toluidina O; J – DAPI; F-PAS. Escala: A-G, I-J e inserção E – 30 μm; H– 50 μm. Ca – célula arquespórica, Cp – célula parietal, Cpp – camada parietal, CMG – célula-mãe dos ginósporos, Cz – calaza, Enu – epiderme nucelar, Fn – funículo, Fp – feixe procambial, Is – iniciais subdepidérmicas, Mi – micrópila, Nu – nucelo, Te – tegumento externo, Ti – tegumento interno.

e se diferencia em células-mãe dos ginósporos (CMG), ao passo que a célula parietal inicial origina, por divisões anticlinais, novas células que são acrescidas à camada parietal (fig. 1I-K; 2F, H-J, inserção 3E, F-I). Ocasionalmente foram observados primórdios ovulares em *N. amazonum* que apresentaram duas células arquespóricas (fig. 1K). As células do feixe provascular continuam a se diferenciar durante o desenvolvimento dos tegumentos (fig. 1E-F, J, M, 2E-F, J, M, 3H). A partir do momento em que os tegumentos emergem, as células nucelares experimentam uma expressiva proliferação celular (fig. 1E-J, 2E-J, 3E-G). Durante o estádio de CMG tardio, o nucelo já corresponde ao mais amplo dos tecidos ovulares, suas células são poligonais e possuem citoplasma denso, núcleos centrais com um pequeno nucléolo e várias regiões heterocromáticas dispersas pelo nucleoplasma (fig. 1M, 2M, 3H, 4A, 5A, 6A).

Em todas as espécies, a CMG, após expandir-se e alongar-se longitudinalmente, torna-se claviforme, com a porção mais alargada no domínio micropilar (fig. 1J, M; 2J, L-M, 3F, H-J). Nesse estádio, além da CMG apresentar densidade citoplasmática inferior, seu núcleo se torna 3-5 vezes mais volumoso que o das células nucelares em seu entorno. Ao entrar em prófase I da meiose, o núcleo posiciona-se no domínio micropilar e, neste momento o tegumento interno atinge o topo do nucelo originando uma micrópila endostômica (fig. 1J, L, M, 2J, L-M, 3H-I). *Nymphaea caerulea* porta um vacúolo nuclear com um conteúdo corado de magenta pelo azul de toluidina (fig. inserção superior direita 5A). Em *N. amazonum* também foi observado um vacúolo nuclear; contudo, seu conteúdo não apresentou coloração (fig. 4A). Pequenos vacúolos dispersos pelo citoplasma de *N. caerulea* exibem um conteúdo granular que também se cora de magenta, assim como o conteúdo vacuolar de muitas das células nucelares e tegumentares (fig. 5A). Em todas as espécies, o citoplasma da CMG apresenta um grande número de pequenas organelas esféricas que se coram de azul escuro pelo azul de toluidina, possuem DNA (fig. 2L, 3J, inserção 4A) e são PAS-positivas (fig. 5A, 6A). *Nymphaea amazonum* também apresenta estas organelas, embora sejam mais alongadas (fig. 4A, B, E) do que aquelas encontradas em *N. caerulea* e *N. lotus* (fig. 5A, E, 6A-B).

No mesmo estádio, origina-se uma zona citoplasmática densa (ZCD) na porção calazal da CMG em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* a qual é tenuemente positiva para o DAPI, é envolvida por platídios com conteúdo de DNA e se cora de azul claro pelo azul de toluidina (fig. 3J, 4A, 5A, 6A-B). Em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus*, neste estádio, já existe mais de uma camada parietal nucelar entre a CMG e a epiderme nucelar (fig. 3J, 4A, 5A, 6A-B). A primeira divisão meiótica é assimétrica e perpendicular ao eixo da CMG, seguida da deposição de calose na parede transversal (fig. 4B-D, 5B-D, 6C-D). A célula calazal da díade apresenta um formato aproximadamente cônico a hemisferóide prolato e, herda a maior parte da ZCD, mantendo a mesma polarização protoplasmática da CMG; a célula micropilar é

aproximadamente hemisférica e entra em apoptose nos estádios subsequentes (fig. 4B-C, 5B-C, 6C).

A segunda divisão meiótica ocorre apenas na célula calazal da díade, sendo também assimétrica e transversal, com a nova parede recebendo deposição de calose (fig. 4E-F, 5E-F, 6E-F). O ginósporo contíguo à célula micropilar da díade apresenta formato discoide, ao passo que o ginósporo calazal mantém o mesmo formado da célula calazal da díade e novamente herda a maior parte da ZCD em todas as espécies (fig. 4E, 5E, 6F); porém o ginósporo calazal apresenta protoplasma claramente polarizado em *N. caerulea* e *N. lotus* (fig. 5E, 6F) e menos polarizado em *N. amazonum*, ocorrendo nesta uma redistriduição da ZCD no citoplasma (fig. 4E). *Nymphaea amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* iniciam, neste estádio, o processo de vacuolação do ginósporo calazal (fig. 4E, 5E, 6F). Somente o ginósporo calazal é funcional e, tal como a célula micropilar da díade, o ginósporo posicionado entre as duas primeiras degenera-se.

Em todas as espécies, o aumento do número de camadas parietais entre a epiderme nucelar e a porção micropilar da CMG/célula micropilar da díade faz com que o nucelo nesta região se torne saliente, projetando-se em direção à micrópila (fig. 2M, 4A-B, 6A-C). As células da epiderme nucelar iniciam um processo de diferenciação que as tornam anticlinalmente alongadas, apresentando citoplasma denso, com pequenos vacúolos e núcleo central (fig. 2M, 4B, E, 5A-B, E, 6A-C). A parede periclinal interna destas células e parte das paredes anticlinais tornam-se espessadas e se coram intensamente de roxo pelo azul de toluidina O, são PAS-positivas e, em *N. amazonum* e *N. lotus* se coram, em maior ou menor intensidade, pelo azul de anilina (fig.4C-F, 5A-B, 6D, F, G-H). Em *N. caerulea*, as paredes anticlinais internas das células da epiderme nucelar, quando coradas com azul de anilina emitem uma fluorescência azulada (fig. 5D, F). Embora os eventos de diferenciação da epiderme nucelar sejam mais ou menos concomitantes ao aumento do número de camadas parietais, ambos acontecem mais cedo em *N. caerulea*, pois são claramente visíveis nesta espécie antes da primeira divisão da meiose (fig. 2M), ao passo que se tornam discerníveis somente a partir do estádio de díade em *N. amazonum* e *N. lotus* (fig. 4B, 6C-D), ficando evidentes apenas durante as etapas iniciais da ginogametogênese (fig. 4H-I, 6G-I).

Ginogametogênese

O ginósporo funcional aumenta em volume e comprimento, e em seu citoplasma os vacúolos se expandem e confluem, fenômenos que marcam a transição do ginósporo funcional para ginófito uninucleado (fig. 4H; 5H, 6G, I). A expansão do ginófito uninucleado é

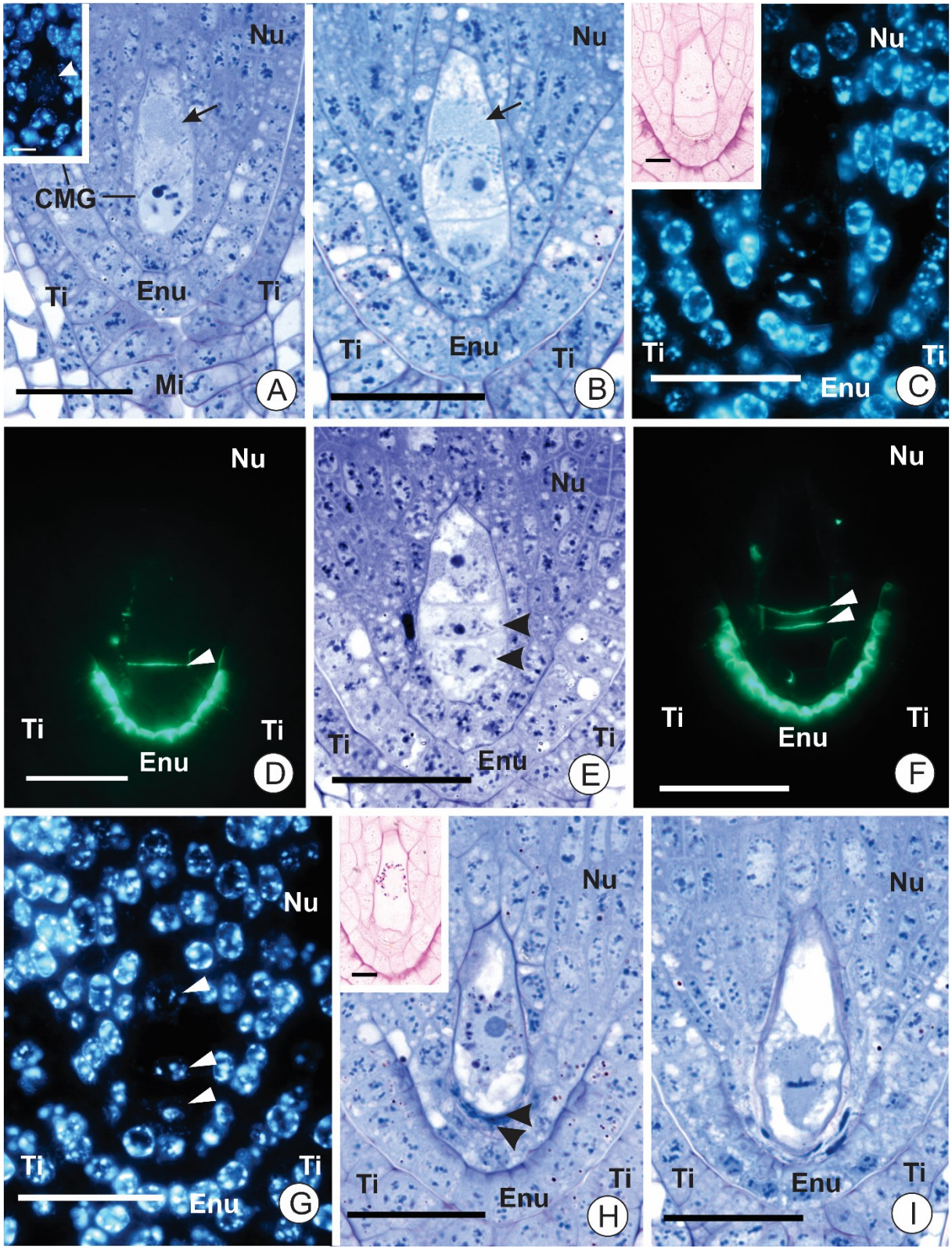

Nu
CMG
Ti
Enu
Ti
Mi
A
Nu
Ti
Enu
Ti
B
Nu
Ti
Ti
Enu
C
Nu
Ti
Ti
Enu
D
Nu
Ti
Enu
Ti
E
Nu
Ti
Ti
Enu
F
Nu
Ti
Ti
Enu
G
Nu
Ti
Enu
Ti
H
Nu
Ti
Enu
Ti
I

Figura 4. Secções longitudinais do primórdio ovular de *Nymphaea amazonum* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Célula-mãe dos ginósporos evidenciando zona citoplasmática densa (seta preta), a partir deste estádio já é possível observar a especialização da epiderme nucelar, inserção superior esquerda indica (ponta de seta branca) dispersão de organelas com conteúdo de DNA. (B) Díade com célula calazal apresentando as mesmas características morfológicas da célula-mãe dos ginósporos. (C) Mesmo estádio da figura anterior demonstrando organelas com conteúdo de DNA, inserção superior esquerda demonstra que tais organelas são PAS-positivas. (D) Parede de calose depositada entre as duas células da díade (ponta de seta branca), paredes tangenciais internas e parte das paredes radias das células da epiderme nucelar são intensamente positivas para calose. (E) Tríade linear formada pelo ginósporo funcional, ginósporo micropilar e célula micropilar da díade. (F) Paredes de calose delgadas entre o ginósporo funcional e o ginósporo micropilar e entre esta última e a célula micropilar da díade, paredes tangenciais internas e parte das paredes radias das células da epiderme nucelar continuam positivas para calose. (G) Ginósporo funcional não apresenta mais zona citoplasmática densa, sendo observáveis apenas organelas com conteúdo de DNA dispersas pelo citoplasma. (H) Diferenciação ginófito uninucleado apresentando polarização do vacuoma, resquícios do ginósporo micropilar e célula micropilar da díade (pontas de seta preta), inserção superior esquerda evidencia a marcação PAS-positiva das organelas presentes ao redor do núcleo. (I) Primeiro ciclo mitótico com placa metáfasica (seta preta) perperdicular ao eixo do ginófito. Colorações: D e F – azul de anilina; A, B, E, H e I – azul de toluidina O; inserção A, C e G – DAPI; inserção A e H - PAS. Escala: inserções A, C e H – 10 μm; A-I – 30 μm. CMG – célula-mãe dos ginósporos, Enu – epiderme nucelar, Mi – micrópila, Nu – nucelo, Ti – tegumento interno.

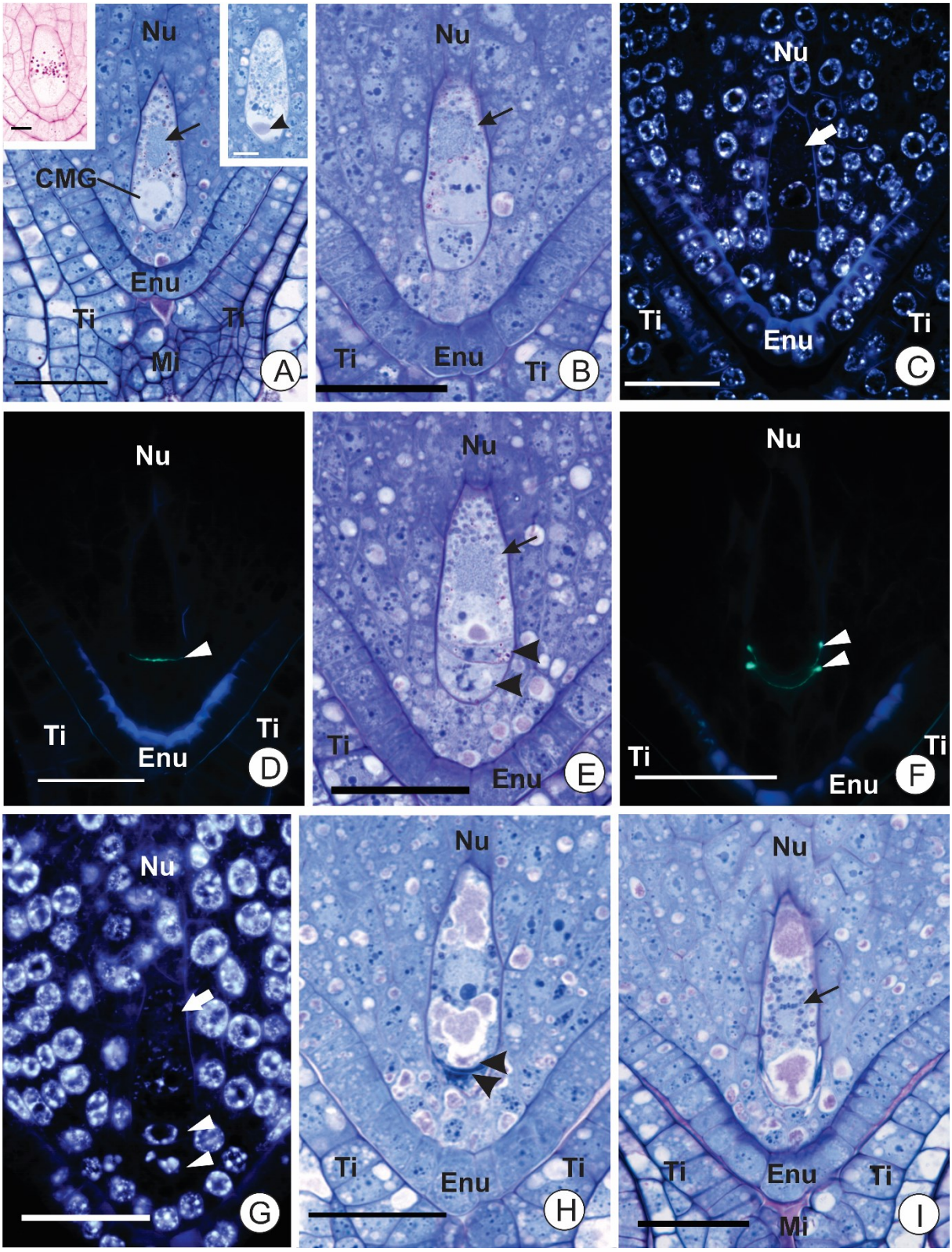

Nu
CMG
Enu
Ti
Ti
Mi
A
Nu
Ti
Enu
Ti
B
Nu
Ti
Enu
Ti
C
Nu
Ti
Enu
D
Nu
Ti
Enu
E
Nu
Ti
Enu
F
Nu
Ti
Enu
G
Nu
Ti
Enu
Ti
H
Nu
Ti
Enu
Ti
Mi
I

Figura 5. Secções longitudinais do primórdio ovular de *Nymphaea caerulea* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Célula-mãe dos ginósporos evidenciando zona citoplasmática densa (seta preta), a partir deste estádio já é possível observar a especialização da epiderme nucelar, inserção superior esquerda mostra que organelas com conteúdo de DNA são PAS-positivas e inserção superior direita indica vacúolo nuclear. (B) Díade com célula calazal apresentando as mesmas características morfológicas da célula-mãe dos ginósporos. (C) Mesmo estádio da figura anterior demonstrando zona citoplasmática densa sem marcação para DNA (seta branca) e organelas com conteúdo de DNA dispersas pelo citoplasma. (D) Parede de calose depositada entre as duas células da díade (ponta de seta branca). (E) Tríade linear formada pelo ginósporo funcional, ginósporo micropilar e célula micropilar da díade, estes dois últimos com núcleos picnóticos (apoptose). (F) Na porção micropilar é possível identificar paredes de calose delgadas entre ginósporo funcional e o ginósporo micropilar e entre este último e a célula micropilar da díade, nas paredes laterais em ambos os lados (pontas de seta brancas) é possível identificar bandas espessadas de calose que marcam a posição inicial das paredes. (G) Célula-mãe do ginófito com zona citoplasmática densa (seta branca) e organelas com conteúdo de DNA dispersas pelo citoplasma. (H) Diferenciação do ginófito uninucleado apresentando polarização do vacuoma, resquícios do ginósporo micropilar e célula micropilar da díade (pontas de seta preta). (I) Primeiro ciclo mitótico com placa metáfasica (seta preta) perperdicular ao eixo do ginófito. Colorações: D e F – azul de anilina; A, inserção superior direita em A, B, E, H e I – azul de toluidina O; C e G – DAPI; inserção superior esquerda A – PAS. Escala: inserções em A – 10 μm; A-I – 30 μm. CMG – célula-mãe dos ginósporos, Enu – epiderme nucelar, Mi – micrópila, Nu – nucelo, Ti – tegumento interno.

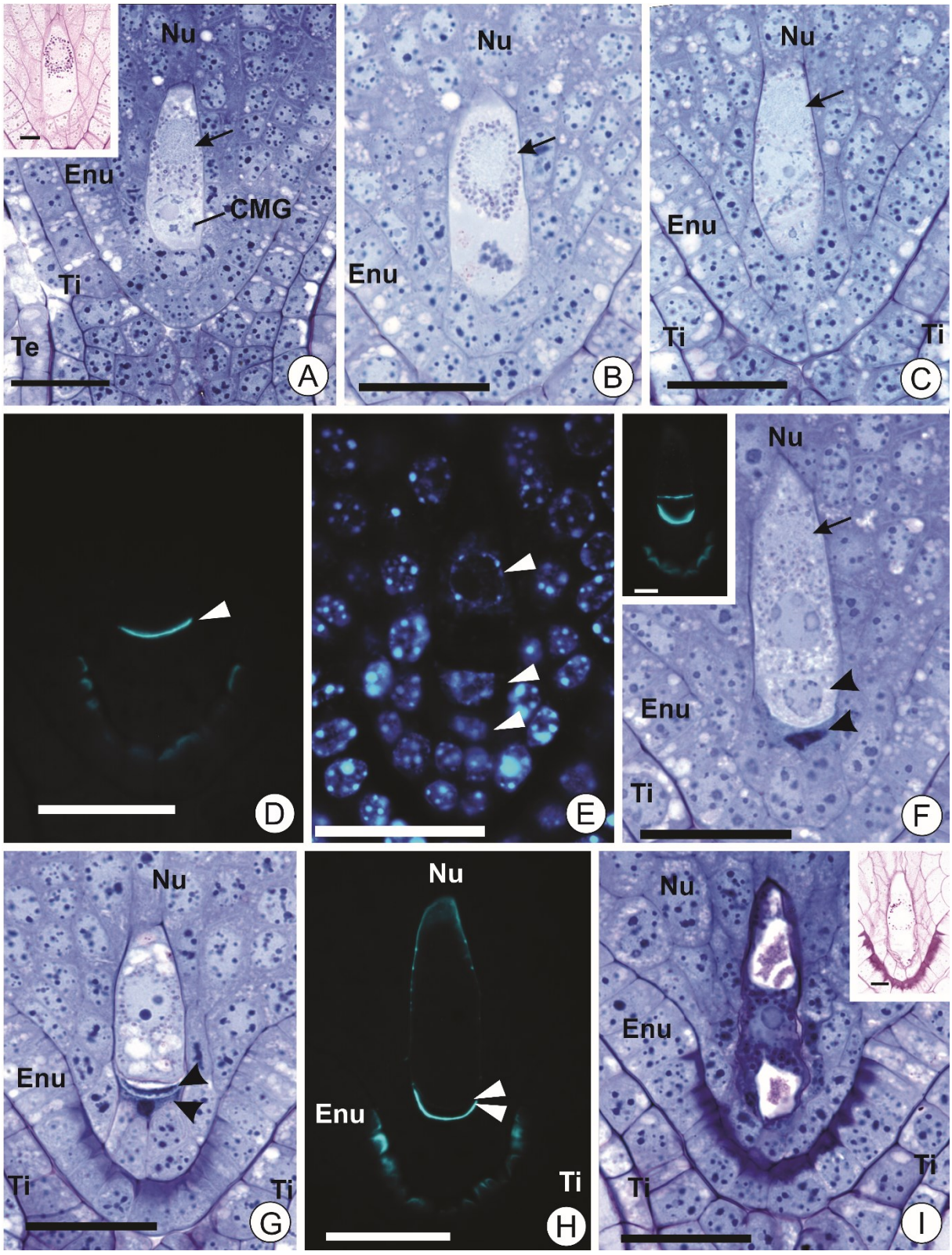

Nu
Enu
CMG
Ti
Te
A
Nu
Enu
B
Nu
Enu
Ti
Ti
C
D
E
Nu
Enu
Ti
F
Nu
Enu
Ti
Ti
G
Nu
Enu
Ti
H
Nu
Enu
Ti
Ti
I

Figura 6. Secções longitudinais do primórdio ovular de *Nymphaea lotus* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Célula-mãe dos ginósporos evidenciando zona citoplasmática densa (seta preta), a partir deste estádio já é possível observar a especialização da epiderme nucelar, inserção superior esquerda mostra que organelas com conteúdo de DNA são PAS-positivas. (B) Metáfase meiótica da célula-mãe dos ginósporos. (C) Díade com célula calazal apresentando as mesmas características morfológicas da célula-mãe dos ginósporos. (D) Parede de calose depositada entre as duas células da díade (ponta de seta branca). (E) Tríade linear formada pelo ginósporo funcional, ginósporo micropilar e célula micropilar da díade, estes dois últimos com núcleos picnóticos (apoptose). (F) Tríade lineras, inserção superior esquerda evidencia deposição de calose na entre o ginósporo funcional e o ginósporo micropilar e entre este último e a célula micropilar da díade (pontas de seta brancas), também há deposição de calose nas paredes periclinais internas e parte das anticlinais das células da porção micropilar da epiderme nucelar. (G) Diferenciação do ginófito uninucleado apresentando polarização do vacuoma, resquícios do ginósporo micropilar e célula micropilar da díade (pontas de seta preta). (H) Paredes de calose na porção micropilar do são estiradas devido ao crescimento do ginófito uninucleado. (I) Ginófito uninucleado em estádio posterior, no qual os vacúolos coalescem em dois vacúolos, um em cada domínio da célula. Amiloplastos estão presentes no citoplasma perinuclear, como pode ser observado na inserção superior direita. Colorações: D, inserção superior esquerda F e H – azul de anilina; A-C, F, G e I – azul de toluidina O; E – DAPI; Inserção superior esquerda A e inserção superior direita I – PAS. Escala: inserções A, F e I – 10 μm; A-I – 30 μm. CMG – célula-mãe dos ginósporos, Enu – epiderme nucelar, Nu – nucelo, Ti – tegumento interno.

concomitante à degeneração e colapso tanto do ginósporo não funcional como da célula micropilar da díade, ambos sendo comprimidos contra as camadas parietais da região micropilar do nucelo. Durante o processo degenerativo, o ginósporo não funcional e a célula micropilar da díade exibem sinais de apoptose, como coagulação citoplasmática, plasmólise e picnose nuclear (fig. 4G; 5E, G, 6E-F). O ginófito assume formato claviforme, com o domínio micropilar mais alargado que o calazal, e seu vacuoma se torna bipolar, com conteúdo que se cora de magenta pelo azul de toluidina. Seu núcleo, centralmente posicionado, torna-se 2-3 vezes mais volumoso do que o de células somáticas adjacentes e exibe um nucléolo conspícuo, apresentando diminutos vacúolos nucleolares (fig. 4H, 5H, 6I). A ZCD não é mais observada a partir deste estádio, embora os plastídeos persistam até o estádio de ginófito binucleado (fig. 7A, 8A, 9B-C).

Na primeira cariocinese da formação do saco embrionário, a placa metafásica se orienta perpendicularmente ao maior eixo da célula (fig. 4I, 5I). Neste estádio, as células das camadas parietais que contornam o domínio micropilar do ginófito degeneram-se e sofrem colapso em *N. amazonum* e *N. lotus* (fig. 4I), mas permanecem intactas em *N. caerulea* (fig. 5I). Os dois núcleos derivados permanecem próximos um do outro e migram em direção ao domínio micropilar do ginófito onde se concentra a maior parte do citossol, ao passo que o vacuoma se expande ainda mais (fig. 7A-B, 8A, 9B-C) e, em *N. amazonum* e *N. lotus*, perde a configuração bipolar (fig. 7B, 9C). Ao mesmo tempo, o domínio micropilar do ginófito expande-se lateralmente, invadindo a região previamente ocupada por células parietais (fig. 7A-B, 9B-C). Em todas as espécies, plastídios DAPI-positivos, que já estavam presentes na CMG, são visualizados até o estádio binucleado do ginófito situando-se no citoplasma perinuclear, ou até mesmo durante o segundo ciclo mitótico em *N. lotus* (fig. 4H, 5H-I, 6G, I, 7A, 8A, 9B-D). Tais plastídios agora são maiores que nos estádios precedentes, têm formato esférico, coram-se de azul escuro pelo azul de toluidina e são PAS-positivos.

A segunda e última cariocinese do saco embrionário é um fenômeno rápido e, a despeito das centenas de óvulos analisados em consecutivos estádios de desenvolvimentos, não foi possível observar diretamente o arranjo das placas metafásicas em *N. amazonum* e *N. caerulea.* Embora em *N. lotus*, as placas metafásicas tenham se posicionado em planos perpendiculares entre si (fig. 9D). No estádio de ginófito sincicial tetranucleado em *N. caerulea*, os quatro núcleos situam-se lateralmente no domínio micropilar do ginófito, próximos às paredes diferenciadas da epiderme nucelar, e os conspícuos plastídios observados em estádios precedentes não são mais verificados (fig. 8B-C).

Em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* o domínio calazal do ginófito se expande atingindo volume superior ao do domínio micropilar, ocupando o espaço previamente

preenchido pelas células nucelares adjacentes ao ginófito (fig. 7J, 8G, 9F), neste momento o nucelo atinge suas maiores dimensões (fig. 7C-D, 8D, F, 9E). Após a migração de um dos núcleos em direção ao domínio calazal do ginófito e a celularização do aparelho oosférico (fig. 7J, 8E-I, 9F-H), o ginófito então passa a apresentar um formato de ampulheta, devido a presença de uma porção mediana estreitada em *N. caerulea* (fig. 8F-G, H-I, 11A, E), sendo que esta porção é bem mais discreta em *N. amazonum* e *N. lotus* (fig. 7H-J, 9F-H, 10A, E 12A, E).

O domínio calazal do ginófito de *N. amazonum* possui formato menos regular que o domínio micropilar (fig. 7C, J, 10A, E), ao passo que o ginófito de *N. lotus* apresenta domínios bem mais simétricos que as outras duas espécies (fig. 9F-H, 12A, E), uma vez que o domínio calazal do ginófito é bem mais amplo que o micropilar em *N. caerulea* e *N. lotus* (fig. 8F-G, H-I, 9F-H, 11A, E, 12A, E). Ao final da ginogametogênese das três espécies analisadas, as células nucelares exibem formato poliédrico com núcleos centrais e citoplasma denso. No nucelo de *N. amazonum* ocorre vacuolação mais pronunciada nas células das camadas mais periféricas, enquanto as mais internas permanecem menos vacuoladas (fig. 7C-D). Em *N. caerulea* há um gradiente de vacuolação de células nucelares do polo calazal para o micropilar (fig. 8F), enquanto em *N. lotus* não há um padrão, com todas as células nucelares apresentando diminutos vacúolos dispersos pelo citoplasma (fig. 9E).

Para todas as espécies, o núcleo da célula central permanece na região mediana e mais estreita do ginófito, ou próximo a ela (fig. 7H-J, 8 G-I, 9F-H, 10A, E, 11A, E, 12A, E). Depois da citocinese, o ginófito maduro exibe uma ampla célula central ocupada por um grande vacúolo (fig. 7J, 8G, 9F, 10A, E, 11A, E, 12A, E). As células do aparelho oosférico apresentam formato aproximadamente piramidal (fig. 10B-D, 11B-D, 12 B-D) com a oosfera interposta às sinérgides em *N. amazonum* e *N. caerulea* (fig. 10B-D; 11B-D), mas não em *N. lotus* (fig. 12B-D). Em *N. amazonum* todas as células do aparelho oosférico possuem um vacuoma bipolar (fig. 10B-D), enquanto em *N. caerulea* e *N. lotus*, apenas a oosfera exibe esta organização do vacuoma, sendo que um único vacúolo está presente na porção calazal de cada uma das sinérgides (fig. 11B-D, 12 B-D).

