

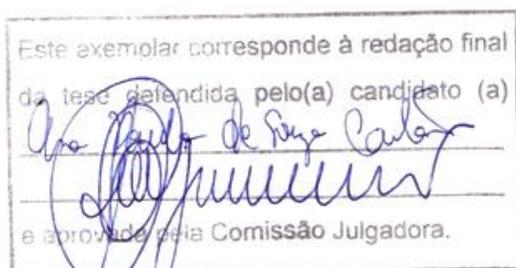
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



ANA PAULA DE SOUZA CAETANO

**“APOMIXIA E REPRODUÇÃO SEXUADA EM ESPÉCIES DE  
*MICONIA* RUIZ & PAVÓN, MELASTOMATACEAE”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Maria Carmello-Guerreiro  
Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Simone de Pádua Teixeira

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C116a	<p>Caetano, Ana Paula de Souza Apomixia e reprodução sexuada em espécies de <i>Miconia</i> Ruiz &amp; Pavón, Melastomataceae / Ana Paula de Souza Caetano. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Sandra Maria Carmello-Guerreiro, Simone de Pádua Teixeira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Apomixia. 2. Aposporia. 3. Poliembrião. 4. Esporogênese. 5. Gametogênese. I. Carmello- Guerreiro, Sandra Maria. II. Teixeira, Simone de Pádua. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(rodt/ib)</p>
-------	--

**Título em inglês:** Apomixis and sexual reproduction in species of *Miconia* Ruiz & Pavón, Melastomataceae.

**Palavras-chave em inglês:** Apomixis; Apospory; Polyembryony; Sporogenesis; Gametogenesis.

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal.

**Banca examinadora:** Sandra Maria Carmello-Guerreiro, Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira, Nelson Sabino Bittencourt Junior.

**Data da defesa:** 26/02/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Vegetal.

Campinas, 26 de fevereiro de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

Profª. Drª. Sandra Maria Carmello-Guerreiro (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira



Assinatura

Prof. Dr. Nelson Sabino Bittencourt Junior



Assinatura

Prof. Dr. João Semir

Assinatura

Drª. Maria Carolina Scatolin do Rio.

Assinatura

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO GERAL .....	01
Apomixia .....	01
A família Melastomataceae e o gênero <i>Miconia</i> .....	05
Aspectos da apomixia em Melastomataceae .....	08
OBJETIVOS .....	10
ESPÉCIES ESTUDADAS.....	11
ÁREA DE ESTUDO .....	13
ESTRUTURA GERAL DA DISSERTAÇÃO.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	16
TABELA .....	25
FIGURAS .....	29

### **CAPÍTULO 1. MICROSPOROGÊNESE, MICROGAMETOGÊNESE E VIABILIDADE POLÍNICA EM UMA ESPÉCIE APOMÍTICA E OUTRA SEXUADA DE *MICONIA* RUIZ & PAVÓN, MELASTOMATACEAE..35**

Resumo.....	37
Introdução .....	38
Material e Métodos.....	40
Resultados .....	43
Discussão.....	52
Referências bibliográficas .....	64
Tabela .....	73
Quadros .....	75
Figuras .....	77

<b>CAPÍTULO 2. MEGASPOROGÊNESE, MEGAGAMETOGÊNESE E POLIEMBRIONIA EM UMA ESPÉCIE APOMÍTICA E OUTRA SEXUADA DE <i>MICONIA RUIZ &amp; PAVÓN</i>, MELASTOMATACEAE.....</b>	<b>93</b>
Resumo.....	95
Introdução .....	96
Material e Métodos.....	98
Resultados .....	101
Discussão.....	107
Referências bibliográficas .....	121
Tabela .....	129
Quadros .....	131
Figuras .....	133
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	147

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp;

A Sandra Maria Carmello-Guerreiro, por confiar em mim e acreditar em meu trabalho, me apoiando sempre. Agradeço pela paciência, amizade e disposição. Agradeço pelas idéias e pelo exemplo profissional e pessoal;

A Simone de Pádua Teixeira, por todo o apoio, pela injeção de ânimo em momentos difíceis e pelas sugestões que contribuíram de forma ímpar para a realização deste trabalho;

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal da Unicamp, pela inspiração profissional e pela formação pessoal e científica;

A Ana Paula Lacchia, Daniela Simão e George Shepherd, membros da banca de qualificação, e Ana Carolina Scatolin, João Semir e Paulo Eugênio Macedo de Oliveira, membros da pré-banca, pelas sugestões e críticas;

A Eliana Forni Martins, por estar sempre acessível, pela disposição e ajuda com a contagem cromossômica;

A Jorge Tamashiro, pela ajuda com as coletas, identificação do material e pelos momentos de descontração durante as viagens à Itirapina;

Aos amigos do laboratório de Anatomia Vegetal: Bárbara Biazotti, Carla Vaccari Ferreira, Nazareth Urquiza, Sandra Obando e Shesterson Aguiar, pelo apoio, pelos risos, conversas, confidências e pela amizade;

A Priscila Cortez, que participou diretamente do meu crescimento profissional. Agradeço pelas inúmeras discussões sobre apomixia, *Miconia* e por aí vai. Pela troca de idéias, pelas palavras de apoio nos momentos difíceis e sugestões valiosas ao meu trabalho;

Aos amigos e colegas do departamento de Biologia Vegetal: Ana Paula de Moraes, Adaíses Maciel, Caroline Polido, Fabiana Firetti, Felipe Amorim, Gustavo Shimizu, João Aranha, Karina Fidanza, Larissa Veiga, Larissa Pereira, Marcela Firens, Marcelo Monge, Rodrigo, Rosemeri Morokawa, Tiago Mouzinho e Vanessa Mancuso;

Aos funcionários do departamento de Biologia Vegetal, em especial a secretária de pós graduação, Maria Roseli e aos técnicos, Iara Bressan, João Carlos Galvão, Lívia Cordi e Sebastião Militão, que contribuíram diretamente na execução deste trabalho;

As meninas da república: Karina Degaki, Nívea Dias e Patrícia Lima, pelo companheirismo, amizade e pelas lições de convivência;

A Rubens Teixeira de Queiroz, pelo carinho, companheirismo, paciência e amor;

A Kátia, minha irmã, pela amizade e apoio “psicológico”;

A Ilzete e Paulo César, meus pais, pelo apoio incondicional, educação e dedicação a mim concedidos, Pelo exemplo de perseverança, trabalho e caráter. Pelo amor e amizade, pela compreensão... por tudo o que sou e por tudo que conquistei, agradeço a vocês.

## RESUMO

Em *Miconia fallax*, uma espécie apomítica, e *Miconia pepericarpa*, uma espécie sexuada, os processos de esporogênese e gametogênese apresentam diversas características semelhantes, muitas delas compartilhadas com outros membros da família Melastomataceae. Entretanto, apesar das similaridades, algumas diferenças foram observadas. Em relação à antera, o formato da célula generativa no grão de pólen maduro é fusiforme em *M. pepericarpa* e esférico em *M. fallax*. Além disso, a quantidade de grãos de pólen viáveis produzidos é marcadamente menor na espécie apomítica. Quanto ao óvulo, as diferenças encontradas são ainda mais marcantes. Em *M. fallax*, células denominadas iniciais apospóricas se diferenciam juntamente com as células-mãe de megásporos, levando à formação de mais de um saco embrionário. Assim, enquanto *M. fallax* apresenta até três sacos embrionários no óvulo maduro, sendo um sexuado e até dois apospóricos, *M. pepericarpa* exibe apenas um saco embrionário. Além disso, na espécie apomítica *M. fallax*, constatou-se a formação de embriões adventícios em sementes jovens. Provavelmente, o desenvolvimento de embriões a partir dos sacos embrionários apospóricos juntamente com a formação do embrião zigótico e adventício levam à poliembrião em *M. fallax*, com formação de até quatro embriões em uma mesma semente. Das diferenças encontradas entre as duas espécies, apenas o formato da célula generativa não foi relacionado à apomixia, sendo um caráter específico. Já as demais diferenças, são características exclusivas de *M. fallax*, e estão diretamente relacionadas à apomixia, sendo elas: 1) formação de uma proporção menor de grãos de pólen viáveis; 2) diferenciação de células iniciais apospóricas; 3) formação de múltiplos sacos embrionários; 4) desenvolvimento de embriões apomíticos; 5) poliembrião. A espécie apomítica *M. fallax* é poliplóide e,

neste caso, a viabilidade polínica baixa pode ser explicada pela ocorrência de alterações na meiose, comuns em espécies poliplóides. A poliembrionia, também tem sido bastante relacionada à apomixia, sendo esta relação confirmada pelos dados obtidos neste trabalho. Além disso, com os resultados alcançados, foi possível reconhecer que *M. fallax* é uma apomítica facultativa, uma vez que, além da possibilidade de produção de embriões apomíticos, a espécie ainda preserva os mecanismos de formação de grãos de pólen e sacos embrionários sexuados, com possibilidade de produção de embriões zigóticos.

**Palavras-chave:** Apomixia, aposporia, poliembrionia, esporogênese, gametogênese

## ABSTRACT

In *Miconia fallax*, an apomictic species, and *Miconia pepericarpa*, a sexual species, the processes of gametogenesis and sporogenesis have a number of similar characteristics, many of which are shared with other members of the family Melastomataceae. However, despite the similarities, some differences were observed. Concerning the anther, the generative cell in mature pollen grain is spindle shaped in *M. pepericarpa* and spherical in *M. fallax*. Furthermore, the quantity of viable pollen grains produced is markedly lower in apomictic species. Regarding the ovule, differences are even more striking. In *M. fallax*, cells called aposporous initials differentiate themselves along with the megaspore mother cell, leading to the formation of more than one embryo sac. Thus, while *M. fallax* exhibit up to three embryo sacs in mature ovule, one being sexed and a maximum of two aposporous, *M. pepericarpa* displays only one embryo sac. Moreover, in apomictic species *M. fallax*, we found the formation of adventitive embryos in young seeds. Probably the development of embryos from the aposporous embryo sac parallel to the formation of zygotic and adventitious embryos lead to polyembryony in *M. fallax*, with formation of up to four embryos in a single seed. About differences found between this two species, only the shape of the generative cell was not related to apomixis, as it is a specific character. The other differences are unique features of *M. fallax* and are directly related to apomixis, namely: 1) the formation of a smaller proportion of viable pollen grains, 2) the differentiation of aposporous initial cells 3) the formation of multiple embryo sacs, 4) the development of apomictic embryos (adventitious or aposporic), and 5) polyembryony. The apomictic species *M. fallax* is polyploid, and, in this case, the low pollen viability can be explained by the occurrence of changes in meiosis, common in polyploid species. The polyembryony, has also been frequently related to apomixis, and

this relationship is confirmed by data obtained in this work. Furthermore, with these results, it was possible to recognize that *M. fallax* is a facultative apomictic, since in addition to the possibility of apomictic embryo production the species still preserves the mechanisms of the formation of pollen grain and sexual embryo sac, with the possibility of producing zygotic embryos.

**Key-words:** Apomixis, apospory, polyembryony, sporogenesis, gametogenesis

## INTRODUÇÃO GERAL

### Apomixia

A descoberta da apomixia em angiospermas ocorreu por volta de 1841, quando Smith (*apud* Asker & Jerling 1992, Naumova 1993) observou que indivíduos com flores pistiladas da espécie dióica *Alchornea ilicifolia* (Js. Sm.) Müll. Arg., vinda da Austrália e plantada no Royal Botanic Gardens, Kew, na Inglaterra, formavam sementes viáveis mesmo na ausência de indivíduos com flores estaminadas. Entretanto, o termo apomixia (“sem mistura”) só foi introduzido em 1908 por Winkler (*apud* Asker & Jerling 1992) para nomear qualquer processo de formação de um novo organismo sem a ocorrência de fecundação, incluindo a propagação vegetativa. Décadas depois, Gustafsson (1946, 1947a, b *apud* Naumova 1993) também se referiu à apomixia como sinônimo de reprodução assexual, dividindo o processo em propagação vegetativa e agamospermia que, por sua vez, foi subdividida em diplosporia, aposporia e embrionia adventícia. Recentemente, os trabalhos têm utilizado o termo apomixia como sinônimo de agamospermia, ou seja, reprodução via sementes sem ocorrência da dupla fecundação (Asker & Jerling 1992, Koltunow *et al.* 1995, Richards 1997, Koltunow & Grossniklaus 2003, Bicknell & Koltunow 2004, Naumova 2008). Neste estudo, a apomixia também é utilizada como sinônimo de agamospermia.

O termo apomixia pode ser definido como um processo de formação assexuada de sementes, com o desenvolvimento de um embrião viável a partir de tecidos do óvulo (Bicknell & Koltunow 2004, Koltunow & Grossniklaus 2003). Três fatores compõem o mecanismo apomítico: a apomeiose (formação do saco embrionário sem que ocorra a meiose), a partenogênese (desenvolvimento autônomo do embrião) e a produção de

endosperma - de forma autônoma ou derivada da fecundação (Koltunow 1993, Bicknell & Koltunow 2004).

De acordo com a origem do embrião, a apomixia pode ser classificada em dois tipos básicos: esporofítica e gametofítica. Na apomixia esporofítica, ou embrionia adventícia, o embrião origina-se a partir de células nucelares ou tegumentares do óvulo, geralmente após a maturação do mesmo (Nogler 1984, Koltunow 1993, Bicknell & Koltunow 2004). Na apomixia gametofítica, o desenvolvimento do embrião ocorre no interior de um saco embrionário não reduzido, ou seja, um saco embrionário cujas células apresentam número cromossômico somático. Neste caso, o endosperma pode se desenvolver de forma autônoma ou induzida pela fecundação. Baseando-se no tipo de célula que origina o saco embrionário, o mecanismo gametofítico é subdividido em diplosporia e aposporia. Na diplosporia, o saco embrionário não reduzido origina-se da célula mãe de megásporos por supressão da meiose. Na aposporia o saco embrionário origina-se de uma ou mais célula(s) somática(s) do óvulo, geralmente do nucelo (Nogler 1984, Bicknell & Koltunow 2004).

A embrionia adventícia e a aposporia podem estar relacionadas à poliembrionia, ou seja, na formação de mais de um embrião em uma mesma semente (Maheshwari 1950, Lakshmanan & Ambegaokar 1984). No caso da embrionia adventícia, os embriões supranumerários são originados a partir da diferenciação de mais de uma célula do nucelo ou dos tegumentos (Naumova 1993). A poliembrionia pode resultar também do desenvolvimento de embriões a partir de múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo (Lakshmanan & Ambegaokar 1984). Neste caso, este fenômeno pode estar associado à aposporia, por meio do sucesso de embriões originados do desenvolvimento de vários sacos embrionários apospóricos (Koltunow & Grossniklaus

2003, Batygina & Vinogradova 2007). Além disso, como a embrionia adventícia e a aposporia não excluem a possibilidade do processo sexual, os embriões adventícios ou apospóricos podem ainda ocorrer ao lado do embrião zigótico, originado pela fecundação da oosfera pelo núcleo gamético da célula espermática (Naumova 1993, Tucker & Koltunow 2009). Vale ainda ressaltar que a poliembrionia pode não estar associada à apomixia, sendo resultado de outros processos como: clivagem do zigoto ou do proembrião, evento considerado raro em angiospermas; diferenciação de células do suspensor; desenvolvimento de células do saco embrionário diferentes da oosfera, frequentemente das sinérgides e muito raramente das antípodas; entre outros (Lakshmanan & Ambegaokar 1984, Batygina & Vinogradova 2007).

Apesar de ser frequentemente sugerido que os embriões apomíticos são geneticamente idênticos à planta mãe, com exceção daqueles em que ocorrem mutações esporádicas (Nogler 1984, Koltunow 1993), estudos envolvendo genética de populações naturais têm demonstrado que os apomíticos não produzem descendentes tão uniformes como o esperado, mantendo certa diversidade por meio de recombinação genética, mutações, auto-segregação, amplificação ou perda de DNA, rearranjo cromossômico, entre outros (Asker e Jerling 1992, Berthaud 2001). Além disso, apesar de em todos os tipos de apomixia os embriões serem derivados exclusivamente do genótipo materno, cada tipo é associado com diferentes probabilidades de produção de uma progênie sexual, diferentes pressões para manter a fertilidade do pólen e diferentes níveis esperados de diversidade genética dentro das populações (Whitton *et al.* 2008).

Nas espécies apomíticas, o desenvolvimento do endosperma pode ser independente ou não da fertilização. Se a espécie é pseudogâmica, é necessário que

ocorra a fusão entre o núcleo espermático e núcleo secundário para formação do endosperma e, conseqüentemente, desenvolvimento normal do embrião. Porém, em algumas espécies a fecundação não é necessária, e há formação autônoma de endosperma (Asker & Jerling 1992, Koltunow 1993). Além disso, há também relatos de espécies nas quais o embrião aparentemente se desenvolve sem a presença de um endosperma, como em *Garcinia* L., Clusiaceae (Richards 1990, Van Baarlen *et al.* 1999).

Como já mencionado, nem sempre a apomixia exclui a reprodução sexual. Os chamados apomíticos facultativos retêm a capacidade de se reproduzir sexualmente e são considerados os apomíticos mais comuns (Nogler 1984). Nestas espécies, o balanço entre apomixia e sexualidade pode ser influenciado, além dos fatores genéticos, por condições ambientais, como mudanças de temperatura e no regime de luz (Nogler 1984, Asker & Jerling 1992, Koltunow & Grossniklaus 2003). Mesmo em certos apomíticos autônomos, sinérgides e grãos de pólen permanecem funcionais, embora não sejam necessários (Nogler 1984). Tem sido questionado se plantas totalmente apomíticas realmente existem na natureza (Nogler 1984, Asker e Jerling 1992), mas alguns dados com espécies apomíticas nas quais a produção de grãos de pólen viáveis é nula, como em *Miconia albicans* (Sw.) Steud., indicam que estas espécies não se reproduzem sexuadamente, sendo apomíticas obrigatórias (Goldenberg & Shepherd 1998, Caetano 2007, Cortez 2007).

As plantas apomíticas apresentam algumas vantagens agronômicas. Nelas, genótipos originados por processos de mutação ou hibridação podem ser rapidamente fixados e distribuídos em amplas áreas (Stebbins 1985). Além disso, podemos citar a importância da apomixia na redução em custo e tempo das polinizações cruzadas; na

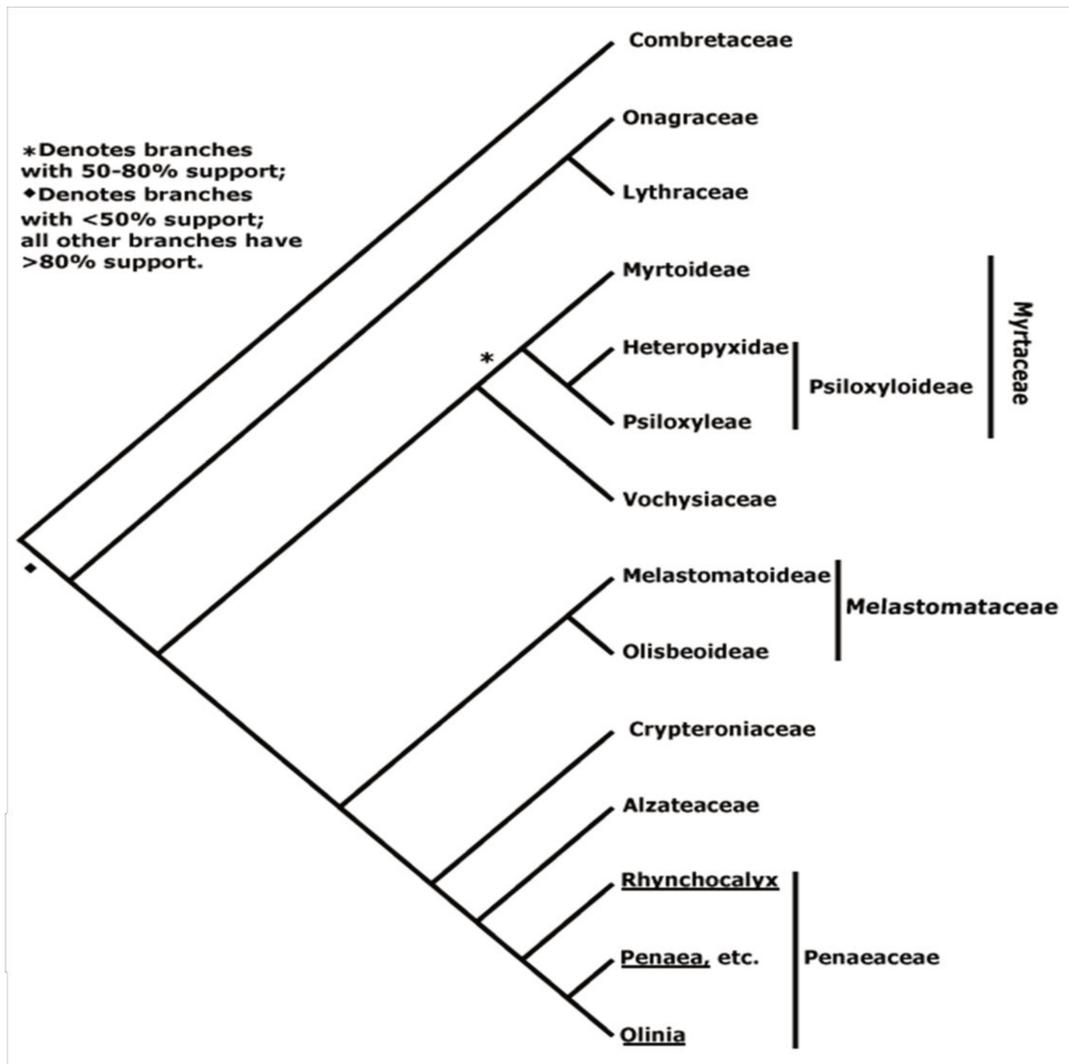
prevenção de complicações associadas à reprodução sexual, como independência de polinizadores e de polinizações cruzadas e na prevenção da transmissão de vírus em plantas propagadas vegetativamente (Hanna 1995, Jefferson & Bicknell, 1995; Koltunow *et al.* 1995, Savidan 2000). Associado a isso, a apomixia pode atribuir às espécies uma maior capacidade de colonização, já que independem de polinizadores. Espécies sexuadas devem ser muito mais dependentes de habitats estáveis com populações ativas de polinizadores especializados, em particular as espécies com anteras poricidas, relacionadas à “buzz polination”, como ocorre em Melastomataceae (Goldenberg 2000a).

Os processos apomíticos foram descritos em aproximadamente 460 táxons, distribuídos em 33 famílias de Angiospermas (Carman 1997), sendo marcadamente mais freqüentes em alguns grupos de plantas como Poaceae, Rosaceae, Asteraceae, Rutaceae (Richards 1997, Naumova 2008) e Melastomataceae (Goldenberg & Shepherd 1998), refletindo possivelmente, uma predisposição que certos grupos têm à apomixia (Grimanelli *et al.* 2001). A ampla distribuição taxonômica de espécies apomíticas indica que a apomixia surgiu em diversos momentos durante a evolução das plantas com flores, e que pode ter sido determinada por oportunidades genéticas apropriadas favorecidas por circunstâncias ecológicas (Whitton *et al.* 2008).

### **A família Melastomataceae e o gênero *Miconia***

A família Melastomataceae Juss. pertence à ordem Myrtales Juss. ex Bercht. & J. Presl, um grupo monofilético composto por nove famílias (Fig. 1): Alzateaceae, Combretaceae, Crypteroniaceae, Lythraceae, Melastomataceae (incluindo Memecylaceae), Myrtaceae (incluindo Heteropyxidaceae e Psiloxylaceae), Penaeaceae

(incluindo Oliniaceae, Rhynchocalycaceae), Onagraceae e Vochysiaceae (APG III 2009).



**Figura 1.** Árvore filogenética de Myrtales, incluindo nove famílias.

Fonte: [www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/) (acesso em 01/11/2009)

Melastomataceae inclui cerca de 166 gêneros e aproximadamente 4.500 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (Fig. 2), das quais cerca de

3.000 são registradas para o novo mundo (Renner 1993, Clausing & Renner 2001). No Brasil, Melastomataceae é considerada uma das maiores famílias de angiospermas, com cerca de 68 gêneros e 1.500 espécies, ocorrendo em praticamente todas as formações vegetacionais (Romero & Martins 2001).

Os representantes da família são reconhecidos pela nervura acródroma de suas folhas, flores perfeitas, radialmente simétricas e diplostêmones, e estames com apêndices no conectivo (Clausing & Renner 2001).



**Figura 2.** Distribuição geográfica de representantes de Melastomataceae.  
Fonte: [www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/) (acesso em 01/11/2009).

*Miconia* Ruiz & Pavón é o maior gênero de Melastomataceae, com cerca de 1050 espécies (Goldenberg 2000b), que ocorrem desde o sul do México e Caribe até o norte da Argentina e Uruguai (Goldenberg *et al.* 2008). O gênero é claramente parafilético (Michelangeli *et al.* 2004, Goldenberg *et al.* 2008) e caracterizado por folhas destituídas de formicários, inflorescências terminais, hipanto sem constrição no ápice, cálice com pequenas lacínias externas, pétalas livres com ápice arredondado, obtuso ou emarginado, e anteras sem bifurcação na base (Goldenberg *et al.* 2008).

## Aspectos da apomixia em Melastomataceae

O sistema reprodutivo de aproximadamente 130 espécies de Melastomataceae já foi estudado (Sobrevila & Arroyo 1982, Renner 1984, 1989, Borges 1991, Dent-Acosta & Breckon 1991, Fracasso & Sazima 2004, Goldenberg & Shepherd 1998, Sousa-Silva 2000, Goldenberg & Varassin 2001, Santos 2003, Santos 2008) e os dados, apesar de relativamente poucos, frente ao grande número de espécies da família, apontam algumas tendências. A apomixia se concentra notoriamente na tribo Miconieae (Tab. 1), na qual uma proporção de 68,3% das espécies estudadas são apomíticas (Renner 1984, 1989, Borges 1991, Fracasso & Sazima 2004, Goldenberg & Shepherd 1998, Sousa-Silva 2000, Goldenberg & Varassin 2001, Santos 2003, Santos 2008). Segundo Goldenberg & Shepherd (1998), se os dados existentes de sistema reprodutivo em Melastomataceae são de fato representativos, e se a proporção de espécies apomíticas é constante, a tribo Miconieae apresentaria cerca de 1300 espécies apomíticas, e neste caso seria um dos maiores complexos apomíticos nas angiospermas.

Outro aspecto importante é a viabilidade polínica baixa ou nula observada em diversas espécies apomíticas do gênero (Tab. 1) (Borges 1991, Goldenberg & Shepherd 1998, Souza-Silva 2000, Simão *et al.* 2006), condição que deve ser melhor investigada. Acredita-se que a variação da viabilidade polínica em espécies apomíticas de *Miconia* pode estar relacionada principalmente a irregularidades no processo de divisão meiótica (Goldenberg & Shepherd 1998). O número básico de cromossomos para a tribo *Miconieae* é  $x=17$  (Almeida & Chuang 1992), mas algumas espécies podem ter número cromossômico maior, provavelmente devido à poliploidia, já que várias destas espécies parecem ter origem híbrida. Frequentemente, a combinação de dois

genomas em um híbrido interespecífico resulta em anormalidades na meiose (Nijs & Menken 1996, Risso-Pascotto *et al.* 2006), sendo esperada a formação de grãos de pólen inviáveis.

Como já mencionado, a apomixia parece estar relacionada com eventos de hibridação e poliploidia. Grande parte das plantas apomíticas gametofíticas são poliplóides, frequentemente originados pela duplicação de genomas diferentes, normalmente após um evento de hibridação. Muitos híbridos poderiam ser incapazes de se reproduzir sexualmente, sendo na maioria das vezes inférteis. Adquirindo a capacidade de formação de sementes via apomixia, esses híbridos inférteis que se multiplicariam apenas vegetativamente, teriam um modo de aumentar sua aptidão reprodutiva (Asker & Jerling 1992).

Na tribo Miconieae, diferentes tipos de apomixia podem ocorrer. A diplosporia foi descrita em *Miconia albicans* por Caetano (2007) e Cortez (2007). Borges (1991) relata, em *Leandra australis* (Cham.) Cogn., o desenvolvimento de embriões adventícios e a formação de sacos embrionários não reduzidos, provavelmente diplospóricos, indicando que nesta espécie, apomixia esporofítica e gametofítica coexistem. Borges (1991) também descreve a formação de embriões adventícios nucelares em *Miconia discolor* DC. Em *Miconia ferruginata* DC. e *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC., apomixia esporofítica também é relatada, com a formação de embriões adventícios a partir de células do nucelo (Caetano *et al.* em prep.).

Estudos envolvendo sistema reprodutivo em Melastomataceae apontam para a necessidade de informações anatômicas. Esse tipo de dado possibilitaria conhecer a origem do embrião apomítico e as anormalidades morfológicas ocorrentes na formação e no desenvolvimento de esporos e gametas que estão associadas à apomixia.

