

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

DESENVOLVIMENTO DA ANTERA EM DYCKIA POLYCLADUS .B.SM. (PITCAIRNIOIDEAE - BROMELIACEAE).¹

Merieleme Saldanha Martins², Luana Ehle Joras³, Cesar Carvalho De Freitas⁴, Mariane Paludette Dorneles⁵, Joao Marcelo Santos De Oliveira⁶.

¹ Pesquisa realizada no curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Agrobiologia - Universidade Federal de Santa Maria.

² Bolsista CAPES. Aluna do Programa de Pós Graduação em Agrobiologia da Universidade Federal de Santa Maria

³ Bolsista PRAE. Aluna de graduação do curso de Ciências Biológicas da Universidade federal de Santa Maria, Rs.

⁴ Bolsista CAPES. Aluno do Programa de Pós Graduação em Agrobiologia da Universidade Federal de Santa Maria

⁵ Mestre pelo Programa em Agrobiologia da Universidade Federal de Santa Maria.

⁶ Professor Drº Departamento de Biologia - CCNE, Universidade Federal de Santa Maria

Introdução:

Bromeliaceae é uma das mais importantes famílias neotropicais. Compreende cerca de 3140 espécies distribuídas em 58 gêneros (GIVINISH et al., 2011), é uma família típica pela morfologia básica, pela diversidade ecológica e riqueza de espécies. Atualmente esta subdividida em oito subfamílias (GIVINISH et al., 2007), dentre estas a subfamília Pitcairnioideae na qual esta inserida *Dyckia polycladus* L.B. Sm. A espécie é nativa e endêmica do Rio Grande do Sul. Atualmente informações sobre *D. polycladus* são insuficientes para avaliação de seu risco de extinção, a espécie encontra-se na lista Vermelha da Flora do Rio Grande do Sul (FZBRS, 2014) na categoria DD, dados insuficientes, isto devido à falta de conhecimento sobre a mesma.

A família apresenta muitas descrições em relação à anatomia vegetativa, principalmente anatomia foliar, podendo ser citados os trabalhos de Tomlinson (1969), Aoyama; Sajo (2003), Proença; Sajo (2004, 2007, 2008). Porém, em relação à morfologia e anatomia dos órgãos reprodutivos de Bromeliaceae, poucos estudos foram realizados. Em relação ao androceu podemos dar maior ênfase para os trabalhos de Lakshmanan (1967), Rao; Wee (1979), Conceição (2005), Sartori (2008), Paludette (2013), Paludette et al. (2014), Oliveira et al. (2015).

Assim, espera-se que as características encontradas na descrição morfológica acerca da anatomia da antera e do desenvolvimento do grão de pólen da espécie *Dyckia polycladus* corrobore com as características apresentadas na literatura para a família.

Objetivo:

O trabalho objetiva conhecer a morfologia da antera e a embriologia básica de *Dyckia polycladus*, reunir informações morfológicas a fim de melhor caracterizar seu processo reprodutivo, além de contribuir com a sua conservação.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

Metodologia:

O material botânico no município de Santo Antônio em Santa Maria, Rio Grande do Sul. *Dyckia polycladus* se desenvolve em um ambiente rochoso, e nunca sombreado. Os botões florais e flores foram fixados em 1% glutaraldeído e 4% formaldeído (McDOWELL; TRUMP, 1976). Após fixação, o material botânico, foi lavado em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,2 (GABRIEL, 1982), por 15 minutos, seguido de lavagem em água destilada por 15 minutos. Posteriormente, o material foi imerso em tween20, em tubos de microcentrifuga durante três dias. Posteriormente, foi desidratado em série etílica ascendente (10, 30, 50, 70, 90, 100%), 15 min cada etapa. O material foi pré-infiltrado com uma solução 1:1 de hidroxietilmetacrilato (GERRITS; SMID, 1983) e etanol absoluto durante o período de 12h, seguido de infiltração em hidroxietilmetacrilato por cerca de 12h e emblocado com esta resina até sua polimerização (GERRITS; SMID, 1983). Secções de 3 µm, foram feitas em micrótomo de rotação Leica RM2245. Azul de Toluidina O 0,05%, pH 4.4 foi utilizado como corante (FEDER; O'BRIEN, 1968); Azul de Anilina 0,05% (MARTIN; 1959) foi utilizado para detecção de calose. Para as observações do espessamento do endotécio, anteras maduras foram imersas em solução de maceração (FRANKLIN, 1945). As observações e os registros fotomicrográficos foram realizados em microscópios Leica DM2000, com campo claro, e Axio Imager. A2 com fluorescência.

Resultados e Discussão:

As flores de *D. polycladus* são trímeras, heteroclamídeas e possuem uma bráctea floral. O androceu é homodínamo, apresenta seis estames, dos quais três são adnatos às pétalas. O filete encontra-se fixado na face dorsal-basal da antera e apresenta formato triangular. A epiderme é uniestratificada e suas células possuem citoplasma denso e vacuolação variável. O tecido fundamental é constituído por células parenquimáticas, as quais apresentam grandes vacúolos que ocupam quase todo o volume celular; o citoplasma é menos denso que o citoplasma das células epidérmicas. É típico ao parênquima a diferenciação de grandes espaços intercelulares. O filete em seção transversal possui contorno triangular.