Dentre todos os óvulos de *N. amazonum* analisados, dois deles apresentaram ginófitos com organização anômala de sua estrutura. Um deles apresentou ginófito com quatro núcleos e três células, sendo a célula central binucleada e o aparelho oosférico composto de uma única sinérgide e a oosfera (fig. 7E). O outro óvulo apresentou ginófito com aparelho oosférico normal, porém com célula central binucleada (fig. 7F-G).

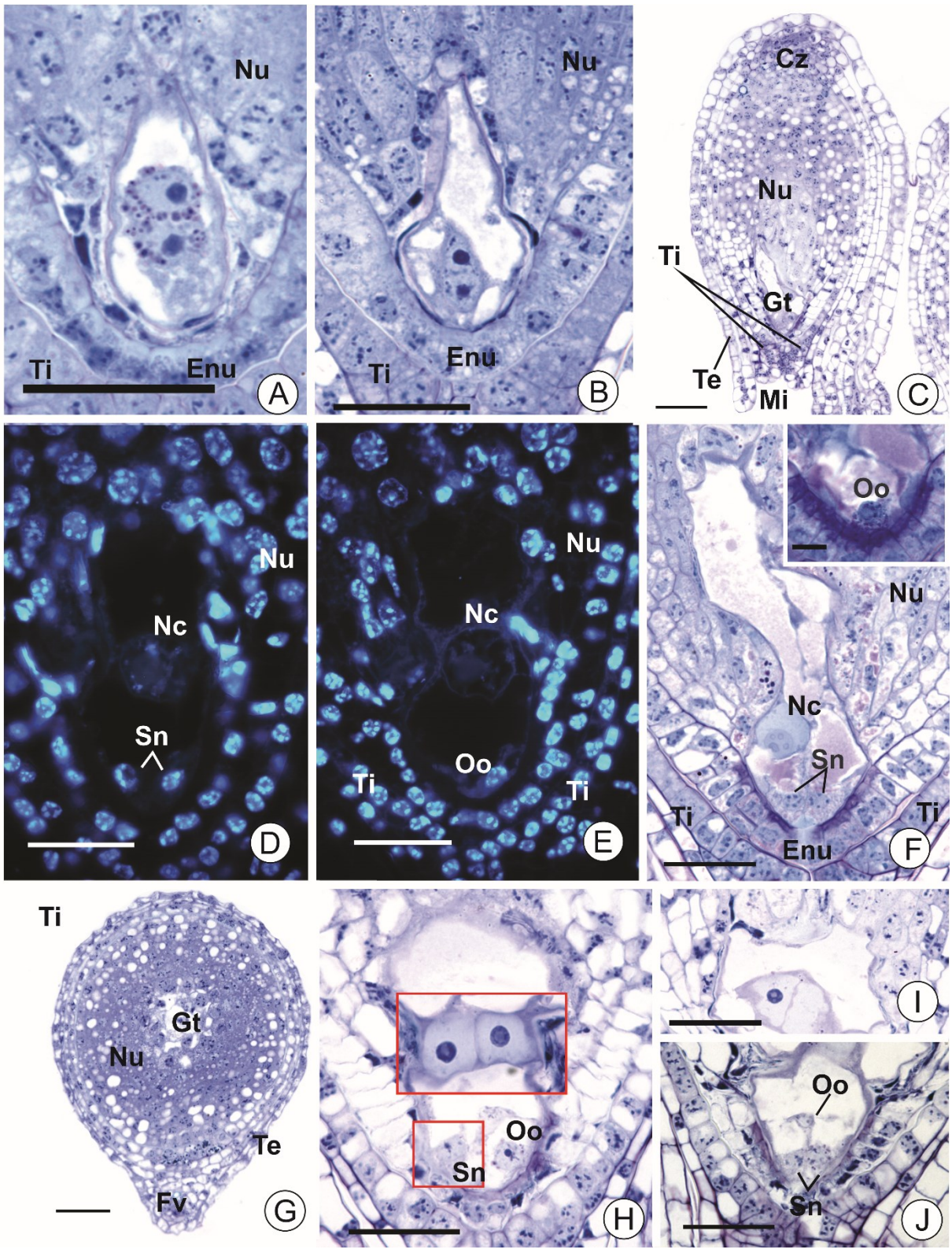

Nu
Ti
Enu
A
Nu
Ti
Enu
B
Cz
Nu
Ti
Gt
Te
Mi
C
Nu
Nc
Sn
D
Nu
Nc
Oo
Ti
Ti
E
Oo
Nu
Nc
Sn
Ti
Ti
Enu
F
Ti
Gt
Nu
Te
Fv
G
Oo
Sn
H
I
Oo
Sn
J

Figura 7. Secções longitudinais e transversais do primórdio ovular e óvulo maduro de *Nymphaea amazonum*. (A-B) Ginófito binucleado, observar polarização do vacuoma e migração dos núcleos acompanhado de expansão do domínio micropilar do ginófito. (C). Óvulo maduro em corte longitudinal paralelo ao plano da rafe. (D- E) Secções subsequentes do ginófito maduro, notar fluorescência menos intensa das células do ginófito (n) em relação ao nucelo (2n). (F) Ginófito maduro normal, inserção superior esquerda consiste em secção subsequente que exibe a oosfera. (G). Óvulo maduro em corte transversal (H-J) Ginófito maduro anômalos, observar: (H) célula central com dois núcleos e ausência de uma das sinérgides, (I-J) secções sucessivas de um óvulo com 5 núcleos, apresentando um aparelho oosférico normal e 2 núcleos polares. Coloração: A-C e F-J – azul de toluidina O; D e E – DAPI. Escala: Inserção F – 10 μm; A-B, D-F e H-J – 30 μm; C e G – 50 μm. Cz – calaza, Enu – epiderme nucelar, Fv – feixe vascular, Gt – ginófito, Mi – micrópila, Nc – núcleo da célula central, Nu – nucelo, Oo – oosfera, Sn – sinérgides, Te – tegumento externo, Ti – tegumento interno.

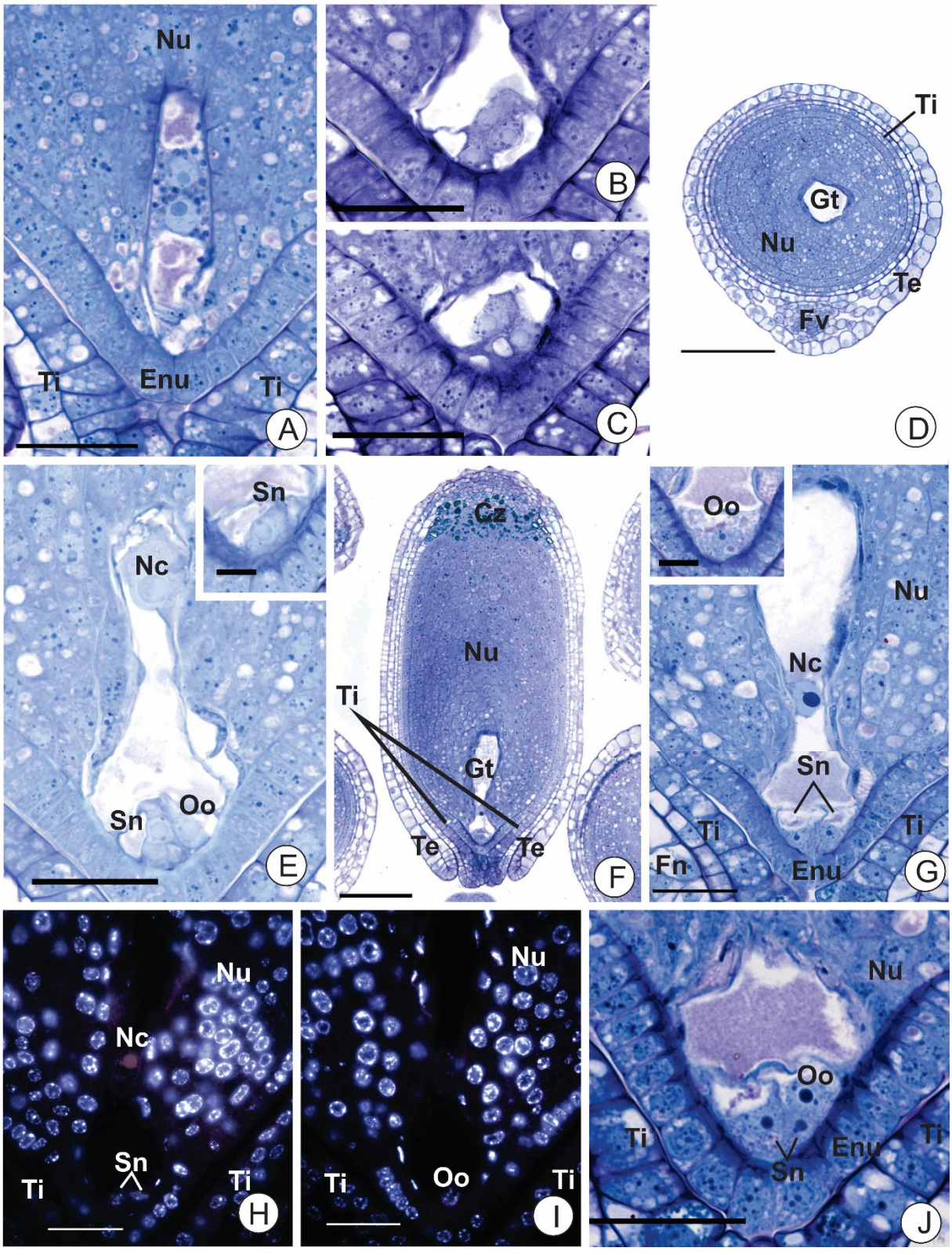

Nu
Ti
Enu
Ti
A
B
C
Ti
Gt
Nu
Te
Fv
D
Sn
Nc
Sn
Oo
E
Cz
Nu
Ti
Gt
Te
Te
F
Oo
Nu
Nc
Sn
Ti
Ti
Fn
Enu
G
Nu
Nc
Ti
Sn
Ti
H
Nu
Ti
Oo
Ti
I
Nu
Oo
Ti
Sn
Enu
Ti
J

Figura 8. Secções longitudinais, transversais e oblíquas do primórdio ovular e óvulo maduro de *Nymphaea caerulea*. (A) Ginófito binucleado, observar polarização do vacuoma. (B-C) Secções sucessivas do ginófito sincicial com 4 núcleos (D). Óvulo maduro em corte transversal. (E) Migração do núcleo polar que precede a expansão do domínio calazal no ginófito imaturo. (F) Óvulo maduro em corte longitudinal perpendicular ao plano da rafe, atentar para o formato de ampulheta do ginófito. (G) Ginófito maduro, inserção superior esquerda consiste em secção subsequente que exibe a oosfera. (H e I) Secções subsequentes do ginófito maduro, notar fluorescência menos intensa das células do ginófito (n) em relação ao nucelo (2n). (J) Secção oblíqua do ginófito evidenciando todas as células do aparelho oosférico. Coloração: A-G e J – azul de toluidina O; H e I – DAPI. Escala: A-C, E, G-J – 30 μm; D e F – 100 μm. Cz – calaza, Enu – epiderme nucelar, Fn – funículo, Fv – feixe vascular, Gt – ginófito, Mi – micrópila, Nc – núcleo da célula central, Nu – nucelo, Oo – oosfera, Sn – sinérgides, Te – tegumento externo, Ti – tegumento interno.

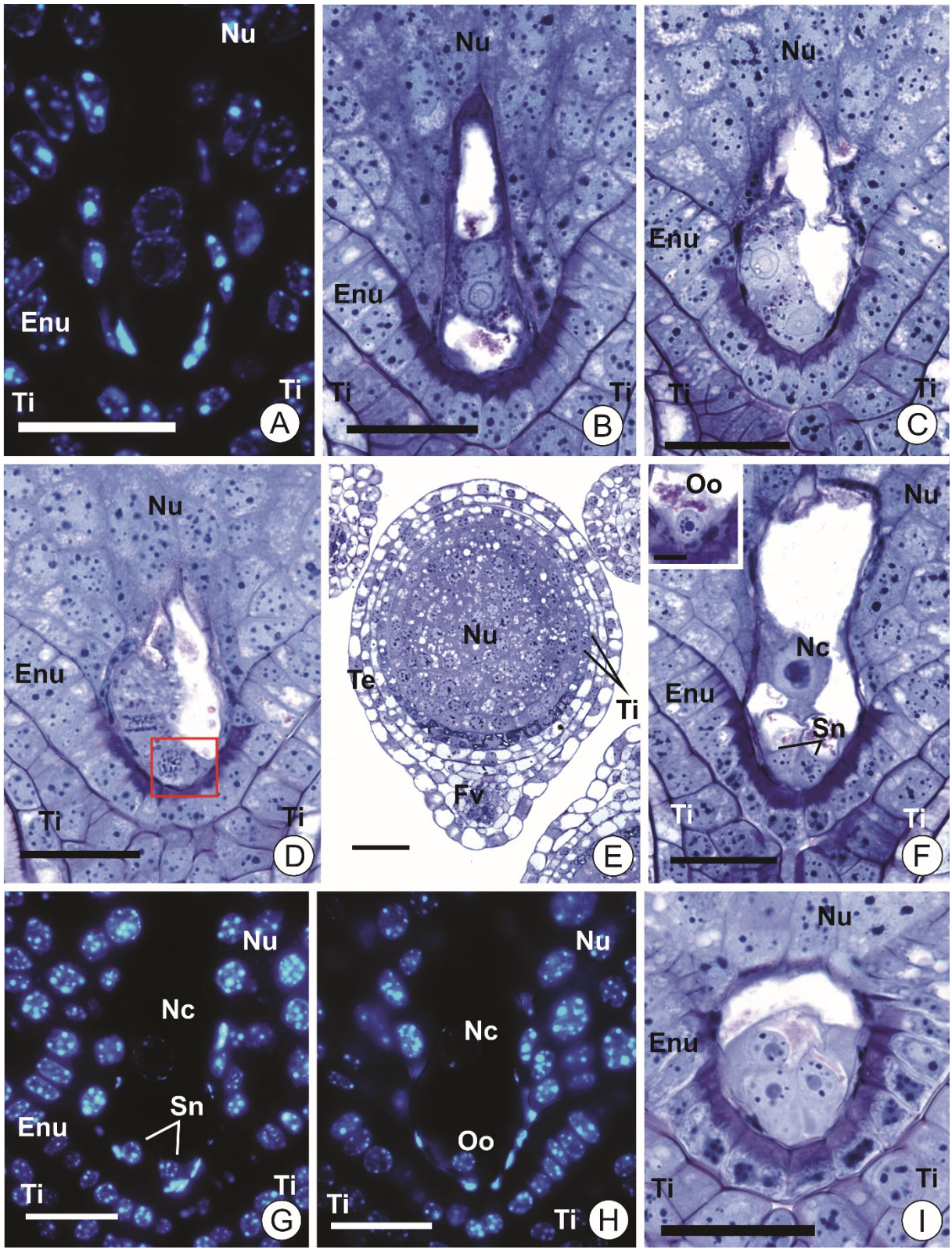

Nu
Enu
Ti
Ti
A
Nu
Enu
Ti
Ti
B
Nu
Enu
Ti
Ti
C
Nu
Enu
Ti
Ti
D
Nu
Te
Ti
Fv
E
Oo
Nu
Nc
Enu
Sn
Ti
Ti
F
Nu
Nc
Enu
Sn
Ti
Ti
G
Nu
Nc
Oo
Ti
Ti
H
Nu
Enu
Ti
Ti
I

Figura 9. Secções longitudinais, transversais e oblíquas do primórdio ovular e óvulo maduro de *Nymphaea lotus*. (A-B) Ginófito binucleado, observar polarização do vacuoma. (C) Migração dos núcleos acompanhado de expansão do domínio micropilar do ginófito. (D) Segundo ciclo mitótico do ginófito, com placas metafásicas posicionadas perpendicularmente entre si. (E) Óvulo maduro em corte transversal. (F) Ginófito maduro, inserção superior esquerda consiste em secção subsequente que exibe a oosfera. (H e I) Secções subsequentes do ginófito maduro, notar fluorescência menos intensa das células do ginófito (n) em relação ao nucelo (2n). (J) Secção oblíqua do ginófito evidenciando todas as células do aparelho oosférico. Coloração: B-F e I – azul de toluidina O; A, G e H – DAPI. Escala: inserção superior esquerda F – 10 μm; A-D, F-I – 30 μm; E – 50 μm. Enu – epiderme nucelar, Fv – feixe vascular, Gt – ginófito, Nc – núcleo da célula central, Nu – nucelo, Oo – oosfera, Sn – sinérgides, Te – tegumento externo, Ti – tegumento interno.

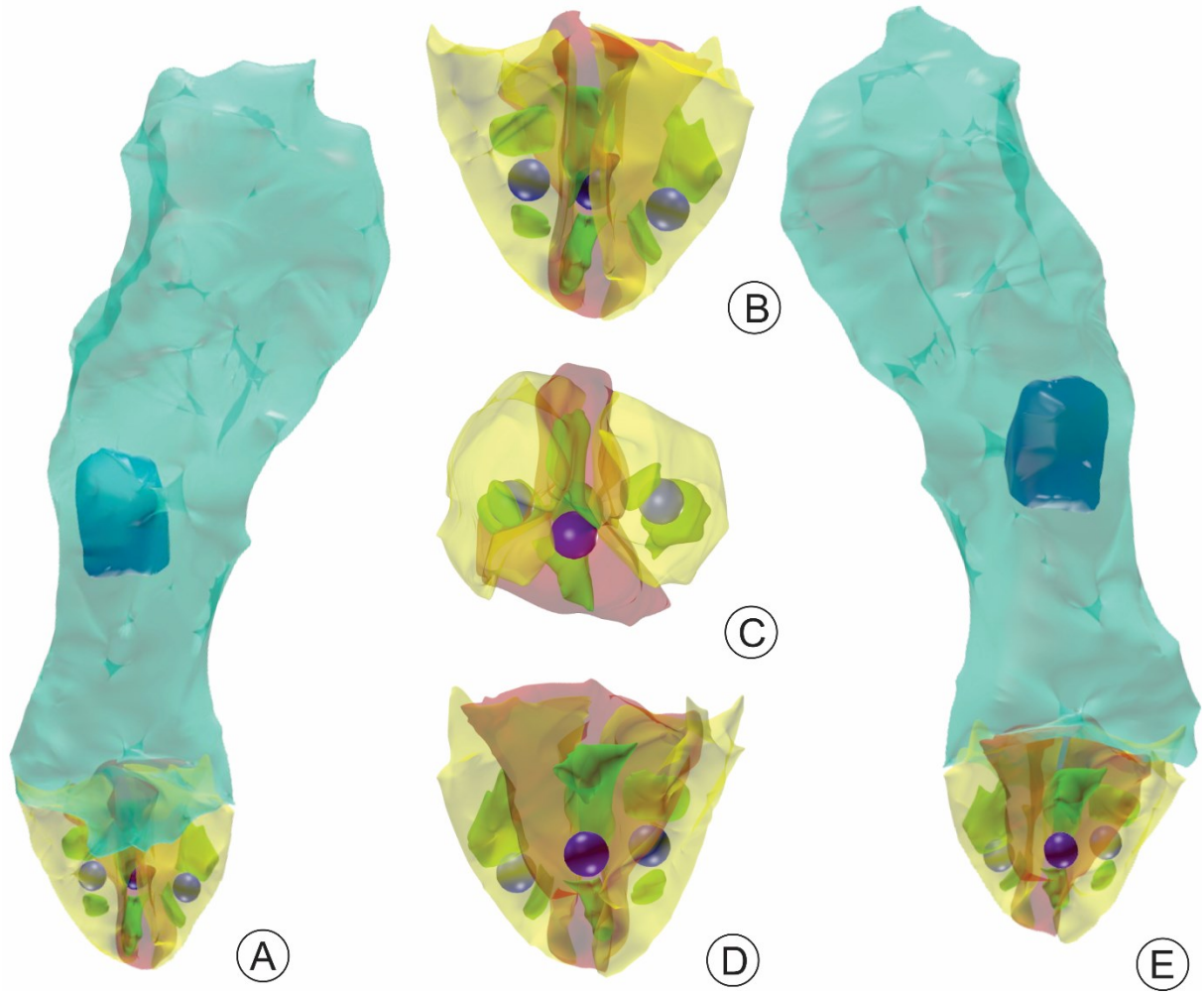


Figura 10. Reconstrução tridimensional do ginófito de *Nymphaea amazonum*. (A-E) Visão geral do ginófito, pela face das sinérgides (A) e da oosfera (E). (B-D) Aparelho oosférico em maior aumento observada pela face das sinérgides (B), da oosfera (D) e vista frontal (C). Azul claro – célula central, azul escuro – núcleos, amarelo – sinérgides, verde – vacúolos, vermelho – oosfera.

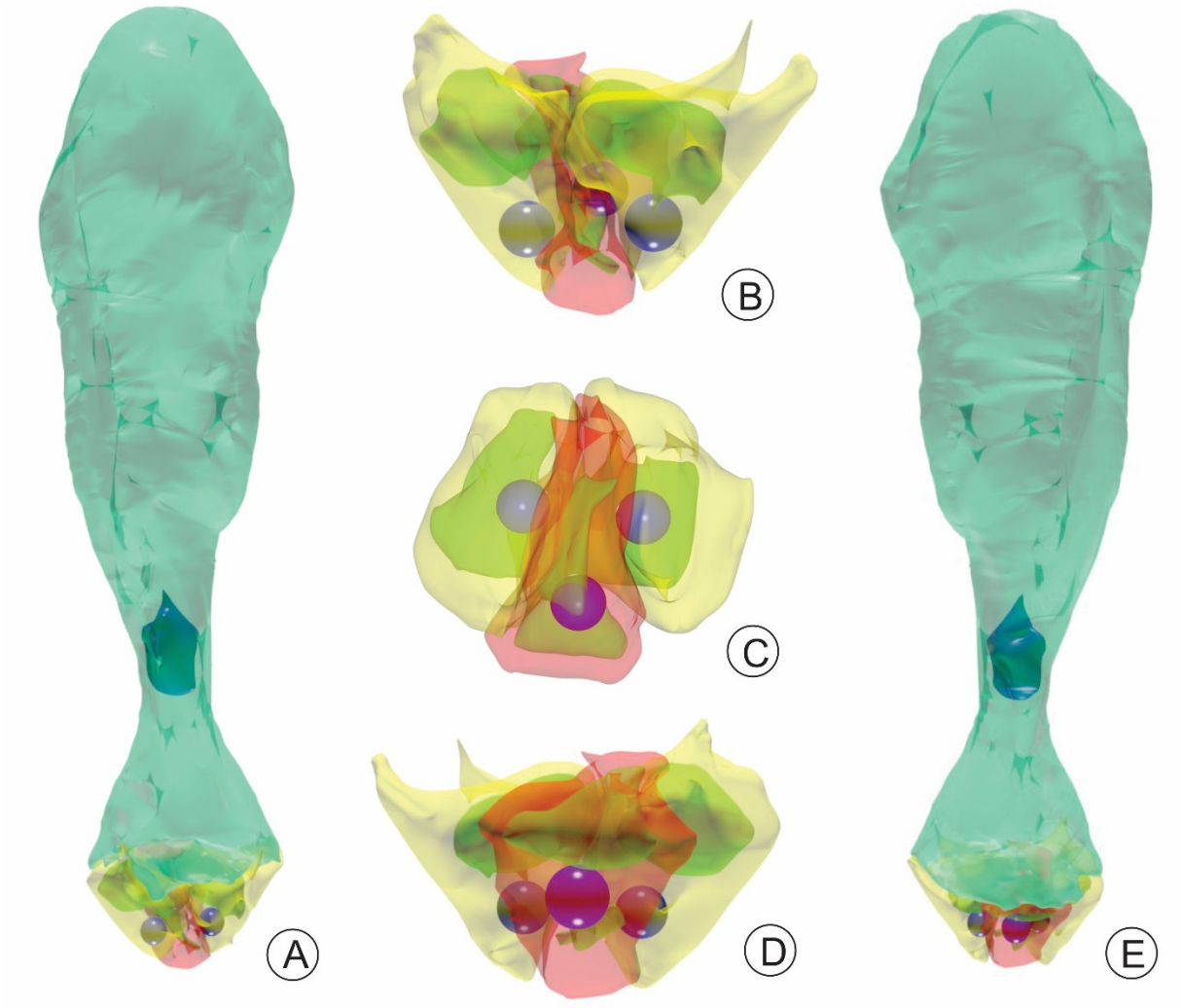


Figura 11. Reconstrução tridimensional do ginófito de *Nymphaea caerulea*. (A-E) Visão geral do ginófito, pela face das sinérgides (A) e da oosfera (E). (B-D) Aparelho oosférico em maior aumento observada pela face das sinérgides (B), da oosfera (D) e vista frontal (C). Azul claro – célula central, azul escuro – núcleos, amarelo – sinérgides, verde – vacúolos, vermelho – oosfera.

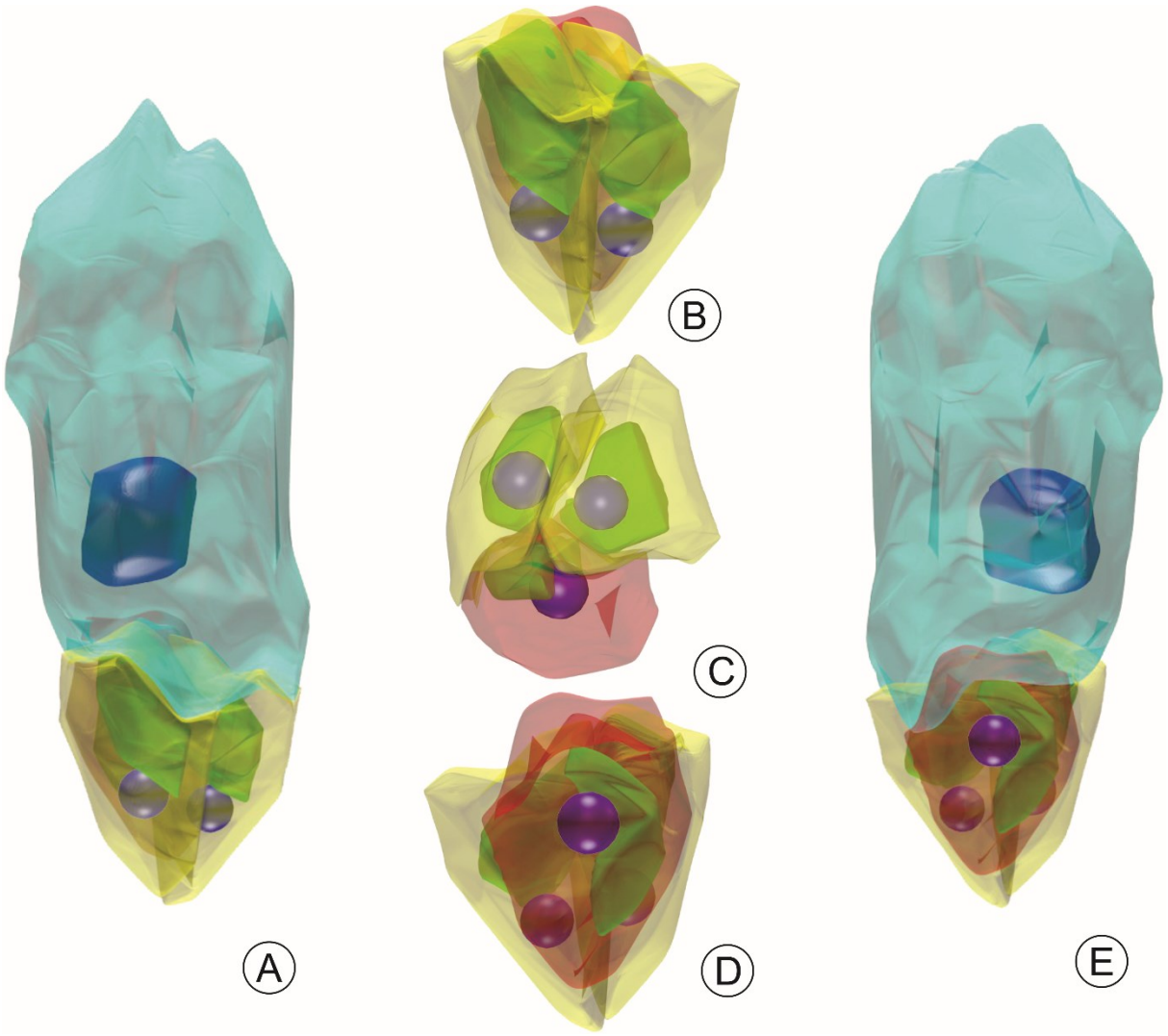


Figura 12. Reconstrução tridimensional do ginófito de *Nymphaea lotus*. (A-E) Visão geral do ginófito, pela face das sinérgides (A) e da oosfera (E). (B-D) Aparelho oosférico em maior aumento observada pela face das sinérgides (B), da oosfera (D) e vista frontal (C). Azul claro – célula central, azul escuro – núcleos, amarelo – sinérgides, verde – vacúolos, vermelho – oosfera.

Discussão

A histogênese inicial dos primórdios ovulares é subexplorada em estudos embriológicos e poucos artigos descrevem a iniciação do óvulo, o que dificulta uma ampla análise destes eventos iniciais em uma perspectiva filogenética, sendo que as descrições morfológicas do primórdio ovular geralmente se iniciam com o surgimento de uma ou mais iniciais subepidérmicas[1] (Bouman, 1984). Em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* ocorrem primórdios ovulares trizonados, condição que Bouman (1984) considera como um estado de caráter primitivo, pois diversas famílias, previamente consideradas basais, apresentam esta organização tecidual. Contudo, esta afirmação requer um cuidado especial, devido às mudanças na circunscrição das angiospermas basais no início do século XXI (Qiu et al., 1999; Hilu et al., 2003; APG III, 2009).

A análise das figuras presentes em alguns dos trabalhos embriológicos publicados para o grado ANA indica inconsistências com a afirmação de Bouman (1984) sobre a plesiomorfia da condição trizonada do primórdio ovular. Estudos ontogenéticos em *Amborella trichopora* (Yamada et al 2001b), *Trithuria submersa* (Rudall et al., 2008) e *Cabomba caroliniana* (Ramji and Padmanabham 1965) sugerem a ocorrência de óvulos bizonados, embora isto não tenha sido percebido ou discutido pelos autores. Portanto, investigações adicionais são requeridas para a verificação da condição bizonada nos primórdios ovulares destas três espécies, uma vez que apenas a observação direta do padrão de divisões celulares pode confirmar este estado de caráter (Bouman 1984). A despeito dos primórdios ovulares trizonados nas três espécies de *Nymphaea* empregadas neste estudo, a possível presença do primórdio bizonado em Amborellales e em famílias basais de Nymphaeales, respectivamente o primeiro e o segundo ramo da filogenia das angiospermas, (Qiu et al 1999, Hilu et al 2003; APG III, 2009) pode modificar a polarização destes estados de caráter.