Somado a isso, a avaliação de dados sobre viabilidade polínica, poliembrião e número cromossômico permitiriam interpretar de forma mais abrangente o mecanismo apomítico, tão frequente na família. Estudos deste tipo são comuns em espécies de Asteraceae e Poaceae, principalmente em herbáceas de clima temperado, sendo relativamente raros em espécies tropicais. Desta forma, a família Melastomataceae, especialmente a tribo Miconieae, oferece a oportunidade de discutir o processo apomítico em um cenário diferente do que já foi estudado até agora.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho é determinar quais alterações ocorrem no processo embriológico em uma espécie apomítica de *Miconia* em relação a uma espécie sexuada do mesmo gênero. Pretende-se também investigar se, na espécie estudada, a apomixia ocorre em paralelo ao processo sexuado e se este fenômeno está relacionado a eventos de poliembrião, poliploidia e inviabilidade polínica.

### **Objetivos específicos**

- Descrever a megasporogênese, megagametogênese, microsporogênese e microgametogênese em duas espécies de *Miconia* com sistemas reprodutivos contrastantes: *Miconia fallax* DC., uma espécie apomítica; e *Miconia pepericarpa* Mart. ex DC., uma espécie sexuada;
- Comparar as principais características embriológicas das espécies, buscando ressaltar quais estão relacionadas à apomixia;

- Reconhecer o tipo de apomixia em *M. fallax* por meio do estudo da origem do embrião apomítico;
- Verificar a ocorrência de poliembriõnia. Se a espécie for poliembriônica, determinar também a taxa de poliembriõnia e verificar a existência ou não de diferenças morfológicas entre os embriões formados;
- Analisar a viabilidade polínica de ambas as espécies e a ploidia da espécie apomítica, buscando responder as seguintes questões: 1) Existe diferença de viabilidade polínica entre a espécie sexuada e a espécie apomítica? 2) Se a espécie apomítica apresenta viabilidade polínica nula ou baixa, essa condição pode estar relacionada a eventos de poliploidia?

## **ESPÉCIES ESTUDADAS**

As espécies estudadas neste trabalho pertencem à tribo Miconieae, família Melastomataceae. A escolha destas espécies foi feita com base no seu sistema reprodutivo, que foi caracterizado por Goldenberg & Shepherd (1998). Estes autores classificaram *Miconia fallax* DC. (Fig. 1.A-K) como uma espécie apomítica e *Miconia pepericarpa* Mart. ex DC. (Fig. 2.A-F) como sexuada e autoincompatível.

### ***Miconia fallax***

*Miconia fallax* é conhecida popularmente como guamirim-do-cerrado ou jacatirão. Ocorre desde o Peru, Venezuela e Guiana até o Paraguai e Sudeste do Brasil (Wurdack 1973). O período de floração estende-se de setembro a outubro; a frutificação de outubro a janeiro (Goldenberg 1994).

Arbustos de até 2 m. Possui inflorescências do tipo panículas escorpióides, com cerca de 15 cm, terminais. As flores são sésseis, pentâmeras, com cálice persistente, lacínias internas e externas fundidas, triangulares e agudas. As pétalas são brancas com margem ciliada; anteras com cerca de 4 mm de comprimento, amarelas, uniporosas e com conectivo espessado no dorso. O ovário é trilocular e glabro, com estilete levemente espessado no ápice. Fruto do tipo baga atropurpúrea, com cerca de 45 sementes (Martins 2009).

### ***Miconia pepericarpa***

No Brasil esta espécie ocorre em Goiás, Distrito Federal, Bahia, Minas Gerais e São Paulo. Presente em cerrados fechados e bordas de mata. O período de floração estende-se de novembro a dezembro; a frutificação de janeiro a julho (Goldenberg 1994).

Arbustos de 2-3 m ou árvores de até 5 m. Possui inflorescências do tipo panículas de glomérulos, com até 10 cm e ramos secundários curtos, de até 2,5 cm, com apenas um glomérulo na extremidade. As flores são sésseis e pequenas, tetrâmeras, com cálice persistente, lacínias internas curtas, largamente triangulares a arredondadas, externas triangulares, agudas, muito reduzidas. As pétalas são de coloração creme, com cerca de 0,1 cm. Anteras com cerca de 1,5 mm de comprimento, creme, uniporosas, com conectivo curtamente prolongado abaixo das tecas e espessado no dorso. O ovário é bi ou trilocular, com estilete espessado no ápice. Fruto do tipo baga azul pálida, com 2-3 sementes (Martins 2009).

## ÁREA DE ESTUDO

*Miconia fallax* e *M. pepericarpa* foram coletadas em fragmentos de cerrado no município de Itirapina (22°15' S e 47°49' W), no estado de São Paulo, Brasil (Fig. 3), a uma altitude aproximada de 770 m. Segundo Silva (2005), o clima da região é caracterizado pelo tipo Cwa de Köppen (1948) – mesotérmico com inverno seco e frio, e verão quente e chuvoso. A temperatura média anual é de 21,9°C, e a precipitação média é de 1.458 mm (Silva 2005).



**Figura 3.** Localização do município de Itirapina, SP, Brasil.

*M. fallax* foi coletada em duas áreas distintas, denominadas: Graúna (População I) e Valério (População II), e *M. pepericarpa* foi coletada em um único local (Pedregulho) (Fig. 4).



**Figura 4.** Localização das três populações estudadas: Graúna, população I, Valério, População II, e Pedregulho.

Valério e Pedregulho são fragmentos de cerrado incluídos na Estação Experimental e Ecológica de Itirapina, uma das unidades da Divisão de Florestas e Estações Experimentais do Instituto Florestal. A vegetação natural no Valério é classificada como cerradão ou cerrado “stricto sensu” subtipo denso (Ribeiro *et al.* 1983), porém, no local existem grandes áreas com plantações de espécies de *Pinus*, onde também crescem alguns representantes de espécies de cerrado, incluindo *M. fallax*. No fragmento Pedregulho, o cerrado é classificado como “stricto sensu” e cerradão (Sasaki *et al.* 1999, Simabukuro *et al.* 1999). O fragmento de cerrado Graúna encontra-se em uma propriedade particular e sua vegetação também é classificada como cerrado “stricto sensu” (Ribeiro *et al.* 1983).

## **ESTRUTURA GERAL DA DISSERTAÇÃO**

### **Capítulo 1. Microsporogênese, microgametogênese e viabilidade polínica em uma espécie apomítica e outra sexuada de *Miconia* Ruiz & Pavón, Melastomataceae**

Neste capítulo aspectos embriológicos da formação do grão de pólen de uma espécie apomítica e outra sexuada foram comparados com o objetivo de detectar possíveis alterações ocorrentes no processo de microsporogênese e microgametogênese que levariam à quantidade relativamente alta de grãos de pólen inviáveis formados na espécie apomítica. Além disso, a viabilidade polínica de ambas as espécies foi calculada para evidenciar a diferença na quantidade de grãos de pólen viáveis formados. Contagens cromossômicas foram realizadas para verificar se a inviabilidade polínica poderia estar relacionada à poliploidia.

### **Capítulo 2. Megasporogênese, megagametogênese e poliembrionia em uma espécie apomítica e outra sexuada de *Miconia* Ruiz e Pavón, Melastomataceae**

A comparação do processo de megalogênese e megagametogênese de uma espécie apomítica e outra sexuada foi realizada para detectar as alterações embriológicas associadas à apomixia. Procurou-se determinar a origem do embrião apomítico e investigar se este evento ocorre em paralelo ao processo sexuado. Verificou-se também se a espécie apomítica produz embriões supranumerários (poliembrionia) e se este processo está ou não relacionado à apomixia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeda, F. 1997. Chromosome numbers and their evolutionary significance in some neotropical and paleotropical Melastomataceae. **BioLlania ed. especial** 6:167-90.
- Almeda, F. & Chuang, T.I. 1992. Chromosome numbers and their systematic significance in some Mexican Melastomataceae. **Systematic Botany** 17: 583-593.
- APG (The Angiosperm Phylogeny Group). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** 141: 399-436.
- Arroyo, M. T. K. & Cabrera, E. 1977. Preliminary self-incompatibility test for some tropical cloud forest species in Venezuela. **Incompatibility Newsletter** 8: 72-76.
- Asker, S.E. & Jerling, L. 1992. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press.
- Batygina, T.B. & Vinogradova, G.Y. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology* 38(3): 126-151.
- Baumgratz, J. F. A. & Silva, N. M. F. 1986/1988. Ecologia da polinização e biologia da reprodução de *Miconia stenostachya* DC. (Melastomataceae). **Rodriguésia** 64/66 (38-40): 11-24.
- Berthaud, J. 2001. Apomixis and the management of genetic diversity. Pp. 8-23. In: Y. Savidan, J.D. Carman, T. Dresselhaus (eds.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. El Batan: CIMMYT.
- Bicknell, R.A. & Koltunow, A.M. 2004. Understanding apomixes: recent advances and remaining comundrums. **The Plant Cell** 16: 229-245.
- Borges, H.B.N. 1991. **Biologia reprodutiva de quatro espécies de Melastomataceae**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

- Caetano, A.P.S. 2007. **Aspectos embriológicos e reprodutivos em *Miconia albicans* (Sw.) Triana e *Miconia chamissois* Naud. (Melastomataceae)**. Monografia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperm may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society** 61: 51-94.
- Clausing, G. & Renner, S.S. 2001. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany** 88: 486-498.
- Cortez, P.A. 2007. **Embriologia de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae), espécie agamospérmica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Dent-Acosta, S.R. & Breckon, G.J. 1991. **Reproductive biology of six species of Melastomataceae in western Puerto Rico**. First International Melastomataceae Symposium, Smithsonian Institution, Washington D.C.
- Fracasso, C.M. & Sazima, M. 2004. Polinização de *Cambessedesia hilariana* (Kunth) DC. (Melastomataceae): sucesso reprodutivo *versus* diversidade, comportamento e freqüência de visitas de abelhas. **Revista Brasileira de Botânica** 27(4): 797-804.
- Goldenberg, R. 1994. **Estudos sobre a biologia reprodutiva de espécies de Melastomataceae de cerrado em Itirapina, SP**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

- Goldenberg, R. 2000a. Apomixia como alternativa à reprodução sexuada em Melastomataceae. Pp. 225-230. In: T.B. Cavalcanti & B.M.T. Walter (eds.). **Tópicos Atuais de Botânica**. Embrapa Recursos Genéticos, Brasília.
- Goldenberg, R. 2000b. **O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae): I. Listagens analíticas, II. Revisão taxonômica da seção *Hypoxanthus* (Rich.ex DC.) Hook.F.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Goldenberg, R., Penneys D. S., Almeda, F., Judd, W. S. & Michelangeli F. A. 2008. Phylogeny of *Miconia* (Melastomataceae): Patterns of stamen diversification in a megadiverse neotropical genus. **International Journal of Plant Science** 169(7): 963–979.
- Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. **Plant Systematics and Evolution** 211: 13-29.
- Goldenberg, R. & Varassin, I.G. 2001. Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiá, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 24: 283-288.
- Grimanelli, D., Leblanc, O., Perotti, E. & Grossniklaus, U. 2001 Developmental genetics of gametophytic apomixis. **Trends in Genetics** 17: 597-604.
- Gustafsson, A. 1946. **Apomixis in higher plants. Part I. The mechanisms of apomixis.** Lunds Universitets Arsskrift 42: 1-67.
- Gustafsson, A. 1947a. **Apomixis in higher plants. Part II. The causal aspect of apomixis.** Lunds Universitets Arsskrift 43: 71-179.

- Gustafsson, A. 1947b. **Apomixis in higher plants. Biotype and species formation.**  
Lunds Universitets Arsskrift 43: 181-370.
- Hanna, W.W. 1995. Use of apomixis in cultivar development. **Advances in Agronomy**  
54: 333-350.
- Hokche, O.D. & Ramírez, N. 2008. Sistemas reproductivos en especies de  
Melastomataceae en Lagran Sabana (Estado Bolívar, Venezuela). **Acta Botánica  
Venezuelica** 31(2): 387-408.
- Jefferson, R.A. & Bicknell, R.A. 1995. The potential impacts of apomixis: A molecular  
genetics approach. Pp. 87-101. In: B.W.S. Sobral (ed). **The Impact of Plant  
Molecular Genetics.** Birkhäuser, Boston.
- Köeppen, W. 1948. Climatología. Fondo de Cultura Económica, México.
- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryo formed without meiosis or  
fertilization in ovules. **Plant Cell** 5: 1425-1437.
- Koltunow, A.M., Bicknell, R.A. & Chaudhury, A.M. 1995. Apomixis: Molecular strategies  
for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant  
Physiology** 108:1345-1352.
- Koltunow, A. M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective.  
**Annual Review of Plant Biology** 54: 547-574.
- Lakshmanan, K.K. & Ambegaokar, K.B. 1984. Polyembryony. Pp. 445-474. In: B.M.  
Johri (ed.). **Embryology of Angiosperms.** Springer-Verlag, Berlin.
- Lumer, C. 1982. **The pollination ecology, breeding systems and phenology of  
Blakea and Topobea (Melastomataceae) in Monteverde, Costa Rica.** Doctoral  
dissertation, The City University of New York, New York.

- Maheshwari, P. 1950. **An introduction to the embryology of angiosperms**. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Martins, A.B. (coord.). 2009. Melastomataceae. Pp. 1-167. In T.S. Melhem, M.G.L. Wanderley, S.E. Martins, S.L. Jung-Mendaçolli, G.J. Shepherd & M. Kirizawa (eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Vol. 6.
- Meenakamuri, R. & P. Kuriachan. 1990. SOCGI plant chromosome number reports–X. **Journal of Cytology and Genetics** 25: 321–322.
- Melo, G.F.A. & Machado, I.C.S. 1996. Biologia da reprodução de *Henriettea succosa* DC. (Melastomataceae). **Revista Brasileira de Biologia** 56(2): 383-389.
- Melo, G.F.A. & Machado, I.C.S. 1998. Auto-incompatibilidade em *Miconia ciliata* (L.C. Rich.) DC. (Miconieae-Melastomataceae). **Acta Botânica Brasílica** 12(2): 113-120.
- Melo, G.F., Machado, I.C. & Luceño, M. 1999. Reproducción de tres especies de *Clidemia* (Melastomataceae) en Brasil. **Revista de Biología Tropical** 47: 359-363.
- Michelangeli, F.A., Penneys, D.S., Giza, J., Soltis, D., Hils, M.H. & Skeeon, D.J.D. 2004. A preliminary phylogeny of the tribe Miconieae (Melastomataceae) based on nrITS sequence data and its implications on inflorescence position. **Taxon** 53: 279-290.
- Naumova, T.N. 1993. **Apomixis in angiosperms: nucellar and integumentary embryony**. CRC Press, Boca Raton.
- Naumova, T.N. 2008. Apomixis and amphimixis in flowering plants. **Cytology and Genetics** 42(3): 179-188.
- Nijs, H.C.M. den & Menken, S.B.J. 1996. Relations between breeding system, ploidy level, and taxonomy in some advanced sections of *Taraxacum*. Pp. 665-677. In:

- H.D.N. Hind, H.J. Beentje (eds.). **Advances in Compositae systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Nogler, G.A. 1984. Gametophytic apomixis. Pp. 475-518. In: B.M. Johri (ed.). **Embryology of Angiosperms**. Springer-Verlag, Berlin.
- Ramirez, N. & Brito, Y. 1990. Reproductive Biology of a Tropical Palm Swamp Community in the Venezuelan Llanos. **American Journal of Botany** 77(10): 1260-271.
- Renner, S.S. 1984. Pollination and breeding systems in some central Amazonian Melastomataceae. **Les Colloques de INRA** 21: 275-280.
- Renner, S.S. 1986/1987. Reproductive biology of *Bellucia* (Melastomataceae). **Acta Amazonica** 16/17: 197-208.
- Renner, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 76: 496-518.
- Renner, S.S. 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. **Nordic Journal of Botany** 13: 519-540.
- Ribeiro, J.F., Sano, S.M. & Silva, J.A. 1983. **Os principais tipos fitofisionômicos da região dos Cerrados**. Boletim de Pesquisa, Vol. 21. EMBRAPA/CPAC, Brasília, DF.
- Richards, A.J. 1990. Studies in Garcinia: tropical dioecious fruit trees: agamospermy. **Botanical Journal of the Linnean Society** 103: 233-250.
- Richards, A.J. 1997. **Plant breeding systems**. Chapman & Hall, Londres.
- Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M.S. & Valle, C.B. 2006. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* Stapf (Poaceae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research** 5: 837-845.

- Romero, R. & Martins, A.B. 2002. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 25: 19-24.
- Santos, M.L. 2003. **Florística e biologia reprodutiva de espécies de Melastomataceae no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas e Parque Estadual dos Pirineus, Goiás.** Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília.
- Santos, A.P.M. 2008. **Biologia reprodutiva de Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Saraiva, L.C. 1994. **Biologia da reprodução de arbustos e árvores do cerrado em Corumbataí, Estado de São Paulo.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP.
- Sasaki, R.M., Rondon, J.N., Zaidan, L.B.P. & Felipe, G.M. 1999. Number of buried seeds and seedlings emergence in cerradão, cerrado and gallery forest soils at Pedregulho, Itirapina (SP), Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 22: 147-152.
- Savidan, Y. 2000. Apomixis: Genetics and breeding. **Plant Breeding Reviews** 18: 13–86.
- Silva, D.A. da. 2005. Levantamento do meio físico das estações ecológicas e experimentais de Itirapina, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Florestal de São Paulo** 17: 113-128.
- Simabukuro, E.A., Begovacz, A., Esteves, L.M. & Felipe, G.M. 1999. Fern spore bank at Pedregulho (Itirapina, São Paulo, Brazil). **Revista Brasileira de Biologia** 59: 131-139.
- Simão, D.G., Caetano, A.P.S., Oliveira, P.E.A.M. & Carmo-Oliveira R. 2006. **Embriologia em espécies apomíticas e sexuadas em *Miconia* Ruiz & Pav. e**

- Tococa* Aubl. (Miconieae, Melastomataceae): desenvolvimento da antera e do grão de pólen.** In Resumos do 57º Congresso Nacional de Botânica, Gramado.
- Smith, J. 1841. Notice of a plant which produces seeds without any apparent action of pollen. **Transactions of the Linnaean Society of London** 18: 509-512.
- Sobrevila, C. & Arroyo, M.T.K. 1982. Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. **Plant Systematics and Evolution** 140: 19-37.
- Solt, M.L. & Wurdack, J.J. 1980. Chromosome numbers in the Melastomataceae. **Phytologia** 47: 199-220.
- Souza-Silva, S.C.S. 2000. **Biologia reprodutiva e polinização em Melastomataceae no Parque do Sabiá, Uberlândia, MG.** Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.
- Stebbins, G.L. 1985. Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 72: 824–832.
- Tucker, M.R. & Koltunow, A.M.G. 2009. Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. **Functional Plant Biology** 36: 490-504.
- Van Baarlen, P., Verduijn, M. & Van Dijk, P.J. 1999. What can we learn from natural apomitics? **Trends in Plant Science** 4: 43-44.
- Whitton, J., Sears, C.J., Baack, E.J. & Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. **International Journal of Plant Science** 169(1): 169-182.
- Winkler, H. 1908. Über parthenogenesis und apogamie im pflanzenreiche. **Prog. Rei. Bot.** 2: 293-454.
- Wurdack, J.J. 1973. Melastomataceae. Pp. 1-819. In: T. Lasser (ed.). Flora de Venezuela. Vol 8. Instituto Botánico, Caracas.

**Tabela 1.** Relação das espécies da tribo Miconieae estudadas até o momento, com seu respectivo sistema reprodutivo, viabilidade polínica e número cromossômico. AC: auto compatível; AI: auto incompatível; AP: apomítica.

Espécies	Sistema reprodutivo	Viabilidade polínica (%)	Número cromossômico	Referências
<b>Apomíticas</b>				
<i>Clidemia bullosa</i> DC.	AP		2n=30	15, 24
<i>Clidemia capitellata</i> (Bonpl.) D.Don	AP		n=17	14, 16, 24
<i>Clidemia epibaterium</i> DC.	AP			17
<i>Clidemia fendleri</i> Cogn.	AP			23
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D.Don	AP		n=17	12, 15
<i>Clidemia novemnervia</i> (DC.) Triana	AP			17
<i>Clidemia pustulata</i> DC.	AP		n=17	10, 24
<i>Clidemia rubra</i> (Aubl.) Mart.	AP			17
<i>Clidemia ruddae</i> Wurdack	AP		n=23	2
<i>Clidemia sericea</i> D. Don	AP		n=17	10, 24
<i>Leandra australis</i> (Cham.) Cogn.	AP	4,9 ± 4,0		4, 5, 9
<i>Leandra involucrata</i> DC.	AP			22
<i>Leandra lacunosa</i> Cogn.	AP	38,6 ± 17,0		8
<i>Leandra melastomoides</i> Raddi	AP	6,9 ± 4,5		9
<i>Maieta guianensis</i> Aubl.	AP		2n=34	19, 24
<i>Maieta poeppigii</i> Mart. ex Cogn.	AP		2n=46	19, 24
<i>Miconia alata</i> (Aubl.) DC.	AP			17
<i>Miconia aplostachya</i> (Bonpl.) DC.	AP			10
<i>Miconia argyrophylla</i> DC.	AP			17
<i>Miconia discolor</i> DC.	AP	40-95%		5

<b>Espécies</b>	<b>Sistema reprodutivo</b>	<b>Viabilidade polínica (%)</b>	<b>Número cromossômico</b>	<b>Referências</b>
<i>Miconia egensis</i> Cogn.	AP			17
<i>Miconia fallax</i> DC.	AP	39,5 ± 19,2	n=17	8
<i>Miconia ferruginata</i> DC.	AP			20
<i>Miconia ibaguensis</i> (Bonpl.) Schltld.	AP		2n=62	10, 24
<i>Miconia laevigata</i> (L.) D. Don	AP		n=24/2n=48	7, 23, 24
<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin	AP	9,6 ± 5,4		9
<i>Miconia ligustroides</i> (DC.) Naudin	AP	20,3 ± 8,3		8
<i>Miconia petropolitana</i> Cogn.	AP	60,4		9
<i>Miconia pohliana</i> Cogn.	AP	0,9 ± 0,8		8
<i>Miconia prasina</i> (Sw.) DC.	AP		2n=48/2n=52	7, 19, 24
<i>Miconia rubiginosa</i> (Bonpl.) DC.	AP	38,3 ± 20,7	2n=50	8, 24
<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	AP			22
<i>Miconia spinulosa</i> Naudin	AP		n=46	23, 24
<i>Miconia stenostachya</i> DC.	AP	12,5 ± 5,4	n=26	4, 8
<i>Miconia stephananthera</i> Ule	AP			16
<i>Miconia tomentosa</i> (Rich.) D.Don ex DC.	AP		2n=34	17
<i>Ossaea amygdaloides</i> (Mart. & Schr.) Triana	AP	0		9
<i>Ossaea confertiflora</i> (DC.) Triana	AP	0		9
<b>Sexuadas</b>				
<i>Bellucia acutata</i> Pilg	AI			18
<i>Bellucia dichotoma</i> Cogn.	AI			17
<i>Bellucia grossularioides</i> (L.) Triana	AI			18

<b>Espécies</b>	<b>Sistema reprodutivo</b>	<b>Viabilidade polínica (%)</b>	<b>Número cromossômico</b>	<b>Referências</b>
<i>Conostegia macrantha</i> O.Berg ex Triana	AI			11
<i>Leandra dasytricha</i> (A.Gray) Cogn.	AC	92,3 ± 7,1		9
<i>Leandra regnellii</i> (Triana) Cogn.	AC	94,5 ± 4,4		9
<i>Miconia angelana</i> R.Romero & R.Goldenberg	AC	94,6 ± 3,9		21
<i>Miconia araguensis</i> Wurdack	AC		n=17	23, 24
<i>Miconia chamissois</i> Naudin	AC	95,2		6
<i>Miconia dodecandra</i> Cogn.	AC		n=34/n=68	1, 23, 24
<i>Miconia elegans</i> Cogn.	AI	70-95		5
<i>Miconia langsdorffii</i> Cogn.	AI	58 ± 33,5		8
<i>Miconia minutiflora</i> (DC.) Naudin	AC	82 ± 13,0	2n=34	8,24
<i>Miconia pepericarpa</i> Mart. ex DC.	AI	59,8 ± 13,0		8
<i>Miconia theaezans</i> (Bonpl.) Cogn.	AI	70-95	2n=34/n=17	5, 24
<i>Miconia tuberculata</i> (Naudin) Triana	AI		n=17	3, 13
<i>Tococa bullifera</i> Mart. & Schrank ex DC.	AC			17
<i>Tococa guianensis</i> Aubl.	AI		2n=34	10, 24
<i>Tococa formicaria</i> Mart.	AI			25
<i>Tococa longisepala</i> Cogn.	AI			17
<i>Tococa nitens</i> (Benth.) Triana	AC		n=17	10, 24

1. Almeda 1997; 2. Almeda & Chuang 1992; 3. Arroyo & Cabrera 1977 (*apud* Renner 1989); 4. Baumgratz & Silva 1988; 5. Borges 1991; 6. Caetano 2003; 7. Dent-Acosta & Breckon 1991 (*apud* Goldenberg 1994); 8. Goldenberg & Shepherd 1998; 9. Goldenberg & Varassin 2001; 10. Hokche & Ramírez 2008; 11. Lumer 1982 (*apud* Renner 1989); 12. Meenakumari & Kuriachan 1990; 13. Melo & Machado 1996; 14. Melo & Machado 1998; 15. Melo *et al.* 1999; 16. Ramirez & Brito 1990; 17. Renner 1984 (*apud* Renner 1989); 18. Renner 1987 (*apud* Renner 1989); 19. Renner 1989; 20. Santos 2003; 21. Santos 2008; 22. Saraiva 1994; 23. Sobrevila & Arroyo 1982; 24. Solt & Wurdack 1980; 25. Souza-Silva 2000.

# FIGURAS

**Figura 1.** *Miconia fallax*. **A-B:** Hábito – arbusto. **C:** Aspecto geral da inflorescência. **D:** Ramo com botões em diversos estádios de desenvolvimento. **E-G:** Ramos com botões e flores. **H:** Ramo com frutos em início de desenvolvimento. **I:** Detalhe de frutos em desenvolvimento. **J-K:** Detalhe dos frutos maduros.



**Figura 2.** *Miconia pepericarpa*. **A:** Hábito - arbusto. **B-C:** Ramo com botões em diversos estádios de desenvolvimento. **D:** Ramo com botões e flores. **E:** Detalhe das flores. **F:** Ramo com frutos em desenvolvimento, rosas, e fruto maduro, roxo.



# CAPÍTULO 1

## **CAPÍTULO 1. MICROSPOROGÊNESE, MICROGAMETOGÊNESE E VIABILIDADE POLÍNICA EM UMA ESPÉCIE APOMÍTICA E OUTRA SEXUADA DE *MICONIA* RUIZ & PAVÓN, MELASTOMATACEAE**

### **Resumo**

Na família Melastomataceae, o gênero *Miconia* destaca-se pela grande porcentagem de espécies apomíticas. Nas espécies que apresentam este mecanismo reprodutivo, diversos graus de viabilidade polínica são encontrados, porém pouco se conhece a respeito do processo de microsporogênese e microgametogênese, bem como as modificações nestas duas vias. O objetivo do presente trabalho é identificar as possíveis alterações ocorrentes na microsporogênese e na microgametogênese em uma espécie apomítica, *Miconia fallax*, comparando estes dois processos aos resultados encontrados em uma espécie sexuada, *M. pepericarpa*. Pretende-se também comparar a viabilidade polínica entre estas duas espécies e verificar se a espécie apomítica é poliplóide. Botões florais, em vários estádios de desenvolvimento, e flores foram coletados e processados para microscopia de luz. A viabilidade polínica das espécies foi determinada com DAB e a estimativa do número cromossômico de *M. fallax* foi realizada utilizando-se células mitóticas. *M. fallax* e *M. pepericarpa* apresentam grande similaridade na formação de micrósporos e microgametófitos, corroborando os dados já descritos para outras espécies da família. Entretanto, a quantidade de grãos de pólen viáveis produzidos ao final destes processos é bem menor na espécie apomítica. *M. fallax* é poliplóide e apresenta irregularidades no processo meiótico que levam à inviabilidade de uma grande proporção dos grãos de pólen formados. Assim, em *M. fallax*, a apomixia está associada à inviabilidade polínica e a poliploidia. Entretanto, apesar desta espécie ser uma apomítica autônoma, ela ainda preserva o mecanismo de formação de grãos de pólen viáveis, mesmo que em menor quantidade quando comparada a uma espécie sexuada do mesmo gênero, o que torna parcialmente possível que esta espécie também se reproduza sexualmente.