As anteras são tetralobadas e tetrasporângiadas. Os esporângios apresentam: epiderme, endotécio, camada média, tapete. A epiderme é uniseriada e torna-se papilada durante o desenvolvimento. O endotécio possui uma camada espessa. Bhandari (1984) propôs que endotécio com múltiplas camadas pode ser considerado uma característica plesiomórfica, o que é comum em famílias relativamente mais primitivas. A camada média apresenta de dois a três estratos. O tapete é do tipo secretor, também observado em *D. pseudococcinea* (MENDES et al., 2012) e *Dyckia racianae* (PALUDETTE, 2013). Johri et al. (1992) descrevem tapete tipo secretor para Bromeliaceae. Furness; Rudall (1998), Conceição (2005), Sartori (2008), citam tapete invasivo para algumas espécies de bromélias. Para Pacini (1997) o tapete secretor é a condição mais primitiva. O tipo de padrão do tapete não pode ser considerado como um caractere que possa ser usado para inferir as relações filogenéticas e/ou auxiliar na compreensão da evolução morfológica no grupo. Com o avanço do desenvolvimento parte dos estratos parietais é consumido, persistindo apenas a epiderme,

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

o endotécio e a camada média, com um ou dois estratos celulares, nas regiões dorsal e ventral dos esporângios. No endotécio são observados espessamentos parietais típicos, os quais também se desenvolvem nos estratos remanescentes da camada média. A maceração das anteras maduras permitiu a identificação de quatro tipos de espessamentos: em “U”, helicoidal, reticulado e anelar. A análise histológica não permitiu, de forma conclusiva, interpretar se existe tipo de espessamento parietal específico ao tipo de camada celular, do endotécio ou das derivadas das camadas médias.

As células do tecido esporogênico se diferenciam em células-mãe de micrósporos (CMM), onde o início do processo de diferenciação é marcado por uma expansão celular, núcleos maiores e pequenos vacúolos. Ao final da sua diferenciação as CMM possuem maior volume em relação às fases anteriores, não apresentam vacúolos e o núcleo ocupa grande parte do citoplasma. Pouco antes do início da meiose ocorre o depósito de calose, isolando os meiócitos. As CMA dividem-se e originam díades, estas estão envoltas por calose. A citocinese é caracterizada como sendo sucessiva. Furness et al. (2002) relatam esse padrão como sendo típico para as monocotiledôneas.

Após a meiose II, ocorre a formação de tétrades isobilaterais e decussadas. Durante a meiose inicia-se formação de espaços intercelulares entre os meiócitos. Espaços intercelulares similares foram observados em *Dyckia racinae* (PALUDETTE, 2013). A análise das imagens apresentadas por Mendes et al. (2012), nos mesmos estádios, permitem caracterização similar para *D. pseudococcinea*. O final desta etapa é marcado pela dissolução da calose e liberação dos micrósporos no lóculo da antera, seguido de período de rápida expansão de volume dos micrósporos e desenvolvimento da exina e da região da abertura. Como etapa inicial da gametogênese, foi observada diferenciação de um vacúolo que desloca o núcleo para o polo generativo. Posteriormente, ocorre a primeira divisão mitótica assimétrica, a qual resulta em uma célula vegetativa maior e uma célula generativa menor, periférica e lenticular, que caracterizam o estádio bicelular do grão de pólen. No decorrer do desenvolvimento, a célula generativa migra em direção ao núcleo da célula vegetativa. A célula generativa quando totalmente englobada se torna fusiforme e forma a unidade germinativa masculina com o núcleo da célula vegetativa. O grão de pólen em *D. polycladus* é disperso na forma bicelular, também observado em outras espécies da família (JOHRI et al., 1992; CONCEIÇÃO, 2005) e na maioria das angiospermas.

Conclusão:

Os resultados específicos relativos à diferenciação das células reprodutivas, como as células-mãe de micrósporos, dos micrósporos e dos microgametófitos são similares ao descritos para Bromeliaceae e monocotiledôneas de maneira ampla. Como exemplos, podem ser citados estrutura anatômica e histológica das anteras, o modo de formação dos micrósporos bem como padrões de organização das tétrades. A ocorrência de espessamentos parietais em derivadas das camadas médias é peculiar, e incomum, ao até então descrito para espécies de *Dyckia*, revelando também que as células das camadas médias não são efêmeras, como é usual no gênero e em Bromeliaceae. Além disso, a diversidade de espessamentos parietais mostra-se importante, e também incomum em estudos na família. De maneira geral, diversos dos resultados são estáveis dentro do grupo, enquanto outros aparentemente são peculiares à *D. polycladus* os quais podem estar indicando maior plasticidade de

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

interação com o ambiente em função da estratégia de liberação dos grãos de pólen. Os dados apresentados são importantes para melhor compreensão do funcionamento do processo reprodutivo de *D. polycladus*, além de inéditos para a espécie.