A presença eventual de mais de uma inicial subepidérmica em *N. caerulea* e *N. lotus*, seguida de divisão periclinal em apenas uma delas para a formação da célula arquespórica e da célula parietal inicial, mostram que as características citológicas indicativas de sua natureza de iniciais subepidérmicas, quais sejam, o maior volume celular, o citoplasma mais denso e núcleo e nucléolo mais conspícuos que nas células em seu entorno, são indicativos apenas de um potencial para formar células arquespóricas, tal como proposto por Pozner (2001) com relação

[1] Bouman (1984), na verdade, segue tradição da terminologia em embriologia vegetal, baseada em Goebel (1932), segundo a qual denomina-se *arquespório* a célula ou grupo de células subepidérmicas que originam o ginosporângio. Porém tal concepção foi revista por Pozner (2001), prevalecendo a denominação *iniciais subepidérmicas*.

às células esporogênicas em processo de diferenciação pré-meiótica. Nos estádios iniciais da formação do ginosporângio em *N. caerulea* e *N. lotus*, apenas uma em até 3 iniciais subepidémicas passa pelos eventos que levam a formação do arquespório e da célula parietal; as demais terminam por tornar-se células somáticas do nucelo. Por outro lado, esporadicamente foram encontradas mais de uma CMG em *N. amazonum*, fato reportado também para outras espécies de angiospermas basais, tais como *Nuphar advena* (1-2, Seaton, 1908), *Nuphar polysepala* (1-2, Friedman & Williams 2003), *Illicium mexicanum* (3-8, Williams & Friedman, 2004) e *Trimenia moorei* (10, Bachelier & Friedman 2011). Tanto a diferenciação de tecidos vasculares durante a organogênese (Benková et al., 2003) quanto o potencial para formar células arquespóricas a partir das iniciais subepidérmicas podem estar relacionadas a eventos moleculares direta ou indiretamente influenciados pela presença de um gradiente crescente de auxina em direção ao polo distal do primórdio ovular, que persiste até o momento da fecundação (Friedman, 2009; Pagnussat et al., 2009; Cucinotta et al., 2014), o que pode estar relacionado aos eventos relatados acima nos primórdios ovulares de *N. amazonum, N. caerulea* e *N. lotus*.

Os óvulos das três espécies de *Nymphaea* analisadas são anátropos, crassinucelados e bitegumentados, tais características são amplamente relatadas para Nymphaeales (Khanna, 1965, 1967; Moseley, 1972; Schneider, 1976, 1978; Williamson & Moseley, 1989; Johri et al., 1992; Igersheim & Endress, 1998). Contudo, quanto à curvatura dos óvulos existe variação desde a ortotropia até a anatropia (Khanna, 1965, 1967; Moseley, 1972; Schneider, 1976, 1978; Williamson & Moseley, 1989; Johri et al., 1992; Igersheim & Endress, 1998). Óvulos bitegumentados e anátropos são comuns nas angiospermas basais sendo considerados plesiomórficos para as plantas com flores (Stebbins, 1974; Bouman, 1984; Cronquist, 1988; Takhtajan, 1991; Johri et al., 1992; Yamada et al. 2001b; Yamada et al., 2003b). Apenas poucos autores defendem a ortotropia como condição ancestral nas angiospermas (Bocquet & Bersier, 1960). Dentro de Nymphaeales apenas a família Hydatellaceae apresenta óvulos tenuinucelados (ou pseudo-crassinucelados *sensu* Davis, 1966, i.e., com divisões periclinais das células da epiderme nucelar), visto que a célula arquespórica se diferencia logo abaixo da epiderme nucelar sem a produção de célula parietal. Rudall et al. (2008) atribui este fato à uma redução, visto que a condição tenuinucelada é considera derivada para as angiospermas (Herr, 1995).

Yamada et al. (2001a,b, 2003a,b) propõe que o tegumento externo dos óvulos/sementes das angiospermas basais possui formato de capuz ou semianular com simetria bilateral, contrariando a literatura precedente que considerava que o tegumento interno das angiospermas basais possui formato de taça ou anelar com simetria radial (Bouman, 1984, Endress & Igersheim, 1997; Igersheim & Endress, 1997, 1998). De fato, em *Austrobaileya scandens*, *Brasenia schrebei*, *C. caroliniana* e *Trimenia moorei* apresentaram um tegumento externo

semianular, *N. alba* e *Nuphar japonicum* também exibe um tegumento externo semianular, embora, em estádios mais avançados, os autores indiquem que o tegumento externo se torne anelar, o que é inconsistente pois há uma descontinuidade no referido tegumento (Yamada et al., 2001a,b, 2003a,b). Por outro lado, *I. anisatum*, *Euryale ferox* e *Victoria cruziana* possuem um tegumento externo anelar (Yamada et al. 2001a). Portanto, juntado os dados obtidos com as espécies de *Nymphaea* estudadas com a literatura existente sobre o tema, há indícios suficientes para sustentar o tegumento externo semianular com simetria bilateral como o estado de caráter plesiomórfico para as angiospermas (Yamada 2003b). Yamada et al. (2001b) divide Nymphaeales em dois grupos: Cabombaceae que possui óvulos com tegumento externo semianulares e Nymphaeaceae com óvulos anulares; contudo, os dados obtidos neste trabalho, com as três espécies de *Nymphaea* empregadas, indicam a existência de um tegumento anelar apenas em *N. lotus*, o que sustenta a proposta de Igershein & Endress (1998) sobre a ocorrência de uma variação interespecífica da morfologia do tegumento externo para os gêneros *Nuphar* e *Nymphaea*.

Os óvulos de *Austrobaileya scandens*, *Nuphar japonicum* e *I. anisatum* são endostômicos, enquanto os óvulos de *B. schrebei*, *C. caroliniana* e *Trimenia moorei* são anfistômicos (Yamada et al., 2001a,b, 2003a,b). Contudo, durante o amadurecimento da semente de *Illicium* a micrópila passa a ser anfistômica (Yamada et al., 2003b). Em Yamada et al. (2001a) também há o relato de óvulos anfistômicos em *N. alba* e *Barclaya longiflora*, contudo, o autor deixa claro o fato de que o exostoma é frouxo. Uma vez que *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* apresentaram micrópila endostômica e levando-se em conta que a micrópila consiste em um canal estreito no qual o tubo polínico cresce e atinge o nucelo (Endress, 2011), a conclusão de Yamada (2001a) que a micrópila do gênero *Nymphaea* é anfistômica pode ser questionável, pois além de se basear em poucas observações, o tegumento externo de *Nymphaea* não contribui de fato para formar um canal estreito responsável pela canalização dos gametas masculinos como apontado por Endress (2011). A condição endostômica da micrópila é considerada plesiomórfica para as angiospermas (vide Yamada 2001a para revisão bibliográfica), e os dados observados nas três espécies de *Nymphaea* analisadas confirmam tal afirmação.

O espessamento das paredes periclinais internas e parte das paredes anticlinais da epiderme nucelar em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* também foi relatado para *N. advena*, *N. gigantea*, *N. odorata* e *Victoria amazonica,* sendo atribuídas a um processo de esclerificação (Cook,1902, 1906; Winter & Sharmov, 1991). Contudo, em *N. thermarum* foi relatado que tais paredes espessadas eram convolutas e compostas de camadas de calose e celulose (Povilus et al., 2015). De fato, em *N. amazonum* e *N. lotus* estas paredes apresentam-se positivas para

calose no teste realizado com azul de anilina, em diferentes intensidades. Segundo Povilus et al. (2015), tais características são comuns a células de transferência e tal configuração da epiderme nucelar é uma característica única de Nymphaeaceae, ou então um aspecto pouco reportado em estudos embriológicos.

A ZCD presentemente verificada na CMG e em algumas de suas derivadas imediatas é também relatada em diversos táxons do grado ANA como *Amborella trichopoda* (Friedman & Ryerson 2009), *Nuphar polysepala* (Friedman & Williams, 2003), *Kadsura japonica* (Friedman et al., 2003), *I. mexicanum* (Williams & Friedman, 2004). A análise de ilustrações sobre a ontogenia do ginófito em *N. advena* revela uma estrutura na porção calazal da CMG/célula calazal da díade que pode ser interpretada como ZCD (Seaton 1908). Uma vez que esta estrutura é DAPI-positiva e contem DNA, provavelmente consiste em um agrupamento de mitocôndrias e plastídios, (Friedman & Williams, 2003). O papel da ZCD não é claro e necessita de maior número de investigações. Contudo, há relatos desta organização citoplasmática das organelas com conteúdo de DNA na célula central do gametófito feminino de *Ephedra*, um gênero de gimnosperma que exibe dupla fecundação (Moussel, 1978; Friedman, 1990, 1991). Há uma suposição de que a migração do núcleo do canal ventral, partindo da micrópila em direção às adjacências da oosfera, e o contato com o ambiente citoplasmático provisionado pela ZCD, confere ao núcleo do canal ventral a capacidade de se fundir ao gameta masculino (Moussel, 1978). Em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus*, a zona citoplasmática densa está presente no domínio calazal da CMG tardia, na célula calazal da díade e no ginósporo funcional, e possui uma marcação tênue pelo DAPI. Portanto, a presença da ZCD marca a porção do citoplasma da CMG que será herdada pelo ginósporo funcional, após o término da meiose. Numerosos plastídios PAS e DAPI-positivos circundam a ZCD e o núcleo da CMG/ginósporo funcional. Em *N. caeruela* e *N. lotus* estas organelas possuem formato esférico, enquanto em *N. amazonum* exibem formato alongado e provavelmente consistem em amiloplastos.

Após o estabelecimento da ZCD, ocorre a primeira divisão da meiose na CMG seguida de citocinese originando uma parede celular transversal, na qual há deposição de calose. A díade é composta por células de tamanho e composição desiguais, sendo que a célula calazal permanece com a ZCD e um núcleo volumoso com nucléolo conspícuo, ao passo que a célula micropilar não exibe desenvolvimento posterior e entra em apoptose. A segunda divisão da meiose é seguida novamente de citocinese, e da deposição de calose resultando numa tríade linear. Tal organização dos ginósporos foi relatada para várias outras espécies do grado ANA, como *N. nouchali* (Orban & Bouharmont, 1998), *Nuphar polysepala* (Friedman & Williams, 2003), *Nuphar pumila* (Zhou & Fu, 2008), e em *Austrobaileya scandens* coexistem tríades e tétrades lineares (Tobe et al., 2007). A organização em tríade provavelmente evoluiu

independentemente dentro do grado mais de uma vez, pois mesmo em um subgênero como o *Brachyceras* há espécies com tríades lineares como é o caso de *N. caerulea* e tétrades lineares como é o caso de *N. thermarum* (Povilus et al., 2015). A ampla distribuição de tétrades lineares em Amborellaceae (Tobe et al., 2000; Friedman & Ryerson, 2009), Cabombaceae (Rudall et al., 2008), Hydatellaceae (Rudall et al., 2008), Austrobaileyales (Tobe et al., 2007) Illiciaceae (Williams & Friedman, 2004) e Schisandraceae (Friedman et al., 2003) também indicam que as tríades lineares se originaram independentemente várias vezes durante a evolução das espécies pertencentes ao grado ANA.

É interessante notar que os núcleos do ginófito binucleado, de início localizados medianamente, migram em direção ao domínio micropilar. Tal deslocamento é acompanhado de apoptose das células parietais do nucelo, adjacentes à parede micropilar do ginófito, assim como pela expansão do domínio micropilar do gametófito feminino que passa a contatar diretamente a epiderme nucelar. Embora a migração dos núcleos não tenha sido relatada para *N. thermarum*, esta espécie também exibiu a apoptose das células do nucelo e a expansão do domínio micropilar do ginófito (Povilus et al., 2015). A migração nuclear conjunta no ginófito binucleado não foi descrita para nenhuma das espécies do grado ANA até o momento e pode gerar implicações para a teoria de que o ginófito monospórico com sete células e oito núcleos do tipo *Polygonum* teria se originado a partir do ginófito monospórico com quatro células e quatro núcleos do tipo *Nuphar*/*Schisandra*, por meio da duplicação ectópica do modulo básico de desenvolvimento (Friedman & Williams, 2004). Cada módulo consistiria em um quarteto de núcleos que teria por características: (1) a origem a partir de um único núcleo posicionado em um dos domínios citoplasmáticos; (2) a ocorrência de duas mitoses sem a existência de citocinese intermediária e; (3) a celularização das três células adjacentes a cada um dos domínios, de tal forma que o quarto núcleo é confinado à célula central (Williams & Friedman, 2002; Friedman & Williams, 2003). Portanto, a origem de um ginófito *Polygonum* a partir do ginófito do tipo *Nuphar*/*Schisandra* requereria como primeiro evento ontogenético a migração dos dois núcleos para domínios opostos do ginófito binucleado, seguida por mais dois ciclos mitóticos (Williams & Friedman, 2004).

Rudall et al., (2008) também levanta a possibilidade do gametófito feminino do tipo *Polygonum* se originar a partir da fusão de dois ginófitos adjacentes, originados a partir da ginogametogênese de mais de um ginósporo de uma mesma tétrade, ou ainda, da mitose dos ginósporos, sendo que os autores chegaram a tais proposições a partir das observações realizadas no gênero *Trithuria* (Hydatellaceae), no qual tal fenômeno foi observado. Também há a possibilidade de que o ginófito do tipo *Nuphar*/*Schisandra* seja derivado, visto que *Amborella* possui um saco embrionário com oito células e nove núcleos, que em certos aspectos

é semelhante ao tipo *Polygonum*, salvo pela existência de uma sinérgide extra, originada por uma mitose adicional e interpretada como um evento de peramorfose (Friedman, 2006; Friedman & Ryerson, 2009). Desta maneira, a migração conjunta observada no ginófito binucleado de *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* dos núcleos em direção ao domínio micropilar, estaria em desacordo com a existência de módulos tal como são descritos por Friedman & Williams (2003) e Williams & Friedman (2004), pois a migração contraria a determinação de que a origem do módulo deve ocorrer a partir de um único núcleo restrito a um dos domínios do ginófito e que passa por dois ciclos mitóticos.

Contudo, a plesiomorfia do ginófito do tipo *Nuphar*/*Schisandra* ainda parece convincente quando observamos um panorama evolutivo maior e levamos em conta fatores como o conflito interparental e o aumento da expressão gênica ocasionada pelo advento de uma célula central diploide e, consequentemente, de um endosperma triploide que acarreta um incremento no valor adaptativo das angiospermas (Friedman et al., 2008; Rudall et al., 2008; Friedman & Ryerson, 2009). A presença de dois núcleos na célula central nos óvulos anômalos de *N. amazonum* pode indicar que uma duplicação de fato pode ocorrer no ginófito monospórico do tipo *Nuphar*/*Schisandra*, e que o posicionamento do núcleo por si só promove sua diferenciação, visto que sempre que houve um núcleo adicional na porção mediana dos ginófitos anômalos, este apresentou as mesmas características morfológicas observadas para o segundo núcleo central do mesmo ginófito, assim como para o núcleo central de ginófitos normais no mesmo ovário, i. e., núcleo amplo com cromatina descondensada e nucléolos conspícuos portando vacúolos nucleolares. Desta forma, a duplicação no módulo básico de desenvolvimento do ginófito no ancestral de todas as angiospermas poderia ser um evento bem mais comum do que se possa imaginar, uma vez que mitoses extras podem ocorre no ginófito resultando em núcleos adicionais e o posicionamento dos núcleos já é suficiente para sua diferenciação. Se a duplicação do módulo básico de desenvolvimento surgisse pela migração em direções opostas dos núcleos no estádio bicelular do ginófito e pela aquisição de um terceiro ciclo mitótico, esta nova configuração do ginófito poderia ser favorecida pela seleção natural originando então o ginófito do tipo *Polygonum*.

O conflito interparental ou intersexual ocorre entre os genitores masculino e feminino sobre o investimento em tecidos nutritivos oferecido pelo esporófito materno a sua prole, ou ainda, a competição entre os óvulos fecundado por pólen de diferentes procedências sobre os recursos provenientes do esporófito materno (Wu et al., 2013). Uma contribuição maior do genoma do esporófito materno no endosperma promoveria uma distribuição de recursos compatível com os indivíduos da prole com maior valor adaptativo, o que promoveria um maior sucesso reprodutivo e evitaria a extração egoísta ou agressiva de recursos maternos por parte

de um genótipo paterno específico (Haig & Westoby, 1989; Friedman et al., 2008). O aumento da ploidia 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). Assim sendo, a migração conjunta dos núcleos do ginófito para o domínio micropilar poderia consistir num processo preexistente, e uma alteração no sentido da migração de um dos dois núcleos poderia explicar, conjuntamente com as modificações citoesqueléticas necessárias, a aquisição do módulo calazal que estaria presente no ginófito do tipo *Polygonum*. Portanto, embora ainda não seja possível aceitar definitivamente a teria proposta por Friedman & Williams (2003) e Williams & Friedman (2004), a plesiomorfia do ginófito monospórico do tipo *Nuphar*/*Schisandra* parece robusta, uma vez que todas as espécies de Nymphaeales (Orban & Bouharmont, 1998; Friedman & Williams, 2003; Zhou & Fu, 2008; Rudall et al., 2008; Povilus et al., 2015) e Austrobaileyales (Tobe et al., 2007; Williams & Friedman, 2004; Friedman et al., 2003) com análise ontogenética completa até o momento apresentam um ginófito portando quatro células e quatro núcleos.

Conclusões

Os estudos filogenéticos baseados em dados moleculares recentemente revolucionaram a filogenia das angiospermas, alterando os táxons anteriormente reconhecidos como mais primitivos dentre as angiospermas e indicando os táxons pertencentes ao grado ANA como as linhagens mais basais das plantas com flores. Tal mudança de paradigmas ocasionou um grande interesse no estudo da embriologia deste grupo de plantas, assim como suscitou importantes questões a respeito da polaridade de estados de caracteres do ginófito. Um dos aspectos mais relatados para o grado ANA é a existência de labilidade no que diz respeito a aspectos da embriologia dos diversos táxons do grupo; contudo, a ampla ocorrência do ginófito monospórico do tipo *Nuphar*/*Schisandra* em Nymphaeales, inclusive *Nymphaea* como observado neste estudo, e Austrobaileyales levantou a hipótese de que um ginófito com quatro células e quatro núcleos seria plesiomórfico em relação ao ginófito monospórico com sete células e oito núcleos do tipo *Polygonum*, o que ao longo dos últimos quinze anos tem se provado plausível. *Amborella trochopoda*, o táxon apontado como mais basal da filogenia das angiospermas, exibe um ginófito monospórico com oito células e nove núcleos muito similar ao tipo *Polygonum,* exceto pela presença de uma sinérgide extra. Este fato gera dúvidas acerca da plesiomorfia do tipo *Nuphar*/*Schisandra*. Contudo, os problemas evolutivos enfrentados pelo decréscimo no valor adaptativo de espécies que apresentem um endosperma diploide é um forte indício que advoga contra a plesiomorfia do tipo *Polygonum* e, indica que este tipo de

ginófito poderia ter se originado a partir da duplicação ectópica do módulo básico de desenvolvimento, ou seja, a partir de ginófito com quatro células e quatro núcleos e não o contrário.

Este trabalho é o primeiro que traz uma análise histológica e histoquímica completa do ginófito, desde os estádios mais precoces da ontogenia do primórdio ovular, assim como o primeiro a realizar uma reconstrução tridimensional no gênero *Nymphaea*. Também foi relatado pela primeira vez a ocorrência de migração conjunta dos núcleos no estádio de ginófito binucleado que tem implicações sobre a definição do módulo básico de desenvolvimento do ginófito e dá pistas a respeito dos fenômenos que possam estar envolvidos com a duplicação do módulo básico de desenvolvimento do ginófito nas angiospermas, haja visto que já ocorria migração nuclear, mesmo que conjunta, no ginófito binucleado do tipo *Nuphar*/*Schisandra* em *Nymphaea*. O primeiro evento ontogenético distintivo do ginófito do tipo *Polygonum* é a migração dos núcleos no estádio binuclear para os domínios opostos do ginófito, seguido da aquisição de um ciclo mitótico adicional. Logo, a modificação no sentido da migração de um dos núcleos do ginófito binucleado parece consistir no primeiro passo na evolução do ginófito *Polygonum*, pois com o presente trabalho constata-se que a migração nuclear, embora conjunta entre os núcleos do ginófito bicelular, já estava presente ao menos em *Nymphaea*.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor e a FAPESP pelo auxílio financeiro (processo nº 2014/01529-8).

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.

BACHELIER, J.B. & FRIEDMAN, W.E. 2011. Female gamete competition in an ancient angiosperm lineage. PNAS 108(30):12360-12365.

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.

BATTAGLIA, E. 1986. Embryological questions: 7. Do new types of embryo sac occur in *Schisandra*? Ann. Bot. 44: 69–92.

BATYGINA, T.B. & VASILYEVA, V.E. 2002. Oenothera-type of embryo sac development. In: Batygina TB. ed. Embryology of flowering plants. Terminology and concepts I. Generative organs of flower. Plymouth, MA: Science Publishers, 173–176.

BENKOVA, E.; MICHNIEWICZ, M.; SAUER, M.; TEICHMANN, T.; SEIFERTOVA, D.; JÜRGENS, G.; FRIML, J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. Cell 115: 591–602.

BOCQUET, G. & BERSIER, J. D. 1960. La valeur systématique de l'ovule: développments tératalogiques. Arch. Sci. 13: 475-496.

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.

BORSH, T.; LÖHNE, C.; WIERSEMA, J. 2008. Phylogeny and evolutionary patters 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 lignt on subg. *Brachyceras* and its relationships to the Australian water-lilies. Telopea 13(1-2): 193–217.

BOUMAN, F. 1984. The ovule. *In*: JOHRI, B.M. (ed) Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, pp123-157.

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.; FRIIS, E. M.; PEDERSEN, K. R. 1995. The origin and early diversification of angiosperms. Nature 374: 27-33.

CRONQUIST, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants, 2ª ed. New York Botanical Garden, New York, New York, USA.

CUCINOTTA, M.; COLOMBO, L.; ROIG-VILLANOVA, I. 2014. Ovule development, a new model for lateral organ formation. Front. Plant Sci. 5:1-12.

DAVIS, O. L. 1966. Systematic Embryology of the Angiosperms. John Wiley & Sons, New York

ENDRESS, P. K. 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. Ann. Bot. 107(9): 1465-1489.

ENDRESS, P. K. & IGERSHEIM, A. 1997. Gynoecium diversity and systematics of Laurales. Bot. J. Linn. Soc. 161(s6): s211-s223.

ESCHRICH, W. & CURRIER, H.B. 1964. Identification of callose by its dichrome and fluorochrome reactions. Stain Technology 39: 303-307.

FIALA, JC. 2005. Reconstruct: A free editor for serial section microscopy. J. Microsc. 218: 52–61.

FRIEDMAN, W.E. 1990. Sexual reproduction in *Ephedra nevadensis* (Ephedraceae): further evidence of double fertilization in a nonflowering seed plant. Am. J. Bot. 77: 1582-1598.

FRIEDMAN, W.E. 1991. Double fertilization in *Ephedra trifurca,* a non flowering seed plant: the relationship between fertilization events and the cell cycle. Protoplasma 165: 106-120.

FRIEDMAN, W.E. 2009. Auxin at the evo-devo intersection. Science 324: 1652-1653.

FRIEDMAN, W.E.; GALLUP, W.N.; WILLIAMS, J.H. 2003. Female gametophyte development in *Kadsura*: implications for Schisandraceae, Austrobaileyales, and the early evolution of flowering plants. Int. J. Plant Sci. 164: S293-S305.

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. 2006. Embryological evidence for developmental lability during early angiosperm evolution. Nature 441: 337-340.

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: 79-92.

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.

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

GOEBEL, K. 1932. Organographie der Pflanzen. Fischer, Jena, Germany.

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

HAYASHI, Y. 1963a. The embryology of the family Magnoliaceae sens. lat. I. Megasporogenesis, female gametophyte and embyrogeny 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* Radlkofer and *Kadsura japonica* Dunal. Sci. Rep. Tohoku Biol. 29: 403–411.

HERR, J.M. 1995. The origin of the ovule. Am.J. Bot. 82: 547–564.

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.

IGERSHEIM, A. & ENDRESS, P. K. 1997. Gynoecium diversity and systematics of the Magnoliales and winteroids. Bot. J. Linn. Soc. 124: 213-271.

IGERSHEIM, A. & ENDRESS, P. K. 1998. Gynoecium diversity and systematics of the paleoherbs. Bot. J. Linn. Soc. 127: 289-370.

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.

JOHRI, B.M. & AMBEGAOKAR, K.B.; Srivastava, P.S. 1992. Comparative embryology of angiosperms, vols. 1, 2. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

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.

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.

McDOWELL, E. M. & TRUMP, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med. 100: 405-414.

MOORE, M. J.; BELL, C. D.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. 2007. Using plastid genome-scale data to resolve enigmatic relationships among basal angiosperms. PNAS 104(49): 19363-19368.

MOSELEY, M. F. 1972. Morphological studies of the Nymphaeaceae. IV, Development of flower of *Nuphar*. Phytomorph. 21: 253–283.

MOUSSEL, B. 1978. Double fertilization in the genus *Ephedra*. Phytomorph. 28: 336-345.

O'BRIEN, T. P. & McCULLY, M. E. 1981. The Study of Plant Structure Principles and Selected Methods. Melbourne: Termarcarphi Pty.

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

PAGNUSSAT, G. C.; ALANDETE-SAEZ, M.; BOWMAN, J. L.; SUNDARESAN, V. 2009. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. Science 324, 1684.

POVILUS, R. A.; LOSADA, J. M.; FRIEDMAN, W. E. 2015. 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):211-26

POZNER, R. 2001. Approach to early sporangial development in angiosperms considering meiosis control and cellular differentiation. Plant Syst. Evol. 230: 25-42.

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.

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

RUDALL, P. G.; REMIZOWA, M. V.; BEER, A.S.; BRADSHAW, E; TEVENSON, D. W.; MACFARLANE, T. D.; TUCKETT, R. E.; YADAV, S. R.; SOKOLOFF, D. D. 2008. Comparative ovule and megagametophyte development in Hydatellaceae and water lilies reveal a mosaic of features among the earliest angiosperms. Ann. Bot. 101: 941–956.

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

SCHNEIDER, E.L. 1976. The floral anatomy of *Victoria* Schomb. (Nymphaeaceae). Bot. J. Linn. Soc. 72:115–148

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

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.

SOUSA, D. J. L.; MATIAS, L. Q. 2012. Sinopse do gênero *Nymphaea* L. (Nymphaeaceae) no Estado do Ceará. Rev. Caatinga. 25(3): 72-78.

STEBBINS G. L. 1974. Flowering plants: evolution above the species level. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

TAKHTAJAN, A. L. 1991. Evolutionary trends in flowering plants. Columbia University Press, New York, New York, USA.

TOBE, H.; JAFFRÉ, T.; RAVEN, P. H. 2000. Embryology of *Amborella* (Amborellaceae): Descriptions and Polarity of Character States. J. Plant Res. 113: 271-280.

TOBE, H; KIMOTO, Y; PRAKASH, N. 2007. Development and structure of the female gametophyte in *Austrobaileya scandens* (Austrobaileyaceae). J. Plant Res. 120: 431–436.

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.

WILLIAMS, J. H.; FRIEDMAN, W. E. 2004. The four-celled female gametophyte of *Illicium* (Illiciaceae; Austrobaileyales): implications for understanding the origin and early evolution of monocots, eumagnoliids, and eudicots. Am. J. Bot. 91: 332-351.

WILLIAMSON, P. S. & MOSELEY, M. F. 1989. Morphological studies of the Nymphaeaceae sensu lato. XVII. Floral anatomy of *Ondinea purpurea* subspecies purpurea (Nymphaeaceae). American Journal of Botany 76: 1779-1794.

WINTER, A. N. & SHAMROV, I. I. 1991. 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.

YAMADA, T.; IMAICHI, R.; PRAKASH, N.; KATO, M. 2003b. Developmental morphology of ovules and seeds of Austrobaileyales. Aust. J. Bot. 5: 555–564.

YAMADA, T.; IMAICHI, R.; TOBE, H.; KATO, M. 2001b. Developmental morphology of the ovules of *Amborella trichopoda* (Amborellaceae) and *Chloranthus serratus* (Chloranthaceae). Bot. J. Linn. Soc. 137(3): 277–290.

YAMADA, T.; IMAICHI, R.; KATO, M. 2001a. Developmental morphology of ovules and seeds of Nymphaeales. Am. J. Bot. 88: 963–974.

YAMADA, T.; IMAICHI, R.; KATO, M. 2003a. The outer integument and funicular outgrowth complex in the ovule of *Magnolia grandiflora* (Magnoliaceae). J. Plant Res. 116(3): 189–198.

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

Capítulo III

Desenvolvimento Comparado da Semente de Espécies do Gênero *Nymphaea* L. (Nymphaeales: Nymphaeaceae) com ênfase na Endospermogênese e na Embriogênese

Eduardo João Pereira Junior[1,2] & Nelson Sabino Bittencourt Júnior[2]

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Biociências, IBB/UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Caixa Postal 510, Rubião Junior, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

[2]Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência: eduardojpjr@yahoo.com.br

Resumo

A semente das angiospermas tem como funções a nutrição, a proteção e a dispersão da próxima geração esporofítica, consistindo em uma parte evolutivamente sensível do ciclo de vida do organismo. A compreensão das características das sementes das angiospermas basais é vital para inferir a polaridade dos estados de caracteres; portanto, o estudo das *Nymphaea*, o único gênero globalmente diversificado dentro do grado ANA, pode contribuir significativamente na compreensão da evolução inicial das plantas com flores. Óvulos fecundados naturalmente e sementes em diversos estádios de desenvolvimento provenientes de *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* foram fixados, desidratados, infiltrados em historesina e as secções semi-seriadas de 1-4 μm foram submetidas a coloração com azul de toluidina, ou submetidas a testes histoquímicos. 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 homologia entre o embrião e o endosperma em *Nymphaea*.