**Palavras-chave:** Apomixia, Melastomataceae, *Miconia*, microsporogênese, microgametogênese.

## INTRODUÇÃO

Melastomataceae Juss. inclui aproximadamente 4.500 espécies, distribuídas em 166 gêneros (Clausing & Renner 2001). É uma das mais representativas famílias no Brasil, com cerca de 2000 espécies, ocorrendo em quase todas as formações vegetacionais (Romero e Martins 2002, Souza & Lorenzi). Um quarto das espécies desta família está inserido no gênero *Miconia* Ruiz & Pavón, com cerca de 1056 espécies, que ocorrem desde o sul do México e Caribe até o Uruguai e norte da Argentina (Goldenberg 2000a).

No gênero *Miconia*, mais da metade das espécies em que o sistema reprodutivo foi estudado é apomítica (Sobrevila & Arroyo 1982, Renner 1984, Borges 1991, Dent-Acosta & Breckon 1991, Goldenberg & Shepherd 1998, Sousa-Silva 2000, Goldenberg & Varassin 2001, Santos 2003). A apomixia é, atualmente, definida como um processo de reprodução assexuada por meio de sementes, com o desenvolvimento de um embrião viável a partir de tecidos do óvulo (Bicknell & Koltunow 2004, Koltunow & Grossniklaus 2003). Sabe-se que diversas espécies apomíticas, especialmente aquelas facultativas ou as pseudogâmicas, ainda preservam os processos de formação de grãos de pólen (Whitton *et al.* 2008).

A apomixia é comumente associada à poliploidia (Asker & Jerling 1992, Carman 1997). Em Melastomataceae, Goldenberg & Shepherd (1998) relacionaram apomixia, poliploidia e viabilidade polínica em espécies da tribo Miconieae. Os autores observaram que diversas espécies apomíticas desta tribo são poliplóides e apresentam viabilidade polínica baixa e em alguns casos, nula. Eles sugerem que irregularidades meióticas, comuns em espécies poliplóides, levem aos baixos níveis de viabilidade polínica nas espécies deste grupo.

Apesar de alguns trabalhos embriológicos já terem sido realizados com representantes de Melastomataceae (Tobe & Raven 1983a, Medeiros & Morretes 1996, Medeiros & Roos 1996, Caetano 2007, Cortez 2007), pouco se conhece sobre o processo que envolve a formação de micrósporos e microgametófitos em espécies apomíticas da família. Trabalhos recentes de embriologia comparativa de espécies apomíticas e sexuadas de *Miconia* vêm sendo realizados por Cortez e colaboradores (em prep.) e Caetano e colaboradores (em prep.).

Para entender o sistema reprodutivo de espécies apomíticas de forma mais ampla, é importante conhecer também os processos de microsporogênese e microgametogênese. A comparação destes dados aqueles encontrados em espécies sexuadas filogeneticamente próximas possibilitam identificar, nas apomíticas, alterações e irregularidades durante os eventos de formação de esporos e gametas, e suas consequências ao final de todo o processo. Estas informações, aliadas às de megasporogênese e megagametogênese, permitem avaliar se há ou não possibilidade da apomixia ocorrer em paralelo com a reprodução sexuada nas espécies apomíticas investigadas.

O objetivo do presente trabalho é investigar as alterações ocorrentes na microsporogênese e na microgametogênese em uma espécie apomítica de Melastomataceae, *Miconia fallax* DC., comparando os dados aos de uma espécie sexuada do mesmo gênero, *Miconia pepericarpa* Mart. ex DC. Procura verificar se, apesar das possíveis alterações, a espécie apomítica ainda preserva os mecanismos de formação de grãos de pólen viáveis. Além disso, busca-se determinar a viabilidade polínica de ambas as espécies e a ploidia da espécie apomítica.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Miconia fallax* e *M. pepericarpa* foram coletadas em áreas de cerrado no município de Itirapina (22°15' S e 47°47' W), estado de São Paulo, Brasil. *M. fallax* foi coletada em dois locais distintos denominados: Graúna (População I) e Valério (População II). *M. pepericarpa* foi coletada em uma única área, denominada Pedregulho. O material testemunho foi depositado de maneira convencional no Herbário UEC – Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, sob os números 150450 e 150451, para *M. fallax* e *M. pepericarpa*, respectivamente.

Botões florais em diversos estádios de desenvolvimento e flores foram coletados para o estudo do desenvolvimento dos estratos parietais da antera e dos micrósporos e microgametófitos. Seis indivíduos de cada população de *Miconia fallax* e seis indivíduos da população de *M. pepericarpa* foram utilizados para coleta.

A fixação foi realizada em solução de glutaraldeído 2% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8 (McDowell & Trump 1976) por 24h. Fissuras com lâmina de barbear foram feitas nos botões florais e flores antes da fixação, para melhor penetração da solução fixadora. Durante a fixação, o material foi submetido à bomba de vácuo por aproximadamente 12h. As amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8, desidratadas em série etanólica e estocadas em etanol 70% (v/v). As diversas fases do desenvolvimento foram definidas de acordo com o tamanho do botão floral (Quadro 1 e 2).

Parte do material foi fixada em solução de formalina com sulfato ferroso por 48h (Johansen 1940), com a finalidade de evidenciar a presença de compostos fenólicos em tecidos da antera. Após a fixação, as amostras foram lavadas em água destilada

(três vezes de 15min), desidratadas em série etanólica (Johansen 1940) e estocadas em etanol 70% (v/v).

O material foi incluído em resina plástica (historesin) Leica<sup>®</sup>. Os cortes foram obtidos em micrótomo rotativo manual Leica<sup>®</sup> com navalha descartável de tungstênio, entre 1,0 e 4,0 µm de espessura. As secções foram aderidas a lâminas de vidro e, posteriormente, coradas em azul de toluidina (C.I. 52040) a 0,05% em tampão citrato, pH 4,8. As lâminas foram montadas no momento da observação, com água destilada ou óleo de imersão e lamínula de vidro. As observações e fotografias digitais foram obtidas em microscópio de luz Olympus<sup>®</sup> BX 51 com câmera digital acoplada modelo DP71.

Algumas lâminas foram tratadas com azul de anilina (C.I. 42755) a 0,05% em tampão fosfato de potássio a 0,06M e pH 8,0, e observadas em microscópio de fluorescência Olympus<sup>®</sup> BX51 com filtro de luz ultra violeta para verificar a deposição de calose durante o desenvolvimento dos micrósporos e microgametófitos (Eschrich & Currier 1964).

A viabilidade polínica foi testada com DAB (3.3' diaminobenzidina, Sigma FastTM), que detecta a presença de peroxidases no citoplasma (Dafni *et al.* 2005). Para *Miconia fallax* foram utilizados nove e 17 indivíduos das populações I e II, respectivamente. Para *M. pepericarpa*, foram utilizados seis indivíduos de uma única população. Cerca de oito botões florais em pré-antese de cada indivíduo foram utilizados para a confecção das lâminas. Cada lâmina foi feita a partir das dez anteras de um botão floral, e os cem primeiros grãos de pólen de cada lâmina foram contabilizados e classificados como viáveis ou inviáveis.

Para o estudo cromossômico, frutos maduros de *M. fallax* foram coletados a

partir de cinco e seis indivíduos das populações I e II, respectivamente. Células mitóticas foram obtidas a partir de pontas de raízes emergidas de sementes recém germinadas. As sementes selecionadas para germinação foram deixadas por cerca de três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 10%, lavadas em água destilada e montadas em caixas plásticas Gerbox com o fundo recoberto com algodão e com papel de filtro, ambos umedecidos com água destilada. O experimento foi realizado em câmara de germinação com iluminação contínua branca fluorescente e temperatura constante de 28°C. A ponta das raízes foram pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) a 0.002M a 14-15°C por 5 horas, posteriormente fixadas em solução de Carnoy (etanol e ácido acético, 3:1 v/v) e estocadas em freezer nesta mesma solução. Os meristemas radiculares pré-tratados foram mergulhados em HCl 5N à temperatura ambiente por 20 minutos e lavados em água destilada. Estes meristemas foram esmagados em uma gota de ácido acético 45%, entre lâmina e lamínula. As lâminas foram congeladas em nitrogênio líquido por cerca de cinco minutos e as lamínulas, removidas com o auxílio de uma lâmina de aço. Após a secagem, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa 2% por aproximadamente 20 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada para eliminar o excesso de corante. Depois de secas, as lâminas foram montadas com Entelan. Células mitóticas bem condensadas e espalhadas foram selecionadas e fotografadas em microscópio de luz Olympus® BX 51 com câmera digital acoplada modelo DP71.

Algumas anteras de botões florais em início de desenvolvimento de indivíduos da população I e II de *Miconia fallax* foram esmagadas sobre lâmina com solução de carmim acético para análise das tétrades de micrósporos, que foram selecionadas e fotografadas em microscópio de luz Olympus® BX 51 com câmera digital acoplada

modelo DP71

## RESULTADOS

Os principais caracteres embriológicos relacionados à antera e com valor taxonômico observados em *Miconia fallax* e *M. pepericarpa* estão apresentados na tabela 1, juntamente com informações obtidas para a família Melastomataceae e a ordem Myrtales. Nos quadros 1 e 2, o tamanho dos botões florais foi relacionado às principais características encontradas em cada estágio de desenvolvimento da antera.

### MORFOLOGIA DOS ESTRATOS PARIETAIS DA ANTERA

*Miconia fallax* e *M. pepericarpa* possuem dez e oito anteras, respectivamente (Fig. 1A, 4A). As anteras são bitecas, tetrasporangiadas (Fig. 1B-C, 4B, 5A) e apresentam cristais (1C), provavelmente de oxalato de cálcio, em células do filete e do conectivo. Os dois microsporângios de cada teca são separados por um septo formado por células parenquimáticas que se degeneram momentos antes da antese, formando um único saco polínico em cada teca (1B, F, 4B, G).

Durante a microsporogênese, a parede das anteras é formada pelas seguintes camadas: epiderme, endotécio, camada média e tapete (Fig. 1D-E, 2B-C, 4C-D, 5B-C). Com o desenvolvimento da antera, camada média e tapete se degeneram, e apenas epiderme e endotécio constituem o estrato parietal da antera madura (1F-G, 3J, 4G-H, 6C). Nas flores já abertas, é possível observar que o endotécio, principalmente próximo ao ápice da antera, também se degenera (1H).

A epiderme é recoberta, em ambas as espécies, por uma cutícula estriada (Fig. 4F,H). Em *M. pepericarpa*, logo após a liberação dos micrósporos das tétrades, as

células epidérmicas em contato com os sacos polínicos, armazenam uma grande quantidade de compostos fenólicos, evidenciado pelo azul de toluidina e sulfato ferroso (Fig. 4E-H).

O endotécio, localizado logo abaixo da epiderme, é formado por uma única camada de células, inicialmente delgadas e alongadas (Fig. 1D-E, 4C-D). Com o desenvolvimento da antera e a degeneração da camada média e do tapete, as células do endotécio se expandem, permanecendo assim até a pré-antese (Fig. 1F-G, 4G-H). Nas duas espécies investigadas, as células do endotécio não apresentam paredes espessadas e/ou lignificadas, mesmo depois da antera estar madura (Fig. 1G, 4H).

A camada média é, geralmente, unisseriada (Fig. 1D, 2B, 4C-D, 5B), mas divisões pontuais foram observadas em algumas regiões da antera, formando dois estratos (Fig. 1E, 2C). A camada média começa a degenerar quando as células-mãe de micrósporos estão no início da prófase meiótica. Nesta fase, as células do tapete e as próprias células-mãe de micrósporos atingem seu tamanho máximo, empurrando a camada média, que é esmagada (Fig. 1D-E, 4D).

O tapete é do tipo secretor, com células uninucleadas (Fig. 1E, 2C-D, 4C-D, 5C). Quando as células-mãe de micrósporos entram em prófase meiótica, as células do tapete iniciam sua atividade sintética, tornando-se maiores, com citoplasma mais denso e núcleo proeminente. Durante a liberação dos micrósporos, o tapete está em início do processo de degeneração (Fig. 3D, 6A).

A membrana tapetal foi observada ao longo das paredes tangenciais internas das células do tapete, onde se encontram depositadas uma grande quantidade de orbículos (corpúsculos de Ubisch), que se coram de forma similar à exina do grão de

pólen (Fig. 1G-H, 4H). A membrana tapetal é contínua em toda a teca e se forma logo após a liberação dos micrósporos, podendo ser observada ainda na antera madura.

## **MICROSPOROGÊNESE**

As células esporogênicas (Fig. 2A, 5B) dividem-se e diferenciam-se em células-mãe de micrósporos (CMMis), que apresentam citoplasma de aspecto denso, núcleo proeminente e tamanho maior em comparação às células da parede da antera (Fig. 1D-E, 2C-D, 4C-D, 5C-D). Pouco antes do início da meiose, ocorre a deposição de calose nas células-mãe de micrósporos, isolando-as das demais, exceto pela presença dos canais citomíticos (Fig. 2E-H, 5D-G).

A prófase I foi identificada devido ao espiralamento dos cromossomos (Fig. 2D, 5C-D). Na metáfase I, é possível observar os cromossomos alinhados no equador da célula e as fibras do fuso (Fig. 2H-I). A presença de cromossomos nos dois pólos da célula indica o final da anáfase I (Fig. 2J). O restabelecimento dos nucléolos e da membrana nuclear identifica a telófase I (Fig. 2k, 5F). Na metáfase II, observam-se dois conjuntos de cromossomos alinhados no equador da célula e as fibras do fuso (Fig. 2L). Na anáfase II, foi possível distinguir a migração dos quatro conjuntos de cromossomos para os pólos da célula (Fig. 2M). O final da telófase II foi identificado pela presença dos quatro núcleos reestruturados, indicando também o final da cariocinese (Fig. 2N, 5G). A citocinese simultânea, com formação das tétrades tetraédricas de micrósporos, ocorre após a meiose II (Fig. 2O, 3A, 5H). Nas tétrades, também é possível observar uma camada de calose que envolve os micrósporos, que são liberados logo após a degradação desta camada (Fig. 2P, 5I).

Durante a meiose, verificou-se a presença de canais citomíticos entre as CMMis (Fig. 2G-H, 5D, F-G), que acarretam uma sincronia durante a meiose em um mesmo microsporângio. Estes canais também foram vistos entre os micrósporos de uma mesma tétrade (Fig. 3A). Observou-se que há sincronia dentro de um mesmo microsporângio e entre as tecas de uma mesma antera. Porém, diferentes anteras de um mesmo botão floral podem estar em diferentes estádios de desenvolvimento.

Os micrósporos recém liberados possuem citoplasma de aspecto denso, núcleo central proeminente e uma fina camada de exina corada em azul claro com azul de toluidina (Fig. 3B, 5J).

### **MICROGAMETOGÊNESE**

O início da microgametogênese é marcado pela formação de um grande vacúolo no micrósporo recém liberado (Fig. 3C, 6A-B). Este processo faz com que o núcleo do micrósporo seja empurrado para a periferia da célula, onde ocorre uma mitose assimétrica, formando as células, vegetativa, maior, e a generativa, menor, originando o grão de pólen bicelular (Fig. 3E, 6D).

Em *Miconia fallax*, alguns micrósporos não passam pelo processo de vacuolação, acarretando uma mitose simétrica (Fig. 3H-I). Neste caso, o grão de pólen formado apresenta as células vegetativa e generativa muito semelhantes, sem qualquer distinção morfológica ou espacial entre elas.

O grão de pólen, antes da liberação da antera, é constituído pelas células vegetativa e generativa. Enquanto a célula vegetativa ocupa grande parte do grão de pólen e tem núcleo central, a célula generativa é menor, ocupa posição periférica e têm formato lenticular (Fig. 3E). A célula generativa adquire um formato campanular (Fig.

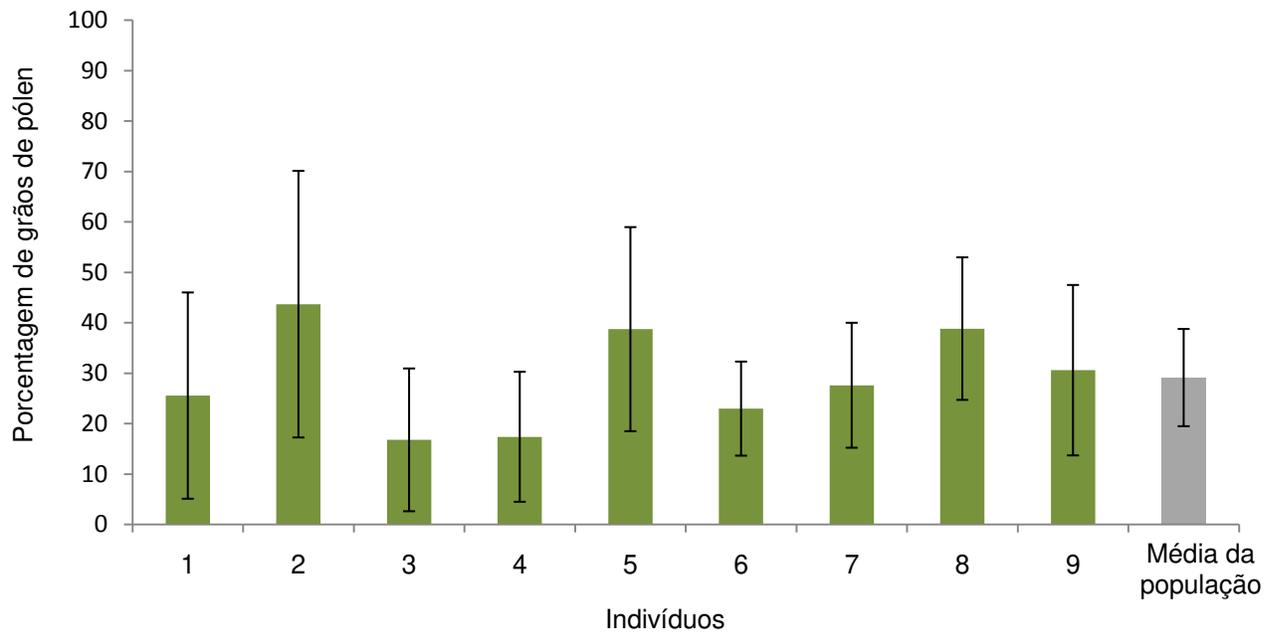
3F, 6D) e projeta-se para dentro da célula vegetativa, sendo englobada, e assumindo um formato esférico (3G). Em *Miconia pepericarpa*, pouco antes da antese, a célula generativa passa a ter formato fusiforme (Fig. 6E-F); em *M. fallax*, essa célula permanece com formato esférico até o momento da antese (Fig. 3G). Em ambas as espécies, no momento da dispersão, os grãos de pólen são bicelulares, sendo liberados em mônades (Fig. 3J-K, 6E).

A formação de grãos de pólen inviáveis ocorre em ambas as espécies, em número maior na apomítica, *Miconia fallax* (Fig. 3J-M, 6C ). Nesta espécie, na antera madura, é possível identificar grãos de pólen com deposição de exina e intina, mas completamente vazios (Fig. 3L). Em alguns casos, mesmo quando o citoplasma e o núcleo estão presentes (Fig. 3K, M), os grãos de pólen são menores, com citoplasma menos denso e formato irregular, quando comparados aos grãos viáveis.

#### **VIABILIDADE POLÍNICA E PLOIDIA**

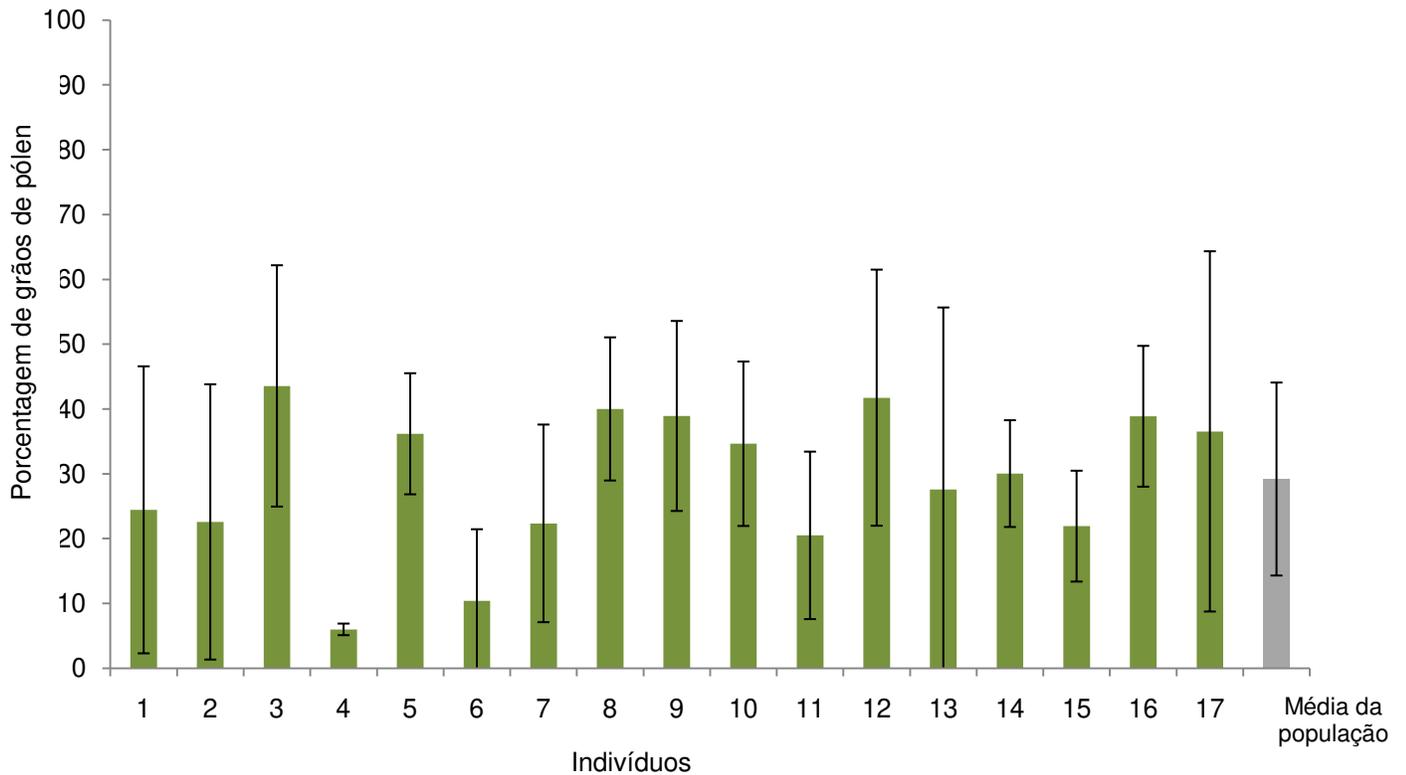
A proporção de grãos de pólen viáveis e inviáveis (Fig. 7A-C) nas populações I e II de *Miconia fallax* foi semelhante. A média de grãos de pólen viáveis na população I variou entre 16,8 (indivíduo 1) a 43,7% (indivíduo 2) (Fig. 8). A média da população foi de 29,1%.

**Figura 8.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis estimados a partir de anteras de botões em pré-antese dos indivíduos da população I de *Miconia fallax* (média±desvio padrão). A coluna cinza representa a média geral da população I (média±desvio padrão).



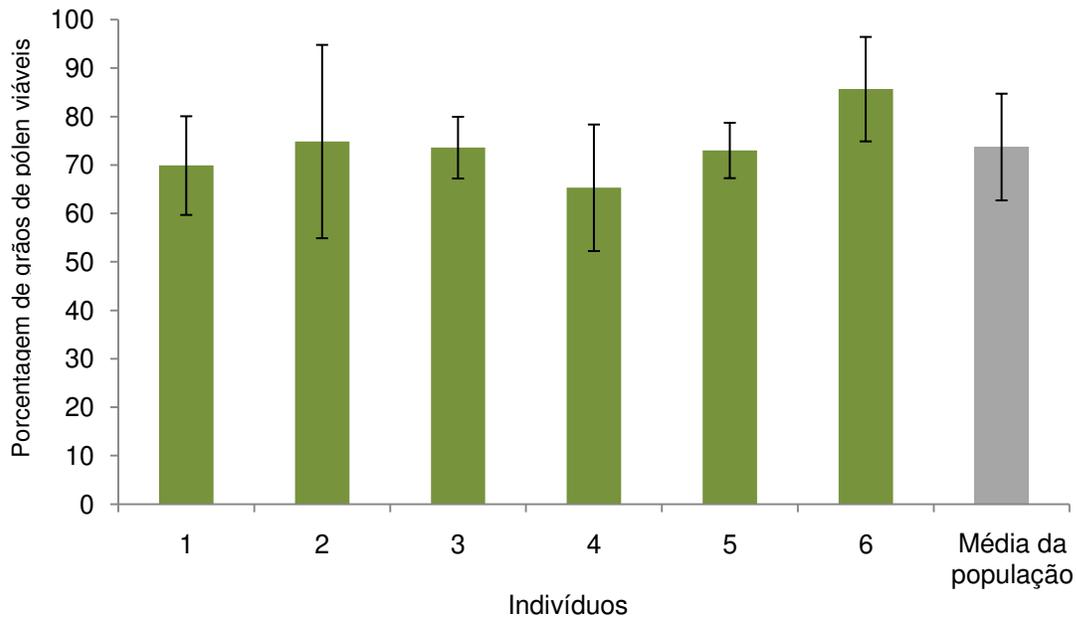
Na população II, a média de grãos de pólen viáveis foi de 29,2%, variando entre 10,4 (indivíduo 5) a 43,5% (indivíduo 3) (Fig. 9).

**Figura 9.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis estimados a partir de anteras de botões em pré-antese dos indivíduos da população II de *Miconia fallax* (média±desvio padrão). A coluna cinza representa a média geral da população II (média±desvio padrão).



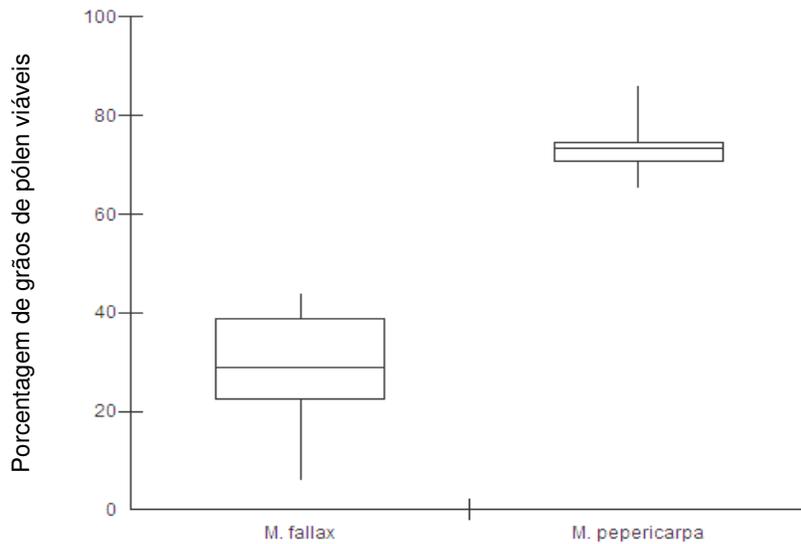
*Miconia pepericarpa* apresentou grãos de pólen viáveis e inviáveis (Fig. 7D-F). A média de pólen viável na população de *M. pepericarpa* foi de 73,7%, variando entre 65,3 (indivíduo 4) a 85,7% (indivíduo 6) (Fig. 10).

**Figura 10.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis estimados a partir de anteras de botões em pré-antese dos indivíduos da população de *Miconia pepericarpa* (média±desvio padrão). A coluna cinza representa a média geral da população (média±desvio padrão).



A diferença observada na proporção de grãos de pólen viáveis entre a espécie apomítica, *Miconia fallax*, e a espécie sexuada, *M. pepericarpa* é marcante (Fig. 11). Estes resultados confirmam os dados obtidos a partir dos cortes anatômicos, que indicaram uma proporção de grãos de pólen viáveis maior em *M. pepericarpa*.

**Figura 11.** Box-Plots da porcentagem de grãos de pólen viáveis estimados a partir de anteras de botões em pré-antese de *Miconia fallax* e *M. pepericarpa*. Retângulos delimitam 50% da observação, traços centrais representam a mediana e barras indicam a amplitude total da distribuição.



A estimativa do número cromossômico foi determinada a partir da análise de cerca de sete metáfases em cada população de *Miconia fallax*. O número cromossômico estimado foi de  $2n = \text{ca. } 58-60$  para a população I (Fig. 7G) e  $2n = \text{ca. } 66-68$  (Fig. 7H) para a população II, sendo a última possivelmente uma população com indivíduos tetraplóides. Houve certa dificuldade na contagem cromossômica devido principalmente, ao grande número de cromossomos e ao seu tamanho diminuto. Entretanto, apesar de não ser possível reconhecer com exatidão o número cromossômico de *M. fallax*, o trabalho possibilitou afirmar que a espécie é poliplóide, o que atende aos objetivos aqui propostos.

Além de tétrades normais (Fig. 7J), ou seja, com quatro micrósporos de tamanho semelhante, tétrades com micronúcleos (Fig. 7I) foram observadas em ambas as populações de *Miconia fallax*.