Palavras chave: Esporogênese, Gametogênese, Bromeliaceae, *Dyckia*, Grão de pólen.

Agradecimentos: Departamento de Biologia/CCNE - UFSM. CAPES.

Referência Bibliográfica:

- AOYAMA, E. M.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de *Aechmea Ruiz & Pav.* Subgênero *Lamprococcus* (Beer) Baker e espécies relacionadas (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v.26 (4), p. 461-473, 2003.
- BHANDARI, N.N. The microsporangium. In: JOHRI, B.M. (Ed.). *Embryology of angiosperms*. Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag, p. 53-121, 1984.
- CONCEIÇÃO, S. P. Ontogenia das anteras de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae). Monografia de conclusão de curso. Universidade Santa Úrsula, Rio de Janeiro, RJ, 2005.
- FRANKLIN, G.L. Preparation of thin section of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature*. V.155, N 3924, P 51, 1945.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique. Some principles and new methods. *American Journal of Botany*, v. 55, p. 123-142, 1968.
- FUNDAÇÃO ZOBOTANICA DO RIO GRANDE DO SUL. Lista Vermelha da Flora do Rio Grande do Sul. Disponível em <http://www.fzb.rs.gov.br/> (acessado em 19/06/2015)
- FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. The tapetum and systematics in monocotyledons. *Botanical Review*, v.64(3), p. 201-239, 1998.
- FURNESS C. A.; RUDALL, P. J. Microsporogenesis in Monocotyledons. *Annals of Botany*, v. 84, p. 475-499, 1999.
- FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J.; SAMPSON, F. B. (2002). Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *International Journal Plant Science*, 163, 235-260.
- GABRIEL, B.L. *Biological Electron Microscopy*. Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1982.
- GERRITS, P. O.; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy*, v. 132, p. 81-85, 1983.
- GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E.; SYSTMA, K. J. Phylogeny, adaptative radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso*, v. 23, p. 3-26, 2007.
- GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; EE, B. V.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, J. A. C.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.;

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

- BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptative radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, v. 98 (5): 872-895. 2011.
- OLIVEIRA, J.M.S; MARTINS, M.S; DORNELES, M.P; FREITAS, C.C. Starch distribution in anthers, microspores and pollen grains in *Aechmea recurvata* (Klotzsch.) L.B.Sm., *Dyckia racinae* L.B.Sm. and *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasílica*, 29(1): 103-112. 2015.
- JOHRI, B.M., AMBEGAOKAR, K.B., SRIVASTAVA, P.S. *Comparative Embryology of Angiosperms*. Springer, Berlin, 1992.
- LAKSHMAN, K.K., *Embryological studies in Bromeliaceae. I. Lindmania penduliflora* (Ch Wright) Stapf. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B*, v. 65, p. 49-55, 1967.
- MARTIN, F.W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, v. 34, p. 125-128, 1959.
- MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. R. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 1000, p. 405-414, 1976.
- MENDES, S. P., COSTA, C. G., DE TONI, K. L.G. De. Androecium development in the bromeliad *Dyckia pseudococcinea* L.B.Sm. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered species endemic to Brazil: implications for conservation. *Flora*, v. 207 (2012), p.622- 627, 2012.
- PALUDETTE, M.D. Desenvolvimento inicial, caracterização estrutural da flor, androsporogênese e androgametogênese em *Dyckia racinae* .B.Sm. (PITCAIRNIOIDEAE-BROMELIACEAE) Dissertação Mestrado em Agrobiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.
- PALUDETTE, M.D.; OLIVEIRA, J.M.S ; CANTO-DOROW, T.S. *Dyckia racinae* L. B. Sm. (Bromeliaceae): morphological description emphasizing the reproductive structures. *Iheringia*. v. 69, n. 2, p. 397-404, 2014.
- PACINI, E. Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities *Canadian Journal of Botany*. v.75, p. 1448-1459, 1997.
- PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, v. 18 (2), p. 319-331, 2004.
- PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, v. 21 (3), p. 657-673, 2007.
- PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. *Rodriguésia*, v. 59 (1), p. 113-128, 2008.
- RAO, A. N.; WEE, Y. C. Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. *New Phytologist*, v. 83, p.485-497. 1979.
- REITZ, R. Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica. *Flora ilustrada catarinense (BROM)*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1983.
- SAJO, M. G.; FURNESS, C. A.; PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Microsporogenesis and anther development in Bromeliaceae. *Grana*. v. 44, p. 65-74, 2005.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

SARTORI, J. S. Desenvolvimento Floral em *Vriesea carinata* Wawra (Tillandsioideae – Bromeliaceae). Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

TOMLINSON, P.B. Anatomy of the monocotyledons-Commelinales-Zingiberales. Oxford University Press, New York, 1969.