Palavras-chave: homologia, embrião, endosperma *ab initio* celular, angiospermas basais, epiderme nucelar

Abstract

The seed of angiosperm functions in nurture, protection and dispersion of the next sporophytic generation, consisting in an evolutionarily sensitive part of the life cycle of the whole organism. The understanding of the features of basal angiosperm seeds is indispensable to infer the polarity of character states in the angiosperms, therefore, the study of *Nymphaea*, the only globally diverse genus within the ANA grade, may contribute significantly to undestanding of the early evolution of flowering plants. Naturally fertilized ovules and seeds of *N. amazonum*, *N. caerulea* and *N. lotus* in several stages of development were fixed, dehydrated and infiltrated in historesin, and microthomic semi-serial sections 1-4 μm thick were stained with toluidine blue or, subjected to histochemical tests. 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 celulose 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 the hypocotile-radicle axis, 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 supports the homology between the embryo and the endosperm in *Nymphaea*.

Keywords: homology, embryo, endosperm *ab initio* cellular, basal angiosperms, nucellar epidermis

Introdução

A semente das angiospermas tem como funções a nutrição, a proteção e a dispersão da próxima geração esporofítica; portanto, consiste em uma fase evolutivamente sensível do ciclo de vida do organismo (Tiffney, 1984). Considerando que os aspectos reprodutivos correspondem à 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 (Sargant, 1908; Crane et al., 1995).

Embora haja uma literatura considerável a respeito da fecundação, endospermogênese, embriogênese e desenvolvimento dos demais tecidos da semente em Nymphaeales (vide Povilus et al., 2015 para revisão bibliográfica), estes dados estão espalhados por um século de estudos embriológicos e, consequentemente, foram obtidos sob diferentes perspectivas conceituais, apresentando muitas vezes erros de interpretação, não raro fruto de um processamento deficiente do material botânico empregado, assim como de uma análise ontogenética incompleta. Por exemplo, características anatômicas dos tegumentos não puderam ser empregadas em um estudo filogenético realizado por Borsch et al. (2008) por não haver dados suficientes na literatura para vários dos subgêneros de *Nymphaea*, o que demostra a necessidade de estudos mais detalhados neste gênero. Levando em conta a importância na compreensão das características das sementes das angiospermas basais para inferir a polaridade dos estados de caracteres (Yamada et al., 2003b), um estudo detalhado de membros pertencentes às linhagens basais se torna altamente atrativo e necessário.

Nymphaeales (Nymphaeaceae, Cabombaceae e Hydatellaceae) é considerado o segundo ramo na filogenia das angiospermas, logo depois da ordem Amborellales e, conjuntamente com Austrobaileyales (Illiciaceae, Trimeniaceae e Schisandraceae) compõe o grado ANA (Qiu et al., 1999, 2005; Soltis et al., 1999, 2000; Zanis et al., 2002; Borsch et al., 2003, 2008; Hilu et al., 2003). Compreender a diversificação das Nymphaeales é de considerável interesse como um modelo da evolução inicial das angiospermas (Borsch et al., 2008). Esta ordem é constituída por ervas morfologicamente 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 correnteza (Borsch et al., 2008). A família Nymphaeaceae apresenta cinco gêneros (*Barclaya*, *Euryale*, *Nuphar*, *Nymphaea* e *Victoria*); por sua vez o gênero *Nymphaea* divide-se em cinco subgêneros (*Anecphya*, *Brachyceras*, *Hydrocallis*, *Lotus* e *Nymphaea* [= subg. *Castalia*]) (Conard, 1905; Warner et al., 2008; Borsch et al., 2008; Borsch et al., 2011). Com relação à fusão carpelar, Conard (1905)

divide ainda os subgêneros de *Nymphaea* em dois grupos que seriam as principais linhagens dentro do gênero e consistiriam em Apocarpiae (*Anecphya* 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* (*Anecphya* [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).

Existem várias características sinapomórficas em Nymphaeales, como por exemplo a presença de um ginófito com quatro células e quatro núcleos, sementes com opérculo (região com células radialmente alongadas e esclerificadas nas imediações da micrópila que se destaca durante a germinação da semente para a protrusão do hipocótilo+ radícula – Haines & Lye, 1975), perisperma e célula haustorial unicelular no domínio calazal do endosperma (Rudall et al., 2009). Contudo, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas sobre o desenvolvimento da semente em membros desta ordem, assim como especificamente para o gênero *Nymphaea*.

Existem duas hipóteses a respeito da origem evolutiva do endosperma: Sargant (1900), com base na presença de mais de um embrião nas sementes de *Gnetum* e *Ephedra*, propôs que o endosperma seria um embrião adicional originado pela fecundação da célula central que, em última análise, consistiria num segundo gameta feminino. Este embrião teria evoluído "altruisticamente" de maneira a se tornar um tecido estéril, cumprindo uma função nutritiva em relação à nova geração esporofítica originada a partir da fecundação da oosfera. A presença de um endosperma diploide nos táxons basais das angiospermas e o seu caráter bipolar (domínios calazal e micropilar) similar ao observado nos embriões das angiospermas, também reforçam a teoria de Sargant (Friedman, 2001; Linkies et al., 2010).

Outra hipótese é a de que o endosperma nas plantas com flores consistiria numa porção do ginófito que, no transcurso da evolução, teria se tornado sexualizada (Strasburger, 1900; Coulter, 1911). A segunda fecundação teria gerado vantagens ao potencial adaptativo do embrião em desenvolvimento e por isso foi retida nas angiospermas (Friedman & Williams, 2004). Tal hipótese pode ser corroborada pela existência de mutantes de *Arabidopsis thaliana* que desenvolvem um tecido similar ao endosperma a partir da célula central sem a necessidade da fertilização do núcleo secundário por um dos núcleos das células espermáticas (Ohad et al., 1996).

O presente trabalho tem como objetivo analisar de maneira integrada e detalhada a embriogenia, a endospermogênese com ênfase no padrão de divisões iniciais do domínio micropilar do endosperma, a dinâmica de produção e armazenamento de amiloplastos nos

diversos tecidos durante a ontogenia da semente, a natureza das inclusões citoplasmáticas presentes nas células cotiledonares e endospérmicas e, a natureza das paredes periclinais da porção micropilar da epiderme nucelar. Tais informações serão confrontadas com a literatura existente, com o propósito de compreender as implicações destes dados na evolução das angiospermas, e com o intuito de discutir a hipótese sobre a homologia entre o embrião e o endosperma.

Material e Métodos

Preparações para Epifluorescência e Microscopia de Luz

Flores polinizadas naturalmente e frutos em diversos estádios de desenvolvimento foram coletados entre 2012 e 2015 de espécimes de *Nymphaea caerulea* Savigny (subg. *Brachyceras*) provenientes de uma população subespontânea localizada em Uchoa (21° 02' 53,15" S, 49° 08' 22,70" O), de uma população natural de *Nymphaea amazonum* Mart. & Zucc. subsp. *amazonum* (subg. *Hydrocallis*) localizada em Onda verde (20° 38' 28,12" S, 49° 19' 53,01" O) e de uma população cultivada de *Nymphaea lotus* L. (subg. *Lotus*) localizada em Américo Brasiliense (21° 42' 48,52" S, 48° 01' 34,37" O) todos municípios do Estado de São Paulo, Brasil. As exsicatas de *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* foram depositadas no Herbário do Campus da UNESP de São José do Rio Preto, respectivamente, sob os números de registro: SJRP 31878, SJRP 31879 e SJRP 31880. Após a dissecção, os óvulos fertilizados/sementes foram fixados em solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976) e desidratados em série etílica até etanol 70%, no qual foram armazenados. Completada a desidratação, as amostras foram incluídas em historesina Leica®. Secções semi-seriadas de 1-4 μm foram obtidas com navalhas de vidro, utilizando-se um micrótomo de rotação Leica RM2255. As secções foram aderidas em lâminas de vidro e submetidas a testes histoquímicos ou coloração com azul de toluidina O (O'Brien & McCully 1981) e montadas com Permount®.

Foram realizados os seguintes testes histoquímicosos: para a detecção de polissacarídios insolúveis empegou-se o Ácido Periódico - Schiff (PAS), precedido pelo tratamento das secções com o bloqueador de aldeídos 2,4-dinitrofenilhidrazina (O'Brien & McCully 1981); IKI (Sass, 1940) para amiloplastos; para a verificação de compostos polissacarídios ácidos foi usado o vermelho de rutênio (Southworth, 1973); para proteínas totais utilizou-se o azul de bromofenol (Mazia et al, 1953). Todo o material foi examinado em um microscópio Zeiss Axioskop e fotografado com um fotomicroscópio Olympus BX51 (Olympus Optical, Tokyo, Japan)

equipado com uma câmera digital Olympus Q-Colour 5. Para detecção de calose utilizou-se o método fluorocromático com azul de anilina (Eschrich & Currier 1964), e para a detecção de celulose com Calcoflúor White M2R (O'Brien & McCully, 1981) utilizou-se um sistema de epifluorescência (lâmpada de mercúrio USH-103OL, modelo do cubo U-MWU2, filtro de excitação BP330-385, espelho dicróico DM400 e filtro de barreira BA420). Alguns cortes selecionados foram examinados por meio de contraste de interferência diferencial (DIC) de Nomarski (polarizador U-AN, prisma U-DICTHR e placa matiz U-UCDTP530).

Resultados

A célula primária do endosperma, gerada pela fecundação do núcleo da célula central do ginófito, se divide transversalmente e, a parede celular formada junto à região mediana afunilada do ginófito delimita as câmaras calazal e micropilar do endosperma bicelular. Assim são estabelecidos os domínios micropilar e calazal do endosperma (*sensu* Floyd & Friedman, 2000) (fig.1B, F, H-I). Com exceção da epiderme nucelar, o nucelo passa a funcionar como perisperma imediatamente após a dupla fecundação e exibe quantidades crescentes de amiloplastos compostos que progressivamente se tornam maiores (fig. 1A, 2A, 3D, 4C). A célula micropilar do endosperma é ligeiramente menor que a calazal envolvendo parcialmente o zigoto e a sinérgide persistente; apresenta um vacúolo que preenche a maior parte do citoplasma e seu núcleo posiciona-se próximo a porção calazal da célula, exibindo um nucléolo conspícuo, além de várias regiões heterocromáticas dispersas pelo nucleoplasma (fig. 1B, F, H-I). A célula calazal do endosperma em *N. lotus* possui um citoplasma altamente denso e um núcleo com cromatina descondensada que ocupa a maior parte da porção central da célula, com diminutas regiões heterocromáticas dispersas pelo nucleoplasma, nucléolo evidente podendo apresentar vacúolos nucleolares (fig. 1H-I, 4A).

Em *N. amazonum* e *N. caerulea* o núcleo da célula calazal do endosperma também é amplo e está deslocado para a porção calazal da mesma; contudo, as porções micropilar e central da célula são ocupadas por um grande vacúolo (fig. 1B, F). A primeira divisão da célula endospérmica primária aparenta ser um evento extremamente rápido, uma vez que, a despeito do alto número de primórdios seminais analisados, não foi possível observar nenhuma figura mitótica. A diferenciação da célula calazal aparenta ser igualmente rápida (fig. 1B, F, H-I, 4A). Nas três espécies de *Nymphaea* analisadas, tão logo ocorre a dupla fecundação, um faixa de células epidérmicas ao redor do funículo, próximo à micrópila, se alongam perpendicularmente ao eixo funicular e dividem-se anticlinalmente; as células parenquimáticas desta região experimentam uma intensa proliferação celular acompanhada do surgimento de espaços

intercelulares, dando origem ao aerênquima que preencherá o arilo, neste estádio apresentando grande número de amiloplastos (fig. 2A, 3B).

A célula calazal do endosperma não apresenta nenhuma divisão posterior e passa a funcionar como um haustório (fig. 2D, 3B-C, 4A-B). Já a célula micropilar de *N. lotus* passa por uma divisão paralela ao eixo do ginófito, originando duas células que flanqueiam o polo calazal do zigoto (fig. 4A). Em seguida, cada uma das células-filhas passa por uma divisão transversal produzindo uma série com duas células de cada lado do zigoto (fig. 4B). Em *N. amazonum* (fig.1C) e *N. caerulea* a primeira divisão da célula micropilar do endosperma é desigual e perpendicular ao eixo do ginófito. Em *N. caerulea* a célula posicionada na porção calazal do domínio micropilar divide-se transversalmente mais uma vez originando duas células enfileiradas, enquanto a célula na porção micropilar do domínio micropilar divide-se longitudinalmente originando duas células-filhas que flanqueiam o zigoto (fig. 1G, 3A). Em seguida, inicia-se um processo de proliferação celular sem um padrão regular que é responsável por um grande incremento no volume do domínio micropilar do endosperma nos estádios seguintes (fig. 2F, 3G-I, 4D-F); contudo, é possível observar uma tendência do domínio micropilar do endosperma apresentar uma série de células posicionadas em cada lado do proembrião (fig. 2B-C, 3B-E, 4B).

O zigoto inicialmente apresenta-se levemente alongado e é oblíquo em relação ao eixo do nucelo, exibe um citoplasma com vacúolos predominantemente posicionados na porção micropilar e um amplo núcleo no polo calazal com um nucléolo evidente e várias regiões heterocromáticas (fig. 1C, G, I, 3A, 4A-B). Lateralmente ao zigoto, observa-se uma sinérgide persistente nas três espécies analisadas, a qual possui núcleo menor (relativamente ao do zigoto), nucléolo conspícuo e citoplasma vacuolado (fig.1C, F-G, I, 3E-F). Em *N. caerulea* a sinérgide persistente está presente até os estádios mais avançados do desenvolvimento da semente, como uma célula altamente vacuolada, com um núcleo reduzido de posição variável e paredes celulares intensamente coradas pelo azul de toluidina e PAS-positivas (fig. 3D, 6F, I, 9B, inserção 12E). Em *N. amazonum*, a sinérgide persistente é detectada até o estádio de proembrião octocelular (fig. 5D), enquanto em *N. lotus* esta célula foi observada até o estádio de proembrião globular (fig. 7I). A morfologia da sinérgide persistente é muito similar à apresentada por *N. caerulea*; contudo, estas duas espécies não exibiram paredes celulares intensamente coradas pelo azul de toluidina, embora tenham se mostrado PAS-positivas.

Uma divisão transversal do zigoto origina um proembrião bicelular (fig. 2B, 3D-E, 4D). A célula basal do proembrião pode ou não passar por divisões adicionais, é cilíndrica e, via de regra, exibe menor densidade citoplasmática, além de tamanho e vacuolação superiores aos da

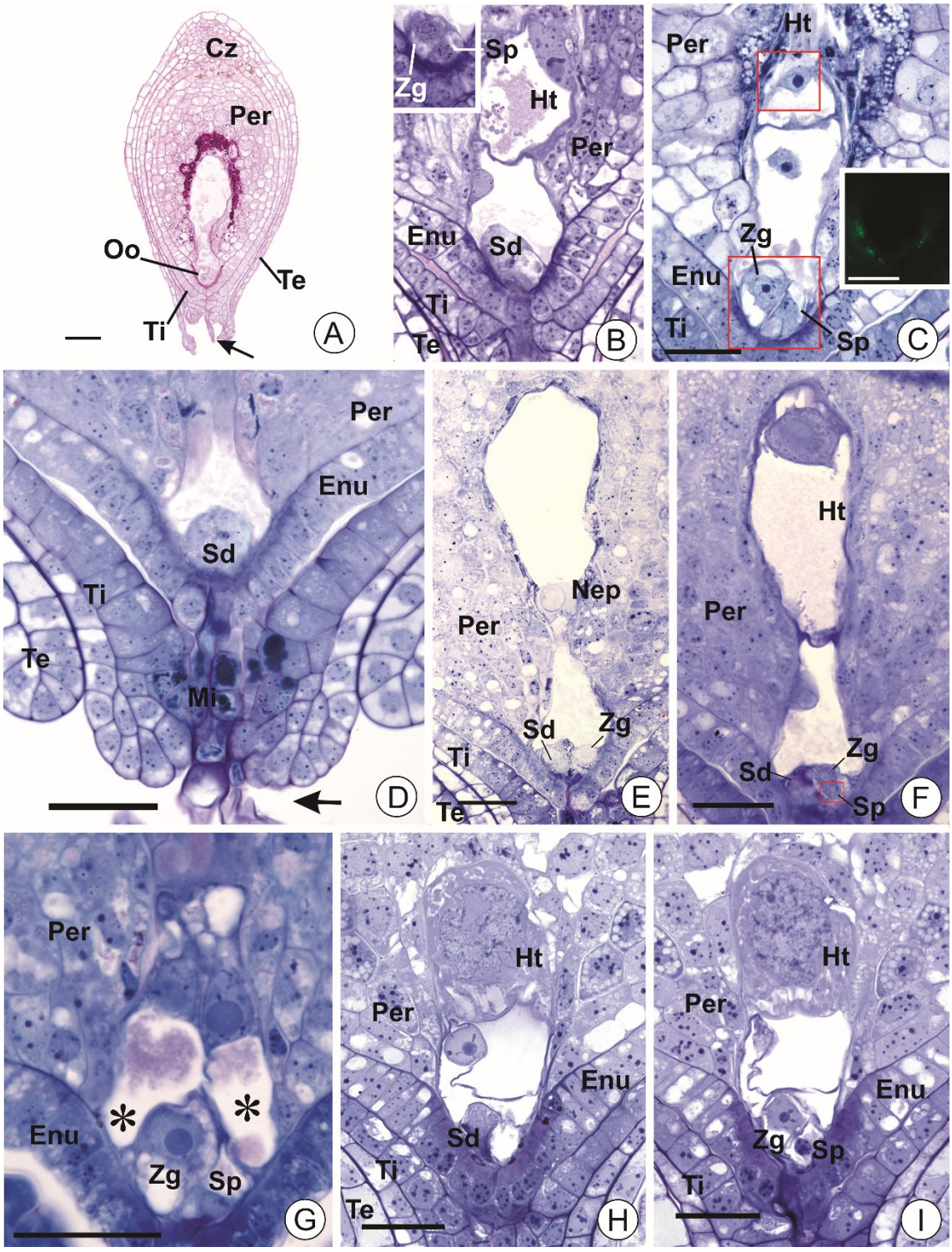

Cz
Per
Oo
Te
Ti
A
Zg
Sp
Ht
Per
Enu
Sd
Ti
Te
B
Per
Ht
Zg
Enu
Ti
Sp
C
Per
Enu
Sd
Ti
Te
Mi
D
Nep
Per
Sd
Zg
Ti
Te
E
Ht
Per
Zg
Sd
Sp
F
Per
Enu
Zg
Sp
G
Ht
Per
Enu
Sd
Ti
Te
H
Ht
Per
Enu
Zg
Sp
Ti
I

Figura 01. Secções longitudinais da semente imatura de *Nymphaea* em sucessivos estádios de desenvolvimento. *Nymphaea amazonum* – (A) Visão geral de um óvulo recentemente fecundado; é possível observar amiloplastos no perisperma adjacente ao ginófito, assim como um tubo polínico atado à micrópila (seta preta). (B) Primórdio seminal após a primeira divisão do endosperma, exibindo a célula haustorial do domínio calazal, assim como o núcleo da primeira célula do domímio micropilar do endosperma. A inserção superior esquerda traz a secção subsequente mostrando o zigoto e a sinérgide persistente. (C) Primeira divisão celular transversal do domínio micropilar do endosperma. A inserção à direita evidencia deposição de calose nas paredes periclinais da porção micropilar da epiderme nucelar. *Nymphaea caerulea* – (D) Região opercular do primórdio seminal, na qual é possível observar um tubo polínico (seta preta) atado à micrópila. (E) Núcleo endospérmico primário. (F) Configuração do primórdio seminal após a primeira divisão do endosperma. (G) Zigoto flanqueado por duas células endospérmicas (asteriscos). *Nymphaea lotus* – (H-I) Secções sucessivas do primórdio seminal após primeira divisão do endosperma. Colorações: A – PAS; inserção B, B-C e D-I – azul de toluidina O; inserção C– azul de anilina. Escala: A-I – 30 μm. Cz – calaza, Enu – epitélio nucelar, Ht – célula haustorial do domínio calazal do endosperma, Mi – micrópila, Oo – aparelho oosférico, Per – perisperma, Sd – sinérgide degenerada, Sp – sinérgide pesistente, Te – tegumento externo, Ti – tegumento interno, Zg – zigoto.

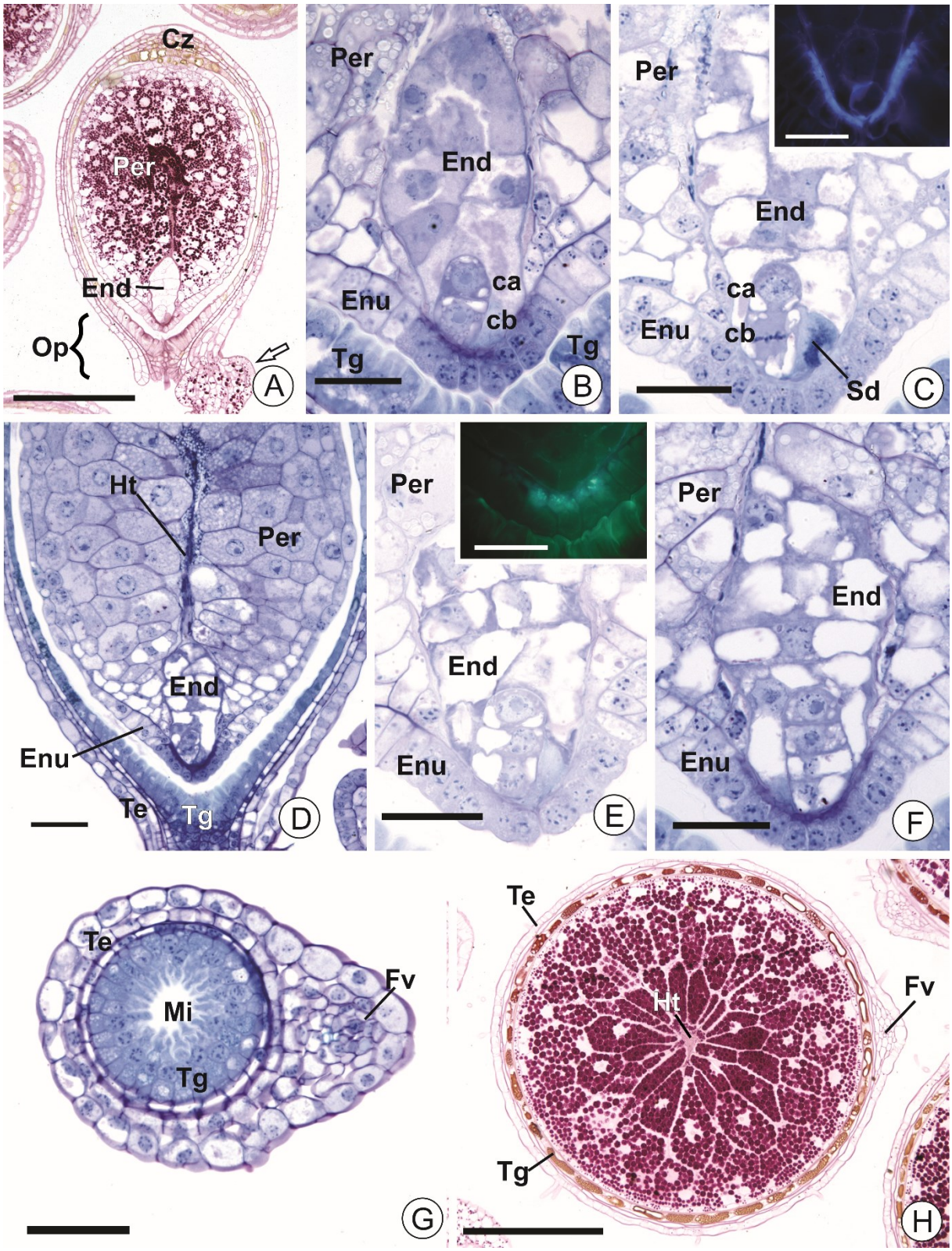

Cz
Per
End
Op
A
Per
End
Enu
ca
cb
Tg
Tg
B
Per
End
ca
Enu
cb
Sd
C
Ht
Per
End
Enu
Te
Tg
D
Per
End
Enu
E
Per
End
Enu
F
Te
Fv
Mi
Tg
G
Te
Fv
Ht
Tg
H

Figura 02. Secções longitudinais e tranversais da semente imatura de *Nymphaea amazonum* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Visão geral do primórdio seminal durante o estádio de proembrião bicelular, evidenciando o início do desenvolvimento do arilo na região do funículo próxima à micrópila (seta branca) e formação de amiloplastos no perisperma. (B) Proembrião bicelular, com a célula apical hemisférica (maior densidade citoplasmática) e a célula basal cilíndrica (menor densidade citoplasmática). (C) Divisão da célula basal do proembrião bicelular. (D) Domínios micropilar e calazal do endosperma, o último colapsado. (E) Proembrião com três células. (F) Proembrião com quatro células. (G) Secção transversal do complexo micrópila-hilo, evidenciando a natureza semianular do tegumento externo e a ausência de células exotestais entre o hilo e a micrópila. (H) Secção transversal mediana da semente no estádio de proembrião com 4 células. É possível observar estratificação do perisperma em direção à região do haustório calazal do endosperma e a acúmulo de uma substância com alta afinidade para hidrazina nos vacúolos células da camada interna do tegumento interno. Colorações: B-G – azul de toluidina O; inserção superior direita C – Calcoflúor Withe M2R; inserção superior direita E – azul de anilina; A e H – PAS. Escalas: A e H – 200 μm; B-C, inserções C e E, E-F – 30 μm; D e G – 50 μm. ca – célula apical, cb – célula basal, Cz – Calaza, End – endosperma, Enu – epitélio nucelar, Fv – feixe vascular, Ht – célula haustorial do domínio calazal do endosperma, Mi – micrópila, Op – região opercular, Per – perisperma, Te – tegumento externo, Tg – endotégmen.

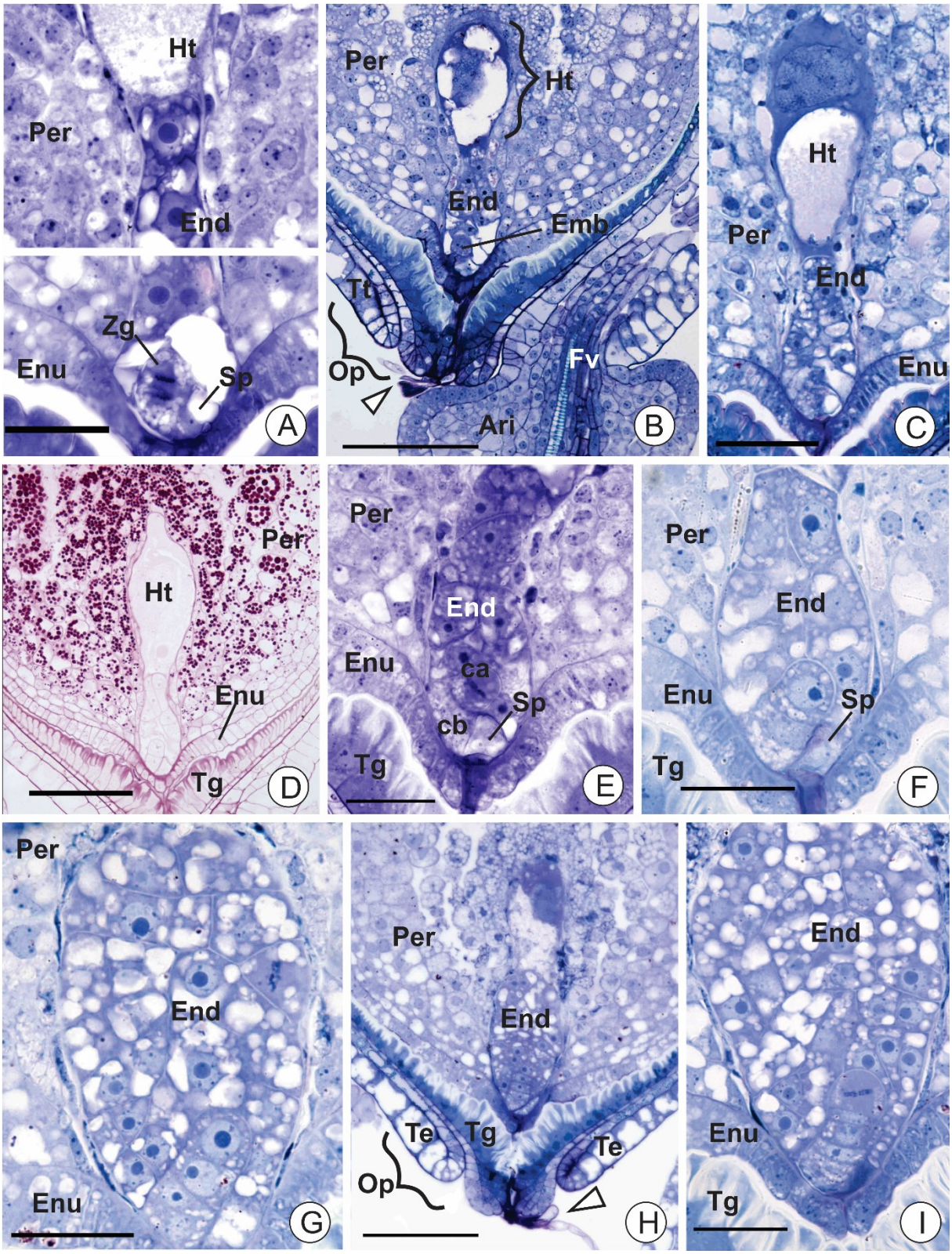

Ht
Per
End
Zg
Enu
Sp
A
Per
Ht
End
Emb
Tt
Op
Fv
Ari
B
Ht
Per
End
Enu
C
Per
Ht
Enu
Tg
D
Per
End
Enu
ca
cb
Sp
Tg
E
Per
End
Enu
Sp
Tg
F
Per
End
Enu
G
Per
End
Te
Tg
Te
Op
H
End
Enu
Tg
I

Figura 03. Secções longitudinais da semente de *Nymphaea caerulea* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Cortes seriais consecutivos mostrando a organização do domínio micropilar tetracelular do endosperma. Neste momento o zigoto passa pela primeira divisão que é tranversal. (B) Endosperma com haustório calazal unicelular. Na base do funículo inicia-se o desenvolvimento do arilo e também é possível observar resquícios do tubo polínico atado à micrópila (ponta de seta branca). (C) Dois domínios do endosperma durante o estádio de proembrião linear. (D) Estádio bicelular do proembrião evidenciando amiloplastos no perisperma. (E) Mitose da célula apical do proembrião bicelular. (F) Proembrião com três células. (G) Proembrião com quatro células. (H) Mesmo estádio da figura anterior, em menor aumento. Notar resquícios do tubo polínico atado à micrópila. (I) Proembrião com cinco células; célula apical passa pela última divisão mitótica horizontal. Colorações: A-C e E-F – azul de toluidina O; D – PAS. Escalas: A-B, D, H – 30 μm; C, E-G, I – 100 μm. Ari – arilo, ca – célula apical, cb – célula basal End – endosperma, Enu – epiderme nucelar, Fv – feixe vascular, Ht – células haustorial do domínio micropilar do endosperma, Op – região opércular, Sp – sinérgide persistente, Te – tegumento externo, Tg – endotégmen, Zg – zigoto.