## DISCUSSÃO

### MORFOLOGIA DOS ESTRATOS PARIETAIS DA ANTERA

Anteras tetrasporangiadas, como observadas em *Miconia fallax* e *M. pepericarpa*, constituem uma característica comum em Melastomataceae (Tobe & Raven 1983a, Medeiros & Morretes 1996, Medeiros & Roos 1996, Caetano 2007, Cortez 2007), com exceção de algumas espécies dos gêneros *Chaetostoma* DC. e *Microlicia* D. Don, tribo Microlicieae Naudin, onde foram relatadas anteras polisporangiadas (Baumgratz *et al.* 1996). Na ordem Myrtales, apesar de também ser mais comum a presença de anteras tetrasporangiadas (Tab.1) (Tobe & Raven 1983a), em *Olinia* Thunb. (Oliniaceae) e em diversos membros de Onagraceae, existem representantes com anteras polisporangiadas (Tab.1) (Tobe & Raven 1984a, 1986a). Tanto em Melastomataceae como em Onagraceae, as anteras polisporangiadas ocorrem devido à formação de diversos septos dentro de cada teca (Tobe & Raven 1986a, Baumgratz *et al.* 1996).

*Miconia fallax* e *M. pepericarpa* exibem a epiderme intacta até na antera madura, assim como outras espécies já estudadas de Melastomataceae e grande parte dos representantes da ordem Myrtales (Tab.1) (Tobe & Raven 1983a, Medeiros & Morretes 1996, Medeiros & Roos 1996, Caetano *et al.* em prep., Cortez 2007). Em ambas as espécies descritas aqui e em membros de *Miconia* sect. *Hypoxanthus* (Rich. Ex DC.) (Goldenberg *et al.* 2003), a epiderme é recoberta por uma cutícula estriada. Uma característica que deve ser ressaltada é a presença de compostos fenólicos nas células epidérmicas da antera de *M. pepericarpa*, assim como ocorre em espécies de Brexiaceae, Cyrullaceae e Myristicaceae (Batygina 2002).

A ocorrência e a morfologia do endotécio geram controvérsias em Melastomataceae. Em *Miconia fallax* e *M. pepericarpa*, o endotécio está presente mesmo na antera dos botões em pré-antese. Estes resultados são similares aos dados encontrados em diversas das espécies já analisadas na família (Medeiros & Morretes 1996, Medeiros & Ross 1996, Caetano *et al.* em prep., Cortez 2007). Entretanto, há também relatos da ausência desta camada em anteras maduras em membros de Melastomataceae, como em *Oxyspora paniculata* DC. (Subramanyam 1951). Clausen & Renner (2001) caracterizaram morfologicamente as Melastomataceae (exceto a tribo *Kibessieae*) pela ausência de endotécio nas anteras maduras, relacionando esta condição à deiscência poricida, encontrada na maioria de seus representantes. Devido à sua grande variação, o caráter presença/ausência de endotécio deve ser utilizado com cautela, apenas a partir da avaliação de anteras antes da liberação do pólen, já que, como foi verificado neste trabalho, após a sua deiscência, as anteras contatam o ambiente externo, acarretando a desidratação e, conseqüentemente, degeneração das células do endotécio.

Apesar da presença do endotécio na antera madura de ambas as espécies estudadas, as células desta camada não desenvolvem espessamentos parietais em suas paredes. Na família Melastomataceae, o desenvolvimento de paredes espessadas nas células do endotécio também é uma característica variável (Tab.1). Há descrições de endotécio com paredes espessadas, como em *Mouriria* Juss. (Johri 1992), *Sonerila* Roxb. (Subramanyam 1944) e *Tococa* Aubl. (Simão, comunicação pessoal) e sem paredes espessadas, como em espécies de *Miconia* (Medeiros e Morretes 1996, Caetano *et al.* em prep., Cortez 2007), *Tibouchina cerastifolia* Cogn. (Medeiros e Ross 1996), *Melastoma malabathricum* L. e *Oxyspora paniculata* (D. Don) DC.

(Subramanyam 1948, 1951). Na ordem Myrtales, a presença de anteras com espessamentos fibrosos nas células do endotécio é uma condição presente em grande parte dos grupos, com exceção de Melastomataceae, Alzateaceae, Crypteroniaceae e Penaeaceae (Tab.1) (Tobe & Raven 1983a, 1984a, b, 1987b, c).

A ausência de espessamentos na parede das células do endotécio tem sido comumente associada à deiscência poricida das anteras (Maheshwari 1950). Entretanto, sabe-se que diversas espécies de monocotiledôneas apresentam anteras poricidas e endotécio com paredes espessadas (Gerenday & French 1988). Em Melastomataceae, essa associação também não deve ser aplicada, já que apesar da deiscência poricida que caracteriza grande parte dos representantes da família, existem espécies com e sem espessamentos de parede nas células do endotécio. Portanto, mais trabalhos devem ser realizados a fim de se esclarecer a relação entre o mecanismo de deiscência da antera e o desenvolvimento de espessamentos parietais nas células do endotécio em representantes desta família.

*Miconia fallax* e *M. pepericarpa* apresentam camada média unisseriada, assim como vários membros de Melastomataceae (Tab.1). Entretanto, foram observadas divisões periclinais em algumas células deste tecido. Na família Melastomataceae a camada média diverge quanto ao número de estratos e a sua persistência na antera madura (Subramanyam 1942, 1951, Davis 1966, Medeiros e Morretes 1996, Medeiros e Ross 1996, Caetano *et al.* em prep.), havendo relatos da presença deste estrato parietal pluriestratificado em *M. malabathricum* (Subramanyam 1948) e *Rhynchanthera grandiflora* DC. (D.G. Simão, comunicação pessoal).

O tapete de *Miconia fallax* e *M. pepericarpa* é do tipo secretor, constituído por uma única camada de células uninucleadas. O tapete secretor é uma das condições

embriológicas que definem a ordem Myrtales, estando presente em todos os seus representantes já analisados (Tab.1) (Tobe & Raven 1983a) e é o tipo predominante dentre as eudicotiledôneas (Pacini *et al.* 1985). Por sua vez, as células uninucleadas do tapete dos membros de Melastomataceae (Tab.1) (Tobe & Raven 1983a, Medeiros & Ross 1996, Medeiros e Morretes 1996, Caetano 2007, Cortez 2007) representam uma condição exclusiva que distingue embriologicamente essa família das demais da ordem Myrtales, que apresenta quase que exclusivamente células tapetais multinucleadas (Tab.1) (Tobe & Raven 1983a, 1987c).

O tapete é um tecido polifuncional e sua principal função é suprir nutricionalmente o desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen (Pacini *et al.* 1985, Batygina 2002). Adicionalmente, outras funções são atribuídas a este tecido, como: 1) produção do fluido locular; 2) secreção da enzima calase, que irá dissolver a parede de calose das tétrades e liberar os micrósporos; 3) produção de alguns precursores da esporopolenina; 4) formação de orbículos e da membrana tapetal; 5) formação do “pollenkitt”; 6) formação do trifino; entre outros (Pacini 1990, Batygina 2002). Segundo Bhandari (1984), um delicado balanço funcional e bioquímico entre o tapete e as células-mãe de micrósporos é necessário para a formação normal de micrósporos e grãos de pólen. Qualquer distúrbio nessa harmonia resulta em anormalidades e, conseqüentemente, inviabilidade polínica. Assim, alterações físicas ou funcionais nas células do tapete poderiam explicar a grande quantidade de grãos de pólen anormais, e claramente inviáveis encontrados na espécie apomítica *Miconia fallax*. Entretanto as características das células do tapete da espécie apomítica, quando comparada à sexual, são muito similares, sendo que não foi encontrado qualquer tipo

de alteração deste tecido que pudesse explicar a formação de uma grande quantidade de grãos de pólen inviáveis.

A grande quantidade de orbículos que reveste as paredes tangenciais internas das células do tapete de *Miconia fallax* e *M. pepericarpa* é responsável pela formação da membrana tapetal, que persiste até a maturidade da antera. É provável que a membrana tapetal isole os grãos de pólen formados, atuando como uma barreira hidrofóbica no lóculo, facilitando a liberação do pólen (Pacini *et al.* 1985). Os orbículos, também conhecidos como corpúsculos de Ubisch, ocorrem somente em espécies com tapete do tipo secretor e têm composição similar à exina dos grãos de pólen (Huysmas *et al.* 1998, Batigyna 2002). Existem várias hipóteses para explicar as funções dos orbículos, mas ainda não há consenso na literatura (Huysmans *et al.* 1998). Alguns autores acreditam que os orbículos representam um mecanismo de transporte de esporopolenina entre o tapete e os micrósporos em desenvolvimento, participando assim ativamente da formação da esporoderme (Pacini *et al.* 1985). Outros acreditam que os orbículos não têm uma função específica, e não são mais do que produtos do metabolismo tapetal (Heslop-Harrison 1968). Estudos mais detalhados são necessários para esclarecer a função dos orbículos e da membrana tapetal não só em Melastomataceae, mas também em outros grupos de angiospermas.

## **MICROSPOROGÊNESE**

A parede de calose observada ao redor das células-mãe de micrósporos em *Miconia fallax* e *M. pepericarpa* tem sido comumente relatada para as angiospermas, embora muitos autores não apresentem testes para detecção deste polissacarídeo. A calose é composta por  $\beta$ -1,3-glucano, produzido pelas próprias células-mãe de

micrósporos, e secretado entre a membrana plasmática e a parede primária destas células (Heslop-Harrison 1968, Batygina 2002, Scott *et al.* 2004). Ela é responsável por promover o isolamento químico e físico dos micrósporos, agindo como um filtro molecular entre as células esporogênicas e o restante do esporófito (Bhandari 1984, Scott *et al.* 2004). Assim, a calose protege as células reprodutivas da desidratação e da influência nutricional e hormonal do tecido adjacente (Bhandari 1984). Além disso, acredita-se que os produtos da degradação da calose podem servir como fonte de glicose para o desenvolvimento da primexina e ainda, a própria calose pode atuar como molde, determinando o futuro padrão de escultura da exina (Bhandari 1984, Batygina 2002).

Canais citomíticos são ampliações de plasmodesmos com até 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Scott *et al.* 2004) e ocorrem entre as células-mãe de micrósporos de *Miconia fallax* e *M. pepericarpa*. Estes canais possibilitam a passagem de componentes citoplasmáticos e até organelas de uma célula para outra (Heslop-Harrison, 1966), sendo provavelmente responsáveis por manter a sincronia durante a meiose dentro do mesmo microsporângio nas espécies estudadas de *Miconia*, embora esta sincronia não tenha sido observada também entre as anteras de uma mesma flor.

A citocinese nas espécies estudadas de *Miconia* é simultânea, ou seja, não há formação imediata de parede após a primeira divisão da meiose, sendo que o isolamento dos núcleos dos micrósporos ocorre simultaneamente, ao final da meiose II. A citocinese simultânea ocorre em 186 famílias, das quais 176 são eudicotiledôneas (Davis 1966), e nos representantes já estudados de Myrtales (Tab.1) (Tobe & Raven 1983a). As tétrades formadas em *M. fallax* e *M. pepericarpa* são tetraédricas, o tipo mais freqüente de organização encontrado em eudicotiledôneas (Mariath *et al.* 2006).

Em Myrtales, apesar de tétrades tetraédricas serem mais comuns (Tobe & Raven 1983a, Tobe & Raven 1990), há também descrições de tétrades com formato decussado e isobilateral (Tab.1) (Tobe & Raven 1984a, b, c, 1986b, 1987a, b, c).

## **MICROGAMETOGENESE**

Grande parte dos micrósporos analisados de *M. fallax* e *M. pepericarpa* passam pelo processo de vacuolação, que leva ao aumento do seu tamanho e a uma mitose assimétrica, com formação das células generativa e vegetativa, sendo que a primeira é maior e ocupa posição central no grão de pólen. A posição parietal do núcleo do micrósporo resulta na formação de duas células morfologicamente e fisiologicamente distintas: a célula vegetativa e a generativa (Batygina 2002). Esse padrão assimétrico da primeira divisão mitótica é essencial para a funcionalidade do grão de pólen (Rodrigues *et al.* 2004) e pode ser considerado um padrão em angiospermas (Batygina 2002).

Entretanto, alguns micrósporos da espécie apomítica *Miconia fallax* parecem não sofrer vacuolação, o que resulta em uma mitose simétrica e um grão de pólen com duas células idênticas. Essa alteração é muito semelhante à que ocorre nas primeiras etapas de uma das rotas conhecidas de androgênese (Oliveira *et al.* 2001, Kaltchuk-Santos *et al.* 1997). A androgênese é o fenômeno no qual um grão de pólen é capaz de alterar sua rota de desenvolvimento e originar um esporófito haplóide (Raghavan 1987). Sugere-se que a mitose simétrica seria um sinal reconhecido pela célula para reativar o programa esporofítico (Grando & Moraes-Fernandes 1994). Espécies com esse tipo de alteração na via gametofítica do desenvolvimento dos grãos de pólen têm a capacidade de produção de plantas haplóides e homozigotas, importantes em estudos genéticos e

de melhoramento vegetal, que são essenciais em programas de desenvolvimento agrícola (Kaltchuk-Santos *et al.* 1997, Rodrigues *et al.* 2004). A androgênese foi verificada *in vitro* em espécies de diversas famílias, como em *Datura* L. (Guha & Maheshwari 1964), *Nicotiana tabacum* L. (Rashid & Street 1974), *Brassica napus* L. e *B. carinata* A. Braun (Chuong & Beversdorf 1985), entre outras. *In vivo*, esse processo foi acompanhado no clone CP76 de *Anacardium occidentale* L. (Oliveira *et al.* 2001) e em *Cupressus dupreziana* A. Camus (McKone & Halpern 2003). Segundo Nogler (1984), a androgênese, *in vivo*, pode ocorrer em espécies sexuais e apomíticas, como em *Coix lacryma-jobi* L.

A morfologia da célula generativa de *Miconia fallax* (formato esférico) e *M. pepericarpa* (formato fusiforme), durante a maturação do grão de pólen, é bastante contrastante. De forma geral, o formato da célula generativa varia de lenticular, no início do desenvolvimento, passando por esférico ou radialmente alongado, e frequentemente tornando-se fusiforme ou elíptico (Batygina 2002). Maheshwari (1950) destaca que existe uma considerável variação no formato da célula generativa. Outras espécies apomíticas de *Miconia* também exibem diferenças no formato da célula generativa (Cortez, comunicação pessoal). Entretanto, essa diferença encontrada entre as espécies do gênero possivelmente não está relacionada ao sistema reprodutivo das mesmas, sendo um caráter específico.

No momento da dispersão, os grãos de pólen das espécies estudadas encontram-se no estágio bicelular, assim como em 70% das 2.000 espécies amostradas de mono e eudicotiledôneas (Brewbaker 1967). Apesar de alguns trabalhos mais antigos apontarem a presença de grãos de pólen maduros tricelulares em Melastomataceae (Subramanyan 1951, Tobe & Raven 1983a), uma revisão feita por

Tobe & Raven (1984a), somada a dados mais recentes (Medeiros & Morretes 1996, Medeiros & Ross 1996, Caetano *et al.* em prep., Cortez 2007) indicam grãos de pólen bicelulares quando dispersos, condição compartilhada com toda a ordem Myrtales (Tab.1) (Tobe & Raven 1983a). A divisão da célula generativa em células espermáticas pode ocorrer ainda dentro da antera, sendo o grão de pólen liberado no estágio tricelular, como observado em espécies de Compositae, Cruciferae e Poaceae. Porém é mais comum o grão de pólen ser liberado no estágio bicelular, e a divisão da célula generativa ocorrer pouco depois do tubo polínico germinar na superfície estigmática (Knox 1984).

#### **VIABILIDADE POLÍNICA E PLOIDIA**

A espécie apomítica *Miconia fallax* produz uma grande quantidade de grãos de pólen inviáveis ao final do processo de gametogênese, facilmente identificados nos cortes anatômicos e contabilizados pelo teste de viabilidade polínica com diaminobenzidina (DAB).

Avaliar a viabilidade polínica utilizando métodos de coloração pode superestimar os dados, já que os corantes apenas detectam a presença de citoplasma no grão de pólen, podendo corar também grãos inviáveis (Dafni & Firmage 2000). O teste com DAB detecta atividade enzimática, e é um procedimento relativamente rápido e fácil, sendo por isso adotado neste estudo.

A viabilidade polínica de *Miconia fallax* e *M. pepericarpa* já havia sido realizada por Goldenberg & Shepherd (1998), utilizando o teste com carmim acético. A média de grãos de pólen viáveis determinada por estes autores foi de 39,5% para *M. fallax* e 59,8% para *M. pepericarpa*. O valor descrito por estes autores para a espécie apomítica

*M. fallax* é próximo ao valor encontrado nas duas populações estudadas neste trabalho (29,11 e 29,18%), confirmando que a espécie realmente apresenta algum tipo de alteração que leva à formação de uma grande proporção de grãos de pólen inviáveis, inclusive em diferentes anos e em distintas populações. Apesar de a diferença ser pequena em relação aos resultados obtidos neste estudo, a maior porcentagem de grãos viáveis encontrada por Goldenberg & Shepherd (1998) para *M. fallax* provavelmente se deve ao método utilizado por estes autores, o de coloração, que pode ter superestimado os dados.

Para *Miconia pepericarpa*, os resultados deste estudo revelam uma proporção maior de grãos de pólen viáveis produzidos (73,73%) quando comparado ao percentual anteriormente descrito (59,8%) (Goldenberg & Shepherd 1998). A viabilidade polínica pode ser influenciada por diversos fatores, ambientais ou da própria planta, como: o suprimento de nitrogênio, a umidade, a temperatura e horário da antese, as condições durante a microsporogênese, a variabilidade genética interespecífica, o metabolismo do pólen, entre outros, (Dafni & Firmage 2000). Todos os fatores citados, principalmente os ambientais, contribuem para diferentes proporções de grãos de pólen viáveis produzidos em uma determinada população ao longo dos anos, o que poderia explicar a diferença encontrada nos dados de viabilidade polínica de *M. pepericarpa* obtidos por Goldenberg & Shepherd (1998) e os deste estudo.

Diversas espécies apomíticas de Melastomataceae já foram analisadas quanto à viabilidade polínica, sendo que os valores podem variar de próximos a 0%, como em *Miconia albicans* (Sw.) Steud. e *Miconia pohliana* Cogn., até 38%, como em *Leandra lacunosa* Cogn. e *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC. (Goldenberg & Shepherd 1998). Já nas espécies sexuadas, a porcentagem de pólen fértil é maior: 58% em *Miconia*

*langsдорffii* Cogn. (Goldenberg & Shepherd 1998), 82% em *Miconia minutiflora* (DC.) Naudin (Goldenberg & Shepherd 1998) e 94,6% em *Miconia angelana* R. Romero & R. Goldenberg (Santos 2008), entre outros. Goldenberg & Shepherd (1998) sugerem que, em Melastomataceae, os baixos níveis de viabilidade polínica estão relacionados à apomixia. Entretanto, a grande variação intra-específica e a quantidade relativamente baixa de grãos de pólen viáveis em alguns indivíduos de espécies sexuadas, mostram que generalizações devem ser evitadas, já que o ambiente também pode influenciar nesta característica (Goldenberg 2000b).

Os resultados indicaram que *Miconia fallax* é uma espécie poliplóide, ou seja, apresenta mais de dois genomas no núcleo de suas células (Grant 1981). A apomixia é frequentemente associada à poliploidia (Asker & Jerling 1992, Carman 1997). Na tribo Miconieae, algumas espécies apomíticas já foram reconhecidas como poliplóides, entre elas: *Maieta poeppigii* Mart. ex Cogn., com  $2n=46$  (Solt & Wurdack 1980), *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC., com  $2n=50$  (Solt & Wurdack 1980), *Miconia stenostachya* DC., com  $n=26$  (Goldenberg & Shepherd 1998), entre outras. As espécies poliplóides, principalmente aquelas de origem híbrida, podem apresentar viabilidade polínica baixa, pois, frequentemente, a combinação de dois genomas em um híbrido interespecífico resulta em anormalidades meióticas (Nijs & Menken 1996, Risso-Pascotto *et al.* 2006).

A formação de tétrades com micronúcleos indica que a grande proporção de grãos de pólen inviáveis em *Miconia fallax* pode ser explicada pela ocorrência de irregularidades meióticas. Segundo Batygina (2002), espécies apomíticas apresentam variados graus de alterações durante o pareamento dos cromossomos homólogos. Goldenberg & Shepherd (1998) descrevem a presença de cromossomos retardatários na anáfase I, além de pontes cromossômicas durante a anáfase II na espécie apomítica

*Miconia stenostachia*, que apresenta cerca de 12,5% de grãos de pólen viáveis. Em *Clidemia bullosa* DC. e *Clidemia capitellata* (Bonpl.), espécies pertencentes à tribo Miconieae, os autores também relatam alterações durante a meiose, como a presença de cromossomos retardatários na anáfase I e tétrades com micronúcleos que, conseqüentemente, levam a uma alta inviabilidade polínica nestas espécies (Melo *et al.* 1999).

Assim, os resultados obtidos a partir deste trabalho possibilitaram identificar que em *Miconia fallax* a apomixia está associada à inviabilidade polínica, que por sua vez, provavelmente está relacionada à poliploidia. Apesar disso, *M. fallax* ainda preserva os mecanismos que levam a formação de grãos de pólen viáveis, mesmo que em menor proporção que na espécie sexuada *M. pepericarpa*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeda, F. 1997. Chromosome numbers and their evolutionary significance in some neotropical and paleotropical Melastomataceae. **BioLlania ed. especial** 6:167-90.
- Asker, S.E. & Jerling, L. 1992. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press.
- Batygina, T.B. 2002. **Embryology of flowering plants: terminology and concepts. Generative Organs of Flower**. Vol. 1. Science Publishers, USA.
- Baumgratz, J.F.A., Souza, M.L.D.R., Woodgyer, E.M. & Nic Lughada, E.M. (1996). Polysporangiate anthers: described for the first time in Melastomataceae. **Kew Bulletin** 51: 133-144.
- Bhandari, N.N. 1984. The microsporangium. Pp. 51-121. In: B.M. Jorhi (ed). **Embryology of angiosperms**. Springer-Verlag, Berlin.
- Bicknell, R.A. & Koltunow, A.M. 2004. Understanding apomixes: recent advances and remaining comundrums. **The Plant Cell** 16: 229-245.
- Borges, H.B.N. 1991. **Biologia reprodutiva de quatro espécies de Melastomataceae**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Brewbaker, J.L. 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the Angiosperms. **American Journal of Botany** 54(9): 1069-1083.
- Caetano, A.P.S. 2007. **Aspectos embriológicos e reprodutivos em *Miconia albicans* (Sw.) Triana e *Miconia chamissois* Naud. (Melastomataceae)**. Monografia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperm may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society** 61: 51-94.

- Chuong, P.V. & Beversdorf, W.D. 1985. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. **Plant Science** 39(2): 219-226
- Clausing, G. & Renner, S.S. 2001. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany** 88: 486-498.
- Cortez, P.A. 2007. **Embriologia de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae), espécie agamospérmica.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Dafni, A. & Firmage, D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution** 222: 113-132.
- Davis, G.L. 1966. **Systematic embryology of the angiosperms.** John Wiley, New York.
- Dent-Acosta, S.R. & Breckon, G.J. 1991. **Reproductive biology of six species of Melastomataceae in western Puerto Rico.** First International Melastomataceae Symposium, Smithsonian Institution, Washington D.C.
- Eschrich, W. & Currier H.B. 1964. Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. **Stain technology** 39: 303-307.
- Gerenday, A. & French, C. 1988. Endothelial thickenings in anthers of porate monocotyledons. **American Journal of Botany** 75(1): 22-25.
- Goldenberg, R. 2000a. **O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae): I. Listagens analíticas, II. Revisão taxonômica da seção *Hypoxanthus* (Rich.ex DC.) Hook.F.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Goldenberg, R. 2000b. Apomixia como alternativa à reprodução sexuada em Melastomataceae. Pp. 225-230. In: T.B. Cavalcanti & B.M.T. Walter (eds.). **Tópicos Atuais de Botânica**. Embrapa Recursos Genéticos, Brasília.
- Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. **Plant Systematics and Evolution** 211: 13-29.
- Goldenberg, R., Teixeira, S.P., Martins, A.B. 2003. Anther dehiscence and circumscription of *Miconia* sect. *Hypoxanthus* (Melastomataceae). **Kew Bulletin** 58: 195-203.
- Goldenberg, R. & Varassin, I.G. 2001. Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiá, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 24: 283-288.
- Grando, M.F. & Moraes-Fernandes, M.I.B. 1994. Two point deterministic model for acquisition of in vitro pollen grain androgenetic capacity based on wheat studies. **Brazilian Journal of Genetics** 20: 467-476.
- Grant, V. 1981. **Plant Speciation**. 2nd ed. Columbia University Press, New York and London.
- Guha, S. & Maheshwari, S.C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. **Nature** 204:497.
- Heslop-Harrison, J. 1966. Cytoplasmic connections between angiosperm meiocytes. **Annals of Botany** 30: 221-230.
- Heslop-Harrison, J. 1968. Pollen wall development. **Science** 161: 230-237.

- Huysmans, S., El-Ghazaly, G. & Smets, E. 1998. Orbicules in Angiosperms: morphology, function, distribution and relation with tapetum types. **The Botanical Review** 64: 240-272.
- Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Johri, B.M., Ambegaokar, K.B. & Srivastava, P.S. 1992. **Comparative embryology of angiosperms**. Springer-Verlag, Berlin.
- Kaltchuk-Santos, E., Mariath, J. E., Mundstock, E., Hu, C. Y. & Bodanese-Zanettini, M. H. 1997. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 49: 107-115.
- Knox, R.B. 1984. The pollen grain. Pp. 197-271. In: B.M. Johri (ed). **Embryology of angiosperms**. Springer-Verlag, New York.
- Koltunow, A. M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review of Plant Biology** 54: 547-574.
- Maheshwari, P. 1950. **An introduction to the embryology of angiosperms**. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Mariath, J.E.A., Santos, R.P. & Bittencourt Júnior, N.S. 2006. Flor. Pp. 329-373. In: B. Appezzato-da-Glória & S.M. Carmello-Guerreiro (eds). **Anatomia Vegetal**. 2<sup>a</sup> ed. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Mcdowell, E.M. & Trump, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 100: 405-414.
- McKone, M.J. & Halpern S.L. 2003. The Evolution of Androgenesis. **The American Naturalist**. 161: 641-656.
- Medeiros, J.D. & Morretes, B.L. 1996. The embryology of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). **Cytologia** 61: 83-91.

- Medeiros, J.D. & Roos, A.L. 1996. Aspectos do microsporângio, da microsporogênese e do gametófito masculino de *Tibouchina cerastifolia* (Naud.) Cogn. (Melastomataceae). **Biotemas** 9(2): 5-14.
- Melo, G.F., Machado, I.C. & Luceño, M. 1999. Reprodução de tres especies de *Clidemia* (Melastomataceae) en Brasil. **Revista de Biología Tropical** 47: 359-363.
- Nijs, H.C.M. den & Menken, S.B.J. 1996. Relations between breeding system, ploidy level, and taxonomy in some advanced sections of *Taraxacum*. Pp. 665-677. In: H.D.N. Hind, H.J. Beentje (eds.). **Advances in Compositae systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Nogler, G.A. 1984. Gametophytic apomixis. Pp. 475-518. In: B.M. Johri (ed.). **Embryology of Angiosperms**. Springer-Verlag, Berlin.
- Oliveira, J.M.S., Mariath, J.E.A. & Bueno, D.M. 2001. Grãos de pólen anômalos no clone CP76 de *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 24(4): 425-433.
- Pacini, E. 1990. Tapetum and microspore function. Pp. 213-237. In: S. Blackmore, R.B. Knox (eds). **Microspores: Evolution and Ontogeny**. Academic Press, London.
- Pacini, E., Franchi, G.G. & Hesse, M. 1985. The tapetum: Its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. **Plant Systematics and Evolution** 149: 155-185.
- Raghavav, V. 1987. Developmental strategies of the angiosperm pollen: a biochemical perspective. **Cell Differentiation** 21: 213-226.
- Rashid, A., & Street, H.E. 1974. Segmentations in microspores of *Nicotiana tabacum* which lead to embryoid formation in anther cultures. **Protoplasma** 80: 323-324.
- Renner, S.S. 1984. Pollination and breeding systems in some central Amazonian Melastomataceae. **Les Colloques de INRA** 21: 275-280.

- Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M.S. & Valle, C.B. 2006. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* Stapf (Poaceae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research** 5: 837-845.
- Rodrigues, L.R., Santos, Oliveira, J.M.S. de. & Mariath, J.E.A. 2004. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências** 2(3/4): 159-167.
- Romero, R. & Martins, A.B. 2002. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 25: 19-24.
- Santos, A.P.M. 2008. **Biologia reprodutiva de Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Santos, M.L. 2003. **Florística e biologia reprodutiva de espécies de Melastomataceae no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas e Parque Estadual dos Pirineus, Goiás**. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília.
- Scott, R.J., Spielman, M. & Dickinson. 2004. Stamen Structure and Function. **The Plant Cell** 16: S46–S60.
- Sobrevila, C. & Arroyo, M.T.K. 1982. Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. **Plant Systematics and Evolution** 140: 19-37.
- Solt, M.L. & Wurdack, J.J. 1980. Chromosome numbers in the Melastomataceae. **Phytologia** 47: 199-220.
- Souza-Silva, S.C.S. 2000. **Biologia reprodutiva e polinização em Melastomataceae no Parque do Sabiá, Uberlândia, MG**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.

- Subramanyam, K. 1942. Gametogenesis and embryogeny in a few members of Melastomataceae. **Journal of the Indian Botanical Society** 21: 69–85.
- Subramanyam, K. 1944. A contribution to the life history of *Sonerila Wallichii* Benn. **Proceedings of the Indian National Science Academy** 19: 115-20.
- Subramanyam, K. 1948. An embryological study of *Melastoma malabathricum* L. **Journal of the Indian Botanical Society** 27: 11-29.
- Subramanyam, K. 1951. Embryology of *Oxyspora paniculata*. **Phytomorphology** 1:205-212.
- Tobe, H., Raven, P.H. 1983a. An embryological analysis of Myrtales, its definition and characteristics. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 70: 71-94.
- Tobe, H., Raven, P.H. 1983b. The embryology of *Axinandra zeylanica* (Myrtales) and the relationships of the genus. **Botanical Gazette** 144: 426-432.
- Tobe, H., Raven, P.H. 1983c. The embryology and relationships of Penaeaceae (Myrtales). **Plant Systematics and Evolution** 146:181-195.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1984a. The embryology and relationships of Oliniaceae. **Plant Systematics and Evolution** 146: 105- 116.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1984b. The embryology and relationships of *Alzatea* Ruíz and Pav. (Alzateaceae, Myrtales). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 71: 844-852.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1984c. The embryology and relationships of *Rhynchochalyx* Oliv. (Rhynchochalcaceae, Myrtales). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 71: 836-843.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1984d. The number of cells in the pollen of Melastomataceae. **Botanical Gazette** 97:131-136.

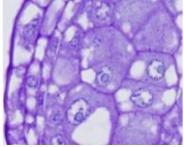
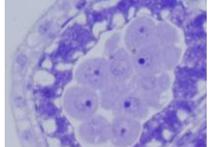
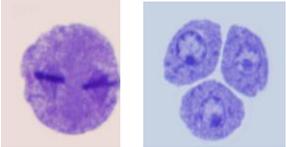
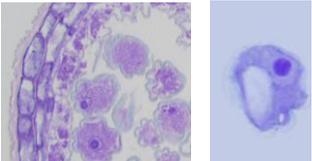
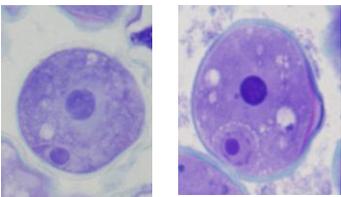
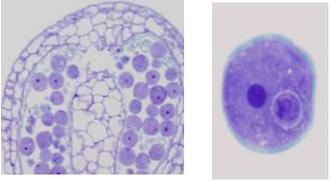
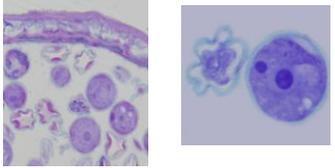
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1986a. Evolution of polysporangiate anthers in Onagraceae. **American Journal of Botany** 73(4): 475-488.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1986b. A Comparative Study of the Embryology of *Ludwigia* (Onagraceae): characteristics, variation, and relationships. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73(4) 768-787.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1987a. Embryology and systematic position of *Heteropyxis* (Myrtales). **American Journal of Botany** 74: 197-208.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1987b. The embryology and relationships of *Crypteronia* (Crypteroniaceae). **Botanical Gazette** 148: 96-102.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1987c. The embryology and relationships of *Dactylocladus* (Crypteroniaceae) and a discussion of the family. **Botanical Gazette** 148: 103-11.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1990. Embryology and systematic position of *Psiloxylon* (Myrtales). **Botanical Bulletin Academia Sinica** 31: 119-127.
- Whitton, J., Sears, C.J., Baack, E.J. & OTTO, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. **International Journal of Plant Science** 169(1): 169-182.

**Tabela 1.** Dados embriológicos referentes à parede da antera, microsporogênese e microgametogênese. Comparação dos resultados obtidos para as espécies *Miconia fallax* e *M. pepericarpa* com resultados já descritos para outras espécies da família Melastomataceae e da ordem Myrtales.

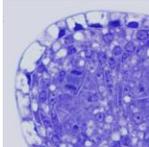
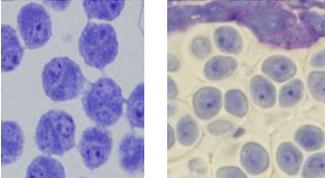
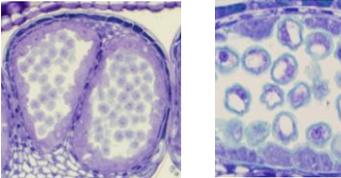
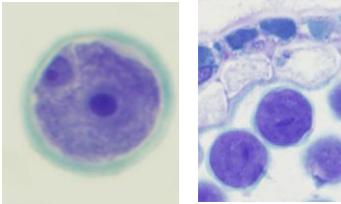
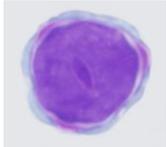
	<i>M. fallax</i> <i>M. pepericarpa</i>	Melastomataceae	Myrtales
<b>Número de esporângios</b>	4	4 ou mais <sup>1</sup>	4 ou mais <sup>2</sup>
<b>Epiderme (persistente ou não?)</b>	Persistente	Persistente	Persistente/efêmera
<b>Endotécio</b>	Sem espessamentos parietais	Geralmente sem espessamentos <sup>3</sup>	Com ou sem espessamentos <sup>4</sup>
<b>Camada média</b>	Efêmera	Geralmente efêmera <sup>5</sup>	Efêmera
<b>Tapete</b>	Glandular Uninucleado	Glandular Uninucleado	Glandular Dois ou mais núcleos (raramente uninucleado <sup>6</sup> )
<b>Citocinese</b>	Simultânea	Simultânea	Simultânea
<b>Formato da tétrade</b>	Tetraédrica	Tetraédrica	Tetraédrica, Isobilateral ou decussada
<b>Grão de pólen no momento da dispersão</b>	Bicelular	Bicelular	Bicelular

- 1) Polispórangiada em *Chaetostoma* e *Microlícia* (Tribo Microlicieae);
- 2) Polispórangiada em *Olinia* (Oliniaceae) e diversos gêneros de Onagraceae;
- 3) Endotécio com espessamentos parietais em *Mouriria*, *Sonerila* e *Tococa*;
- 4) Endotécio sem espessamentos parietais na família Alzateaceae, Crypteroniaceae e nos gêneros *Olinia*, *Penaea* e *Rhynchocalyx* (Penaeaceae);
- 5) Exceção em *Melastoma malabathricum*;
- 6) Uninucleado em *Eucalyptus* (Myrtaceae) e *Dactylocladus stenostachys* (Crypteroniaceae).

**Quadro 1.** Relação entre as fases dos botões florais, determinadas pelo comprimento dos mesmos em milímetros, e as características marcantes em cada estágio de desenvolvimento das anteras em *Miconia fallax*.

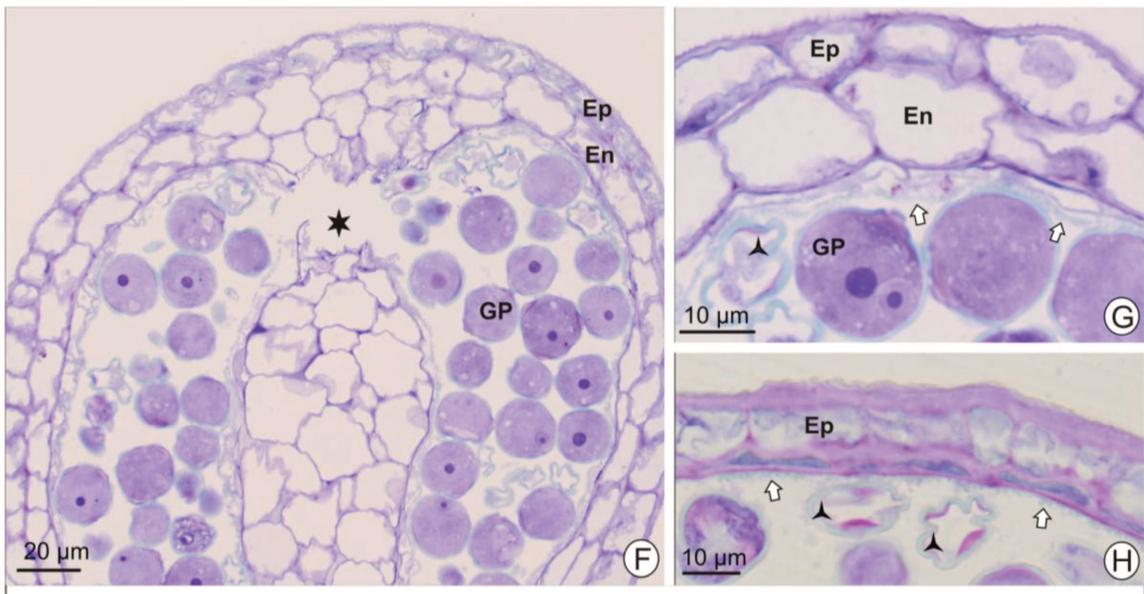
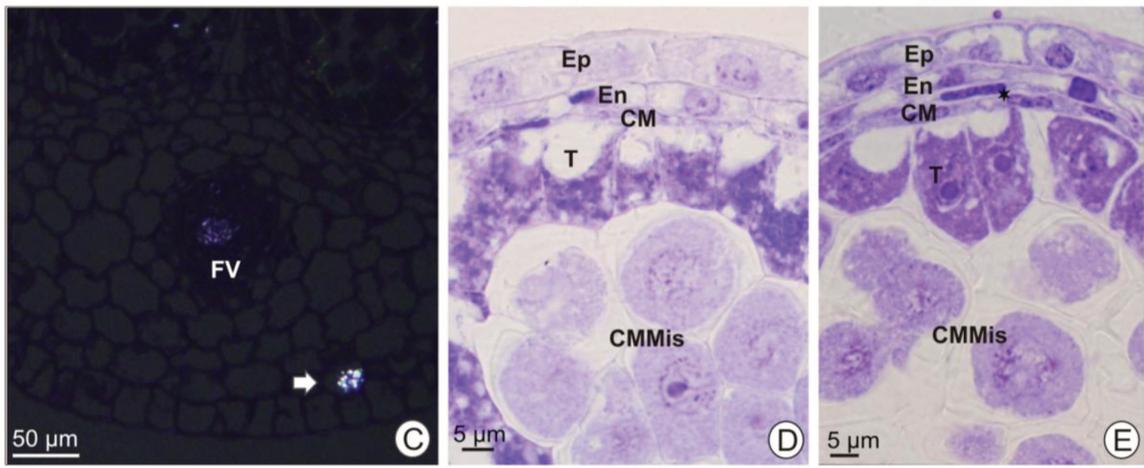
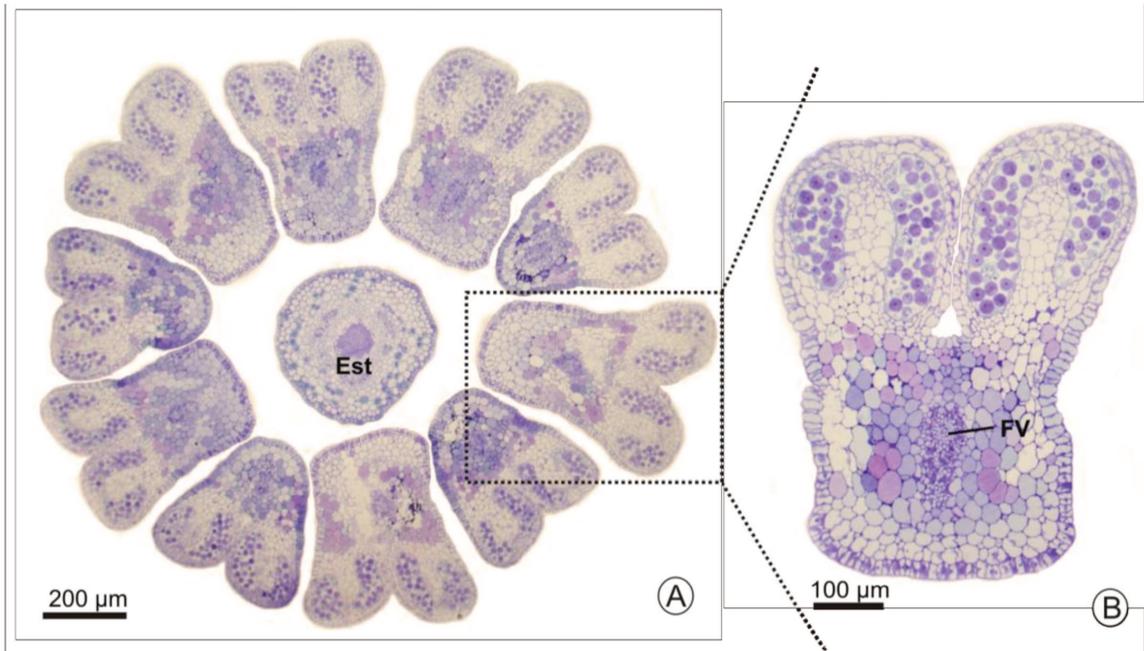
Fase dos botões	Características marcantes em cada estágio de desenvolvimento das anteras	
Botão 1: 1,0 à 2,0: mm	Camadas parietais já definidas: epiderme, endotécio, camada média e tapete - pouco diferenciado. Presença de tecido esporogênico.	
Botão 2: 2,0 à 3,0 mm	Epiderme, endotécio, camada média, em início de degeneração e células tapetais uninucleadas bem diferenciadas. Células-mãe de micrósporos se diferenciando e em início de prófase meiótica.	
Botão 3: 3,0 à 3,5 mm	Camadas parietais da antera: semelhante ao estágio anterior. Células-mãe de micrósporos durante a divisão meiótica. Tétrades de micrósporos.	
Botão 4: 3,5 à 4,0 mm	Epiderme e endotécio íntegros. Camada média obliterada e tapete em processo de degeneração. Micrósporos livres, em processo de vacuolação. Formação da membrana tapetal.	
Botão 5: 4,0 à 5,0 mm	Epiderme e endotécio intactos. Tapete quase totalmente degenerado. Primeira divisão mitótica: formação do grão de pólen bicelular com célula generativa parietal. Célula generativa projetando-se para dentro da célula vegetativa.	
Pré-antese: 5,0 à 6,0 mm	Parede da antera formada apenas por epiderme e endotécio de paredes celulares não espessadas. Grãos de pólen maduros e viáveis constituídos por célula vegetativa e célula generativa de formato esférico. Presença da membrana tapetal.	
Flor aberta	Epiderme íntegra. Endotécio em degeneração (desidratação). Grãos de pólen dispersos no estágio bicelular. Grãos de pólen inviáveis marcadamente distintos dos grãos viáveis.	

**Quadro 2.** Relação entre as fases dos botões florais, determinadas pelo comprimento dos mesmos em milímetros, e as características marcantes em cada estágio de desenvolvimento das anteras em *Miconia pepericarpa*.

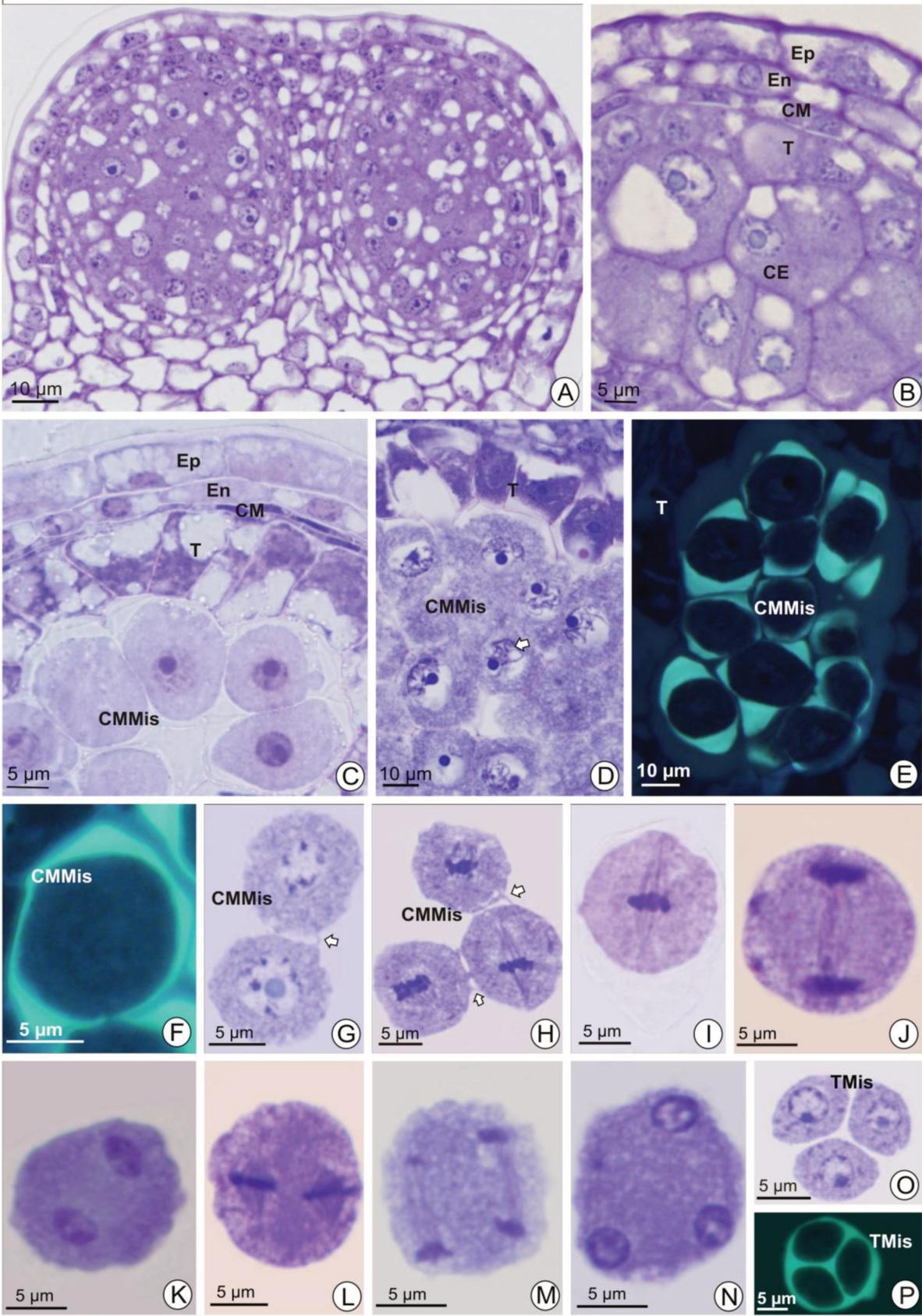
Fase dos botões	Características marcantes em cada estágio de desenvolvimento das anteras	
Botão 1: $\leq 0,5$ mm	Formação das quatro camadas parietais: epiderme, endotécio, camada média e tapete. Presença de tecido esporogênico.	
Botão 2: 0,5 à 1,0 mm	Epiderme, endotécio, camada média, em início de degeneração, e células tapetais uninucleadas bem diferenciadas. Células-mãe de micrósporos se diferenciando e em início de prófase meiótica.	
Botão 3: 1,0 à 1,5 mm	Camadas parietais da antera: semelhantes ao estágio anterior. Células-mãe de micrósporos em divisão meiótica. Tétrades de micrósporos.	
Botão 4: 1,5 à 2,0 mm	Epiderme, endotécio, camada média obliterada e tapete em processo de degeneração. Micrósporos livres, em processo de vacuolação. Formação da membrana tapetal.	
Botão 5: 2,0 à 3,0 mm	Epiderme e endotécio íntegros. Tapete degenerado. Primeira divisão mitótica: formação do grão de pólen bicelular com célula generativa parietal. Célula generativa assume formato fusiforme. Membrana tapetal.	
Pré-antese: 3,0 à 4,0 mm	Parede da antera formada apenas por epiderme e endotécio de paredes celulares não espessadas. Grão de pólen maduro, constituído por célula vegetativa e célula generativa de formato fusiforme. Membrana tapetal.	
Flor aberta	Epiderme íntegra. Endotécio em degeneração (desidratação). Grãos de pólen dispersos no estágio bicelular. Alguns poucos grãos inviáveis, em comparação à <i>Miconia fallax</i> .	

# FIGURAS

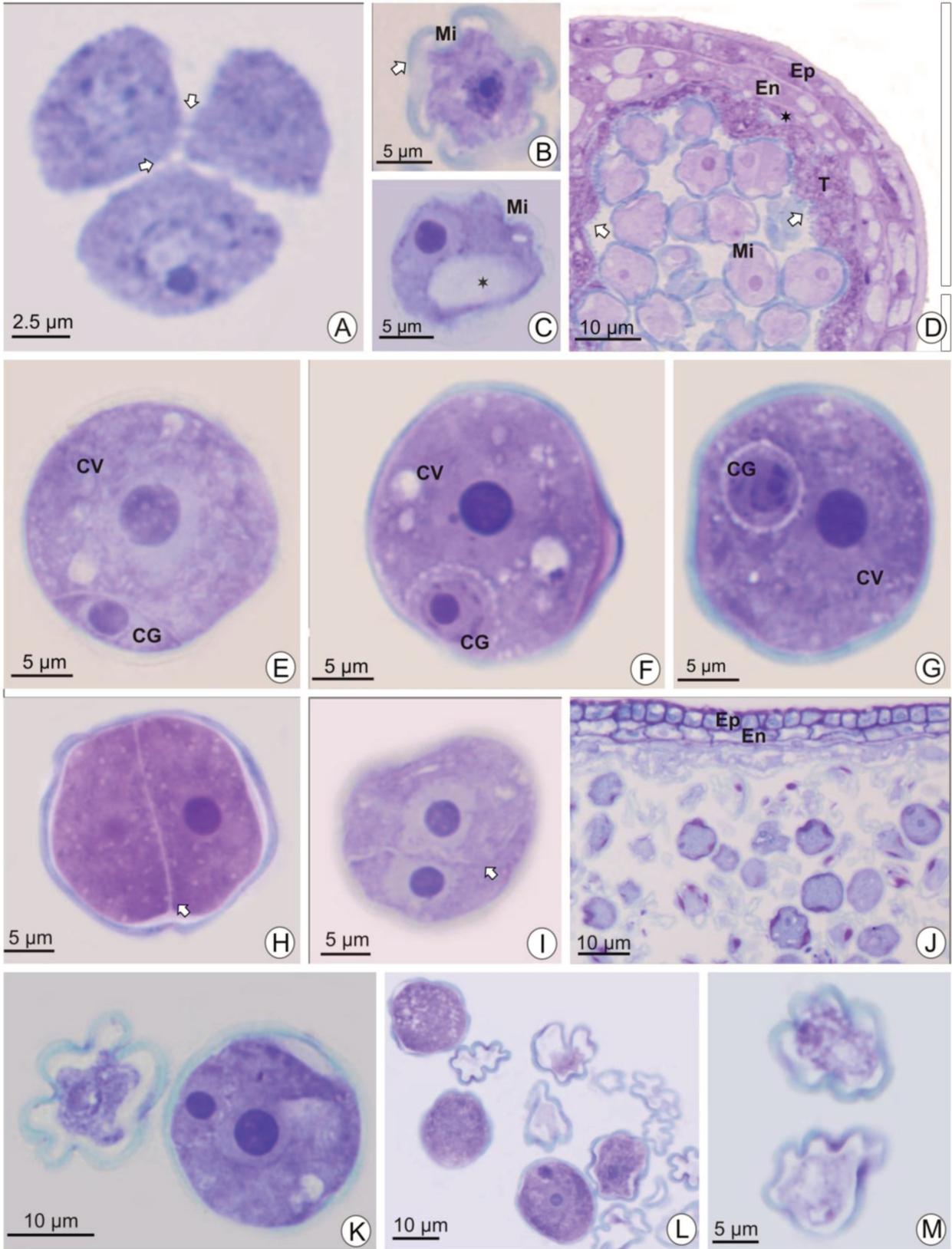
**Figura 1.** *Miconia fallax*. **A:** Corte transversal do botão floral em pré-antese, evidenciando as dez anteras e estilete. **B:** Vista geral de uma antera de botão em pré-antese com duas tecas e quatro microsporângios bem definidos. **C:** Detalhe do conectivo da antera em luz polarizada, evidenciando o feixe vascular central e a presença de um cristal (seta). **D-E:** Estratos parietais completos e camada média formada por duas camadas em alguns locais (★). **F:** Detalhe de uma das tecas da antera em pré-antese, com septo interesporangial em degeneração (★). **G, H:** Parede da antera de botão em pré-antese (G) e flor aberta (H), sendo possível visualizar a presença de grãos de pólen anormais (▲) juntamente com grãos de pólen bem desenvolvidos. Observa-se também a presença dos orbículos (seta). CM: camada média; CMMis: célula-mãe de micrósporos; En: endotécio; Ep: epiderme; Est: estilete; FV: feixe vascular; GP: grão de pólen; T: tapete.