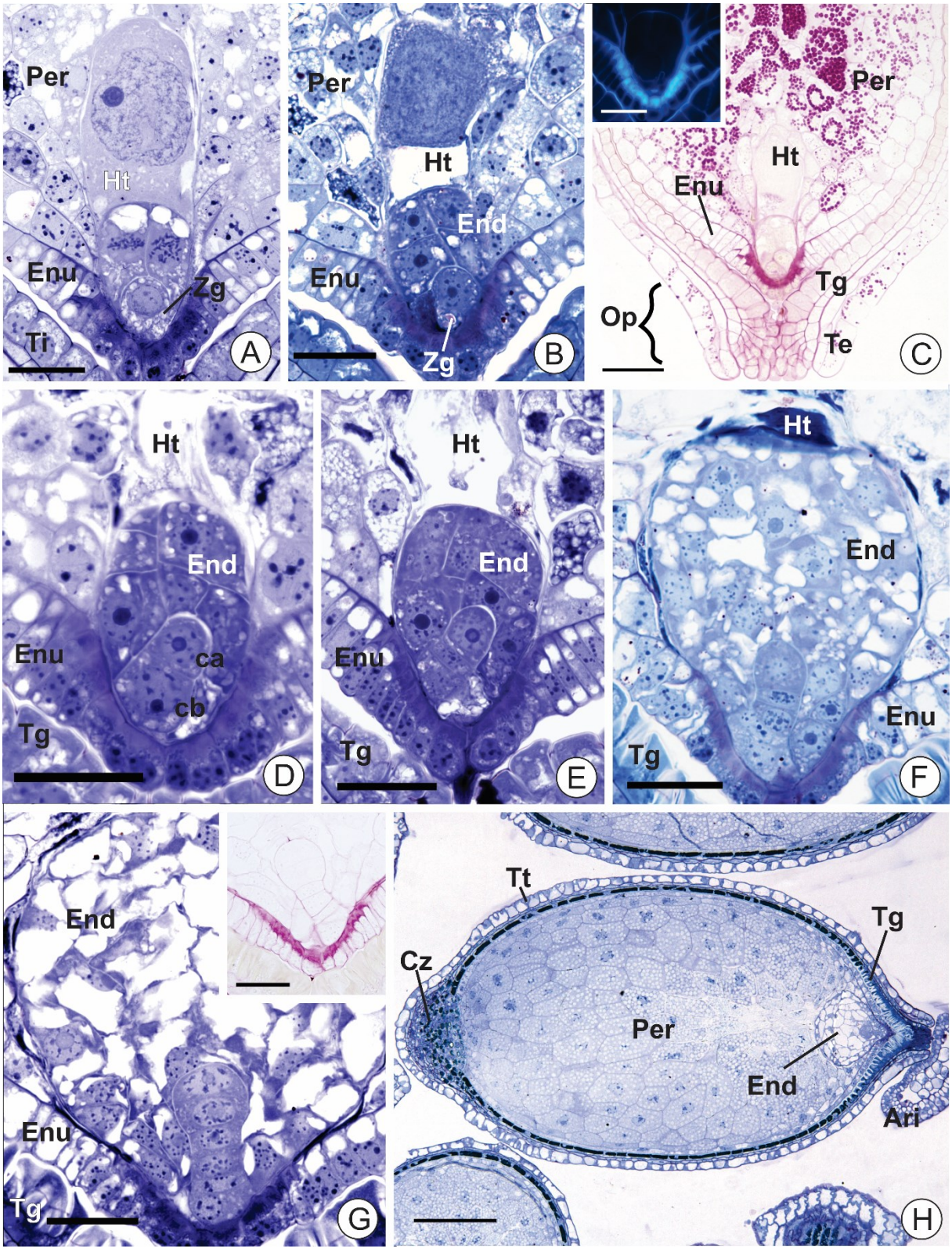

Per
Ht
Enu
Zg
Ti
A
Per
Ht
End
Enu
Zg
B
Per
Ht
Enu
Tg
Op
Te
C
Ht
End
Enu
ca
cb
Tg
D
Ht
End
Enu
Tg
E
Ht
End
Enu
Tg
F
End
Enu
Tg
G
Tt
Tg
Cz
Per
End
Ari
H

Figura 04. Secções longitudinais da semente imatura de *Nymphaea lotus* em sucessivos estádios de dessenvolvimento. (A) Zigoto flanqueado por duas células do domínio micropilar do endosperma em metáfase mitótica. (B) Organização das células do domínio micropilar do endosperma após segundo ciclo de divisões. (C) Amiloplastos no perisperma durante o estádio zigótico. A inserção superior esquerda aponta celulose nos espessamentos das paredes periclinais internas e parte das anticlinais nas células da porção micropilar da epiderme nucelar. (D) Proembrião bicelular, com a célula apical hemisférica e a célula basal cilíndrica. Domínios micropilar e calazal do endosperma, o último apresenta sinais claros de apoptose. (E) Proembrião com três células. (F) Proembrião com cinco células. (G) Proembrião linear com 6 células. Notar a expansão das duas células distais. A inserção superior direita indica que as paredes periclinais internas das células da porção micropilar da epiderme nucelar são PAS-positivas. (H) Aspecto geral da secção longitudinal da semente no estádio de embrião globular com 4 células. É possível observar estratificação do perisperma em direção à região na qual anteriormente se localizava o haustório calazal do endosperma e a esclereificação da camada interna do tegumento interno. Colorações: A-B, D-H – azul de toluidina O; inserção superior direita C – Calcoflúor Withe M2R; C e inserção superior direita G – PAS. Escala: A-B, D-H, inserções C, G – 30 μm; D e C – 50 μm. Ari – arilo, ca – célula apical, cb – célula basal, Cz – Calaza, End – endosperma, Enu – epitélio nucelar, Ht – célula haustorial do domínio calazal do endosperma, Op – região opercular, Per – perisperma, Te – tegumento externo, Tg – endotégmen, Ti – tegumento interno, Tt – exotesta.

célula apical (fig. 2C, 3D-E, 4D). A célula apical possui formato hemisférico e ambas as células do proembrião bicelular possuem amplo núcleo central com nucléolo conspícuo (fig. 2C, 3D-E, 4D). A célula apical e suas derivadas apresentam com maior frequência divisões celulares transversais (fig. 3E, 3I), até que o proembrião linear atinja de 4-6 células (fig. 2D-F, 3F-I, 4E-G, 5A, 6A). Posteriormente, as duas células distais passam por um processo de expansão seguida de divisões longitudinais ao eixo do proembrião, ou perpendiculares entre si (fig. 5B-C, 6B-C, 7C). As quatro células originadas ingressam em um processo de proliferação celular que dá origem ao proembrião globular (fig. 5D-F, 6F, 7D, F, I). Neste estádio as 2-4 células que originam o suspensor se mostram altamente vacuolizadas e geralmente, apresentam diminutos amiloplastos dispersos pelo citoplasma (fig. 5D-F, 6F, 7D, F, I).

Num estádio bem precoce do proembrião globular é possível observar a diferenciação de uma protoderme envolvendo um agrupamento central de células do meristema indiferenciado, sendo que as células protodérmicas são ligeiramente pavimentosas, com núcleo central (fig.5F, H, 6F, I, 7I, 8A) e apresentam, predominantemente, divisões anticlinais. O embrião globular, neste estádio apresenta um gradiente de vacuolação crescente da porção distal do embrião em direção ao suspensor (fig. 5F, H, 6F, I, 7I, 8A). Observa-se logo abaixo do embrião propriamente dito, uma célula com densidade citoplasmática intermediária entre as células do proembrião e as células do suspensor, que constitui a hipófise (fig. 6F, 7D, 8D). É provável que a célula da hipófise seja agregada ao embrião propriamente dito, pelo menos em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* (fig. 6F, I, 8D-E, 10A). Neste momento o endosperma atinge sua maior extensão, apresentando formato aproximadamente esférico e sendo constituído por células com formato poliédrico a irregular, as centrais via de regra são maiores que as periféricas; contudo, nas células endospérmicas de ambos os estratos predomina um amplo vacúolo ocupando a maior parcela do citoplasma, o núcleo usualmente é excêntrico, mas de posicionamento altamente variável (fig. 5G-H, 6F-G, 7F, 10B).

Observa-se, a partir do estádio de proembrião globular, um gradiente de diferenciação do perisperma quanto à forma de suas células e ao conteúdo e tamanho de seus amiloplastos, da região periférica para o entorno da célula haustorial do endosperma (fig. 5G, 6H, 7G-H, 8B-C). Na região periférica do perisperma as células são menores e mais achatadas, assim como o são menores também os amiloplastos compostos; na porção intermediária as células são relativamente maiores e têm formato poligonal (em secção longitudinal) e possuem núcleos centrais com nucléolo conspícuo, além de amiloplastos grandes (fig. 5G, 6H, 7G-H, 8B-C). Nas proximidades da célula haustorial do endosperma, as células perispérmicas se apresentam deformadas exibindo amiloplastos com dimensões reduzidas, em relação à região intermediária, e o espaçamento entre eles também é menor dando a impressão de que o citoplasma é

preenchido completamente por amiloplastos; o núcleo nestas células também se apresenta deformado (fig. 5G, 6H, 7G-H, 8B-C). As células perispérmicas no entorno de todo o endosperma se encontram colapsadas (fig. 5G, H, 6H).

A região da epiderme nucelar contígua à porção micropilar do ginófito maduro exibe espessamentos em suas paredes celulares periclinais internas e parte das anticlinais; e após a fecundação, ocorre um acréscimo no alongamento radial destas células (fig. 1A-I) em relação aos estádios prévios (vide capito II desta tese). Os espessamentos da parede celular são intensamente corados pelo Calcoflúor White M2R evidenciando a presença de celulose (fig. 2C, 4C). Estes espessamentos também são positivos para calose em *N. amazonum* até o estádio de proembrião linear (fig. 1C, 2E). Em *N. caerulea* os espessamentos são positivos para calose apenas durante o estágio de ginófito maduro. Nesta espécie, as paredes periclinais internas das células da porção micropilar da epiderme nucelar emitem uma tênue autofluorescência azul, assim como pode ser observado no estádio de tétrade linear (vide capítulo II desta tese). *Nymphaea lotus* não apresentou deposição de calose na porção micropilar da epiderme nucelar em qualquer estádio de desenvolvimento posterior à dupla fecundação.

Inicialmente, tanto o tegumento interno quanto o externo são formados, em sua maior extensão, por duas camadas de células pavimentosas que, em secção longitudinal da semente, apresentam-se retangulares (fig. 1A-I). A porção opercular da camada interna do tegumento interno exibe, a partir do estádio de proembrião linear, espessamentos parietais que se coram de verde azulado pelo azul de toluidina (fig. 2B, 3B, 4F), além de ter grande afinidade pela hidrazina utilizada na reação de PAS (fig. 5H, 6H, 7I). Esses espessamentos de paredes também são tenuemente PAS-positivos, pelo menos em estádios anteriores ao proembrião globular precoce (fig. 2A, 3D, 5D, G). As células desta região, que nos estádios prévios já se apresentavam alongadas radialmente e com densidade citoplasmática elevada (fig. 1A-I), passam por uma acentuada diferenciação: o alongamento celular anticlinal progride e as paredes periclinais internas e grande parte das anticlinais da região opercular passam por um expressivo espessamento e se tornam convolutas. Tal diferenciação confere a esta camada celular a condição de endotégmen (fig. 2D, G, 3B, 4F-H, 7E). Previamente, no estádio de célula-mãe dos ginósporos, a porção do tegumento interno que circunda a micrópila já exibe uma série de divisões periclinais e oblíquas (vide o capítulo II desta tese). Após a fecundação (fig. 1D) este processo se intensifica e constitui-se a extremidade do opérculo (fig. 3B, 4C, H). Observa-se nas células operculares adjacentes ao canal micropilar um acúmulo de uma substância que se cora intensamente de verde pelo azul de toluidina e possui afinidade pela hidrazina (fig. 1D). Uma outra substância com as mesmas propriedades de coloração está presente nas células da região não opercular da camada interna do tegumento interno/ endotégmen, no interior dos

vacúolos (fig. 2H, 5H, 8B-C). A porção opercular do endotégmen se mostra positivo para calose em todas as espécies analisadas (fig. 9A).

No estádio cordiforme do embrião, as paredes celulares da camada externa do tegumento externo exibem espessamentos que conferem a esta camada celular a condição de exotesta (fig. 8B-D, F-G, 9A, 10B-D). Suas células, em secção paradérmica, apresentam paredes anticlinais sinuosas (em aspecto geral, estas células se assemelham a peças de quebra-cabeça), possuem um amplo vacúolo central com núcleo excêntrico e nucléolo evidente (fig. 7B), assim como amiloplastos dispersos pelo citoplasma (dado não mostrado). Em *N. amazonum* e *N. caerulea*, o tegumento externo possui formato de capuz e, em *N. lotus*, formato de taça, a região entre o feixe vascular rafeal e o endóstoma não é revestida pela exotesta em momento algum, mesmo em *N. lotus* (fig. 2G, 7E, 13A). A camada externa do tegumento interno e a camada interna do tegumento externo não passam por grandes alterações e apresentam células muito menores que as das demais camadas, passam por estiramento no transcurso do desenvolvimento da semente entre a exotesta e a camada interna do tegumento interno/endotégmen, sobretudo na região opercular (fig. 2H, 4C, 5H, 7A, 10D).

O proembrião, inicialmente globular, aos poucos passa a apresentar um formato aproximadamente elíptico em secção longitudinal da semente. Tal mudança conformacional é dirigida pela proliferação celular no meristema indiferenciado e da protoderme e está envolvida na emergência dos cotilédones (fig. 6I, 8D). Em um estádio seguinte, já é possível observar claramente quatro regiões embrionárias: duas protuberâncias que consistem nos primórdios cotiledonares que se voltam em direção à calaza e cujas células passam por vacuolação progressiva; o futuro epicótilo, uma região em formato de domo que é delimitada pelos cotilédones e a região que dará origem à radícula, contígua ao suspensor (fig. 8E, G, 9A-B, 10A-F). Neste estádio, as células da exotesta são ornamentadas por fileiras protrusões piliformes que se projetam da superfície externa da semente como evaginações da parede periclinal externa (fig. 8F-G, 9C, 10D, 12A). As protrusões piliformes são curvadas em *N. amazonum* e *N. caerulea* (fig. 8F-G, 9C, 12A), enquanto que *N. lotus* são mais retas e se estendem perpendicularmente à superfície da exotesta (fig. 10D).

A vacuolação de células meristemáticas subjacentes à protoderme sinaliza a diferenciação do meristema fundamental, ocorrendo tanto nos cotilédones quanto na região do epicótilo (fig. 8E, 10A-B). Apenas as camadas mais internas de células meristemáticas permanecem indiferenciadas, exibindo citoplasma denso, não vacuolado, e núcleo central proeminente (fig. 8E, 9A, 10B). À medida que os cotilédones se expandem em direção ao polo calazal da semente, tanto a plúmula quanto uma radícula incipiente projetam-se em polos opostos do eixo embrionário (fig. 8G, 9A-B, 10B-C). Neste momento, já é possível observar

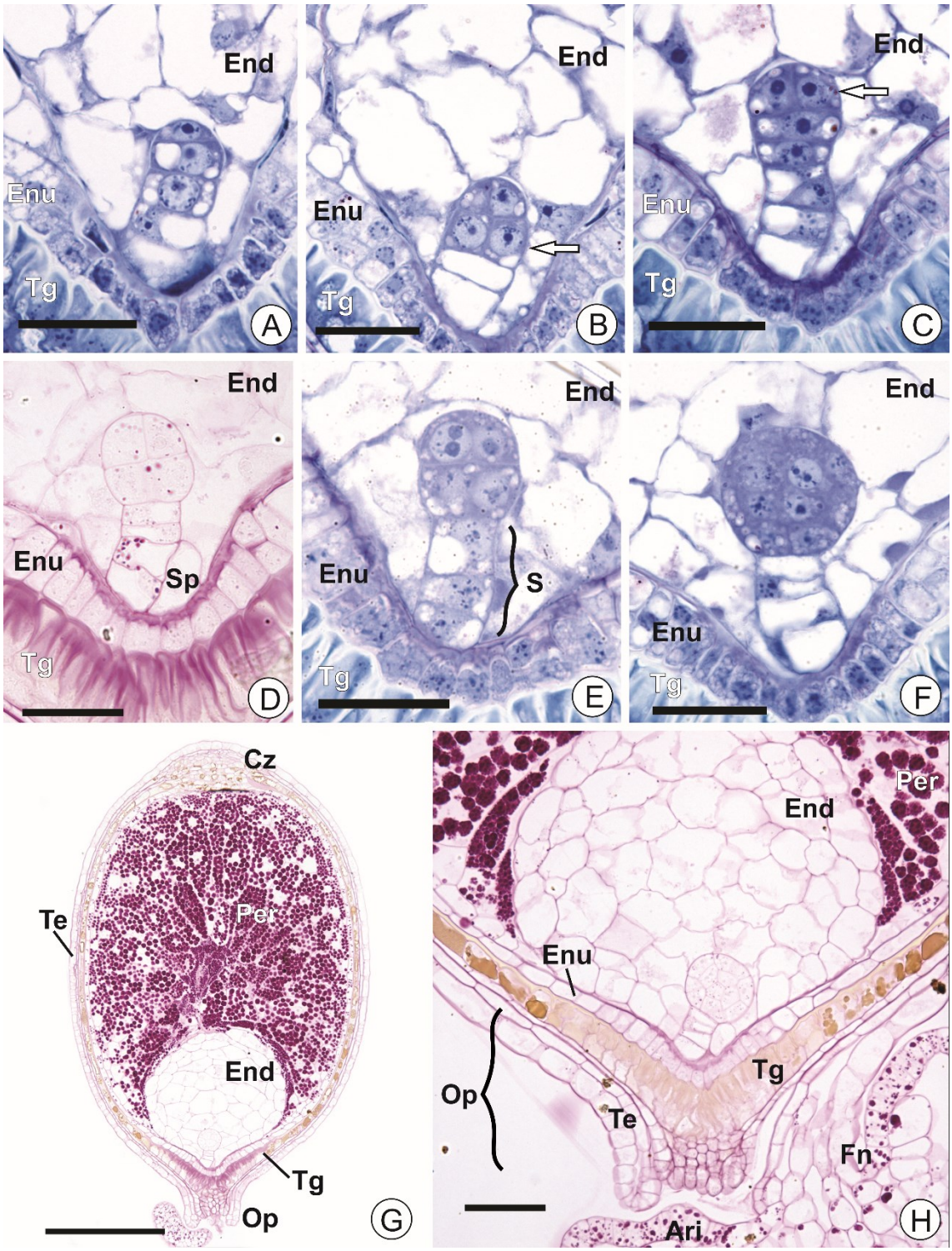

End
Enu
Tg
A
End
Enu
Tg
B
End
Enu
Tg
C
End
Enu
Sp
Tg
D
End
Enu
S
Tg
E
End
Enu
Tg
F
Cz
Te
Per
End
Tg
Op
G
Per
End
Enu
Op
Tg
Te
Fn
Ari
H

Figura 05. Secções longitudinais da semente de *Nymphaea amazonum* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Proembrião com cinco células. (B-C) Formação das primeiras paredes celulares verticais após divisão de derivadas da célula apical do proembrião bicelular (setas brancas). (D-E) Estádio octocelular do proembrião, com suspensor de 2-4 células vacuoladas portando amiloplastos dispersos pelo citoplasma. (F) Embrião globular. (G) Visão geral da secção longitudinal da semente exibindo formato aproximadamente circular do endosperma. Notar amiloplastos pelo perisperma. (H) Região opercular da semente no estágio de embrião globular. Notar progresso no desenvolvimento do arilo e esclereificação dos espessamentos de paredes da camada interna do tegumento interno (endotégmen). Colorações: A-C, E-F – azul de toluidina O; D, G-H – PAS. Escala: A-F – 30 μm; H – 50 μm; G – 200 μm. Ari – arilo, Cz – Calaza, End – endosperma, Enu – epitélio nucelar, Fn – funículo, Op – região opercular, Per – perisperma, S – suspensor, Te – tegumento externo, Tg – endotégmen.

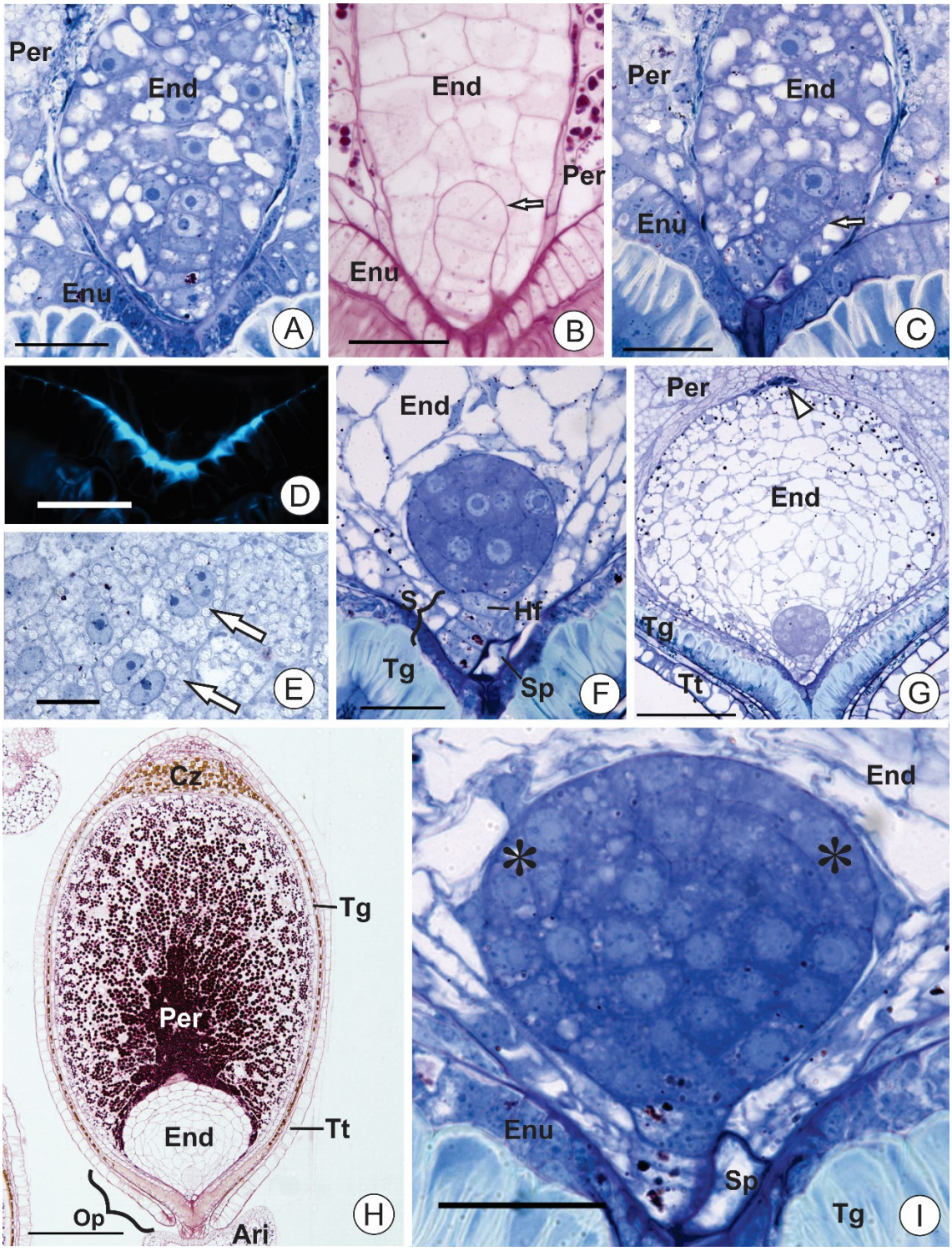

Per
End
Enu
A
End
Per
Enu
B
Per
End
Enu
C
D
End
S
Hf
Tg
Sp
F
Per
End
Tg
Tt
G
E
Cz
Tg
Per
End
Tt
Op
Ari
H
End
Enu
Sp
Tg
I

Figura 06. Secções longitudinais da semente de *Nymphaea caerulea* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Proembrião com seis células. (B-C) Formação das primeiras paredes celulares longitudinais em derivadas da célula apical do proembrião bicelular (setas brancas). (D) Celulose nas paredes periclinais internas e parte das anticlinais da porção micropilar da epiderme nucelar. (E) Corte transversal da semente evidenciando células binucleadas do perisperma (seta brancas). Organelas citoplasmáticas não coradas consistem em amiloplastos. (F) Estádio globular do embrião. Observar suspensor com quatro células, uma delas diferenciada em hipófise. (G) Aspecto geral da secção longitudinal da semente, no mesmo estádio da imagem anterior, na qual se pode observar o formato aproximadamente circular do endosperma. Resquícios da célula haustorial do domínio calazal do endosperma podem ser visualizados junto à porção superior do domínio micropilar do endosperma, esmagados contra o perisperma (ponta de seta branca). No estrato mais externo do endosperma é possível notar grãos de aleurona. (H) Aspecto geral da semente no mesmo estádio da fotomicrografia anterior; notar distribuição de amiloplastos pelo perisperma. (I) Embrião cordiforme precoce, resultante do início do desenvolvimento dos cotilédones (asteriscos). Colorações: A, C, E-G, I – azul de toluidina O; B, H – PAS. Escala: A-E, H – 30 μm; F – 100 μm; G – 200 μm. Ari – arilo, Cz – calaza, End – endosperma, Enu – epitélio nucelar, Hf – hipófise, Ht – célula haustorial do domínio calazal do endosperma, Op – região opércular, Per – perisperma, S – suspensor, Sp – sinérgide persistente, Tt – exotesta, Tg – endotégmen.

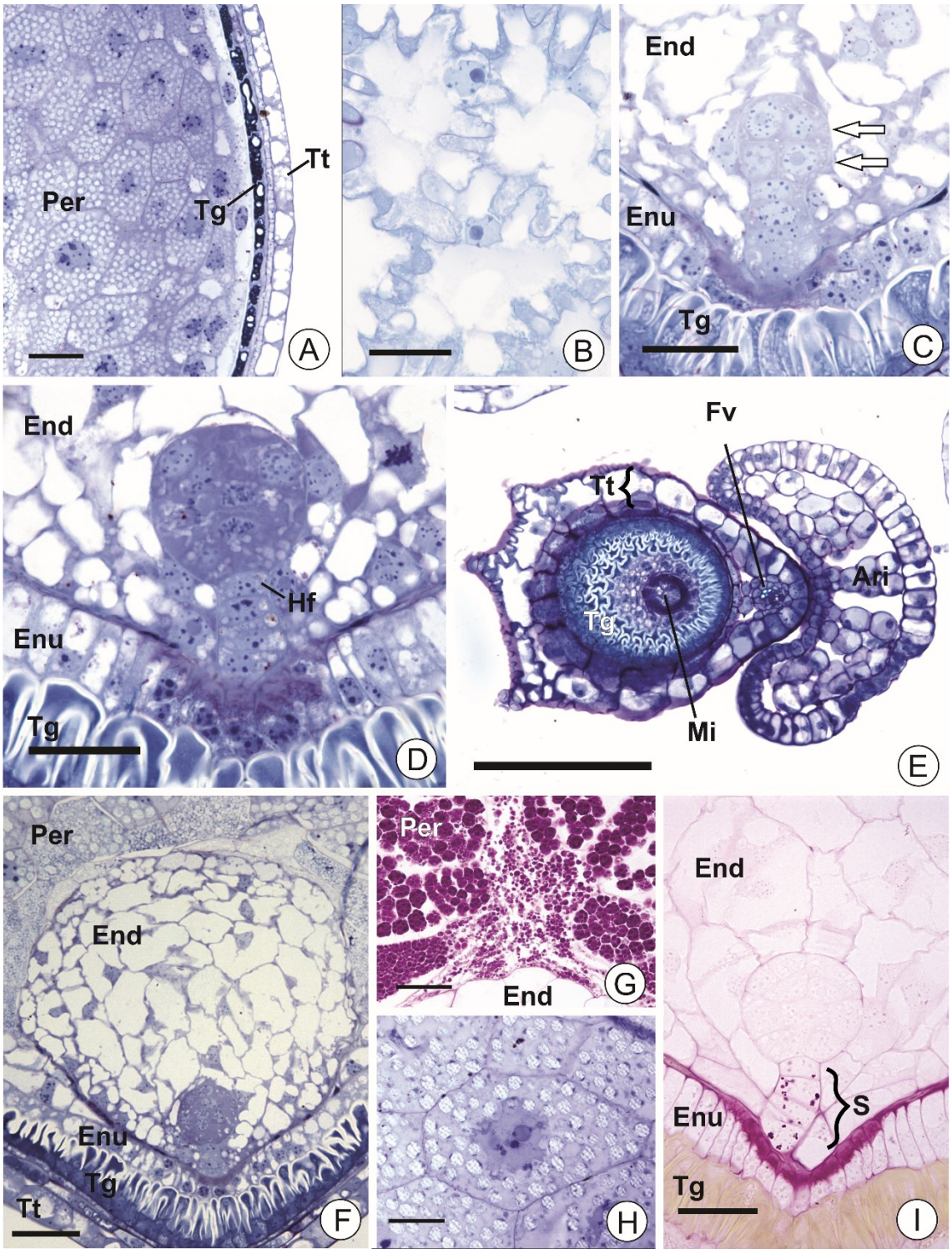

Per
Tg
Tt
A
B
End
Enu
Tg
C
End
Hf
Enu
Tg
D
Fv
Tt
Tg
Ari
Mi
E
Per
End
Enu
Tg
Tt
F
Per
End
G
End
H
End
Enu
S
Tg
I

Figura 07. Secções longitudinais, transversais e tangenciais da semente de *Nymphaea lotus* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Detalhe da semente no estádio de embrião globular mostrando perisperma, endotégmen e exotesta. (B) Corte paradérmico das células da exotesta, no mesmo estágio da figura anterior, mostrando paredes anticlinais sinuosas. (C) Formação das primeiras paredes celulares verticais em derivadas da célula apical do proembrião bicelular (setas brancas). (D) Estádio inicial do embrião globular. Observar suspensor com quatro células, uma delas diferenciada em hipófise. (E) Secção transversal da semente na altura do complexo micrópila-hilo, no qual não é possível observar células exotestais entre as duas estruturas. (F) Formato aproximadamente esférico do endosperma durante o estádio de embrião globular. (G) Detalhe da região do perisperma anteriormente ocupada pela célula haustorial do domínio calazal do endosperma. (H) Célula perispérmica. (I) Estádio de embrião globular. Notar que paredes periclinais internas da porção micropilar da epiderme nucelar permanece PAS-positivas; observar também presença de amiloplastos nas células no suspensor. Colorações: A- F, H – azul de toluidina O; G-I – PAS. Escala: B-D, G-I – 30 μm; A, F – 50 μm; E – 200 μm. Ari – arilo, End – endosperma, Enu – epitélio nucelar, Fv – feixe vascular, Hf – hipófise, Mi – micrópila, Per – perisperma, S – suspensor, Tg – endotégmen, Tt – exotesta.

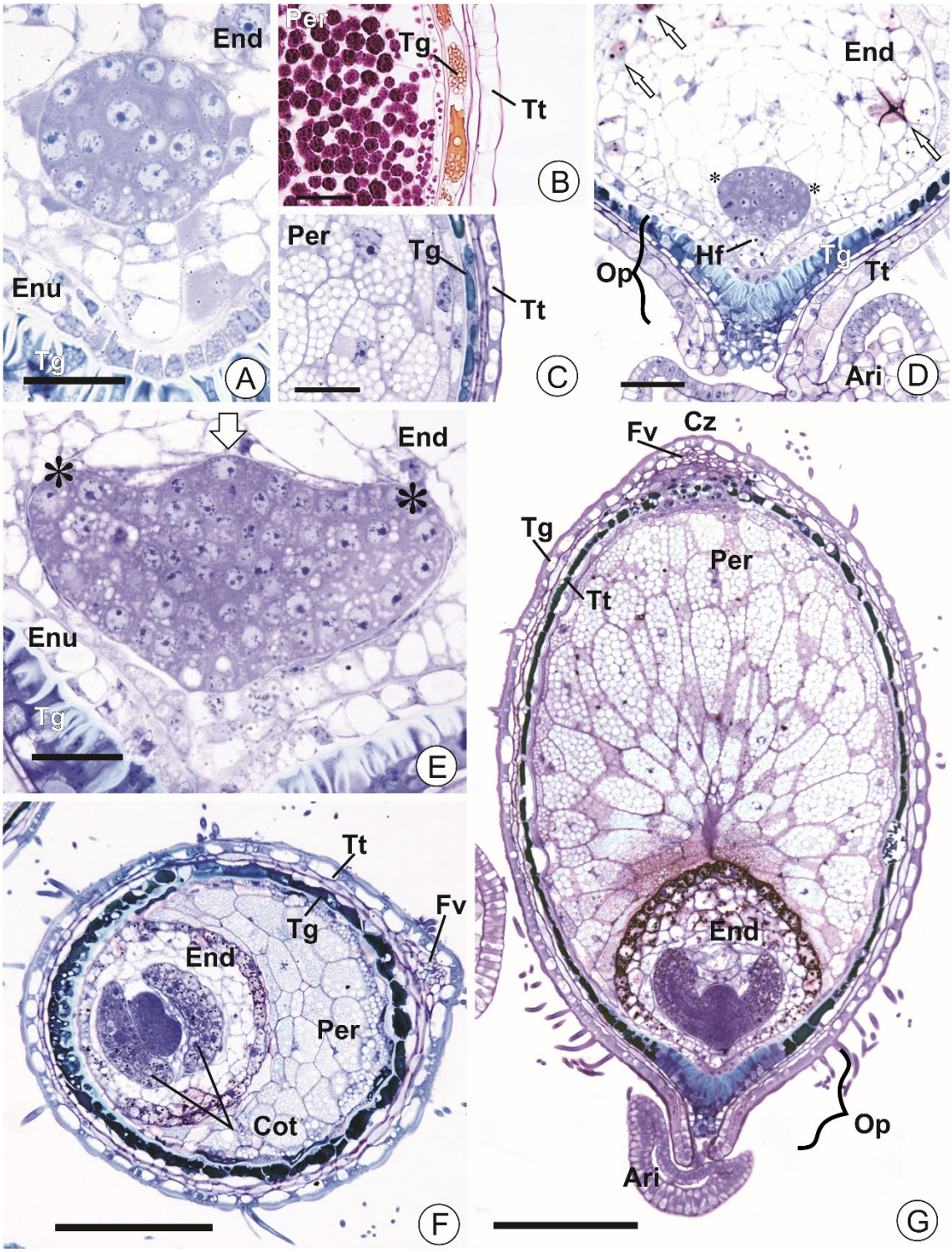

End
Enu
Tg
A
Per
Tg
Tt
B
Per
Tg
Tt
C
End
Op
Hf
Tg
Tt
Ari
D
End
Enu
Tg
E
Tt
Tg
Fv
End
Per
Cot
F
Fv
Cz
Tg
Tt
Per
End
Op
Ari
G

Figura 08. Secções longitudinais e transversais da semente de *Nymphaea amazonum* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Estádio globular do embrião. (B-C) Detalhe da exotesta, endotégmen, morfologia das células perispérmicas, assim como dos amiloplastos neste tecido. (D) Região opercular da semente na transição entre o estádio de proembrião globular e o estádio de embrião cordiforme, resultante do início do desenvolvimento dos cotilédones (asteriscos). No estrato mais externo do endosperma é possível notar grânulos citoplasmáticos que coram intensamente de magenta pelo azul de toluidina O (setas brancas). Notar que uma das células do suspersor se diferenciada em hipófise. (E) Secção longitudinal do embrião no estádio cordiforme intermediário, evidenciando uma protuberância central que originará o epicótilo (seta branca larga), flanqueada pelos cotilédones emergentes (asteriscos). (F) Corte transversal da semente próxima à maturidade, evidenciando posição relativa do embrião + endosperma em relação ao perisperma e rafe, note que já é possível diferenciar os dois primórdios foliares da plúmula. (G) Aspecto geral de uma semente no estádio cordiforme tardio, no qual já é possível observar protrusões piliformes na superfície da exotesta. Colorações: A, B-G – azul de toluidina O; B – PAS. Escala: A-C, E – 30 μm; D – 50 μm; F-G – 200 μm. Ari – arilo, Cot – cotilédones, Cz – calaza, End – endosperma, Enu – epitélio nucelar, Fv – feixe, Hf – hipófise, vascular, Op – região opercular, Per – perisperma, Tt – testa, Tg – endotégmen.

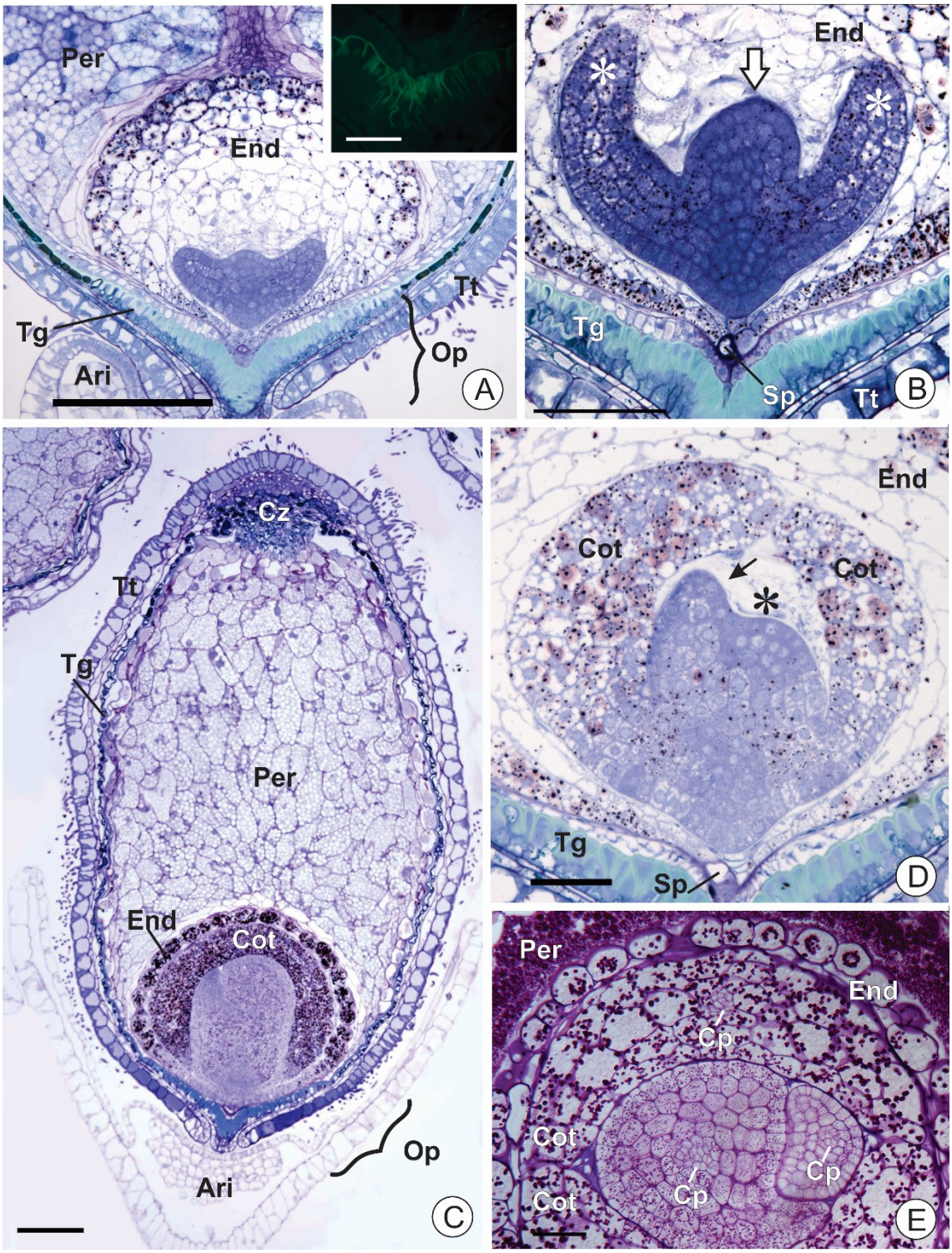

Per
End
Tt
Tg
Op
Ari
A
End
Tg
Sp
Tt
B
Cz
Tt
Tg
Per
End
Cot
Op
Ari
C
End
Cot
Cot
Tg
Sp
D
Per
End
Cp
Cot
Cp
Cot
Cp
E

Figura 09. Secções longitudinais e transversais da semente de *Nymphaea caerulea* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Endosperma com formato elíptico, no estádio de embrião cordiforme. No seu estrato mais externo há um incremento no número e dimensões dos grãos de aleurona. A inserção superior direita evidencia uma leve deposição de calose nas paredes periclinas internas e parte das anticlinais das células da porção micropilar do endotégmen. (B) Secção longitudinal do embrião em um estádio intermediário (entre as fases cordiforme e torpedo), evidenciando uma protuberância central que consiste na região onde se localiza o promeristema do epicótilo e que dará origem ao epicótilo (seta branca), flanqueada pelos cotilédones em desenvolvimento (asteriscos brancos). (C) Visão geral do corte longitudinal da semente passando por primeiro par de primórdios foliares da plúmula. (D) Estádio imediatamente anterior à maturidade da semente, no qual é possível observar a emergência do primeiro primórdio foliar a partir da região do epicótilo (seta preta). É possível distinguir claramente o promeristema do epicótilo lateralmente do primeiro primórdio foliar (asterisco preto). (E) Corte transversal da semente madura, no qual se pode observar o arranjo decussado dos primórdios foliares em relação aos cotilédones, também é possível identificar ramificações do cilindro procambial emitidas para cada um dos órgãos citados. Colorações: inserção superior direita A – azul de anilina; A-D – azul de toluidina O; E – PAS. Escala: D - E – 50 μm; B – 100 μm; C – 150 μm; A – 200 μm. Ari – arilo, Cp – cilindro procambial e ramificações, Cz – calaza, End – endosperma, Enu – epitélio nucelar, Op – região opércular, Per – perisperma, Sp – sinérgide persistente, Tt – exotesta, Tg – endotégmen.

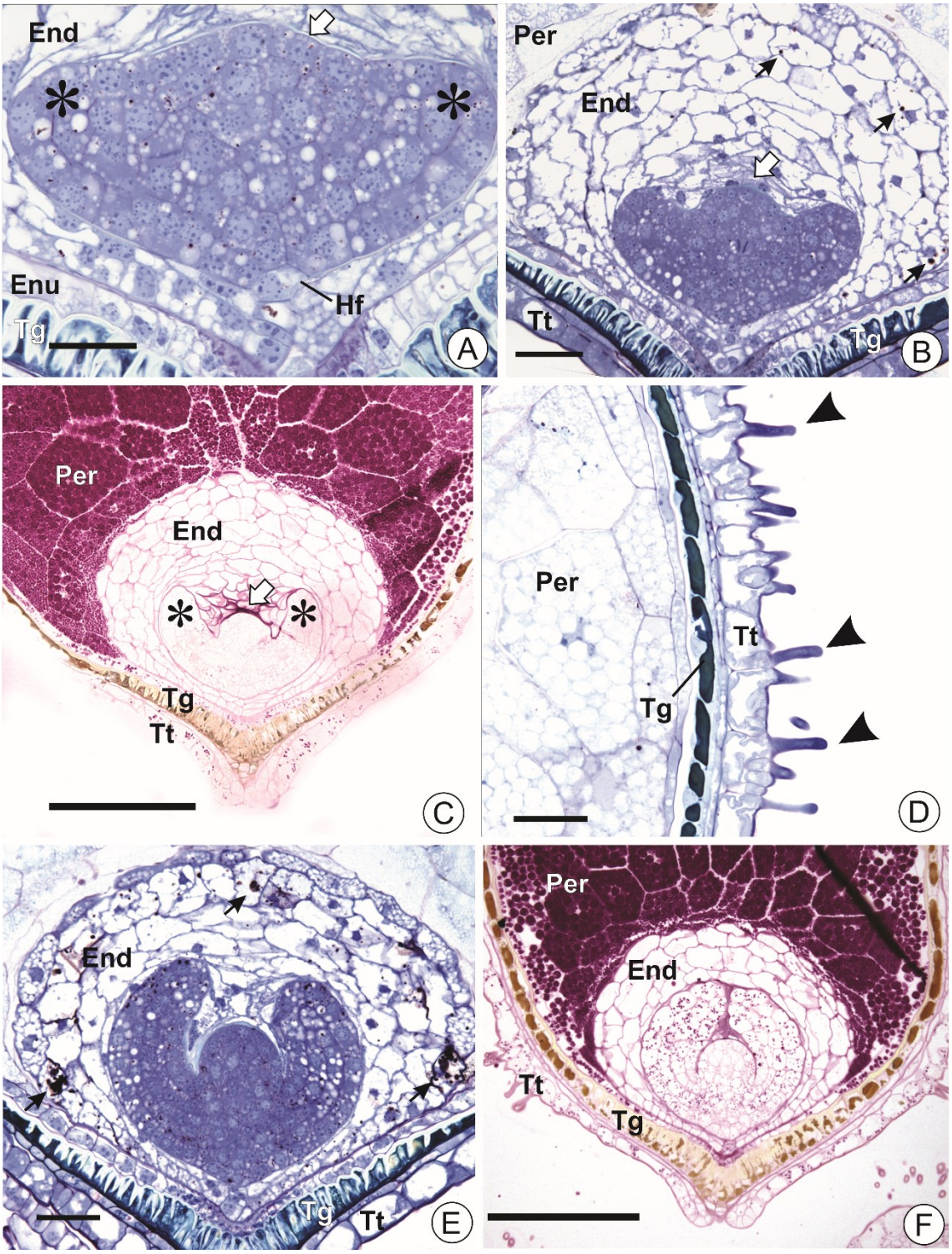

End
Enu
Hf
Tg
A
Per
End
Tt
Tg
B
Per
End
Tg
Tt
C
Per
Tt
Tg
D
End
Tg
Tt
E
Per
End
Tt
Tg
F

Figura 10. Secções longitudinais e transversais da semente de *Nymphaea lotus* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A-C) Secções longitudinal do embrião cordiforme em estádios sucessivos, evidenciando uma protuberância central que originará o epicótilo (seta branca larga), flanqueada pelos cotilédones em desenvolvimento (asteriscos). O endosperma possui formato elíptico e no seu estrato mais externo é possível identificar grãos de aleurona (setas pretas - B). (D) Detalhe indicando protrusões piliformes na exotesta (pontas de seta pretas). (E-F) Estádio imediatamente entre o embrião cordiforme e torpedo, evidenciando o progressivo crescimento dos cotilédones em direção ao topo do epicótilo, grãos de aleurona estão evidentes (seta preta). Colorações: inserção superior direita A – azul de anilina; A-B, D-E – azul de toluidina O; C, F – PAS. Escala: A – 30 μm: B, D-F – 50 μm; C – 200 μm. End – endosperma, Enu – epitélio nucelar, Per – perisperma, Tt – exotesta, Tg – endotégmen.

nos cotilédones, grande número de pequenos grânulos que se coram intensamente de magenta pelo azul de toluidina (fig. 8G, 9B, D, 10E, 11A). Tais grânulos também podem ser observados nas camadas mais externas do endosperma a partir do estádio de embrião globular tardio, assim que se inicia a formação dos cotilédones (fig. 6F, 8D).

A expansão dos cotilédones progride até que se curvem e se interceptem no topo do epicótilo envolvendo-o completamente (fig. 9D, 11A, 13B). Neste momento, a concentração de grânulos citoplasmáticos é elevada nas células cotiledonares, e a região do epicótilo passa por um processo acelerado de proliferação celular que resulta na emergência de uma protuberância correspondente ao primeiro primórdio foliar (fig. 8F, 9D, 11A, 13 B). Na maturidade da semente, o embrião em estádio de torpedo exibe dois primórdios foliares no epicótilo, os quais exibem crescimento assimétrico e filotaxia decussada em relação aos cotilédones (fig. 9C, E, 11C, G-H, 12A, E, 13C-D).

O crescimento do eixo embrionário e, principalmente, dos cotilédones faz com que o endosperma seja restrito a uma ou duas camadas celulares situadas entre o embrião e o perisperma (fig. 11B-H, 12A-F, 13C-F). As células do embrião, sobretudo aquelas localizadas nos cotilédones, passam a mostrar uma grande quantidade de amiloplastos simples dispersos pelo citoplasma, assim como as células endospérmicas (fig. 11C, F, 12C-D, F, 13D, F). O arilo já se encontra completamente desenvolvido, e após se expandir na direção calazal em estádios anteriores (fig. 4H, 5H, 6H, 8D, 9A), por meio de divisões anticlinais de suas células epidérmicas, cobre o primeiro terço da semente a partir da região micropilar (fig. 9C). É delimitado por uma epiderme com células retangulares, em secção longitudinal, maiores na face convexa voltada para o exterior e menores na face côncava voltada para a exotesta. O aerênquima, em seu interior, possui células esparsas, principalmente na região da micrópila, em uma ampla câmara preenchida por ar (fig. 9C, 12E, 13A). Na semente madura, o arilo é translúcido.

Após a emergência do primeiro primórdio foliar, um cordão central de células se alonga paralelamente aos eixos embrionário e dos cotilédones, apresentando citoplasma denso, núcleos centrais que ocupam a maior parte do protoplasto e dimensões reduzidas em relação as células adjacentes, originando então o procâmbio (fig. 9E, 11B-C, 12B, 13C). O promeristema do epicótilo já é identificável lateralmente ao primeiro primórdio foliar do embrião, exibindo células com citoplasma denso, amplos núcleos centrais com nucléolos conspícuos e dimensões intermediárias entre as células procambiais e as células do meristema fundamental (fig. 9D, 11G-H); estas últimas exibem um grande número de diminutos vacúolos dispersos pelo citoplasma, portam quantidade moderada de corpúsculos que se coram de magenta pelo azul de toluidina (fig. 9D, 11G-H, 12E, 13C), além de diminutos amiloplastos dispersos pelo

citoplasma (fig. 9E, 11F, 12 C-D, F, 13D, F). As células do promeristema da radícula, assim como as células do promeristema do epicótilo, portam citoplasma denso com núcleo central e nucléolo conspícuo, além de várias regiões heterocromáticas dispersas pelo nucleoplasma. As células do promeristema da radícula são menores que as células do meristema fundamental, são menos vacuoladas e praticamente não exibem inclusões citoplasmáticas (Fig. 9D, 11G-H, 12B, E, 13E).

Na semente madura de todas as espécies de *Nymphaea* analisadas, as células protodérmicas do eixo epicótilo-radicular são cúbicas com pequenos vacúolos esféricos dispersos pelo citoplasma e núcleo central (fig. 11G-H, 12E, 13C-D). O embrião maduro passa a apresentar um cilindro procambial central que emite ramificações próximas à região radicular para cada um dos cotilédones (fig. 9E, 11B, G-H, 12B, E, 13C, E). Ocorre também uma bifurcação do procâmbio em direção a cada um dos primórdios foliares, sendo que as células procambiais possuem dimensões menores e densidade citoplasmática superior aos tecidos embrionários adjacentes, tendem a ser alongadas paralelamente ao eixo embrionário e não apresentam grânulos citoplasmáticos, embora estas inclusões citoplasmáticas possam ser observadas no meristema fundamental do eixo epicótilo-radicular, assim como nos cotilédones e endosperma (fig. 9E, 11B, G-H, 12B, E, 13C, E). Estes grânulos citoplasmáticos se mostraram levemente positivos para o azul de bromofenol (fig. 11D) e para o vermelho de rutênio (fig. 11E). Neste estádio tanto os cotilédones quanto o endosperma apresentam amiloplastos simples, embora eventualmente possa haver mais de um grão de amido em cada amiloplasto (fig. 11C, F, 12C-D, F, 13D, F). As células do eixo epicótilo-radicular também exibem diminutos amiloplastos dispersos pelo citoplasma (fig. 9E, 11B, G-H, 12B, E, 13C, E). Os grânulos que se coram de magenta pelo azul de toluidina e são levemente positivos para o azul de bromofenol (fig. 11D) e o vermelho de rutênio (fig. 11E) são abundantes tanto nos tecidos cotiledonares quanto na camada remanescente do endosperma que envolve o embrião.

Discussão

Endospermogênese

No momento da dupla fecundação em *Cabomba piauhiensis*, *Brasenia purpurea*, *N. advena*, *N. pubescens* (= *Castalia pubescens*) e *N. thermarum*, o núcleo da célula central se posiciona próximo ao aparelho oosférico (Cook 1906, Povilus et al., 2015); contudo, este posicionamento não corresponde ao encontrado para o mesmo estádio de *N. caerulea*, no qual o núcleo endospérmico primário se localiza na região afunilada mediana do ginófito. Para as

outras espécies de *Nymphaea* investigadas não foi possível observar este estádio de desenvolvimento. A intensa coloração associada à descarga do conteúdo do tubo polínico na sinérgide impediu a observação dos núcleos das células espermáticas em *Nymphaea*, embora seja possível deduzir, indiretamente, com base na ontogenia do ginófito (vide capítulo II desta tese), que o núcleo da célula endospérmica primária é 2n. Atualmente, a presença de um endosperma diploide é considerado uma condição plesiomórfica para as angiospermas (Williams & Friedman, 2002; Friedman & Williams, 2004; Friedman & Bachelier, 2013), embora haja alguma incerteza quando se leva em conta a presença de um núcleo secundário diploide na célula central em Amborellaceae (Friedman & Ryerson, 2009).

Em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus*, a primeira divisão transversal do endosperma ocorre na região afunilada mediana do ginófito, ligeiramente mais próxima ao domínio micropilar. A divisão transversal da célula endospérmica primária teria surgido no ancestral comum de Nymphaeales, consistindo em uma autapomorfia para a ordem, uma vez que em Amborellales, Austrobaileyales e demais angiospermas basais a primeira divisão do endosperma é oblíqua consistindo, portanto, no estado de caráter plesiomórfico para as angiospermas (Floyd & Friedman, 2000, 2001). Nas três espécies analisadas neste trabalho, assim como relatado para a maioria das famílias de Nymphaeales, a primeira divisão do endosperma delimita, com exatidão, os domínios micropilar e calazal, algo que não ocorre em outros membros do grado ANA e demais angiospermas basais (Floyd & Friedman, 2000, 2001; Povilus et al., 2015).

No que concerne ao tamanho relativo das duas primeiras células do endosperma, a célula micropilar das espécies de *Nymphaea* analisadas tende a ser pouco menor que a calazal, assim como referido para *Nuphar polysepala* (=*Nuphar lutea* ssp. *polysepala*) (Floyd & Friedman, 2001), embora *Cabomba caroliniana* tenha apresentado uma célula calazal muito menor que a micropilar (Floyd & Friedman, 2001). Nestas espécies a célula calazal exibe um núcleo amplo, provavelmente, politênico devido a ciclos de endorreduplicação (Rudall et al., 2009; Povilus et al., 2015). Pelo menos em Nymphaeaceae e Cabombaceae (talvez em Hydatellacae – Rudall et al., 2009) a célula do domínio calazal do endosperma passa a funcionar como um haustório, embora a longevidade e a profundidade alcançada pelo haustório no perisperma de *Cabomba* e *Nuphar* se mostraram muito superiores à *Nymphaea* (Floyd & Friedman, 2000, 2001). Em *N. ampla* o domínio calazal do endosperma, assim como as espécies de *Nymphaea* estudadas, é absorvido contemporaneamente à expansão do domínio micropilar

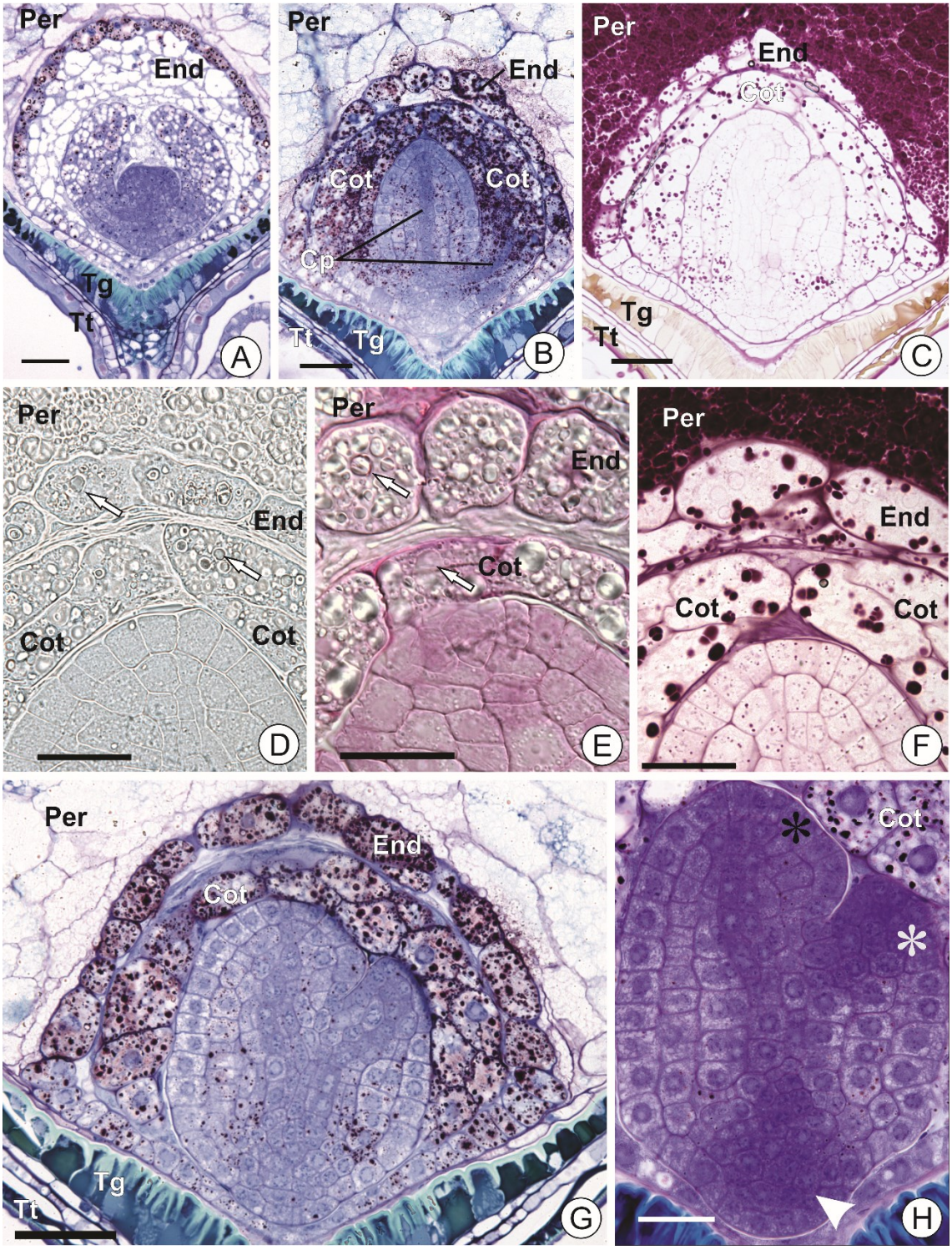

Per
End
Tg
Tt
A
Per
End
Cot
Cot
Cp
Tt
Tg
B
Per
End
Cot
Tg
Tt
C
Per
End
Cot
Cot
D
Per
End
Cot
E
Per
End
Cot
Cot
F
Per
End
Cot
Tg
Tt
G
Cot
H

Figura 11. Secções longitudinais e transversais da semente de *Nymphaea amazonum*. (A) Embrião no qual os cotilédones estão próximos de envolver completamente a epicótilo. O endosperma apresenta formato ovalado, além de grânulos citoplasmáticos dispersos pelo seu estrato mais externo. Tais grânulos também estão presentes nos cotilédones. (B) Corte longitudinal passando pelo maior dos primórdios foliares, evidenciando seu suprimento procambial e o de um dos cotilédones. (C) Corte longitudinal passando por ambos os primórdios foliares. Notar presença de amiloplastos nas células embrionárias (principalmente nos cotilédones) e nas células endospérmicas. Contudo, o perisperma detem a maior reserva nutritiva (amiloplastos compostos) na semente madura. (D-E) Região de interface entre perisperma e endosperma, no qual podemos observar a distribuição dos grânulos anteriormente citados, provavelmente grãos de aleurona, nas células do endosperma, assim como nos cotilédones do embrião (setas brancas). Sua reatividade aos testes histoquímico para proteínas (D) e a polissacarídeos ácidos (E). Ambas as fotomicrografias obtidas sob contraste de interferência diferencial de Nomarski. (F) Mesma região das duas fotomicrografias anteriores, evidenciando a presença de amiloplastos no endosperma, no embrião e no perisperma. (G) Corte longitudinal do embrião em estádio de torpedo, passando pelos dois primórdios foliares. Observa-se também parte da porção opercular da semente madura. (H) Detalhe do eixo epicótilo-radicular, com cilindro procambial emitindo ramificações tanto para o maior (asterisco preto) quanto para o menor primórdio foliar (asterisco branco). Observa-se também o promeristema da radícula (ponta de seta branca). Colorações: A-B, G-H – azul de toluidina O; C, F – PAS. D – azul de bromofenol; E – vermelho de rutênio; Escala: D-F, H – 30 μm; A-C,G – 50 μm. Cot – cotilédones, Cp – cilindro procambial e ramificações, End – endosperma, Per – perisperma, Tt – testa, Tg – endotégmen.