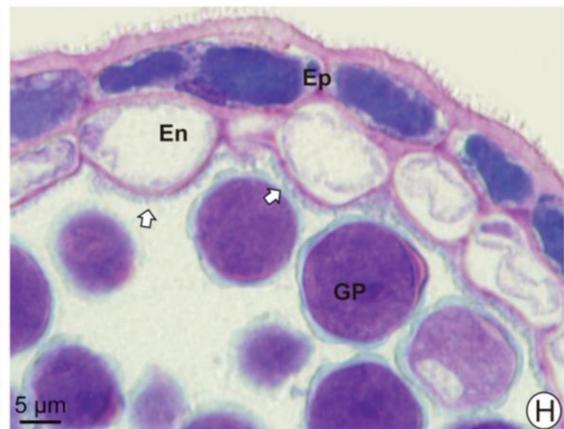
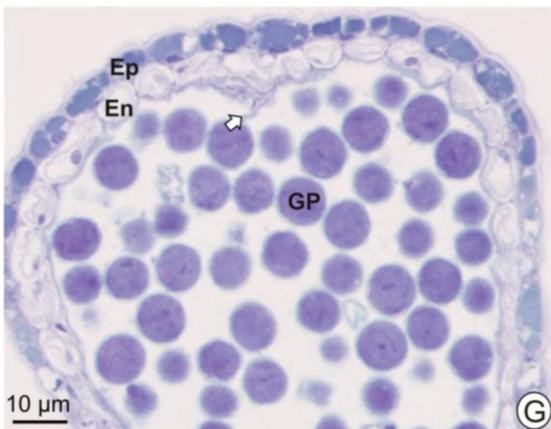
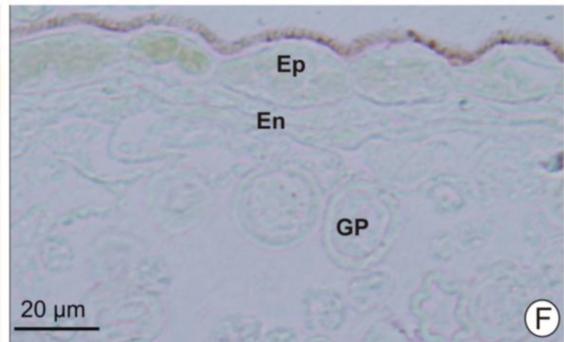
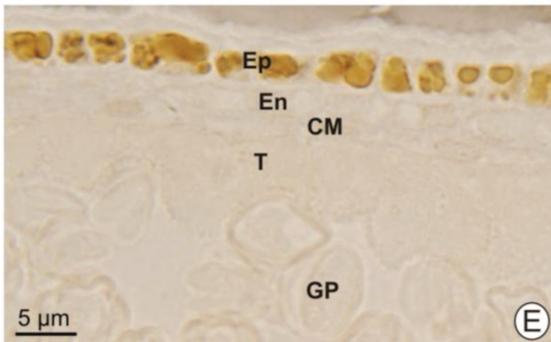
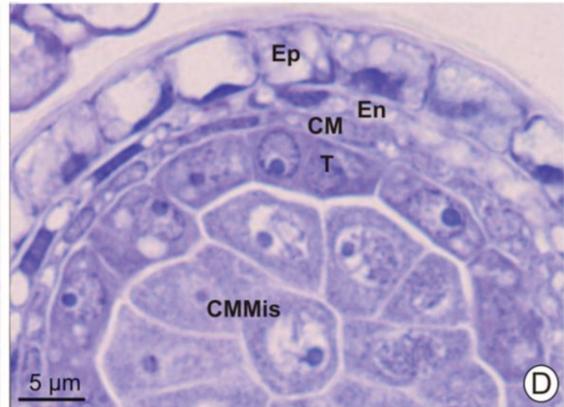
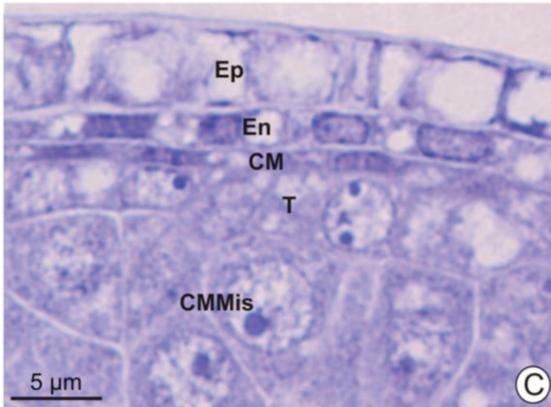
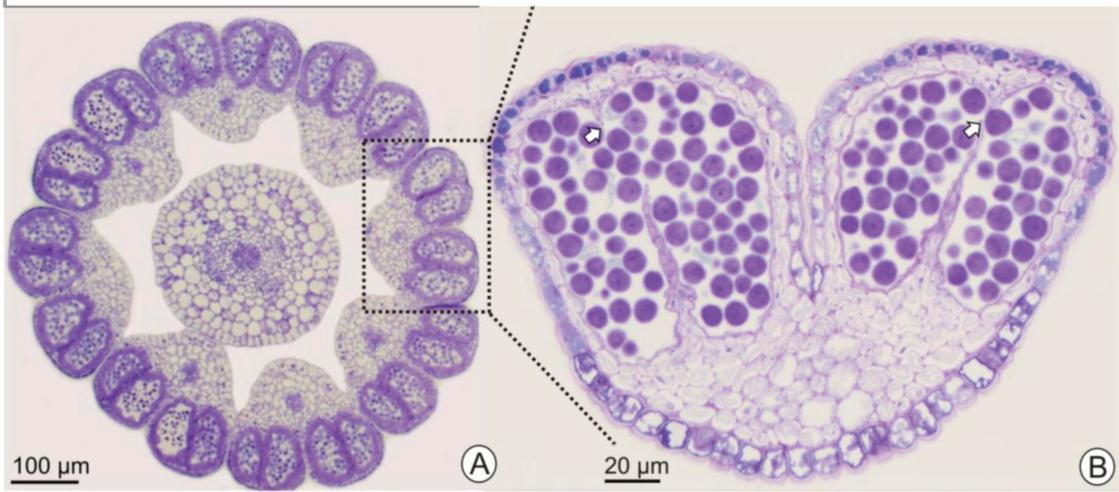
**Figura 2.** *Miconia fallax*. **A-B: Botão 1.** **A.** vista geral de uma das tecas com os dois microsporângios já bem delimitados e tecido esporogênico. **B:** Detalhe de um dos microsporângios com estratos parietais já formados e células esporogênicas grandes de citoplasma bastante denso. **C-G: Botão 2.** **C:** Região com estratos parietais já bem diferenciados e células-mãe de megásporos com deposição de calose. **D:** Células-mãe de micrósporos em prófase 1, sendo possível visualizar a condensação dos cromossomos (seta). **E:** Reação com azul de anilina sob microscópio de fluorescência, indicando a presença de calose ao redor das células-mãe de micrósporos. **F:** Detalhe de E, evidenciando uma célula-mãe de micrósporos. **G:** Células-mãe de micrósporos interligadas pelos canais citomíticos (seta). **H-P: Botão 3.** Meiose das células-mãe de micrósporos: **H:** Células-mãe de micrósporos em metáfase I, interligadas pelos canais citomíticos. **I:** Metáfase I. **J:** Anáfase I. **K:** Telófase I. **L:** Metáfase II. **M:** Anáfase II. **N:** Telófase II. **O:** Tétrade de micrósporos, formada após citocinese simultânea. **P:** Reação com azul de anilina sob microscópio de fluorescência evidenciando calose ao redor dos micrósporos da tétrade. CE: célula esporogênica; CM: camada média; CMMis: célula-mãe de micrósporos. En: endotécio; Ep: epiderme; T: tapete; TMis: tétrade de micrósporos.



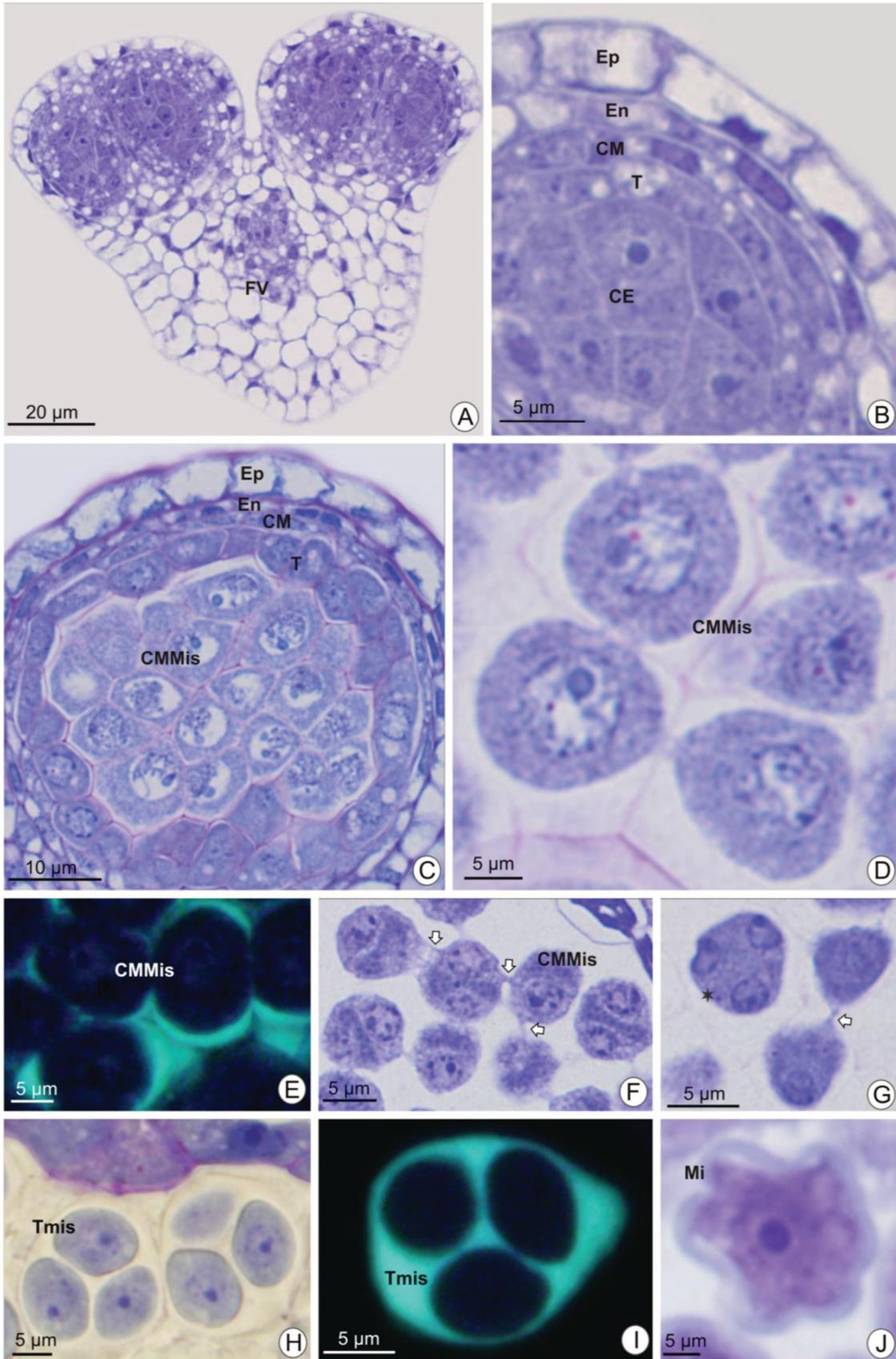
**Figura 3.** *Miconia fallax*. **A: Botão 3.** Tétrade de micrósporos com canais citomíticos indicados pelas setas. **B-D: Botão 4.** **B:** Micrósporo não vacuolado. **C:** Micrósporo vacuolado com núcleo periférico. **D:** Vista geral de um dos microsporângios com micrósporos em processo de vacuolação, camada média quase totalmente degenerada (★), tapete em processo de degeneração e membrana tapetal formada (setas). **E-F: Botão 5.** **E:** Grão de pólen com célula generativa parietal. **F:** Célula generativa projetando-se para dentro da célula vegetativa. **G-M: Botão em pré-antese.** **G:** Grão de pólen maduro com célula generativa esférica, ocupando posição central, imersa no citoplasma da célula vegetativa. **H, I:** Mitose simétrica do micrósporo (setas), com formação de um grão de pólen com duas células idênticas. **J:** Vista geral da antera madura, observar a grande quantidade de grãos de pólen inviáveis. **K, L:** Grãos de pólen viáveis, maiores e com citoplasma denso, ao lado de grãos inviáveis. **M:** Detalhe de dois grãos de pólen inviáveis, com forma bastante irregular e citoplasma pouco corado em relação aos grãos de pólen viáveis. CG: célula generativa; CV: célula vegetativa; En: endotécio; Ep: epiderme; Mi: micrósporo; T: tapete.



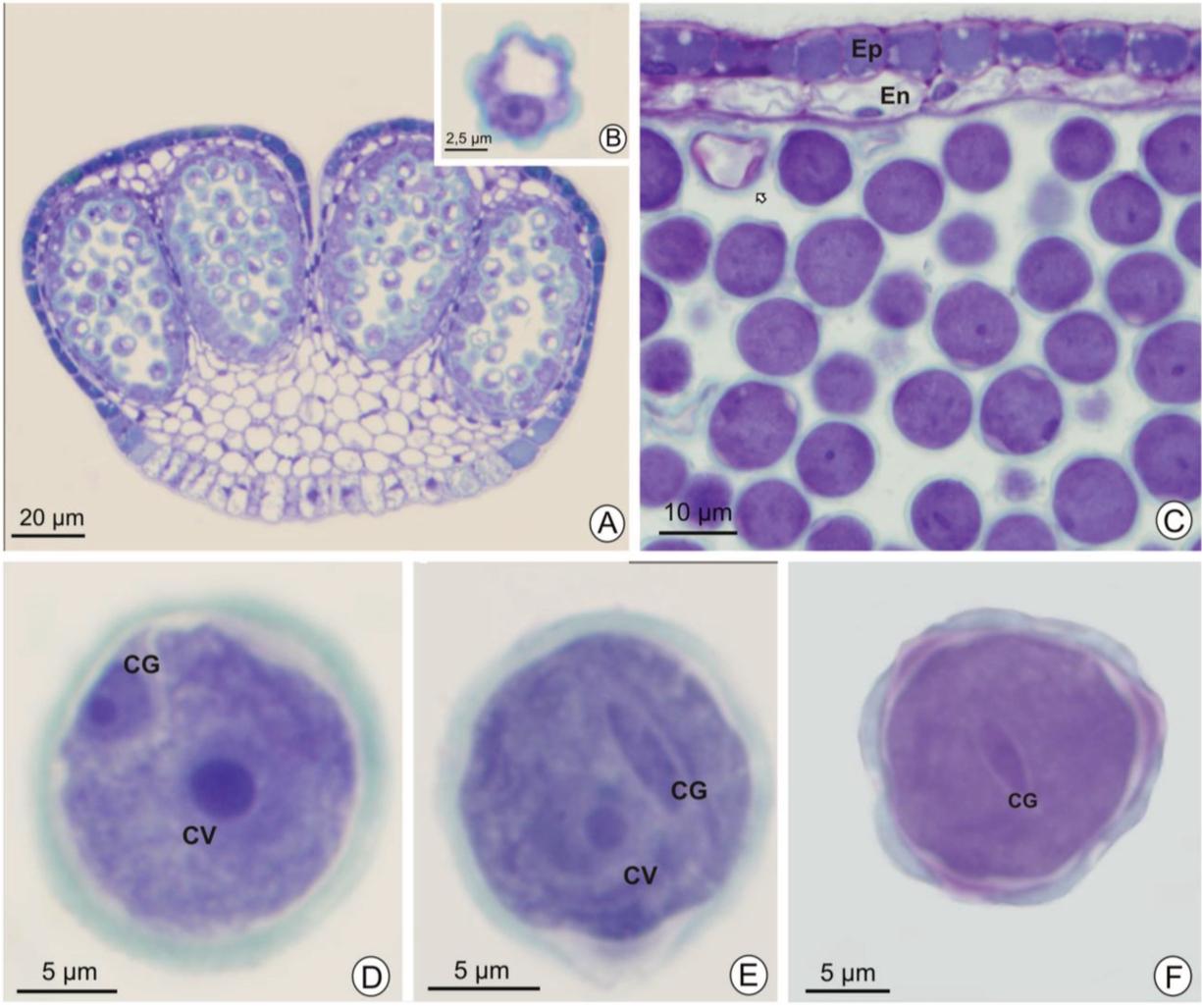
**Figura 4.** *Miconia pepericarpa*. **A:** Corte transversal do botão floral em pré-antese, evidenciando as oito anteras. **B:** Vista geral de uma das anteras madura, biteca e tetrasporangiada, com septos interesporangiais em degeneração (setas). **C-D: Botão 2.** Detalhe da parede da antera totalmente formada, no estágio de diferenciação das células-mãe de micrósporos. **E:** Material obtido a partir da fixação em sulfato ferroso em formalina, evidenciando a presença de compostos fenólicos nas células epidérmicas da antera. **F:** Reação com Sudan, evidenciando a cutícula estriada. **G:** Detalhe de uma teca com septo interesporangial totalmente degenerado (seta), formando um único lóculo em cada teca na antera madura. **H:** Antera madura, com presença de dois estratos parietais, epiderme e endotécio, e orbículos aderidos à parede da antera (setas), formando a membrana tapetal. CMMis: células-mãe de micrósporos; CM: camada média; En: endotécio; Ep: epiderme; GP: grão de pólen; T: tapete.



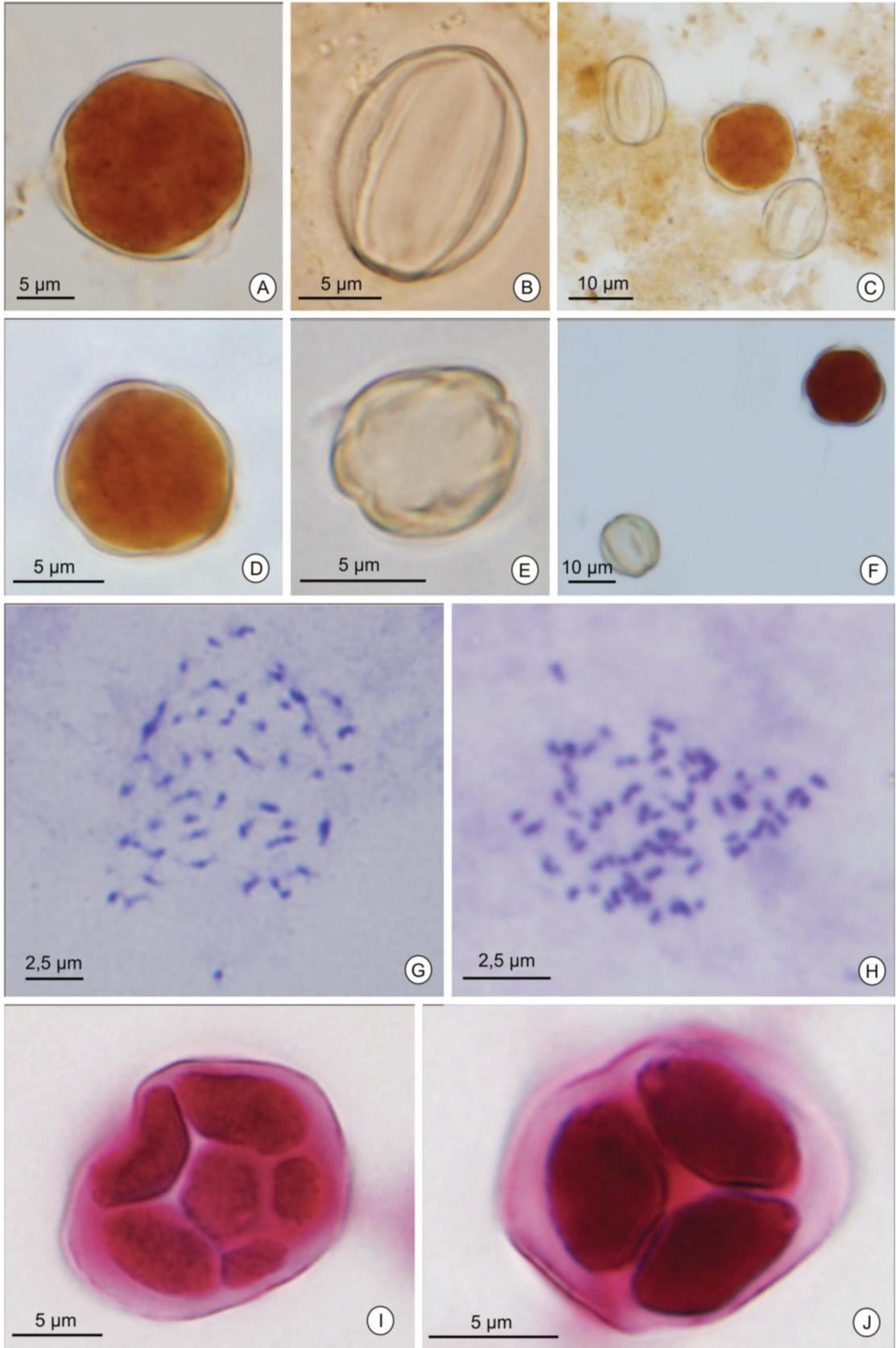
**Figura 5.** *Miconia pepericarpa*. **A-B: Botão 1.** **A:** Antera em início de desenvolvimento, com os quatro microsporângios já delimitados, camadas parietais formadas e tecido esporogênico em proliferação. **B:** Detalhe de A, evidenciando os estratos parietais da antera e as células esporogênicas. **C-E: Botão 2.** **C:** Microsporângio com estratos parietais bem diferenciados e células-mãe de micrósporos em prófase I, com cromossomos condensando. **D:** Detalhe das células-mãe de micrósporos envoltas por calose. **E:** Reação com azul de anilina sob microscópio de fluorescência, evidenciando a presença de calose ao redor das células-mãe de micrósporos em prófase meiótica. **F-I: Botão 3.** **F:** Células-mãe de micrósporos durante a meiose, interligadas pelos canais citomíticos (setas). **G:** Final da cariocinese (★) e canais citomíticos indicados pela seta. **H:** Tétrades tetraédricas de micrósporos, envoltas por calose. **I:** Reação com azul de anilina sob microscópio de fluorescência, evidenciando a presença de calose ao redor da tétrade de micrósporos. **J: Botão 4.** Micrósporo não vacuolado. CE: célula esporogênica; CMMis: célula-mãe de micrósporos; En: endotécio; Ep: epiderme; Mi: micrósporo; T: tapete; Tmis: tétrade de micrósporos.



**Figura 6.** *Miconia pepericarpa*. **A-B: Botão 4.** **A.** Aspecto geral da antera com micrósporos vacuolados. **B:** Detalhe de um micrósporo vacuolado com núcleo periférico. **C:** Antera madura: é possível observar a grande quantidade de grãos de pólen viáveis e poucos grãos inviáveis (seta). **D: Botão 5.** Grão de pólen com célula generativa parietal. **E-F: Pré-antese.** **E.** Grão de pólen maduro, com célula generativa com formato fusiforme e ocupando posição central, imersa no citoplasma da célula vegetativa. **F:** Grão de pólen com célula generativa em evidência. CG: célula generativa; CV: célula vegetativa; En: endotécio; Ep: epiderme.



**Figura 7. A-C:** *Miconia fallax*. **A:** Grão de pólen viável. **B:** Grão de pólen inviável. **C:** Dois grãos de pólen inviáveis e um viável. **D-F:** *Miconia pepericarpa*. **D:** Grão de pólen viável. **E:** Grão de pólen inviável. **F:** Grão viável e inviável. **G-H:** *Miconia fallax* – Metáfases mitóticas. **G:** Célula com  $2n = \text{ca. } 68$ , população I. **H:** Célula com  $2n = \text{ca. } 60$ , população II. **I-J:** *Miconia fallax*. Tétrades de micrósporos. **I:** Tétrade de micrósporos com micronúcleos. **J:** Tétrade de micrósporos “normal”.



# CAPÍTULO 2

## **CAPÍTULO 2. MEGASPOROGÊNESE, MEGAGAMETOGÊNESE E POLIEMBRIONIA EM UMA ESPÉCIE APOMÍTICA E OUTRA SEXUADA DE *MICONIA* RUIZ & PAVÓN, MELASTOMATACEAE**

### **Resumo**

Na família Melastomataceae, o gênero *Miconia* destaca-se pela grande porcentagem de espécies apomíticas. Entretanto, poucos estudos avaliaram os eventos ocorrentes nos óvulos destas espécies. O objetivo do presente trabalho é avaliar a megasporogênese e a megagametogênese em uma espécie apomítica, *Miconia fallax*, e outra sexuada, *M. pepericarpa*, buscando as principais modificações embriológicas que estão associadas à apomixia. Busca-se identificar a origem do embrião apomítico; analisar se o processo sexuado ocorre simultaneamente nestes óvulos e associar a apomixia a outros eventos, como a poliembrionia. Botões florais em vários estádios de desenvolvimento, flores e frutos foram coletados e processados para microscopia de luz. Sementes foram germinadas para verificar a ocorrência de poliembrionia. Em *M. fallax* e *M. pepericarpa*, os eventos de megasporogênese e megagametogênese que culminam na formação de sacos embrionários sexuais são muito similares e corroboram os dados já descritos para outras espécies da família. Entretanto, na espécie apomítica, logo no início da megasporogênese, células do nucelo se diferenciam em células iniciais apospóricas, levando a formação de sacos embrionários apospóricos, onde os embriões apomíticos desenvolvem-se. Estes sacos embrionários podem ocorrer simultaneamente ao sexuado em um mesmo óvulo, levando à poliembrionia, que também pode ser causada pela formação de embriões adventícios. Os experimentos de germinação confirmam que *M. fallax* é poliembrionica, podendo formar até quatro embriões em uma mesma semente. Além dos eventos relacionados à formação do embrião apomítico, a espécie preserva ainda os mecanismos sexuais de formação do saco embrionário. Estes resultados, associados ao fato da espécie produzir grãos de pólen viáveis, permitem concluir que a mesma é possivelmente uma apomítica facultativa, já que preserva os eventos necessários para se reproduzir sexualmente.

**Palavras-chave:** Apomixia, Melastomataceae, *Miconia*, megasporogênese, megagametogênese, aposporia, embriões adventícios, poliembrionia.

## INTRODUÇÃO

A família Melastomataceae Juss., com cerca de 4.500 espécies e 166 gêneros, está presente em praticamente todas as formações vegetacionais no Brasil, sendo uma das famílias mais representativas de angiospermas no país (Clausing & Renner 2001, Romero & Martins 2002, Goldenberg *et al.* 2008). Um quarto das espécies desta família pertencem ao gênero *Miconia* Ruiz & Pavón, com cerca de 1056 espécies, que ocorrem desde o sul do México e Caribe até o Uruguai e norte da Argentina (Goldenberg 2000).

O gênero *Miconia* vem ganhando destaque devido à grande quantidade de espécies apomíticas, que representam mais da metade das espécies com o sistema reprodutivo estudado neste gênero (Renner 1984, 1989, Borges 1991, Goldenberg & Shepherd 1998, Sousa-Silva 2000, Goldenberg & Varassin 2001, Santos 2003, Fracasso & Sazima 2004).

A apomixia é definida como um processo de reprodução assexuada por meio de sementes, com o desenvolvimento de um embrião viável a partir de tecidos do óvulo (Bicknell & Koltunow 2004, Koltunow & Grossniklaus 2003). A apomixia, de acordo com a origem do embrião, pode ser dividida em dois tipos: o tipo esporofítico ou embrionia adventícia, e o tipo gametofítico, que é subdividido em aposporia e diplosporia. No mecanismo esporofítico, o embrião desenvolve-se diretamente de células somáticas do óvulo, geralmente do nucelo e, menos frequentemente, dos tegumentos (Asker & Jerling 1992, Ozias-Akins 2006). No processo gametofítico, o embrião apomítico desenvolve-se a partir da oosfera de um saco embrionário não reduzido, ou seja, um saco embrionário cujas células apresentam número cromossômico somático (Asker & Jerling 1992, Whitton *et al.* 2008). Dependendo da origem do saco embrionário não reduzido, a apomixia gametofítica é subdividida em diplosporia, se o saco embrionário

deriva-se da célula-mãe de megásporos por supressão da meiose ou meiose incompleta, e em aposporia, se ele origina-se por divisões mitóticas de alguma célula do nucelo (Asker & Jerling 1992, Whitton *et al.* 2008).

A embrionia adventícia e a aposporia podem ser acompanhadas pelo fenômeno da poliembrionia, ou seja, pela ocorrência de mais de um embrião em uma mesma semente (Maheshwari 1950, Lakshmanan & Ambegaokar 1984). No caso da embrionia adventícia, é muito comum que mais de uma célula somática do óvulo se desenvolva e dê origem a vários embriões (Naumova 1993, Batygina & Vinogradova 2007). Exemplos são citados em espécies de *Pachira oleagina* Decne., *Hosta coerulea* Tratt., *Euphorbia dulcis* L., em variedades de *Citrus* L. e Manga, entre outros (Naumova 1993). Além disso, como a embrionia adventícia e a aposporia não excluem a possibilidade da formação de um saco embrionário sexuado, é possível que o(s) embrião(ões) apomítico(s), apospórico ou adventício, ocorra(m) juntamente com o embrião zigótico em um mesmo óvulo, levando à poliembrionia (Asker & Jerling 1992, Batygina & Vinogradova 2007). Embriões zigóticos e adventícios são reportados em *Spathiphyllum patinii* (R. Hogg) N.E. Br., *Ruta* L. e em espécies de *Citrus* L. (Naumova 1993).

Em Melastomataceae, existem poucos trabalhos que abordam o tipo de mecanismo apomítico ocorrente na família (Borges 1991, Caetano *et al.* em prep., Cortez 2007). Pouco se sabe também se este processo está ou não relacionado a outros eventos, como a poliembrionia. Em geral, os estudos com espécies apomíticas concentram-se principalmente em representantes de Poaceae e Asteraceae, geralmente em espécies herbáceas de clima temperado (Bicknell & Koltunow 2004). Assim, a família Melastomataceae e, em particular, a tribo Miconieae, representa uma oportunidade de estudo da apomixia em um novo cenário: com representantes naturais

de hábitos diversos, principalmente arbustos e árvores de clima tropical.

Os estudos embriológicos envolvendo a megasporogênese, megagametogênese e embriogênese são de importância fundamental para avaliar o processo apomítico. Dados dessa natureza permitem além de classificar o tipo de apomixia que ocorre em determinada espécie, avaliar se este mecanismo pode ou não ocorrer em paralelo com a reprodução sexuada, respondendo a questões fundamentais acerca da biologia reprodutiva da planta. Além disso, estes dados possibilitam relacionar ou não a apomixia à determinados eventos, como a poliembrionia.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a megasporogênese e a megagametogênese em duas espécies de *Miconia*, Melastomataceae, com sistemas reprodutivos distintos: *Miconia fallax* DC., espécie apomítica, e *Miconia pepericarpa* Mart. ex DC., espécie sexuada. Buscou-se identificar as principais alterações estruturais ocorrentes nestes dois processos e que estão associadas à apomixia. Além disso, o trabalho tem a finalidade de verificar se a espécie apomítica é poliembrionica, investigando se este fenômeno está ou não relacionado à apomixia.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As coletas de botões florais, flores e frutos de *Miconia fallax* e *M. pepericarpa* foram realizadas em fragmentos de cerrado no município de Itirapina (22°15' S e 47°49' W), estado de São Paulo, Brasil. Duas populações foram utilizadas para a coleta do material biológico de *M. fallax*: Graúna (População I) e Valério (População II). Já *M. pepericarpa* foi coletada em um único local, denominado Pedregulho.

As exsiccatas foram depositadas de maneira convencional no Herbário UEC - Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de

Campinas, sob os números 150450 e 150451, para *Miconia fallax* e *M. pepericarpa*, respectivamente.

Botões florais, flores e frutos em diversos estádios de desenvolvimento foram coletados para o estudo do desenvolvimento dos megásporos, megagametófitos e embriões. Doze indivíduos de *Miconia fallax*, sendo seis de cada população, e seis indivíduos de *M. pepericarpa*, foram utilizados neste estudo.