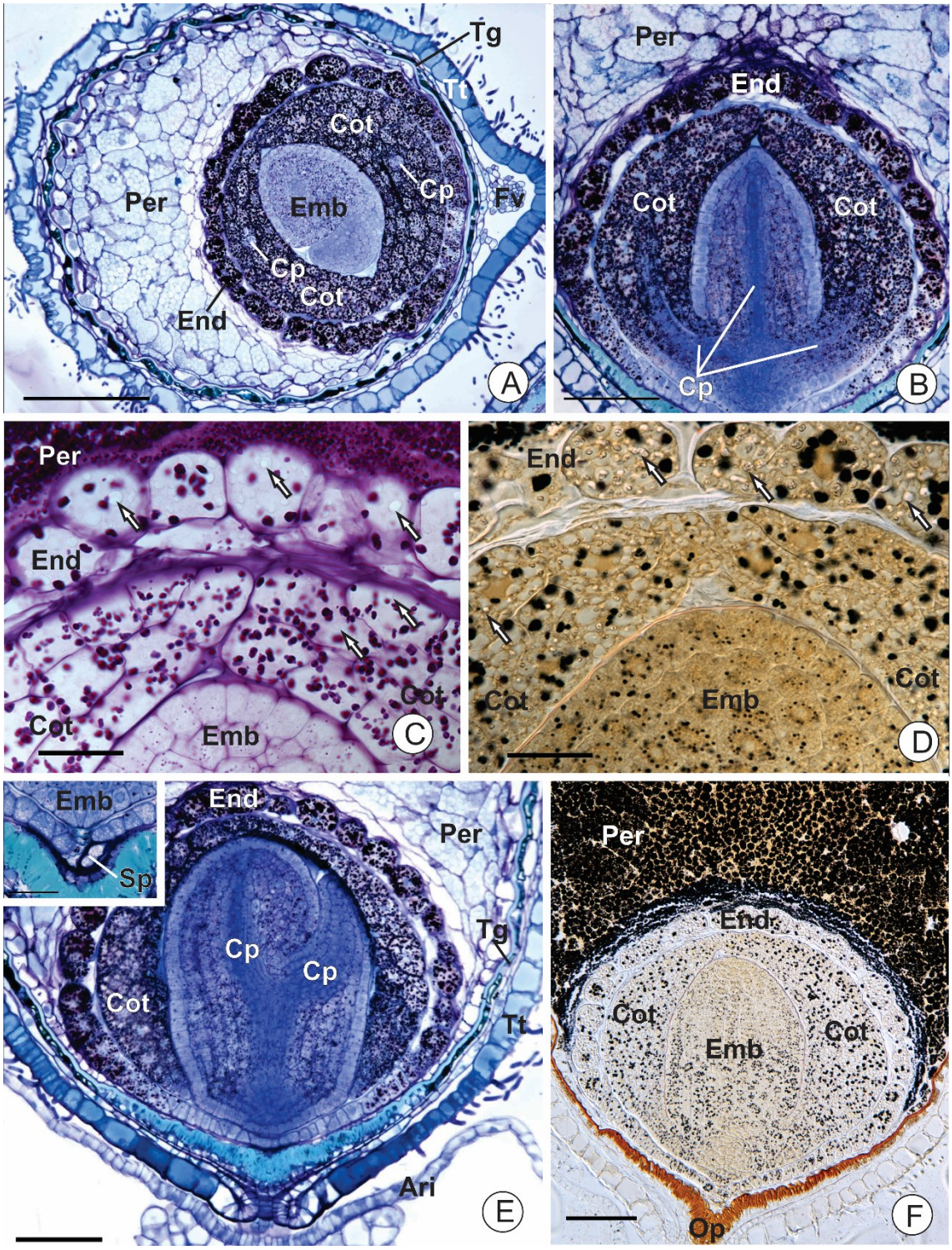

Tg
Tt
Cot
Per
Emb
Cp
Fv
Cp
Cot
End
A
Per
End
Cot
Cot
Cp
B
Per
End
Cot
Cot
C
End
Cot
Emb
Cot
D
Emb
Sp
End
Per
Cp
Cp
Tg
Cot
Tt
Ari
E
Per
End
Cot
Emb
Cot
Op
F

Figura 12. Secções longitudinais e transversais da semente madura de *Nymphaea caerulea* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Corte transversal evidenciando posicionamento do embrião/endosperma dentro da semente. (B) Corte longitudinal passando pelo maior dos primórdios foliares, evidenciando o suprimento procambial do mesmo e dos cotilédones. (C-D) Cortes longitudinais passando pelo maior dos primórdios foliares. As fotomicrografias foram obtidas com a utilização de contraste de interferência diferencial de Nomarski. É possível observar os grãos de aleurona, de natureza cristalina, dispersos pelo citoplasma das células do endosperma e do embrião (setas brancas). Atentar para a presença de amiloplastos no endosperma e embrião, além daqueles presentes no perisperma. (E) Corte longitudinal passando por ambos os primórdios foliares. Notar ramificação do procâmbio para suprir cada um deles. (F) Corte longitudinal passando pelo maior dos primórdios foliares. Colorações: A-B, E – azul de toluidina O; F, D – IKI; C – PAS. Escala: C-D, E - inserção – 30 μm; A-B, E-F – 100 μm. Ari – arilo, Cot – cotilédone, Cp – cilindro procambial e ramificações, End – endosperma, Enu – epitélio nucelar, Fv – feixe vascular, Per – perisperma, Sp – sinérgide persistente, Tt – exotesta, Tg – endotégmen.

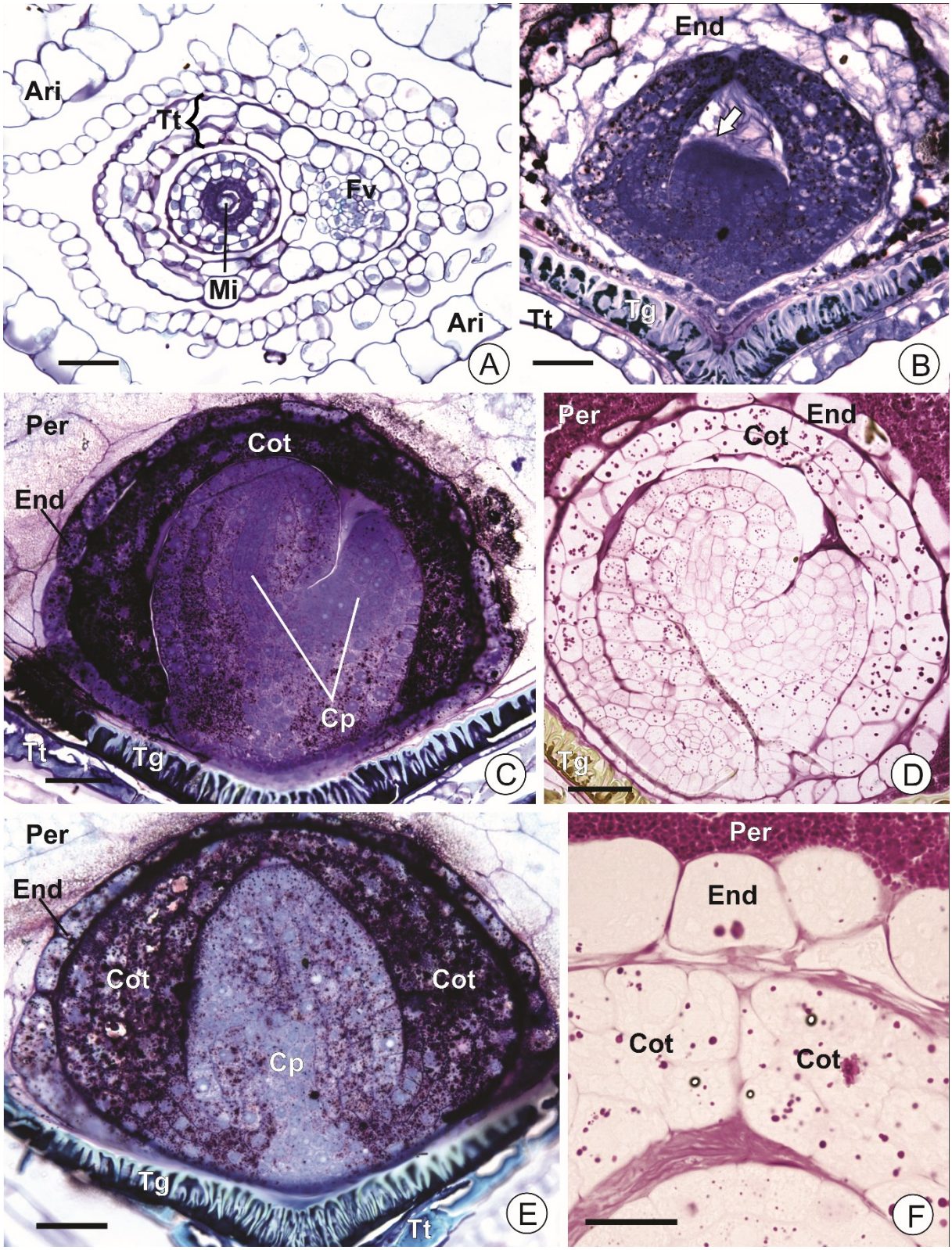

Ari
Tt
Fv
Mi
Ari
A
End
Tt
Tg
B
Per
Cot
End
Cp
Tt
Tg
C
Per
End
Cot
Tg
D
Per
End
Cot
Cot
Cp
Tg
Tt
E
Per
End
Cot
Cot
F

Figura 13. Secções longitudinais e transversais da semente de *Nymphaea lotus* em sucessivos estádios de desenvolvimento. (A) Secção transversal da semente madura na altura do complexo micrópila-hilo, no qual não é possível observar células exotestais entre as duas estruturas. (B) Estádio imediatamente anterior à maturidade da semente, é possível observar a emergência do primeiro primórdio foliar a partir do meristema apical do epicótilo (seta branca). (C-D) Corte longitudinal passando por ambos os primórdios foliares. Notar ramificação do procâmbio para suprir cada um dos primórdios foliares, e os grãos de aleurona nos cotilédones e endosperma (C). (E) Corte longitudinal passando por ambos os primórdios foliares. (E) Corte longitudinal passando pelo maior dos primórdios foliares. (F) Detalhe da semente madura evidenciando presença de amiloplastos no endosperma e cotilédones. Colorações: A-B, C, E – azul de toluidina O; D, F – PAS. Escala: F – 30 μm; A-E – 50 μm. Ari – arilo, Cot – cotilédone, Cp – cilindro procambial e ramificações, End – endosperma, Fv – feixe vascular, Mi – micrópila, Per – perisperma, Tt – exotesta, Tg – endotégmen.

do endosperma, sendo comprimido contra o perisperma (Cook et al., 1906). Rudall et al. (2009) descreve que o haustório de *Trithuria submersa* se degenera originando um espaço entre a porção calazal do domínio micropilar do endosperma e o perisperma (Rudall et al., 2009), embora Friedman et al. (2012) afirme que a célula haustorial do endosperma inexiste nesta espécie.

Povilus et al. (2015), defende que a presença de uma célula haustorial conspícua no domínio calazal do endosperma, pode estar relacionada com a disponibilidade de nutrientes (amiloplastos) durante o desenvolvimento da semente. Ou seja, as espécies de Nymphaeales que possuem menores reservas no perisperma, próximo ao embrião em desenvolvimento, apresentam um haustório calazal mais desenvolvido, como em *Cabomba* e *Nuphar* (Floyd & Friedman, 2000, 2001). Por outro lado, nas espécies em que o perisperma adjacente ao embrião é provido de grandes quantidades de amiloplastos, como é o caso de *Trithuria submersa* e *N. thermarum*, não ocorre um desenvolvimento tão pronunciado do haustório calazal (Friedman et al., 2012; Polivus et al. 2014), *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* se adequam ao segundo tipo, visto que apresentam abundante quantidade de amiloplastos no perisperma e não exibem um haustório calazal desenvolvido na maturidade da semente.

O endosperma consiste em um tecido sexualmente derivado que está envolvido na nutrição embrionária, sendo uma característica única ao ciclo de vida das angiospermas (Floyd & Friedman, 2001). A literatura embriológica tradicionalmente estabelece a existência de três principais tipos de desenvolvimento do endosperma nas plantas com flores; seriam eles: (1) endosperma nuclear, no qual as primeiras fases do desenvolvimento do endosperma são caracterizadas pela ocorrência de ciclos mitóticos sem que haja citocinese; (2) endosperma *ab initio* celular, no qual os ciclos mitóticos sempre são seguidos por celularização; e (3) helobial, no qual após uma primeira divisão transversal da célula endospérmica primária, ocorrem divisões acitocinéticas no domínio micropilar (Vijayaraghavan & Prabhakar, 1989; Floyd & Friedman, 2001). Em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* o endosperma se mostrou *ab initio* celular. Na literatura que versa sobre a endospermogênese em Nymphaeales, embora a maioria dos relatos aponte para um endosperma *ab initio* celular (Cook, 1902, 1906, 1909; Conard, 1905; Seaton, 1908; Guttenberg & Müller-Schröder, 1958; Khanna, 1964a, b, 1967; Wheeler Haines & Lye, 1975; Schneider, 1978; Schneider & Ford, 1978; Schneider & Jeter, 1982; Osborn & Schneider, 1988 ; Shamrov, 1998 ; Floyd & Friedman, 2000, 2001 ; Williams & Friedman 2002; Rudall et al., 2009; Tuckett et al., 2010, Friedman et al., 2012; Povilus et al., 2015), há relatos de um endosperma nuclear em *Euryale ferox* (Khanna, 1964a,b) e de um endosperma helobial em *Nymphaea stellata* (Khanna, 1967) e *Cabomba caroliniana* (Cook, 1906, e Floyd & Friedman, 2000). Em *Brasenia schreberei* (Cabombaceae) há tanto o relato de

um endosperma helobial (Cook,1906) quanto de um endosperma *ab initio* celular (Khanna 1965).

É importante frisar que deve ser tomado um cuidado adicional com alguns dados provenientes de artigos antigos, sendo que novas verificações são necessárias para certificar que os resultados não foram comprometidos por um processamento histológico deficiente. De qualquer maneira, fica evidente que a condição *ab initio* celular é plesiomórfica para o endosperma de Nymphaeales (Floyd & Friedman, 2000, 2001) e os dados obtidos em *Nymphaea* corroboram esta assertiva. Inclusive, o endosperma celular, provavelmente, consiste na condição plesiomórfica para todas as angiospermas, visto que *Amborella tricophoda* (Floyd & Friedman, 2001) e membros de Austrobaileyales (*Illicium* – Floyd & Friedman, 2001; *Trimenia* – Friedman & Bachelier, 2013) também evidenciam este estado de caráter.

Embora Floyd & Friedman (2001) identifiquem o domínio micropilar como unisseriado em *Nuphar*, generalizando tal organização para Nymphaeaceae, não há um relato mais detalhado das divisões iniciais do endosperma, e tal condição unisseriada do domínio micropilar não está de acordo com os resultados observados neste trabalho. Em *Nymphaea*, houve variações, ao nível de espécie, quanto aos padrões de divisão do domínio micropilar do endosperma, sendo que nenhuma delas apresentou um endosperma estritamente unisseriado, e todas as espécies analisadas tiveram uma tendência a exibir duas fileiras de células flanqueando o zigoto/proembrião em estádios precoces do desenvolvimento. De maneira similar, em *Trithuria submersa*, no estádio tetracelular do domínio micropilar do endosperma, existem duas células dispostas de cada lado do zigoto (Friedman et al., 2012). A aplicação dos padrões de divisão do domínio micropilar do endosperma na sistemática do gênero *Nymphaea* necessita de estudos mais extensivos para verificar se consistem em caracteres filogeneticamente aplicáveis, ou são apenas decorrentes de labilidade, como já foi relatado para outras características embriológicas e florais, e.g., a organização dos ginófito dentro do grado ANA (Friedman, 2006; Friedman & Ryerson, 2009), a filotaxia e número de peças florais (Doust, 2000, 2001; Endress, 1987a,1987b) e aspectos da microsporogênese (Furness et al., 2002). Conforme observado em *Nymphaea*, uma simplificação ou tipificação do padrão inicial de divisões do domínio micropilar pode ser algo artificial, acarretando na perda de informações relevantes a respeito de particularidades do desenvolvimento inicial do endosperma em Nymphaeales.

Via de regra, grande parte das angiospermas basais tende a apresentar uma proliferação celular muito mais pronunciada no domínio micropilar do endosperma em detrimento ao domínio calazal, que exibe poucas células como relatado em *Amborella*, *Illicium* e *Ceratophyllum* (Floyd & Friedman, 2000, 2001). A presença de um domínio calazal unicelular e haustorial no endosperma consiste numa característica sinapomorfica de Nymphaeales

(*Victoria cruziana* e *N. stellata* – Khanna, 1967; *Cabomba* – Floyd & Friedman, 2000; *Nuphar* – Floyd & Friedman, 2001; *N. thermarum* – Povilus et al., 2015; *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* – presente trabalho). Muito embora o haustório possa estar ausente em *Trithuria submersa* (Friedman et al., 2012), tal característica pode ser atribuída à redução morfológica frequentemente associada ao hábito de vida aquático na família Hydatellaceae (Cook, 1999; Rudall et al., 2008). De toda forma, fica claro que o endosperma nas angiospermas basais é bipolar, divide-se em dois módulos de desenvolvimento (calazal e micropilar) e recebe uma contribuição mais expressiva da célula micropilar do endosperma bicelular (Floyd & Friedman, 2000, 2001). Inclusive há relato de que no endosperma nuclear de *Arabidopsis thaliana* e *Coronopus didymus*, ambas angiospermas derivadas (Brassicaceae), há uma organização diferencial do citoesqueleto nas células pertencentes a cada um dos domínios do endosperma (Brown et al., 1999; Nguyen et al., 2002).

Na semente madura, frequentemente, o endosperma se restringe a uma ou poucas camadas celulares envolvendo o embrião e este é um padrão bem característico da ordem Nymphaeales (Schneider, 1978; Scheider & Ford, 1978; Floyd & Friedman, 2000, 2001; Friedman et al., 2012; Povilus et al., 2015). A presença de corpúsculos proteicos no endosperma das angiospermas basais tem sido amplamente negligenciada pelos embriologistas vegetais (Johri et al., 1992). O endosperma maduro de *Nuphar polysepala*, *Amborella trichopoda*, *Illicium floridanum* e *Trimenia moorei* apresenta lipídios e corpúsculos proteicos (Floyd & Friedman, 2001; Friedman & Bachelier, 2013), assim como *Cabomba caroliniana*; embora nesta espécie os corpúsculos proteicos não sejam observados na maturidade da semente (Floyd & Friedman, 2000), tudo indica que esta característica é plesiomórfica para as angiospermas (Floyd & Friedman, 2000, 2001).

Há um relato da presença de grandes quantidades de material proteico no epicótilo e cotilédones, assim como no endosperma de *N. ondinea* (=*Ondinea purpurea*) (Schneider & Ford, 1978). *Nymhaea amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* exibem abundantes quantidades de material que se cora intensamente de magenta pelo azul de toluidina; tais inclusões citoplasmáticas ficam evidentes em microscopia de contraste de interferência diferencial de Nomarski, possuem natureza cristalina e são levemente positivos ao teste para proteínas com azul de bromofenol, assim como para vermelho de rutênio, o que caracteriza tais inclusões citoplasmáticas, provavelmente, como glicoproteínas. A presença destes corpúsculos com coloração e distribuição idênticas entre as células do endosperma e do embrião constitui um forte indício a favor da teoria da homologia entre o endosperma e o embrião (Sargant, 1900; Friedman, 1995). Outro argumento a favor desta teoria foi fornecido por Liu et al. (2001), o qual constatou uma grande similaridade proteica entre o embrião e o endosperma de *Jatropha*

curcas por meio de análise proteômica. Tais estruturas também são abundantes nos cotilédones de *Nymphaea* e podem tratar-se de grânulos de aleurona, tal como citado para *Trithuria submersa* (Friedman et al., 2012).

Os grânulos de aleurona foram extensivamente estudados quanto a composição química e ultraestrutura, sobretudo em cereais, devido a sua importância na nutrição humana (Brouns et al., 2012). Em Poaceae, grânulos de aleurona esféricos são envoltos por gotículas lipídicas e delimitados por uma membrana, em seu interior há uma substancia fundamental na qual encontram-se imersas uma cavidade globoide e um corpúsculo composto por proteínas e carboidratos que, eventualmente, pode apresentar estrutura cristalina (Jacobsen et al., 1971). Na cavidade globoide encontra-se a fitina, que corresponde à principal forma de armazenamento de fósforo e outros minerais nas sementes dos cereais e leguminosas (Zhou & Erdman, 1995), componentes polifosfatados como a fitina são conhecidos por serem intensamente metacromáticos ao azul de toluidina exibindo a cor magenta (Wiame, 1947).

Assim como nas células da camada de aleurona do endosperma da cevada (*Hordeum vulgare*), em *Nymphaea* também se observou vacúolos esféricos nas células do endosperma e cotilédones, no interior dos quais haviam uma ou mais estruturas esféricas intensamente coradas de magenta pelo azul de toluidina e, segundo a interpretação de Jacobsen et al. (1971) para a cevada, consistiriam em cavidades globoides dos grãos de aleurona contendo fitina. Os grânulos de aleurona também se coraram tenuemente pelo azul de bromofenol e pela vermelho de rutênio, o que é consistente como a presença de proteínas e carboidratos, sobretudo na substância fundamental e corpúsculo contendo proteínas e carboidratos, assumindo-se que os grânulos de aleurona em *Nymphaea* guardem similaridades aos das Poaceae, embora tais verificações necessitem de um estudo bioquímico e ultraestrutural mais detalhado.

Durante a germinação, enzimas hidrolíticas preexistentes nos grânulos de aleurona na cevada e milho são importantes para a remobilização de reservas do endosperma (Jacobsen, 1984; Mitsuhashi & Oaks, 1996). A presença de grânulos de aleurona nos cotilédones e no endosperma de *Nymphaea* é coerente como o fato destes tecidos terem posição intermediária entre o perisperma e, provavelmente, estarem envolvidos na transferência de nutrientes para o eixo embrionário. Em *Trithuria submersa*, por exemplo, o endosperma persiste ao redor da plântula e é considerado um tecido que regula a transferência de nutrientes provenientes do perisperma (Rudall et al., 2009).

Segundo Floyd & Friedman (2000), em todos seus trabalhos que empregavam angiospermas basais, nenhuma delas apresentou amiloplastos no endosperma, embora, em *Trithuria submersa* exista o relato de amiloplastos neste tecido, assim como no suspensor e protoderme do embrião; contudo, os amiloplastos não estão mais presentes no endosperma

durante a maturidade (Friedman et al., 2012). As espécies de *Nymphaea* analisadas neste estudo, pertencem a três subgêneros (*Brachyceras*, *Hydrocallis* e *Lotus*) e exibiram quantidades moderadas de amiloplastos simples no endosperma, assim como no suspensor e embrião maduros, muito embora suas dimensões sejam menores que aqueles encontrados no perisperma.

Um endosperma típico que cumpre as funções de aquisição de nutrientes provenientes de tecidos esporofíticos maternos extra-seminais, armazenamento de nutrientes anterior à dormência da semente, mobilização de nutrientes após a iniciação da germinação e transferência de nutrientes para o embrião é relatado para Amborellaceae e Trimeniaceae e, ainda é considerado plesiomórfico para as angiospermas (Floyd & Friedman, 2001; Friedman & Bachelier, 2013). Em Hydatellaceae ocorre um perisperma que funciona basicamente como tecido de reserva associado a um diminuto endosperma que atua na transferência de nutrientes para o embrião (Sokoloff et al., 2008; Friedman et al., 2012). Uma condição funcional intermediária foi observada em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus*, pois o perisperma é o principal tecido de reserva, mas não o único, uma vez que o endosperma e o embrião armazenam amido, e ambos também atuam na mobilização de nutrientes, visto que contêm grânulos de aleurona. Também há grânulos de aleurona no endosperma de *Trithuria submersa* (Friedman et al., 2012).

Ainda não se pode afirmar com certeza que um perisperma como principal tecido de reserva, associado a um endosperma reduzido e especializado na transferência de nutrientes é uma condição plesiomórfica para as angiospermas, assim como foi apontado por Friedman & Bachelier (2013). Contudo, é interessante notar, que contrariamente ao relatado para as demais Nymphaeales, nas quais o endosperma cumpri exclusivamente a função de transferência de nutrientes para o embrião durante a germinação (Friedman et al., 2012), nas espécies presentemente estudadas de *Nymphaea*, o endosperma passa a contribuir com o perisperma, mesmo que em menor escala, com as funções de aquisição de nutrientes dos tecidos esporofíticos extra-seminais, armazenamento de nutrientes anterior à dormência da semente e, provavelmente, mobilização de nutrientes depois da iniciação da germinação, pois ocorrem tanto amiloplastos como grãos de aleurona no citoplasma das células endospérmicas.

Segundo as proposições de Friedman et al. (2012), os grânulos de aleurona do endosperma poderiam conter enzimas para a mobilização de carboidratos durante a germinação, sendo que a posição intermediária entre o embrião e o perisperma caracterizaria o endosperma como um tecido de transferência em *Trithuria submersa* (Sokoloff et al., 2008; Rudall et al., 2009; Friedman et al., 2012). Durante a germinação da semente de *N. thermarum* o endosperma apresenta a mesma organização se interpondo entre o embrião e o perisperma, reforçando esta ideia (Povilus et al., 2015).

Perisperma, *Tegumentos e Complexo Micrópila - Hilo*

O termo perisperma geralmente se refere ao tecido de reserva derivado do nucelo em óvulos fecundados, embora o termo também possa ser empregado para óvulos pré-fecundados, como ocorre em *Trithuria submersa* (Rudall, et al., 2008; Friedman, 2008; Rudall et al., 2009). O perisperma evoluiu independentemente em vários táxons, o que fica claro quando se analisa a grande variação na iniciação do perisperma em *Acorus*, *Saururus* e Nymphaeaceae (Rudall, 1997; Rudall & Furness 1997; Floyd & Friedman, 2000, 2001).

Em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* há uma estratificação do perisperma, na qual as células da zona externa, logo abaixo do endotégmen, possuem dimensões e amiloplastos compostos menores que a zona intermediária. A zona interna, correspondente a região anteriormente ocupada pela célula haustorial do domínio calazal do endosperma, exibe um processo de colapso durante o desenvolvimento embrionário, caracterizado pela morfologia irregular das células, pequenas dimensões celulares e redução do tamanho dos amiloplastos compostos, provavelmente como resultado da atividade haustorial na alocação de nutrientes para o embrião. Em *Trithuria* há apenas duas zonas no perisperma, sendo que na zona mais externa ocorrem amiloplastos compostos e células multinucleadas (Rudall et al., 2008, 2009; Friedman et al., 2012). De forma similar *N. caerulea* apresentou células binucleadas em todo o perisperma. A zona mais interna em *Trithuria* (Friedman et al., 2012) é desprovida de amiloplastos e colapsa rapidamente com o crescimento do endosperma e embrião (Friedman et al., 2012). *Nymphaea thermarum* também apresentou o perisperma dividido em três zonas (Povilus et al., 2015), de forma muito similar às espécies analisadas neste trabalho, o que indica que a estratificação do perisperma é uma característica comum em Nymphaeales.

Espessamentos nas paredes periclinais internas e parte das anticlinais, na porção micropilar da epiderme nucelar foram observadas em *N. advena*, *N. ampla*, *N. odorata* e *N. pubescens* e foram atribuídos a um processo de esclerificação (Cook, 1902, 1906). No presente trabalho também observamos a presença de quantidades relativamente grandes de celulose nesta região, em diversos estádios de desenvolvimento (vide capítulo II desta tese), incluindo os estádios ontogenéticos posteriores à fecundação. Em *N. amazonum* houve deposição de calose na porção micropilar da epiderme nucelar durante a ginosporogênese, dupla fecundação e estádios iniciais do proembrião; em *N. caerulea* houve deposição apenas no ginófito maduro, assim como em *N. lotus* (vide capítulo II desta tese). Segundo Povilus et al. (2015) este espessamento foi incorretamente atribuído a um processo de esclerificação, visto que em suas análises os espessamentos eram compostos de camadas de calose e celulose, provavelmente

consistindo em células de transferência. Tal tecido também pode ser interpretado como uma epístase, visto que segundo Maheshwari (1950) tal estrutura se caracteriza por um tecido que se diferencia próximo à micrópila e deriva-se da epiderme nucelar, apresentando alongamento celular radial com espessamentos de parede ou até mesmo suberização.

Segundo Collinson (1980), há diferenças concernentes ao posicionamento relativo entre a micrópila e o hilo nas diferentes espécies da ordem Nymphaeales, contudo apenas recentemente surgiram trabalhos que se preocuparam com tais aspectos (Yamada et al., 2001a,b, 2003a,b). *Nymphaea lotus* exibiu um tegumento externo em formato de taça, embora não tenha sido observada a diferenciação de uma exotesta entre a micrópila e o hilo. Assim como referido para *Austrobaileya scandens*, *Brasenia schrebei* e *Trimenia moorei* (Yamada et al., 2003b), não se observou a formação de exotesta entre o hilo e a micrópila de *N. amazonum* e *N. caerulea* o que é coerente com a presença de um tegumento externo semianular nos óvulos destas espécies, sugerindo que a presença de um complexo micrópila-hilo é o estado de carácter plesiomórfico para as plantas com flores. Contudo, Yamada et al., (2001a) relatam para *Nuphar japonicum*, *N. alba* e *Victoria cruziana* a existência de células exotestais entre a micrópila e o hilo, o que diverge dos resultados observados nas três espécies de *Nymphaea* estudadas. Portanto, o relato de Igersheim & Endress (1998) sobre a existência de uma variação interespecífica em relação a presença de tegumentos externos tanto semianulares quanto anelares em *Nuphar* e *Nymphaea*, aparenta ser coerente, suportada pela ausência de exotesta no complexo hilo-micropilar em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* e pelos relatos de Yamada et al., (2001a), pelo menos para o gênero *Nymphaea*. Mais uma vez fica clara a existência de labilidade para vários aspectos da morfologia reprodutiva do grado ANA. A grande diversidade apresentada pelo grupo, provavelmente, é reflexo do extenso período de anagênese percorrido pelas Nymphaeales que remonta ao Cretáceo Inferior (Friis, 2001).

A presença de arilo em *Nymphaea* provavelmente consiste em uma carácter derivado, visto que tais apêndices não são comuns nas angiospermas basais (Yamada et al., 2001a,b, 2003a,b). O arilo em Nymphaeaceae é uma especialização à reprodução aquática e está associada à presença de frutos submersos, tendo como função a dispersão das sementes no hábitat aquático (Borsch et al., 2008). *Nymphaea amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* apresentaram arilos contíguos à região opercular que ocupam o primeiro terço da semente e são preenchidos por um aerênquima com espaços intercelulares amplos. Não há um relato da presença de arilo em *N. ondinea* (=*Ondinea purpurea*); por outro lado Schneider & Ford (1978) descrevem a presença de uma bainha membranácea hialina que também recobre parte da semente a partir do complexo micrópila-hilo, provavelmente sendo homóloga ao arilo. Um arilo translúcido aerenquimatoso também foi relatado em *Euryale ferox* (Khanna, 1964b), *Victoria*

(Schneider, 1976), *N. ampla*, *N. elegans*, *N. gracilis* e *N. pulchella* (Bonilla-Barbosa et al., 2000), *N. thermarum* (Povilus et al., 2015). A presença de arilo é um dos estados de caráter morfológicos empregados por Borsch et al. (2008) para delimitar o núcleo Nymphaeaceae, composto pelos gêneros *Nymphaea*, *Victoria* e *Euryale*.

O contorno sinuoso das paredes anticlinais das células superficiais da exotesta das espécies de *Nymphaea* analisadas, similares a "peças de quebra-cabeça" quando vistas em secção paradérmica são relatadas para *N. flava* (Conard, 1905), *N. caerulea* (Haines & Lye, 1976), *Ondinea purpurea* (Schneider & Ford, 1978), *Brasenia schreberi* (Osborn & Schneider, 1988), *N. alba* e *N. candida* (Latowski et al., 2014). Latowski et al. (2014), inclusive, utilizou-se da presença ou ausência desta configuração das células exotestais para criar uma chave dicotômica de identificação dos gêneros de *Nymphaea* e *Nuphar* ocorrentes no sul da região Báltica. O contorno das paredes anticlinais das células superficiais da exotesta é um dos caracteres seminais taxonomicamente mais utilizáveis em espécies recentes e fossilizadas de Nymphaeaceae, sendo que *Euryale* e *Nuphar* possuem células hexagonais e não sinuosas, enquanto *Victoria*, *Ondinea* e *Nymphaea* exibem células com contorno sinuoso (Collinson, 1980; Cevallos-Ferriz & Stockey, 1989). *Brasenia*, *Barclaya* e *Cabomba* também possuem padrões distintos de sinuosidade nas paredes anticlinais das células exotestais (Cevallos-Ferriz & Stockey, 1989).

Embriogênese

O núcleo e a maior parte do citoplasma se localizam na porção calazal do zigoto enquanto um amplo vacúolo ocupa a porção micropilar da célula, e tal polarização é uma característica amplamente observada em angiospermas (Natesh & Rau, 1984), podendo ser identificada já na oosfera deste grupo (Lau et al. 2012, Zhang & Laux, 2011). Nas espécies analisadas de *Nymphaea* a célula apical do proembrião bicelular dá origem a maior parte do embrião propriamente dito, enquanto a célula basal dá origem a um supensor com 2-4, sendo que a célula mais próxima à massa embrionária se diferencia em hipófise e é incorporada a região que originará córtex radicular e coifa. De fato, o padrão no qual a primeira divisão mitótica do zigoto origina uma célula apical que, via de regra, forma o embrião propriamente dito e uma célula basal que forma o suspensor é amplamente relatado para as angiospermas (Natesh & Rau, 1984), assim como a presença de uma hipófise (Natesh & Rau, 1984; Jenik & Barton, 2005).

Uma correspondência pode ser feita entre aspectos da embriogênese e às características observadas na endospermogênese das angiospermas basais, tais como: polarização, divisão

desigual da célula inicial, fase filamentosa, modos de desenvolvimento diferentes entre o polo micropilar e o calazal, assim como sua contribuição de cada polo à formação da estrutura madura (Goldberg et al., 1994; Kaplan & Cooke, 1997; Floyd & Friedman, 2000). Podemos deduzir, com base na integralização da hipófise ao embrião propriamente dito de *Nymphaea* e na sua contribuição ao promeristema da radícula, que a inexatidão da primeira divisão tanto da célula endospérmica primária das angiospermas (plesiomorfia – Floyd & Friedman, 2000, 2001) quanto do zigoto de *Nymphaea*, na delimitação dos dois polos de desenvolvimento (domínio micropilar *vs*. domínio calazal; embrião propriamente dito *vs*. suspensor, respectivamente) consiste num padrão compartilhado para estas duas entidades evolutivas, corroborando a homologia entre o endosperma e o embrião nas angiospermas (Sargant 1900).

Segundo a classificação de Schnarf (1931) e Johansen (1950), baseada no desenvolvimento inicial do proembrião, as espécies do gênero *Nymphaea* analisadas se aproxima mais do tipo solanáceo, uma vez que a célula apical do proembrião bicelular passa por divisões transversais, ocorre a formação de um suspensor com 2-4 células a partir da célula basal, sendo que a mais próxima ao proembrião se diferencia em hipófise, contribuindo na formação de parte da região radicular do embrião propriamente dito. Entretanto, durante a quarta divisão celular do proembrião, raramente foram observadas divisões longitudinais nas células do suspensor (Schnarf, 1931; Johansen, 1950), o que pode caracterizar uma variação da embriogenia do tipo solanáceo em *Nymphaea*. Embora, Cook (1906) tenha relatado divisões longitudinais nas células do suspensor de *Nymphaea pubescens* (=*Castalia pubescens*), tais dados necessitam de confirmação, assim como o relato da inexistência de um suspensor em *N. advena* feito pelo mesmo autor.

A aplicação da embriogenia inicial em análises filogenéticas é limitada, pois, embora um determinado padrão de embriogenia possa ser próprio de uma família, gênero ou espécie, também pode haver variação dentro de uma mesma espécie (Natesh & Rau, 1984). De fato, conforme pudemos observar em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus*, há uma variação intraespecífica no número de células do proembrião linear (4-6) quando ocorrem as primeiras divisões longitudinais que originam a fase tetracelular da porção do proembrião que originará o corpo do embrião propriamente dito. Em *N. ampla*, antes que as duas células terminais se dividam longitudinalmente para formar a fase tetracelular da porção do proembrião que originará o corpo do embrião propriamente dito, o proembrião linear também conta com até 6 células (Cook, 1906).

As sinérgides podem persistir por algum tempo após a fecundação, sendo que *Cabomba piauhiensis* apresenta sinérgides um pouco mais persistentes (Cook, 1906). Em *N. amazonum*, *N. caerulea* e *N. lotus* também observamos uma sinérgide que perdurou até estádios iniciais do

proembrião linear; no entanto, a longevidade e diferenciação da sinérgide persistente em *N. caerulea* nunca foram relatadas para qualquer espécie de *Nymphaea*. A análise cuidadosa das imagens fornecidas para o embrião cordiforme de *N. thermarum* (Fig. 8c – Povilus et al., 2015), no estádio em que os cotilédones emergem, permite identificar uma célula lateral ao suspensor que possivelmente corresponde à sinérgide persistente de *N. caerulea*. Ambas as espécies de *Nymphaea* são do subgênero *Brachyceras*, o que pode indicar que esta característica seja uma característica deste táxon, embora análises adicionais sejam necessárias para formular qualquer afirmação. Embora a persistência da sinérgide não penetrada nos estádios imediatamente posteriores à fecundação seja um evento relativamente frequente (*Capsella Bursa-pastoris* – Schulz & Jensen, 1968; *Hordeum vulgare* – Cass & Jensen, 1970; *Quercus gambelii* – Mogensen, 1972), a presença de uma sinérgide que persiste até a maturidade da semente de *N. caerulea*, não foi relatada em nenhum dos trabalhos que chegaram ao nosso conhecimento.

Burger (1998) propõe que os cotilédones das angiospermas basais (ANA, Magnoliídeas), Chloranthales e eudicotiledôneas não são homólogos ao cotilédone das monocotiledôneas, pois, segundo o referido autor, o cotilédone das monocotiledôneas seria homólogo à 'terceira folha' das Nymphaeales, o que provavelmente consistiria no primeiro e maior dos primórdios foliares desta ordem. O autor também sugere que os cotilédones das demais angiospermas seriam órgãos *sui generis*, não sendo homólogos às folhas no grado ANA, Magnoliídeas, Chloranthales e eudicotiledôneas, visto que possuiriam um desenvolvimento totalmente diferente das folhas, obedecendo à um programa de desenvolvimento independente (Burger, 1998). Contudo, quando levamos em conta a anatomia do embrião de *Nymphaea* fica claro uma grande similaridade entre os primórdios foliares e os cotilédones, seja pela presença de amiloplastos simples, grãos de aleurona e um padrão de vascularização composto por um cilindro procambial que emite ramificações para cada um dos primórdios foliares do epicótilo, assim como para cada um dos cotilédones. Contudo, em *Barclaya longifolia* há o relato de um único cilindro procambial suprindo apenas o epicótilo, não emitido ramificações para os cotilédones (Schneider, 1978), já em *N. ondinea* (=*Ondinea purpurea*) o cilindro procambial emite traços procambiais não ramificados para cada um dos cotilédones e primórdios foliares (Schneider & Ford, 1978). Embora haja uma ampla discussão sobre a existência de um ou dois cotilédones em Nymphaeales (Tillich et al., 2007; Sokoloff et al., 2008; Rudall et al., 2009), o embrião de *Nymphaea* mostrou claramente portar dois cotilédones histologicamente similares às folhas. Há relatos de similaridade morfológica entre cotilédones e folhas para embriões de diversas espécies de angiospermas, assim como a origem das duas estruturas citadas a partir do promeristema do epicótilo, sugerindo que tais órgãos possam ser homólogos (vide Kaplan & Cooke, 1997 e Chandler, 2008 para revisão).

Há certo consenso na existência de significativa variação no estádio de desenvolvimento do embrião no momento da dispersão da semente das angiospermas, embora um embrião pequeno e pouco diferenciado seja uma característica encontrada com maior frequência nas angiospemas basais, sendo considerada primitiva para as angiospermas (Martin, 1946; Bailey & Swamy, 1948; Endress, 1980; Floyd & Friedman, 2001; Forbis et al., 2002; Tuckett et al., 2010; Chien et al., 2011; Friedman et al., 2012). No grado ANA, uma exceção é feita para Nymphaeaceae (Cabombaceae? – Floyd & Friedman, 2000), cujos embriões são considerados completamente desenvolvidos, não ocorrendo expansão embrionária entre a maturidade da semente (dispersão) e a germinação (protrusão da radícula) (Baskin & Baskin, 2007). A diferenciação histológica do embrião maduro nas *Nymphaea* estudadas, no qual é possível discernir um eixo epicótilo-radicular com uma plúmula exibindo dois primórdios foliares, cotilédones e até mesmo um cilindro procambial central, também foi relatado para outros gêneros de Nymphaeaceae (*Euryale ferox* – Khanna, 1964; *Barclaya longifolia* – Schneider, 1978; *Ondinea purpurea* – Schneider & Ford, 1978; *Nuphar polysepala*- Floyd & Friedman, 2001), o que corrobora a hipótese de que um embrião completamente desenvolvido é uma característica de Nymphaeaceae (Baskin & Baskin, 2007).

Conclusões

O endosperma de *Nymphaea*, provavelmente, consiste em um tecido diploide e é *ab initio* celular, estando de acordo com o que a literatura indica como condições plesiomórficas para as angiospermas. Um padrão similar de distribuição de amiloplasto e grãos de aleurona entre o endosperma e o embrião, sobretudo nos cotilédones, consiste em mais um argumento a favor da hipótese de homologia entre estas duas entidades evolutivas. Outra caraterística que corrobora a homologia entre embrião e endosperma é a presença de polarização nas duas entidades, assim como a desigualdade dos produtos das divisões do zigoto e da célula endospérmica primária definindo os módulos de desenvolvimento (embrião propriamente dito *vs.* suspensor, domínio micropilar *vs.* domínio calazal do endosperma, respectivamente), sendo que o fato da primeira divisão da célula endospérmica primária de Nymphaeales determinar com exatidão os domínios do endosperma é considerada uma sinapomorfia da ordem.

Embora os resultados confirmem o perisperma como principal tecido de reserva, o endosperma também cumpre, mesmo que de maneira pouco significante, a função de armazenamento de nutrientes, além de sua função na transferência de nutrientes ao embrião, o que consiste numa condição intermediária entre Hydatellaceae (Friedman et al., 2012), na qual

o endosperma é apenas um tecido de transferência, e em Trimeniaceae (Friedman & Bachelier, 2013), na qual o endosperma é o principal tecido de reserva.

Os espessamentos das paredes periclinais internas e parte das anticlinais das células da porção micropilar da epiderme nucelar são constituídos de celulose em todas as espécies de *Nymphaea*, e contêm calose em *N. amazonum* até mesmo durante os estádios iniciais do desenvolvimento da semente. Assim como descrito em *N. thermarum* (Povilus et al., 2015), estas características são próprias de células de transferência (Talbot et al., 2007), o que parece bem plausível. Na semente madura, os cotilédones e os primórdios foliares do epicótilo são supridos por ramificações de um cilindro procambial, adversamente ao descrito para outras Nymphaeaceae, nas quais apenas o epicótilo é suprido por procâmbio não ramificado. Os resultados obtidos sobre a vascularização do epicótilo e cotilédones, assim como a presença de amiloplastos e grãos de aleurona nestes órgãos, advogam a favor da homologia entre os dois cotilédones e os primórdios foliares de *Nymphaea*.

Este trabalho foi o primeiro a descrever detalhadamente a endospermogênese inicial, assim como a embriogênese de *Nymphaea* o que contribuiu significativamente para o esclarecimento de questionamentos acerca da homologia entre embrião e endosperma, assim como da homologia entre os cotilédones e as folhas. Também consiste em um dos poucos trabalhos que analisa, de maneira integrada, a ontogenia de todos os tecidos da semente, contextualizando os resultados em uma perspectiva filogenética. Ficou claro que existem muitos caracteres conservados na família Nymphaeaceae, tais como um domínio calazal unicelular e haustorial do endosperma, presença de opérculo, perisperma como principal tecido de reserva e um endosperma restrito a poucas camadas celulares que envolvem o embrião, nos estádios mais avançados do desenvolvimento da semente. Contudo, ainda são necessários estudos mais extensivos em outros táxons para verificar se os padrões de divisão inicial do endosperma possuem valor taxonômico. Também são necessários estudos proteômicos para analisar se a composição dos grãos de aleurona é similar entre o endosperma e cotilédones, além de análises ultraestruturais das paredes periclinais das células da porção micropilar da epiderme nucelar, para verificar se são de fato paredes labirínticas.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor e a FAPESP pelo auxílio financeiro (processo nº 2014/01529-8).

Referências Bibliográficas

BAILEY, I.W. & SWAMY, B.G.L. 1948. *Amborella trichopoda* Baill., a new morphological type of vesselless dicotyledon. J. Arnold Arbor. 29: 245–254.

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.

BONILLA-BARBOSA, J.; NOVELO, A.; OROZCO, Y. H.; MÁRQUEZ–GUZMÁND, J. 2000. Comparative seed morphology of Mexican *Nymphaea* species. Aquat. Bot. 68: 189–204.

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.

BORSH, T.; LÖHNE, C.; WIERSEMA, J. 2008. Phylogeny and evolutionary patters 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 lignt on subg. *Brachyceras* and its relationships to the Australian water-lilies. Telopea 13(1-2): 193–217.

BROUNS, F.; HEMERY, Y.; PRICE, R.; ANSON, N. M. 2012. Wheat aleurone: separation, composition, health aspects, and potential food use. C.R.C. Crit. Rer. Food. Sci. Nutr. 52: 553–568.

BROWN, R. C.; LEMMON, B. E.; NGUYEN, H.; OLSEN, O. 1999. Development of endosperm in *Arabidopsis thaliana*. Sex. Plant Reprod. 12: 32–42.

BURGER, C. W. 1998. The question of cotyledon homology in angiosperm. Bot. Rev. 64(4): 357–371.

CASS, D. D. & JENSEN, W. A. 1970. Fertilization in Barley. Source: Am. J. Bot. 57(1): 62–70.

CEVALLOS-FERRIZ, S. R. S. & STOCKEY, R. A. 1989. Permineralized fruits and seeds from the Princeton Chert (Middle Eocene) of British Columbia: Nymphaeaceae. Bot. Gaz. 150(2): 207–217.

CHANDLER, J. W. 2008. Cotyledon organogenesis. J. Exp. Bot. 59(11): 2917–2931.

CHIEN, C. T.; CHEN, S. Y.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. 2011. Morphophysiological dormancy in seeds of the ANA grade angiosperm *Schisandra arisanensis* (Schisandraceae). Plant Species Biol.26: 99– 104.

COLLINSON, M. E. 1980. Recent and Tertiary seeds of the Nymphaeaceae sensu lato with a revision of *Brasenia ovula* (Brong.) Reid and Chandler. Ann. Bot. 46: 603–632.

CONARD, H. S. 1905. The water lilies: a monograph of the genus *Nymphaea*. Washington: Carnegie Institution of Washington.

COOK, C. D. K. 1999. The number and kinds of embryo-bearing plants which have become aquatic: a survey. Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst. 2:79–102.

COOK, M. T. 1902. Development of the embryo-sac and embryo of *Castalia odorata* and *Nymphaea advena*. Bull. Torrey Bot. Club 29: 211–220.

COOK, M. T. 1906. The embryogeny of some Cuban Nymphaeaceae. Bot. Gaz. 42: 376–392.

COOK, M. T. 1909. Notes on the embryology of Nymphaeaceae. Bot. Gaz. 48: 56–59.

COULTER, J. M. 1911. The endosperm of angiosperms. Bot. Gaz. 52: 380–385.

CRANE, P. R. 1995. The origin and early diversification of angiosperms. Nature 374: 27–33.

DOUST, A. N. 2000. Comparative floral ontogeny in Winteraceae. Ann. Missouri Bot. Gard. 87: 366–379.

DOUST, A. N. 2001. The developmental basis of floral variation in *Drimys winteri* (Winteraceae). Int. J. Pl. Sci. 162: 697–717.

ENDRESS, P.K. 1980. The reproductive structures and systematic position of the Austrobaileyaceae. Bot. Jahrb. Syst. 101: 393–433.

ENDRESS, P. K. 1987a. Floral phyllotaxis and evolution. Bot. Jahrb. Syst. 108: 417–438.

ENDRESS, P. K. 1987b. The early evolution of the angiosperm flower. Trends Ecol. Evol. 2: 300–304.

ESCHRICH, W. & CURRIER, H.B. 1964. Identification of callose by its dichrome and fluorochrome reactions. Stain Technology 39: 303–307.

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.

FORBIS, T. A.; FLOYD, S. K.; DE QUEIROZ, A. 2002. The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: Implications for the evolution of seed dormancy. Evol. 56: 2112–2125.

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. 2001. Comparative embryology of basal angiosperms. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 14–20.

FRIEDMAN, W.E. 2006. Embryological evidence for developmental lability during early angiosperm evolution. Nature 441: 337–340.

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. & BACHELIER, J. 2013. B. Seed development in *Trimenia* (Trimeniaceae) and its bearing on the evolution of embryo-nourishing strategies in early flowering plant lineages. Am. J. Bot. 100(5): 906–915.

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.

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

FRIIS, K. R.; PEDERSEN, K. R.; CRANE, P. R. 2001. Fossil evidence of water lilies (Nymphaeales) in the Early Cretaceous. Nature 410: 357–360.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J.; SAMPSON, F. B. 2002. Evolution of Microsporogenesis in Angiosperms. Int. J. Plant Sci. 63(2): 235–260.

GOLDBERG, R. B.; PAIVA, G.; YADEGARI, R. 1994. Plant embryogenesis: zygote to seed. Science 266: 605–614.

GUTTENBERG, H. V. & MÜLLER-SCHRÖDER, R. 1958. Untersuchungen über die Entwicklung des Embryos und der Keimpfl anze von *Nuphar luteum* Smith. Planta 51: 481–510.

HAINES, R. W.; LYE, K. A. 1976. Seedlings of Nymphaeaceae. Bot. Jour. Linn. Soc. 70: 255–265.

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.

IGERSHEIM, A.; ENDRESS, P. K. 1998. Gynoecium diversity and systematics of the paleoherbs. Bot. J. Linn. Soc.127: 289–370.

JACOBSEN, J. V.; KNOX, R. B.; PYLIOTIS, N. A. 1971. The structure and composition of aleurone grains in the barley aleurone layer. Planta 101: 189–209.

JACOBSEN, J.V. 1984. The Seed: Germination. In: Johri BM (ed) Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, p.p. 611–646.

JENIK, P. D. & BARTON, M. K. 2005. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. Development 132: 3577–3585.

JOHANSEN, D.A. 1950. Plant Embryology: embryogeny of the Spermatophyta. Waltham, Massachusettes.

JOHRI, B.M.; AMBEGAOKAR, K.B.; SRIVASTAVA, P.S. 1992. Comparative embryology of angiosperms, vols. 1, 2. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

KAPLAN, D. R. & COOKE, T. J. 1997. Fundamental concepts in the embryogenesis of dicotyledons: a morphological interpretation of embryo mutants. Plant Cell 9: 1903–1919.

KHANNA, P. 1964a. Some interesting observations in *Euryale ferox* Salisb. Curr. Sci. 33: 151–152.

KHANNA, P. 1964b. Morphological and embryological studies in Nymphaeaceae. I. *Euryale ferox* Salisb. Proc. Indian Acad. Sci. 59: 237–244.

KHANNA, P. 1965. Morphological and embryological studies in Nymphaeaceae. II. *Brasenia schreberi* Gmel. and *Nelumbo nucifera* Gaertin. Aust. J. Bot. 13: 379–387.

KHANNA, P. 1967. Morphological and embryological studies in Nymphaeaceae III. *Victoria cruziana* D'Orb., and *Nymphaea stellata* Willd. Bot. Mag. Tokyo 80: 305–312.

LATOWSKI, K.; TOMA, C.; DĄBROWSKA, M.; ZVIEDRE, E. 2014. Taxonomic features of fruits and seeds of *Nymphaea* and *Nuphar* taxa of the Southern Baltic region. Limnol. Rev. 14(2): 83–91.

LAU, S.; SLANE, D; HERUD, O.; KONG, J.; JURGENS, G. 2012. Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. Annu. Rev. Plant. Biol. 63: 483–506.

LINKIES, A.; GRAEBER, K.; KNIGHT, C.; LEUBNER-METZGER, G. 2010. The evolution of seeds. New Phytol. 186: 817–831.

LIU, H.; YANG, Z.; YANG, M.; SHEN, S. 2011. The differential proteome of endosperm and embryo from mature seed of *Jatropha curcas*. Plant Sci. 181: 660–666.

MAHESHWARI, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. New York: McGraw-Hill.

MARTIN, A.C. 1946. The comparative internal morphology of seeds. Am. Midl. Nat. 36: 513–660.

MAZIA, D; BREWER P. A.; ALFERT, M. 1953. The Cytochemical Staining and Measurement of Protein with Mercuric Bromphenol Blue. Biol. Bull. 104(1): 57–67.

McDOWELL, E. M. & TRUMP, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med. 100: 405-414.

MITSUHASHI, W. & OAKS, A. 1996. Localization of major endopeptidase activities in maize endosperm. J. Exp. Bot. 47: 749–754.

MOGENSEN, H. L. 1972. Fine Structure and Composition of the Egg Apparatus Before and After Fertilization in *Quercus gambelii*: The Functional Ovule. Am. J. Bot. 59(9): 931–941.

NATESH, S. & RAU, M. A. 1984. The Embryo. In: JOHRI, B.M. (ed) Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, p.p. 377–443.

NGUYEN, H.; BROWN, R. C.; LEMMON; B. E. 2002. Cytoskeletal organization of the micropylar endosperm in Coronopus didymus L. (Brassicaceae). Protoplasma 219: 210–220.

O'BRIEN, T. P. & McCULLY, M. E. 1981. The Study of Plant Structure Principles and Selected Methods. Melbourne: Termarcarphi Pty.

OHAD, N.; MARGOSSIAN, L.; HSU, Y.; WILLIAMS, C.; REPETTI, P.; FISCHER, R. L. A mutation that allows endosperm development without fertilization. 1996. PNAS 93: 5319-5324.

OSBORN, J. M. & SCHNEIDER, E.L. 1988. Morphological studies of the Nymphaeaceae sensu lato. XVI. The floral biology of *Brasenia schreberi*. Ann. Missouri Bot.l Gard. 75: 778–794.

POVILUS, R. A.; LOSADA, J. M.; FRIEDMAN, W. E. 2015. 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.

RUDALL, P.J. 1997. The nucellus and chalaza in monocotyledons: structure and systematics. Bot. Rev. 63:140–184.

RUDALL, P. J. & FURNESS, C. A. 1997. Systematics of *Acorus*: ovule and anther. Int. J. Plant. Sci. 158:640–651.

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.

RUDALL, P.G.; REMIZOWA, M.V.; BEER, A.S.; BRADSHAW, E; TEVENSON, D.W.; MACFARLANE, T.D.; TUCKETT, R.E.; YADAV, S.R.; SOKOLOFF, D.D. 2008. Comparative ovule and megagametophyte development in Hydatellaceae and water lilies reveal a mosaic of features among the earliest angiosperms. Ann. Bot. 101: 941–956.

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.

SASS, J. E. Elements of botanical microtechnique. New York: Mc. Graw-Hill Book Company Inc. 1940, 222 p.

SCHNARF, K. 1931. Vergleichende Embryologie der Angiospermen. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

SCHNEIDER, E. L. 1976. The floral anatomy of *Victoria* Schomb. (Nymphaeaceae). Bot. J. Linn. Soc. 72: 115-148.

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. M. 1982. Morphological studies of the Nymphaeaceae. XII. The floral biology of *Cabomba caroliniana*. Am. J. Bot. 69: 1410– 1419.

SCHULZ, R. & JENSEN, W. A. 1968. *Capsella* Embryogenesis: The Synergids Before and After Fertilization. Am. J. Bot. 55(5): 541–552.

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. Z. 83: 3–14.

SOKOLOFF, D. D.; REMIZOWA, M. V.; MACFARLANE, T. D.; TUCKETT, R.; RAMSAY, M.; BEER, A. S.; RUDALL, P. J. 2008. Seedling diversity in Hydatellaceae: implications for the evolution of angiosperm cotyledons. Ann. Bot. 101:153–164.

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.

SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. J. Histochem. Cytochem. 21: 73–80.

STRASBURGER, E. 1900. Einige Bemerkungen zur Frage nach der ‘‘doppelten Befruchtung’’ bei den Angiospermen. Botanische Zeitung 58: 294–315.

TALBOT, M. J.; WASTENEYS, G. O.; OFFLER, C. E.; MCCURDY, D. W. 2007. Cellulose synthesis is required for deposition of reticulate wall ingrowths in transfer cells. Plant Cell Physiol. 48: 147–158.

TIFFNEY, B. H. Seed Size, Dispersal Syndromes, and the Rise of the Angiosperms: Evidence and Hypothesis. 1984. Ann. Missouri Bot. Gard. 71(2): 551–576.

TILLICH, H.J.; TUCKETT, R.; FACHER, E. 2007. Do Hydatellaceae belong to the monocotyledons or basal angiosperms? Evidence from seedling morphology. Willdenowia 37: 399–406.

TUCKETT, R. E.; MERRITT, D. J.; RUDALL, P. J.; HAY, F.; HOPPER, S. D.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M.; TRATT, J.; DIXON, K. W. 2010. A new type of specialized morphophysiological dormancy and seed storage behaviour in Hydatellaceae, an early-divergent angiosperm family. Ann. Bot. 105: 1053–1061.

VIJAYARAGHAVAN, M. R. & PRABHAKAR, K. 1984. The Endosperm. In: JOHRI, B. M. (ed) Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, p.p. 319–376.

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

WHEELER HAINES, R.; LYE; K. A. 1975. Seedlings of Nymphaeaceae. Botanical J. Linn. Soc. 70: 255–265.

WIAME, J.M. 1947. The metachromatic reaction of hexametaphosphate. J. Amer. Chem. Soc. 69: 3146–3147.

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

YAMADA T.; IMAICHI R.; PRAKASH N.; KATO M. 2003b. Developmental morphology of ovules and seeds of Austrobaileyales. Aust. J. Bot. 5: 555–564.

YAMADA T.; IMAICHI R.; TOBE, H.; KATO M. 2001b. Developmental morphology of the ovules of *Amborella trichopoda* (Amborellaceae) and *Chloranthus serratus* (Chloranthaceae). Bot. J. Linn. Soc. 137(3): 277–290.

YAMADA, T.; IMAICHI, R.; KATO, M. 2001a. Developmental morphology of ovules and seeds of Nymphaeales. Am. J. Bot. 88: 963–974.

YAMADA, T.; IMAICHI, R.; KATO, M. 2003a. The outer integument and funicular outgrowth complex in the ovule of *Magnolia grandiflora* (Magnoliaceae). J. Plant Res. 116(3): 189–198.

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

ZHANG, Z.; LAUX, T. 2011. The asymmetric division of the Arabidopsis zygote: from cell polarity to an embryo axis. Sex. Plant. Reprod. 24(2):161–169.

ZHOU, J.R.; ERDMAN, J. W. J. R. 1995. Phytic acid in health and disease. C.R.C. Crit. Rer. Food. Sci. Nutr. 35: 495–508.

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. A despeito 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.

BORSH, T.; LÖHNE, C.; WIERSEMA, J. 2008. Phylogeny and evolutionary patters 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 lignt 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* (Nyrnphaeaceae). 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 cinetiques chez les vegetaux. 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.; PENAFLOR, 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 embyrogeny 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* Radlkofer 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.; WALLES, 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. Uber das Antheren tapetum mit besonderer Berucksichtigung 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.