A fixação foi realizada em solução de glutaraldeído 2% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8 (McDowell & Trump 1976) por 24h. Foram feitas fissuras, com lâmina de barbear, nos botões florais e flores antes da fixação, para melhor penetração da solução fixadora. Durante a fixação, o material foi submetido à bomba de vácuo por aproximadamente 12h. As amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8, desidratadas em série etanólica e estocadas em etanol 70% (v/v). Os frutos foram fixados em FAA (1:1:18, formalina:ácido acético glacial:etanol 50% (v/v/v)) por 24h, e lavados e estocados em etanol 70% (v/v) (Johansen 1940). As diversas fases do desenvolvimento foram reconhecidas de acordo com o tamanho do botão floral (Quadro 1 e 2) e do fruto. Alguns botões e flores abertas foram fixados em solução de formalina com sulfato ferroso por 48h (Johansen 1940), com a finalidade de evidenciar a presença de compostos fenólicos em tecidos do ovário e do óvulo. Após a fixação, as amostras foram lavadas em água destilada por três vezes de 15min. cada, desidratadas em série etanólica (Johansen 1940) e estocadas em etanol 70% (v/v).

Todo o material foi incluído em resina plástica (historesin) Leica<sup>®</sup>. Os cortes foram obtidos em micrótomo rotativo Leica<sup>®</sup> com navalha descartável de tungstênio, entre 1,0 e 5,0 µm de espessura. As secções foram aderidas a lâminas de vidro e

posteriormente coradas em azul de toluidina (C.I. 52040) a 0,05% em tampão citrato, pH 4,8. As lâminas foram montadas no momento da observação com água destilada ou óleo de imersão e lamínula de vidro. As observações e fotomicrografias foram realizadas em microscópio de luz Olympus® BX 51 com câmera digital acoplada modelo DP71.

Algumas lâminas foram tratadas com azul de anilina (C.I. 42755) a 0,05% em tampão fosfato de potássio a 0,06M e pH 8,0, e observadas em microscópio de fluorescência Olympus® BX51 com filtro de luz ultra violeta para verificar a deposição de pólen e crescimento dos tubos polínicos na superfície estigmática em *Miconia pepericarpa* (Kapil & Tiwari 1978).

Para observar a deposição de pólen e crescimento dos tubos polínicos na superfície estigmática de *Miconia fallax*, foram coletadas, ao acaso, flores abertas de cinco indivíduos das duas populações. As flores foram fixadas em FAA (1:1:18, formalina:ácido acético glacial:etanol 50% (v/v/v)) por 24h e lavadas e estocadas em etanol 70% (v/v) (Johansen 1940). Os pistilos foram diafanizados em solução de NaOH 7N, corados com azul de anilina (C.I. 42755) a 0,05% em tampão fosfato de potássio a 0,06M e pH 8,0, e observados em microscópio de fluorescência Olympus® BX51 sob luz ultra violeta (Martin 1959).

Botões florais de três indivíduos de *Miconia fallax* da população do Valério foram emasculados, isolados com sacos de organza e posteriormente fixados em solução de glutaraldeído 2% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8 (McDowell & Trump 1976) por 24h para verificar a ocorrência do desenvolvimento autônomo do endosperma.

Para o estudo envolvendo poliembrionia, frutos maduros de *Miconia fallax* foram coletados nas populações I e II a partir de sete e seis indivíduos, respectivamente. Nesta análise foi utilizada uma amostra de 200 sementes, sendo quatro repetições de 50 sementes por indivíduo de cada população, totalizando 2.600 sementes. As sementes foram deixadas por cerca de três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 10%, lavadas em água destilada e montadas em caixas plásticas Gerbox com o fundo recoberto com algodão e com papel de filtro, ambos umedecidos com água destilada. O experimento foi realizado em câmara de germinação com iluminação contínua branca fluorescente e temperatura constante de 28°C. Foi feito um acompanhamento diário para verificar a protrusão da raiz, critério utilizado para estabelecer a germinação das sementes. Cada semente germinada foi dissecada sob estereomicroscópio para contagem do número de embriões e observação morfológica dos mesmos.

## **RESULTADOS**

As informações obtidas para a família Melastomataceae e para a ordem Myrtales estão apresentadas na tabela 1 juntamente com os principais caracteres embriológicos de valor taxonômico relacionados ao óvulo observados em *Miconia fallax* e *M. pepericarpa*. Nos quadros 1 e 2, o tamanho dos botões florais foi relacionado às principais características encontradas em cada estágio de desenvolvimento do óvulo.

## **ESTRUTURA DO ÓVULO**

*Miconia fallax* e *M. pepericarpa* apresentam ovário trilocular, com grande quantidade de células com compostos fenólicos e cristais de oxalato de cálcio (Fig. 1A-B, 5A). *M. fallax* possui vários óvulos em cada lóculo do ovário (Fig. 1A-B), enquanto

que em *M. pepericarpa*, cada lóculo apresenta comumente apenas um ou dois óvulos (Fig. 5A); em ambos os casos, a placentação é do tipo axilar (Fig. 1B,F).

Os óvulos das espécies estudadas são anátropos, crassinucelados e bitegmentados, com micrópila em “zig-zag” formada por ambos os tegumentos (Fig. 1C,E-F. 5B-D). Os tegumentos, externo e interno, não são vascularizados, sendo o primeiro formado por três camadas e o segundo formado por duas camadas de células (Fig. 1C, 5C-D). Na região da micrópila, células do tegumento externo passam por divisões anticlinais, aumentando a espessura da camada neste local (Fig. 1E, 5D).

O feixe vascular que percorre a rafe termina na calaza (Fig. 1C), onde células compactas de citoplasma denso e núcleo proeminente, porém sem qualquer indício de lignificação, formam a hipóstase (1D). Durante o desenvolvimento da semente, em ambas as espécies, as células da hipóstase acumulam compostos fenólicos, identificado pela cor esverdeada quando corado em azul de toluidina (Fig. 1G). Em *M. pepericarpa* as células que circundam o feixe vascular acumulam compostos fenólicos, evidenciado no material fixado em formalina com sulfato ferroso (Fig. 5E).

#### **MEGASPOROGÊNESE E MEGAGAMETOGÊNESE**

As diferenças embriológicas entre *Miconia fallax* e *M. pepericarpa* já são observadas no início do desenvolvimento do óvulo, durante o processo de megasporogênese. Entretanto, os eventos sexuais, representados pela diferenciação da célula-mãe de megásporos, meiose e formação dos megásporos, e mitose do megásporo funcional para o desenvolvimento do megagametófito, ou saco embrionário, ocorreram de modo muito similar em ambas as espécies. Assim, em *M. fallax*, os

eventos relacionados à apomixia não impediram a ocorrência do processo sexual no óvulo.

Em *Miconia fallax* e *M. pepericarpa*, uma única célula esporogênica se diferencia em meio ao nucelo (Fig. 2A, 5F). A célula esporogênica desenvolve-se diretamente em célula-mãe de megásporos (Fig. 2B-D, 5G) que sofre meiose, formando uma díade (Fig. 2E) e posteriormente, uma tétrade linear de megásporos (Fig. 2F-G, 5H).

O megásporo funcional tem posição calazal (Fig. 2G, 5H) e após três mitoses (Fig. 3A-B), dá origem a um saco embrionário do tipo *Polygonum*, muito similar nas duas espécies, sendo formado por três antípodas, uma célula central com dois núcleos polares e pelo aparato oosférico, constituído por duas sinérgides e pela oosfera (Fig. 3C-D, 6A-B). É possível distinguir, na porção basal das sinérgides, o aparato filiforme, que se cora em rosa com azul de toluidina (Fig. 3C, 6A).

Em *Miconia pepericarpa* constatou-se a presença de grãos de pólen na superfície estigmática em pistilos oriundos de flores abertas (Fig. 6E-F). Foi possível observar a germinação dos grãos de pólen por entre as papilas estigmáticas (Fig. 6F). Em microscopia de fluorescência, foram evidenciados eventos como a germinação do grão de pólen, a formação do tubo polínico (Figs. 6G-H) e a ocorrência dos tampões de calose no estilete (Figs. 6H). Além disso, observou-se a penetração do tubo polínico em uma das sinérgides, indicando fecundação (Fig. 6D). Nos pistilos coletados a partir de flores abertas de *M. fallax*, também verificou-se a presença e germinação de grãos de pólen no estigma, além do crescimento do tubo polínico através do estilete (Fig. 4A-B).

Nas sementes em início de desenvolvimento de *Miconia pepericarpa* e *M. fallax*, foi possível observar o início da formação do endosperma, com alguns núcleos distribuídos ao longo do saco embrionário, caracterizando o endosperma como do tipo

nuclear (3F, 6C). Em *M. fallax*, observou-se a presença de núcleos do endosperma também nas sementes oriundas de botões emasculados, indicando que a espécie tem formação autônoma deste tecido.

Diversos óvulos analisados de *Miconia fallax* apresentaram células nucleares em desenvolvimento ao redor da célula-mãe de megásporos, da tétrade de megásporos ou do próprio megásporo funcional. Estas são muito semelhantes ao megásporo funcional, possuindo um conspícuo núcleo central, citoplasma denso e a presença de vacúolos nos dois pólos da célula (Fig. 2 H-I), podendo ser caracterizadas como células iniciais apospóricas. Cerca de 42 óvulos foram analisados nestes estádios de desenvolvimento, sendo que 69,05% apresentaram células iniciais apospóricas se diferenciando no nucelo.

Nos óvulos de flores em antese de *Miconia fallax*, constatou-se a presença de até três sacos embrionários em desenvolvimento (Fig. 3C). Geralmente, quando mais de um saco embrionário estava presente em um mesmo óvulo, enquanto um estava maduro, os outros ainda estavam em desenvolvimento, geralmente com quatro ou oito núcleos, ainda não celularizados.

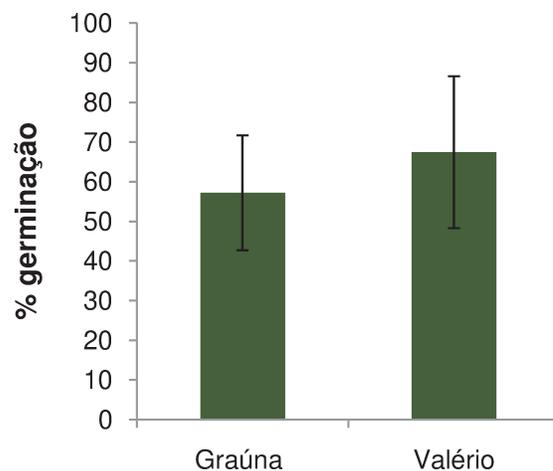
Em *Miconia fallax* verificou-se também o desenvolvimento de embriões a partir de células do nucelo, crescendo em direção à cavidade do saco embrionário (Fig. 3H), indicando a presença de embriões adventícia na espécie.

Nas sementes em diversos estádios de desenvolvimento, foi possível observar a presença de até três embriões em uma mesma semente, indicando que a espécie é poliembriônica (Fig. 3G,I). Não é possível distinguir se todos os embriões são apomíticos ou se existem também embriões zigóticos nas sementes maduras.

## POLIEMBRIONIA EM *MICONIA FALLAX*

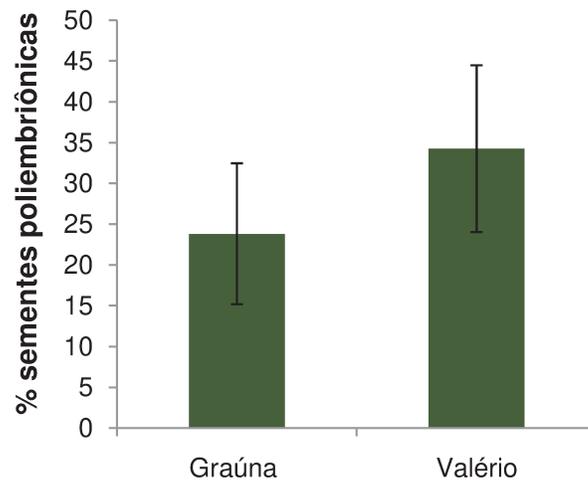
O início da germinação ocorreu sete dias após o início do experimento. A porcentagem média de sementes germinadas foi de 57,1%  $\pm$ 14,5 na população I e 67,4%  $\pm$ 19,1 na população II (Fig. 7).

**Figura 7.** Porcentagem de sementes germinadas de *M. fallax* provenientes das populações Graúna e Valério (média $\pm$ desvio padrão).



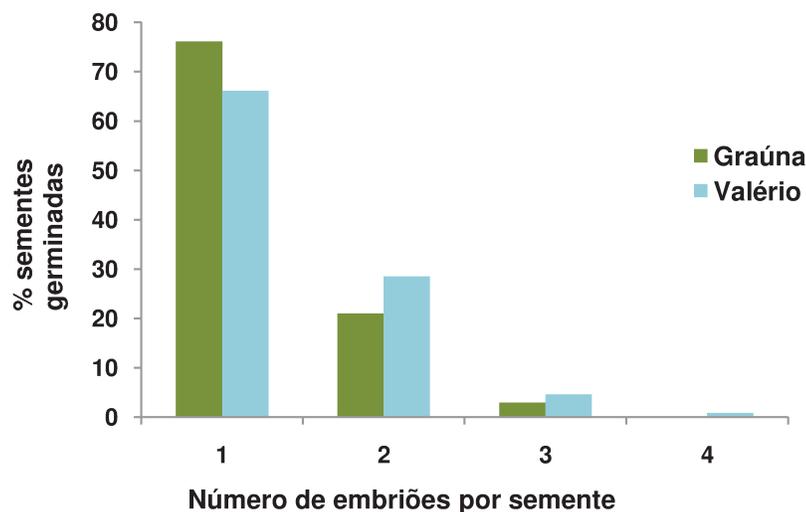
Os resultados confirmaram a natureza poliembriônica das sementes provenientes de ambas as populações de *Miconia fallax*, com médias de 23,8% ( $\pm$ 8,65) e 34,2% ( $\pm$ 10,2) de sementes poliembriônicas nas populações I e II, respectivamente (Fig. 8).

**Figura 8.** Porcentagem de sementes germinadas poliembrionicas de *M. fallax* provenientes das populações Graúna e Valério (média±desviopadrão).



O número máximo de embriões encontrados em uma única semente de *Miconia fallax* foi quatro (Fig. 4E), sendo que a média de embriões por semente foi de  $1,3 \pm 0,1$  na população I e  $1,4 \pm 0,1$  na população II. Em ambas as populações, as sementes monoembrionicas foram as mais freqüentes (Fig. 4C), seguidas por aquelas que apresentaram dois (Fig. 4D), três e quatro embriões (Fig. 4E, ).

**Figura 9.** Porcentagem de sementes germinadas de *M. fallax* com um, dois, três e quatro embriões, provenientes das populações Graúna e Valério.



Mais da metade das sementes analisadas com dois embriões (50,4%) (Fig. 4H) e todas as sementes que continham três (Fig. 4I) e quatro embriões (Fig. 4J) apresentaram diferenças em tamanho, forma e/ou grau de desenvolvimento entre os embriões. Os embriões menores apresentavam, geralmente, cotilédones pouco desenvolvidos e morfologicamente irregulares, e eixo radicular atrofiado, sendo visivelmente inviáveis (Fig. 4I-J).

Em algumas sementes (2,9%) constatou-se a protrusão do embrião não pela raiz, mas pelo cotilédone, com o eixo hipocótilo-radicular voltado para a região calazal (Fig. 4D), indicando a natureza adventícia deste embrião. Esse dado corrobora com os resultados anatômicos encontrados. Os embriões invertidos foram localizados em sementes monoembriônicas e também associados a outro(s) embrião(ões) de posição “normal” ou “invertida”.

## **DISCUSSÃO**

### **ESTRUTURA DO ÓVULO**

Quanto às características do óvulo, as espécies apomítica, *M. fallax*, e sexuada, *M. pepericarpa*, apresentaram grande similaridade.

A natureza crassinucelar do nucelo e a presença de duas camadas no tegumento interno são características das espécies aqui estudadas e compartilhadas com toda a família Melastomataceae e ordem Myrtales (Tab.1) (Borges 1991, Johri *et al.* 1992, Medeiros & Morretes 1996, Caetano *et al.* em prep., Cortez & Carmello-Guerreiro 2008, Tobe & Raven 1983a, b, c, 1984a, b, c, 1986, 1987a, b, c, 1990).

Outros caracteres do óvulo de *Miconia fallax* e *M. pepericarpa*, como curvatura anátropa, presença de dois tegumentos não vascularizados e micrópila formada por ambos os tegumentos são constantes na família, sendo reportadas nos representantes já analisados (Subramanyam 1942, 1951, Borges 1991, Johri *et al.* 1992, Medeiros & Morretes 1996, Caetano *et al.* em prep., Cortez & Carmello-Guerreiro 2008). Entretanto, estes caracteres não são conservados em toda a ordem Myrtales, na qual já foi descrita a presença de óvulos campilótopos, hemi-campilótopos e hemítropos, óvulos unitegumentares vascularizados e micrópila ausente ou formada somente pelo tegumento interno (Tab. 1) (Tobe & Raven 1983a, b, c, 1984a, b, c, 1986, 1987a, b,c, 1990).

A presença de compostos fenólicos que se depositam ao redor do feixe vascular ao final do desenvolvimento do óvulo e durante o desenvolvimento da semente em *M. pepericarpa*, possivelmente é responsável pela cor escura encontrada na região da rafe na semente.

#### **MEGASPOROGÊNESE E MEGAGAMETOGÊNESE**

A apomixia está relacionada a mudanças embriológicas observadas desde o início do processo de megasporogênese na espécie *Miconia fallax*. Estas mudanças envolvem o desenvolvimento de células iniciais apospóricas em meio ao nucelo, que levam à formação de sacos embrionários não reduzidos no óvulo maduro. Entretanto, nesta espécie, a apomixia não altera a rota sexual de formação do saco embrionário, sendo possível a presença de sacos embrionários apospóricos e sexuado em um mesmo óvulo.

Em *Miconia fallax* e *M. pepericarpa*, a meiose da célula-mãe de megásporos resulta em uma tétrade linear de megásporos, com o megásporo calazal funcional que, através de mitoses, dá origem a um saco embrionário do tipo *Polygonum*, muito similar nas duas espécies. Em Melastomataceae, os dados obtidos até o momento também indicam a presença de tétrades lineares, do megásporo calazal funcional e de saco embrionário do tipo *Polygonum* nas espécies analisadas (Subramanyam 1942, 1951, Borges 1991, Johri *et al.* 1992, Medeiros & Morretes 1996, Caetano *et al.* em prep.). Já nos demais representantes da ordem Myrtales, estes caracteres são bastante variáveis (Tab. 1). Por exemplo, há três padrões distintos de formação do saco embrionário em representantes desta ordem: tipo *Oenothera*, em membros de Onagraceae, tipo *Penaea* em *Penaea* e *Saltera* (Penaeaceae), e tipo *Allium* em *Heteropyxis* (Myrtaceae) e *Alzatea* (Alzateaceae) (Tobe & Raven 1983 c, 1984b, 1986, 1987a).

Em *Miconia fallax*, juntamente com os eventos já descritos de megasporogênese, tem início os processos que desencadeiam na formação de sacos embrionários apospóricos. As células iniciais apospóricas foram observadas ao redor da célula-mãe de megásporos, da tétrade de megásporos e do megásporo funcional. Elas foram identificadas pelo seu tamanho maior, em relação às demais células nucelares, pelo seu posicionamento, pois geralmente não ocupam posição central no nucelo, e por apresentarem citoplasma denso, núcleo proeminente e presença de dois vacúolos situados nos dois pólos da célula. Naumova & Vielle-Calzada (2001), com base em dados ultra-estruturais de espécies apospóricas, apontam que as células iniciais apospóricas usualmente diferenciam-se ao redor dos megásporos ou do saco embrionário em estágio uninucleado, assumindo vacúolos esféricos e aumento em volume. Segundo estes autores, a formação dos dois vacúolos em lados opostos é o

primeiro sinal de polarização da célula, que marca a transição do estágio de célula inicial apospórica para saco embrionário apospórico uninucleado.

A aposporia tem sido descrita em vários grupos de angiospermas, sendo especialmente comum em representantes de Asteraceae, Poaceae e Rosaceae (Naumova 2008). Na família Melastomataceae, apesar dos registros de apomixia gametofítica, do tipo diplosporia, em *M. albicans* (Caetano *et al.* em prep., Cortez 2007) e *Leandra australis*, nenhum dado ainda tinha indicado apomixia gametofítica do tipo aposporia na família, sendo este, portanto, um resultado inédito.

Nogler (1971) discute a hipótese de que a aposporia é uma desregulação do processo sexual, baseando seu argumento na ocorrência de alguns componentes da apomixia em plantas sexuais, como a presença de arquespório múltiplo e a partenogênese de oosferas reduzidas. Atualmente, essa hipótese tem sido confirmada por estudos de expressão gênica em *Hieracium*, que demonstram que a apomixia e a reprodução sexual compartilham os mesmos componentes reguladores e padrões de expressão gênica (Koltunow & Grossniklaus 2003, Tucker *et al.* 2003, Tucker & Koltunow 2009). Assim, a apomixia tem sido vista como uma desregulação, em tempo e espaço, do programa de desenvolvimento sexual, levando a mudanças no destino de células e omissão de eventos críticos no processo sexual. Dependendo de quando e onde esta desregulação ocorre, diferentes tipos de apomixia podem ocorrer (Koltunow & Grossniklaus 2003).

A frequente diferenciação de mais de uma célula inicial apospórica em *Miconia fallax* foi seguida pela formação de múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo. Koltunow & Grossniklaus (2003) afirmam que é possível que numerosas células iniciais apospóricas se desenvolvam no nucelo, dando origem a vários sacos embrionários.

Naumova (2008) explica esse evento, sugerindo que, na aposporia, todas as células nucelares carregam a informação genética para se desenvolverem em sacos embrionários, mesmo que somente algumas, principalmente as células adjacentes à célula-mãe de megásporos, possuam realmente tal capacidade. Por esta razão, várias iniciais apospóricas, que podem produzir distintos megagametófitos, se diferenciam no estágio inicial de desenvolvimento do óvulo (Naumova 2008).

Um exemplo é representado em *Eulaliopsis binata* (Retz) C.E. Hubb. (Poaceae), na qual os autores observaram a diferenciação de uma a quatro células apospóricas, levando ao desenvolvimento de vários sacos embrionários em um único óvulo (Yao *et al.* 2007). Em outras espécies, como em *Hieracium piloselloides* Vill., apesar da diferenciação de duas ou mais células iniciais apospóricas, raramente mais de um saco embrionário é formado devido possivelmente, à expansão de uma das células apospóricas, que inibe o desenvolvimento das outras (Koltunow *et al.* 1998). Portanto, o número de sacos embrionários apospóricos formados vai depender da espécie analisada (Koltunow 1993).

Os sacos embrionários apospóricos podem ou não estar associados ao saco embrionário sexuado (Koltunow *et al.* 1998). Em *Eulaliopsis binata* os sacos embrionários apospóricos raramente ocorrem juntamente com o saco embrionário sexuado (Yao *et al.* 2007). De forma semelhante, em *Pennisetum squamulatum* Fresen (Wen *et al.* 1998) e *Hieracium* (Koltunow *et al.* 1998, Tucker *et al.* 2003), o processo apospórico leva ao aborto do processo sexual, com degeneração da célula-mãe de megásporos ou dos produtos da meiose. Estudos envolvendo expressão gênica em espécies apomíticas de *Hieracium* indicam que a presença das células iniciais apospóricas pode influenciar diretamente, por meio de alterações na expressão gênica,

no desaparecimento do programa sexual (Tucker *et al.* 2003). Modelos indicam que em alguns casos há competição entre reprodução sexual e apomixia (Bradley *et al.* 2007). Entretanto, é visto que em outras espécies, como em *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf, os sacos embrionários apospóricos e sexuado podem coexistir no mesmo óvulo (Araújo *et al.* 2000). Em *Miconia fallax*, os dados anatômicos também sugerem a co-ocorrência de sacos embrionários apospóricos e sexuado, já que não foi observado nenhum processo de degeneração ou alteração na célula-mãe de megásporos, na tétrade de megásporos, no megásporo funcional ou saco embrionário, durante o desenvolvimento do óvulo.

Além disso, os resultados alcançados neste trabalho, que demonstram a capacidade de formação de megagametófitos sexuados e, possibilidade de polinização, já que foram observados grãos de pólen germinando na superfície estigmática das flores, juntamente com os dados que comprovam a formação de grãos de pólen viáveis, indicam que *Miconia fallax* é provavelmente uma espécie apomítica facultativa, pois a reprodução sexual não foi completamente eliminada. A maioria das plantas apomíticas retém a capacidade de reprodução sexual, sendo reportado algum grau de sexualidade em todos os três mecanismos conhecidos de apomixia (Koltunow & Grossniklaus 2003, Bicknell & Koltunow 2004). Dependendo do tipo de apomixia, os eventos sexuais podem ocorrer junto com os eventos apomíticos em um mesmo óvulo, ou em diferentes óvulos de uma mesma planta (Koltunow & Grossniklaus 2003).

As espécies apomíticas obrigatórias, que perderam completamente a capacidade de se reproduzirem sexuadamente, representam raras exceções entre as angiospermas (Asker & Jerling 1992, Naumova 2008), podendo ser exemplificadas por dois representantes do gênero aqui estudado: *Miconia albicans* e *M. pohliana* Cogn. Tais

espécies apresentam viabilidade polínica nula, mas formação de sementes viáveis em condições naturais (Goldenberg & Shepherd 1998, Caetano *et al.* em prep., Cortez 2007). Uma importância prática para a manutenção da sexualidade em espécies apomíticas facultativas é a possibilidade de produção de uma progênie diversa, não sendo uniformemente clonal (Bicknell & Koltunow 2004).

Estudos que envolvam a análise da progênie em *Miconia fallax* são necessários para determinar a porcentagem real de plântulas originadas por apomixia ou por reprodução sexuada nas sementes desta espécie. Este tipo de estudo permitirá analisar a interação entre sexualidade e apomixia, proporcionando uma oportunidade para avaliar as implicações ecológicas destes diferentes modos de reprodução.

Muitas plantas apomíticas, assim como *Miconia fallax*, produzem pólen viável, o que possibilitaria a fecundação de oosferas não reduzidas (Bicknell & Koltunow 2004). Entretanto, algumas destas espécies, como *Hieracium piloselloides*, *Parthenium*, *Poa*, *Taraxacum* e *Tripsacum*, têm embriões precoces, ou seja, o embrião se desenvolve antes da antese da flor, limitando a possibilidade de fecundação (Nogler 1984, Bicknell & Koltunow 2004). Em outros casos, a própria parede da oosfera parece agir como uma barreira que previne a fecundação (Nogler 1984). Sabe-se que em algumas espécies sexuais, a parede celular da oosfera é descontínua até o momento da fertilização, e somente após a formação do zigoto a parede é sintetizada completamente (Bicknell & Koltunow 2004). Entretanto, em *Pennisetum ciliare* (L.), uma apomítica apospórica, a parede celular é sintetizada ao redor de toda a oosfera não reduzida, impedindo sua fusão com o núcleo espermático (Vielle *et al.* 1995, Bicknell & Koltunow 2004).

Em *Miconia fallax*, nos óvulos de flores abertas, é provável que os sacos embrionários maduros, com aparato oosférico já formado, sejam os gametófitos

sexuados, prontos para serem fecundados. O desenvolvimento retardatário dos sacos embrionários apospóricos poderia impedir a fertilização da oosfera não reduzida, já que durante a antese da flor, oosferas e sinérgides ainda não estão formadas.

Em espécies apospóricas, como *Miconia fallax*, o embrião é formado por partenogênese. Nas plantas, a partenogênese é definida como o desenvolvimento do embrião a partir de uma célula não fecundada do saco embrionário, geralmente a oosfera (Koltunow 1993, Ozias-Akins 2006, Naumova 2008). Na natureza, a partenogênese pode ocorrer de duas formas: a partir de oosferas haplóides (partenogênese haplóide) ou diplóides (partenogênese diplóide) (Naumova 2008). A partenogênese haplóide, que ocorre em sacos embrionários reduzidos, tem uma baixa frequência, não excedendo 1-2%, sendo descrita em espécies de *Brassica*, *Crepis*, *Datura*, *Hordeum*, *Nicotiana*, *Oryza*, *Solanum*, *Triticum*, *Zea*, entre outros (Naumova 2008). A partenogênese diplóide ocorre em sacos embrionários que não passaram por meiose durante o curso de sua formação, isto é, na diplosporia e na aposporia (Naumova 2008), sendo um dos eventos “chave” que compõem a apomixia (Grossniklaus 2001). Em plantas, os mecanismos moleculares que induzem a partenogênese antes da fecundação são ainda desconhecidos, mas um melhor entendimento da base genética da partenogênese pode prover um instrumento importante na aplicação da apomixia em plantas economicamente importantes (Grossniklaus 2001, Koltunow & Grossniklaus 2003).

Assim como foi constatado em *Miconia fallax*, algumas espécies apomíticas possuem desenvolvimento autônomo do endosperma. Essas espécies não dependem de polinização, pois oosfera e núcleo secundário não requerem fecundação para se desenvolverem e, por isso, são classificadas como apomíticas autônomas (Nogler

1984). Muitas compostas, como *Antennaria alpina* (L.) Gaertn. e *Hieracium piloselloides*, exibem desenvolvimento autônomo do endosperma que, apesar de aparentemente esporádico em outras famílias, já foi reconhecido em *Alchemilla* L. (Rosaceae), *Burmannia coelestis* D. Don (Burmanniaceae), *Calamagrostis* Adans. e *Cortaderia jubata* (Lemoine) Stapf (Poaceae), *Elatostema* J.R. Forst. & G. Forst. (Urticaceae), entre outras (Nogler 1984, Bicknell & Koltunow 2004). Em duas espécies apospóricas amplamente estudadas, *Poa pratensis* e *Brachiaria decumbens*, apesar dos embriões desenvolverem-se por partenogênese a partir da oosfera não reduzida, o endosperma não se desenvolve na ausência de fecundação, e nesta condição, os embriões apospóricos cessam seu desenvolvimento no estágio globular (Naumova 2008). Estas espécies são classificadas como pseudogâmicas, pois dependem da fertilização do núcleo secundário para formação do endosperma e desenvolvimento do embrião (Nogler 1984, Asker & Jerling 1992). A pseudogamia é uma característica comum em membros da família Rosaceae e Poaceae, apesar de algumas exceções (Nogler 1984), e parece ser bastante frequente em apomíticas apospóricas (Asker & Jerling 1992, Koltunow 1994).

É possível que a ativação do desenvolvimento autônomo da oosfera e do endosperma tenha o mesmo controle genético, reforçando a hipótese de que o endosperma é evolutivamente derivado de um segundo embrião (Grossniklaus 2001), como proposto por Sargent (1900). Segundo Grossniklaus (2001), dados moleculares e genéticos têm mostrado que existe uma grande sobreposição da atividade genética de endosperma e embrião, corroborando com esta hipótese.

A importância do endosperma para o desenvolvimento da semente varia entre as espécies, dependendo do seu padrão de desenvolvimento (Grossniklaus 2001). Em

algumas espécies, como em Orchidaceae, o endosperma passa por apenas alguns ciclos de divisão (Grossniklaus 2001). Em Melastomataceae, o endosperma é do tipo nuclear e não forma um tecido celularizado (Corner 1976, Caetano *et al.* em prep.), sendo que o próprio nucelo parece também servir como fonte de nutrientes para o embrião em desenvolvimento (Caetano *et al.* em prep.). Estas características encontradas em representantes da família podem ter contribuído de forma positiva para o sucesso da apomixia nestas espécies.

A presença de embriões adventícios em *Miconia fallax* corrobora a idéia que mais de um tipo de apomixia pode ocorrer em uma mesma espécie. A embrionia adventícia é o tipo mais comum de apomixia na natureza e ocorre em paralelo com a diplosporia e a aposporia em espécies de *Beta* e *Rubus* (Koltunow & Grossniklaus 2003, Naumova 2008). Embrionia adventícia e aposporia coexistem em espécies de *Citrus*, *Allium*, *Hieracium*, *Malus*, *Ochna*, *Pyrus* e algumas gramíneas, como *Eulaliopsis binata* (Naumova 1993, 2008, Koltunow & Grossniklaus 2003, Yao *et al.* 2007). Na tribo Miconieae, Borges (1991) relata a presença de sacos embrionários diplospóricos e embriões adventícios em *Leandra australis* (Cham.), confirmando a idéia que mais de um mecanismo apomítico pode existir em uma mesma espécie na família Melastomataceae.

Na embrionia adventícia, o processo de diferenciação das células que dão origem aos embriões ocorre geralmente no final do desenvolvimento do óvulo, a partir de células do nucelo, como em *Miconia fallax*, ou dos tegumentos (Koltunow & Grossniklaus 2003). É inteiramente possível que embriões sexuais e adventícios estejam simultaneamente presentes na semente, causando poliembrionia (Naumova 2008). Assim, em *M. fallax*, a poliembrionia pode ocorrer devido ao desenvolvimento de

embriões apomíticos que podem ainda, estarem associados ao embrião zigótico. Como não existem diferenças anatômicas entre os três tipos de embriões, as informações obtidas neste trabalho não permitem responder qual a frequência que cada tipo ocorre e nem quais estão presentes na semente madura.

### **POLIEMBRIONIA EM *MICONIA FALLAX***

Os dados obtidos por meio dos experimentos de germinação confirmaram a natureza poliembriônica das sementes de *Miconia fallax*.

Salomão & Allen (2001) investigaram 75 espécies de 28 famílias de angiospermas ocorrentes no cerrado e na caatinga do Brasil, e 14 espécies pertencentes a 12 famílias apresentaram sementes poliembriônicas. Nenhuma espécie da família Melastomataceae foi citada neste trabalho, apesar da existência de indicações de sementes poliembriônicas em seus representantes, como em *M. rubiginosa* (Goldenberg & Shepherd 1998).

Quatro das espécies poliembriônicas investigadas por Salomão & Allen (2001) já tiveram seu sistema reprodutivo testado, sendo apomíticas: *Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng. (Allen 1991), *Eriotheca pubescens* (Mart. & Zucc.) Schott & Endl. (Oliveira *et al.* 1992), *Genipa americana* L. (Crestana 1995) e *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Costa *et al.* 2004). Os autores acreditam que a poliembrionia nestas espécies está relacionada à apomixia (Salomão & Allen 2001). Dados anatômicos confirmaram esta hipótese para *E. pubescens* (Mendes-Rodrigues *et al.* 2005) e *Tabebuia ochracea* (Costa *et al.* 2004), nas quais foi relatada a diferenciação de embriões adventícios, levando a poliembrionia. Não se pode afirmar que a poliembrionia seja uma consequência da apomixia nas demais espécies estudadas por

Salomão & Allen (2001), já que esta pode ser decorrente de outros processos. Para esta relação ser confirmada, é necessário um estudo do sistema reprodutivo e análises embriológicas dos óvulos e sementes destas espécies.

A porcentagem de sementes poliembriônicas é altamente variável e depende da espécie analisada. Em espécies com embrionia adventícia, esse número é particularmente alto, como nos gêneros *Eugenia*, *Citrus* e *Poncirus*, nos quais de 40 a mais de 70% das sementes são poliembriônicas (Naumova 1993). Em *Tabebuia ochracea* (Costa *et al.* 2004), uma espécie comum nos cerrados do Brasil e que também apresenta embrionia adventícia, 81,37% das sementes germinadas são poliembriônicas.

Em *Hieracium aurantiacum*, *H. piloselloides* e *Brachiaria brizantha*, três espécies apospóricas, as sementes poliembriônicas representavam respectivamente, 8, 17 e 8% do total de sementes germinadas (Alves *et al.* 2001, Koltunow *et al.* 1998). Nestas espécies, os autores descrevem a formação de mais de um saco embrionário apospórico em um mesmo óvulo e relatam que as oosferas destes diferentes megagametófitos podem originar os embriões adicionais. Além disso, em *Hieracium*, os autores acreditam que algumas células iniciais apospóricas que não se desenvolveram em sacos embrionários podem formar embriões em estádios posteriores.

Outras espécies com apomixia gametofítica, como *Poa pratensis*, *Elymus rectisetus* e *Malus hupensis*, apresentam cerca de 34, 8 e 37% de sementes poliembriônicas, respectivamente (Xue *et al.* 1997). Portanto, os dados disponíveis mostram que a porcentagem de sementes poliembriônicas em espécies apomíticas gametofíticas pode variar bastante, mas parece não ultrapassar os 40%.

Em *Miconia fallax*, a poliembrionia pode ser resultado do desenvolvimento de embriões a partir de múltiplos sacos embrionários, apospóricos e sexuado, além da formação de embriões adventícios. Análises moleculares das plântulas poderão confirmar a origem mista dos embriões, a partir de processos apomíticos, aposporia e embrionia adventícia, e do processo sexual, confirmando que a espécie utiliza estes dois mecanismos para se reproduzir.

Assim, com a poliembrionia, distintos tipos de organismos com diferentes heranças podem ser formados em uma mesma semente, pois os diferentes processos, sexual e assexual, de formação de um novo indivíduo podem ocorrer lado a lado nestas sementes (Batygina & Vinogradova 2007). Os embriões apomíticos preservam o genótipo materno e não são capazes de manter a variabilidade genética, entretanto, os embriões sexuais carregam uma significativa fonte de variação para as novas populações (Batygina & Vinogradova 2007).

Apesar da presença de poliembrionia, as sementes com um embrião foram as mais frequentes em *Miconia fallax*. Como as sementes desta espécie são diminutas, com cerca de 1 mm, a competição por espaço e nutrientes deve limitar o crescimento de muitos embriões em uma mesma semente. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que a grande maioria das sementes poliembriônicas apresentou embriões com anormalidades, como cotilédones e raízes pouco desenvolvidos e morfologicamente irregulares. Em *Tabebuia ochracea* (Costa *et al.* 2004) e *Citrus* (Mendes-da-Glória *et al.* 2001) os autores também relatam alterações nos cotilédones de embriões oriundos de sementes poliembriônicas, associando estas anormalidades à competição dentro das sementes.

Com os dados obtidos, conclui-se que as espécies *Miconia fallax*, apomítica, e

*M. pepericarpa*, sexuada, apresentaram diversas diferenças durante a formação de esporos e gametófitos femininos. A espécie *M. fallax* possuiu características exclusivas, como a diferenciação de células iniciais apospóricas, a presença de mais de um saco embrionário no óvulo maduro, o desenvolvimento de embriões adventícios e a poliembria. Todas estas características observadas em *M. fallax* estão relacionadas à apomixia. Além disso, apesar da formação dos embriões apomíticos a espécie ainda preserva os mecanismos de formação de sacos embrionários sexuais, com possibilidade de formação de embriões zigóticos, já que como foi visto no capítulo anterior, há formação de grãos de pólen viáveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allem, A.C. 1991. Estudo da biologia reprodutiva de duas espécies florestais (aroeira e gonçalo-alves) da região do cerrado. **Pesquisa em andamento** 2: 1-5.
- Alves, E.R., Carneiro, V.T.C. & Araújo, A.C.G. 2001. Direct evidence of pseudogamy in the apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction** 14: 207-212.
- Araujo, A.C.G., Mukhambetzhanov, S., Pozzobon, M.T., Santana, E.F. & Carneiro, V.T.C. 2000. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales le Botaniste** 23(1) 13-28.
- Asker, S.E. & Jerling, L. 1992. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press.
- Batygina, T.B. & Vinogradova, G.Y. 2007. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology* 38(3): 126-151.
- Bicknell, R.A. & Koltunow, A.M. 2004. Understanding apomixes: recent advances and remaining comundrums. **The Plant Cell** 16: 229-245.
- Borges, H.B.N. 1991. **Biologia reprodutiva de quatro espécies de Melastomataceae**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Bradley, J.E., Carman, J.G., Jamison, M.S. & Naumova, T.N. 2007. Heterochronic features of the female germline among several sexual diploid *Tripsacum* L. (Andropogoneae, Poaceae). **Sexual Plant Reproduction** 20: 9-17.
- Clausing, G. & Renner, S.S. 2001. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany** 88: 486-498.

- Corner, E.J.H. 1976. **The seeds of dicotyledons**. Cambridge: Cambridge University Press. Vol.1.
- Cortez, P.A. 2007. **Embriologia de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae), espécie agamospérmica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Cortez, P.A. & Carmello-Guerreiro, S.M. 2008. Ontogeny and structure of the pericarp and the seed coat of *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) from "cerrado", Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 31(1): 71-79.
- Costa, M.E., Sampaio, D.S., Paoli, A.A.S. & Leite, S.C.A.L. 2004. Poliembriõnia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochraceae* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. 27(2): 395-406.
- Crestana, C.M.S. 1995. Ecologia da polinização de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) na estação ecológica de Moji-Guaçu, estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal** 7: 169-195.
- Fracasso, C.M. & Sazima, M. 2004. Polinização de *Cambessedesia hilariana* (Kunth) DC. (Melastomataceae): sucesso reprodutivo *versus* diversidade, comportamento e frequência de visitas de abelhas. **Revista Brasileira de Botânica** 27(4): 797-804.
- Goldenberg, R. 2000. **O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae): I. Listagens analíticas, II. Revisão taxonômica da seção *Hypoxanthus* (Rich.ex DC.) Hook.F.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. **Plant Systematics and Evolution** 211:

13-29.

Goldenberg, R. & Varassin, I.G. 2001. Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 24: 283-288.

Goldenberg, R., Penneys D. S., Almeda, F., Judd, W. S. & Michelangeli F. A. 2008. Phylogeny of *Miconia* (Melastomataceae): Patterns of stamen diversification in a megadiverse neotropical genus. **International Journal of Plant Science** 169(7): 963–979.

Grossniklaus, U. 2001. From Sexuality to Apomixis: Molecular and Genetic Approaches. Pp. 168-211. In: Y. Savidan, J.D. Carman, T. Dresselhaus (eds.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. El Batan: CIMMYT.

Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book Company, New York.

Johri, B.M., Ambegaokar, K.B. & Srivastava, P.S. 1992. **Comparative embryology of angiosperms**. Springer-Verlag, Berlin.

Kapil, R.N. & Tiwari, S.C. 1978. Plant embryological investigations and fluorescence microscopy: As assessment of integration. **International Review of Cytology** 53: 291-331.

Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryo formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell** 5: 1425-1437.

Koltunow, A.M. 1994. Apomixis – other pathways for reproductive development in angiosperms. In: **Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Koltunow, A.M., Johnson, S.D. & Bicknell, R.A. 1998. Sexual and apomictic development in *Hieracium*. **Sexual Plant Reproduction** 11: 213-230.
- Koltunow, A. M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review of Plant Biology** 54: 547-574.
- Lakshmanan, K.K. & Ambegaokar, K.B. 1984. Polyembryony. Pp. 445-474. In: B.M. Johri (ed.). **Embryology of Angiosperms**. Springer-Verlag, Berlin.
- Maheshwari, P. 1950. **An introduction to the embryology of angiosperms**. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Martin, F.N. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology** 34: 125-128.
- Mcdowell, E.M. & Trump, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 100: 405-414.
- Medeiros, J.D. & Morretes, B.L. 1996. The embryology of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). **Cytologia** 61: 83-91.
- Mendes-da-Glória, F.J., Mourão Filho, F.A.A.; Apezato-da-Glória. B. 2001. Morfologia de embriões nucelares de laranja 'valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Acta Botanica Brasilica** 15: 17-25.
- Mendes-Rodrigues, C., Carmo-Oliveira, R., Tavalera, S., Arista, M., Ortiz, P.L. & Oliveira, P.E. 2005. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae – Bombacoideae). **Plant Biology** 7: 433-450.
- Naumova, T.N. 1993. **Apomixis in angiosperms: nucellar and integumentary embryony**. CRC Press, Boca Raton.
- Naumova, T.N. 2008. Apomixis and amphimixis in flowering plants. **Cytology and Genetics** 42(3): 179-188.

- Naumova, T.N. & Vielle-Calzada, J.P. 2001. Ultrastructural Analysis of Apomictic Development. Pp. 44-63. In: Y. Savidan, J.D. Carman, T. Dresselhaus (eds.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. El Batan: CIMMYT.
- Nogler, G.A. 1971. Genetik der Aposporie bei *Ranunculus auricomus* s.l. W. Koch. I. Embryologie. **Berichte der Schweizer Botanischen Gesellschaft** 81: 139-79.
- Nogler, G.A. 1984. Gametophytic apomixis. Pp. 475-518. In: B.M. Johri (ed.). **Embryology of Angiosperms**. Springer-Verlag, Berlin.
- Oliveira, P.E., Gibbs, P.E., Barbosa, A.A. & Talavera, S. 1992. Constrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. **Plant Systematics and Evolution** 179:207-219.
- Ozias-Akins, P. 2006. Apomixis: Developmental characteristics and genetics. **Critical Reviews in Plant Sciences** 25: 199-214.
- Renner, S.S. 1984. Pollination and breeding systems in some central Amazonian Melastomataceae. **Les Colloques de INRA** 21: 275-280.
- Renner, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 76: 496-518.
- Romero, R. & Martins, A.B. 2002. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 25: 19-24.
- Salomão, A.N. & Allem, A.C. 2001. Polyembryony in angiosperms trees of the brazilian cerrado and caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica** 15: 369-378.
- Santos, M.L. 2003. **Florística e biologia reprodutiva de espécies de Melastomataceae no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas e Parque**

**Estadual dos Pirineus, Goiás.** Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília.

Sargent, E. 1900. Recent work on the results of fertilization in angiosperms. **Annals of Botany** 14: 689-712.

Souza-Silva, S.C.S. 2000. **Biologia reprodutiva e polinização em Melastomataceae no Parque do Sabiá, Uberlândia, MG.** Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.

Subramanyam, K. 1942. Gametogenesis and embryogeny in a few members of Melastomataceae. **Journal of the Indian Botanical Society** 21: 69–85.

Subramanyam, K. 1951. Embryology of *Oxyspora paniculata*. **Phytomorphology** 1:205-212.

Tobe, H. & Raven, P.H. 1983a. An embryological analysis of Myrtales, its definition and characteristics. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 70: 71-94.

Tobe, H.& Raven, P.H. 1983b. The embryology of *Axinandra zeylanica* (Myrtales) and the relationships of the genus. **Botanical Gazette** 144: 426-432.

Tobe, H.& Raven, P.H. 1983c. The embryology and relationships of Penaeaceae (Myrtales). **Plant Systematics and Evolution** 146:181-195.

Tobe, H. & Raven, P.H. 1984a. The embryology and relationships of Oliniaceae. **Plant Systematics and Evolution** 146: 105- 116.

Tobe, H. & Raven, P.H. 1984b. The embryology and relationships of *Alzatea* Ruíz and Pav. (Alzateaceae, Myrtales). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 71: 844-852.

- Tobe, H. & Raven, P.H. 1984c. The embryology and relationships of *Rhynchocalyx* Oliv. (Rhynchocalycaceae, Myrtales). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 71: 836-843.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1986. A Comparative Study of the Embryology of *Ludwigia* (Onagraceae): characteristics, variation, and relationships. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73(4) 768-787.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1987a. Embryology and systematic position of *Heteropyxis* (Myrtales). **American Journal of Botany** 74: 197-208.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1987b. The embryology and relationships of *Crypteronia* (Crypteroniaceae). **Botanical Gazette** 148: 96-102.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1987c. The embryology and relationships of *Dactylocladus* (Crypteroniaceae) and a discussion of the family. **Botanical Gazette** 148: 103-111.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1990. Embryology and systematic position of *Psiloxylon* (Myrtales). **Botanical Bulletin Academia Sinica** 31: 119-127.
- Tucker, M., Araujo, A., Paech, N., Hecht, V., Schmidt, E., Rossell, J., de Vries S. & Koltunow A. (2003) Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. **The Plant Cell** 15: 1524-1537.
- Tucker, M.R., Koltunow, A.M.G. 2009. Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. **Functional Plant Biology** 36: 490-504.
- Vielle, J.P., Burson, B.L., Bashaw, E.C., & Hussey, M.A. 1995. Early fertilization events in the sexual and aposporous egg apparatus of *Pennisetum ciliare* (L.). **Plant Journal** 8: 309-316.

- Wen, X.S., Ye, X.L., Li, Y.Q., Chen, Z.L. & Xu, S.X. 1998. Embryological studies on apomixis in *Pennisetum squamulatum*. **Acta Botanica Sinica** 40: 598-604.
- Whitton, J., Sears, C.J., Baack, E.J. & OTTO, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. **International Journal of Plant Science** 169(1): 169-182.
- Xue, C., Xi-Jin, M., Zhi-Qing, Z. & Zhi-Miing, H. 1997. Polyembryony and multiple seedlings in the apomictic plants. **Acta Botanica Sinica** 39: 590-595.
- Yao, J.L. Zhou, Y. & Hu, C.G. 2007. Apomixis in *Eulaliopsis binata*: characterization of reproductive mode and endosperm development. **Sexual Plant Reproduction** 20(3): 151-158.

**Tabela 1.** Dados embriológicos referentes ao óvulo, megasporogênese e megagametogênese. Comparação dos resultados obtidos para as espécies *Miconia fallax* e *M. pepericarpa* com resultados já descritos para outras espécies da família Melastomataceae e da ordem Myrtales.

	<i>M. fallax</i> <i>M. pepericarpa</i>	Melastomataceae	Myrtales
<b>Curvatura</b>	Anátropo	Anátropo <sup>1</sup>	Anátropo, campilótropo, hemi-campilótropo e hemítropo
<b>Natureza do nucelo</b>	Crassinucelado	Crassinucelado	Crassinucelado
<b>Número de tegumentos</b>	Dois	Dois	Comumente dois <sup>2</sup>
<b>Espessura do tegumento interno</b>	Duas camadas	Duas camadas	Duas camadas
<b>Vascularização dos tegumentos</b>	Ausente	Ausente	Comumente ausente <sup>3</sup>
<b>Formação da micrópila</b>	Ambos os tegumentos	Ambos os tegumentos	Comumente por ambos os tegumentos <sup>4</sup>
<b>Arquespório</b>	Unicelular	Unicelular	Comumente unicelular <sup>5</sup>
<b>Citocinese na meiose</b>	Ocorre	Ocorre	Comumente ocorre <sup>6</sup>

1) Óvulo campilótropo em *Memecylon* (Melastomataceae);

2) Óvulos unitegumentares em *Syzygium* (Myrtaceae);

3) Vascularização no único tegumento de *Syzygium* (Myrtaceae);

4) Micrópila formada somente pelo tegumento interno em *Alzatea* (Alzateaceae), *Darwinia* (Myrtaceae), *Guiera senegalensis* (Combretaceae), *Rhynchochalyx* (Penaeaceae) e em *Stenosiphon* (Onagraceae). Ausente em *Trapa* (Lythraceae);

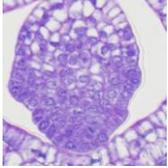
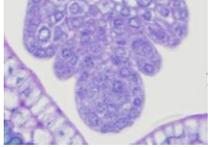
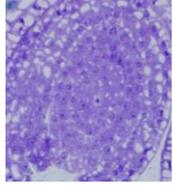
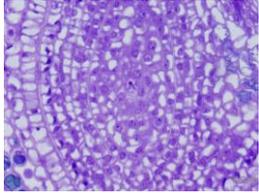
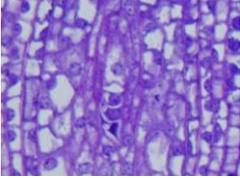
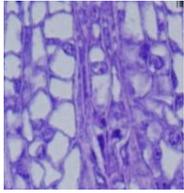
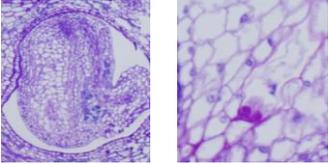
5) Arquespório multicelular em *Alzatea* (Alzateaceae), *Qualea* e *Callisthene* (Vochysiaceae), e *Rhynchochalyx* (Penaeaceae). Presente também em algumas espécies de Lythraceae, e *Ludwigia* (Onagraceae);

6) Não ocorre citocinese na meiose em *Penaea* (Penaeaceae);

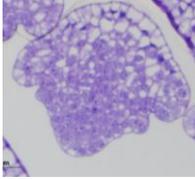
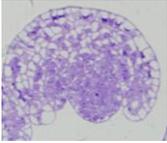
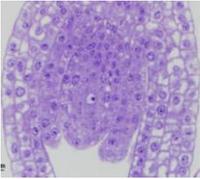
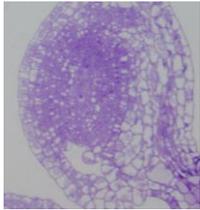
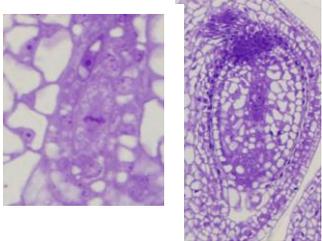
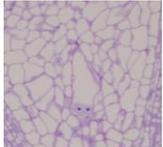
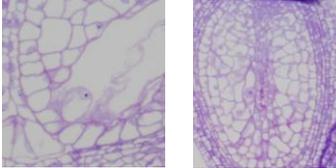
	<i>M. fallax</i> e <i>M. pepericarpa</i>	Melastomataceae	Myrtales
<b>Tétrade de megásporos</b>	Linear	Linear	Comumente linear <sup>7</sup>
<b>Megásporo funcional</b>	Calazal	Calazal	Comumente calazal <sup>8</sup>
<b>Padrão de formação do saco embrionário</b>	Tipo <i>Polygonum</i>	Tipo <i>Polygonum</i>	Comumente do tipo <i>Polygonum</i> <sup>9</sup>
<b>Antípodas</b>	Efêmeras	Efêmeras	Comumente efêmeras <sup>10</sup>
<b>Tipo de formação do endosperma</b>	Tipo nuclear	Tipo nuclear	Tipo nuclear
<b>Endosperma na semente madura</b>	Ausente	Ausente	Ausente

- 7) Tétrade de megásporos decussata em *Penaea* (Penaeaceae) e com formato de T em *Olinia* (Penaeaceae);
- 8) Megásporo micropilar funcional em espécies de Onagraceae e todos os núcleos dos megásporos funcionais em *Penaea* (Penaeaceae);
- 9) Formação do saco embrionário do tipo *Oenothera* (Onagraceae), do tipo *Penaea* em *Penaea* e *Saltera* (Penaeaceae) e do tipo *Allium* em *Heteropyxis* (Myrtaceae) e *Alzatea* (Alzateaceae);
- 10) Antípodas não efêmeras em *Guiera senegalensis* (Combretaceae) e ausentes em *Penaea* (Penaeaceae).

**Quadro 1.** Relação entre as fases dos botões florais, determinadas pelo comprimento dos mesmos em milímetros, e as características marcantes em cada estágio de desenvolvimento dos óvulos em *Miconia fallax*.

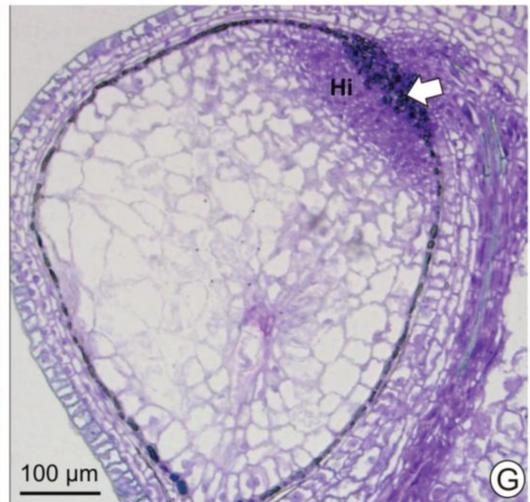
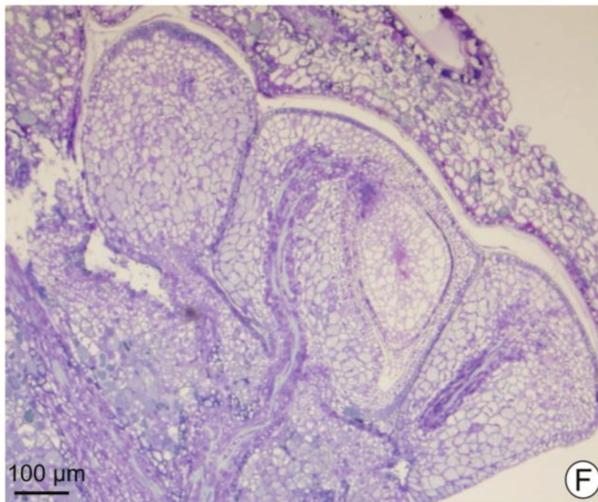
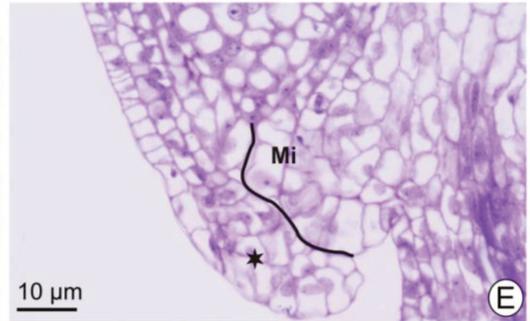
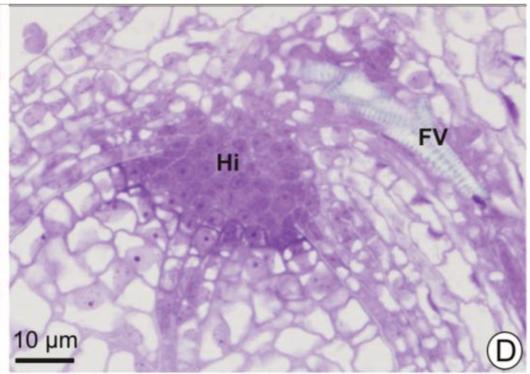
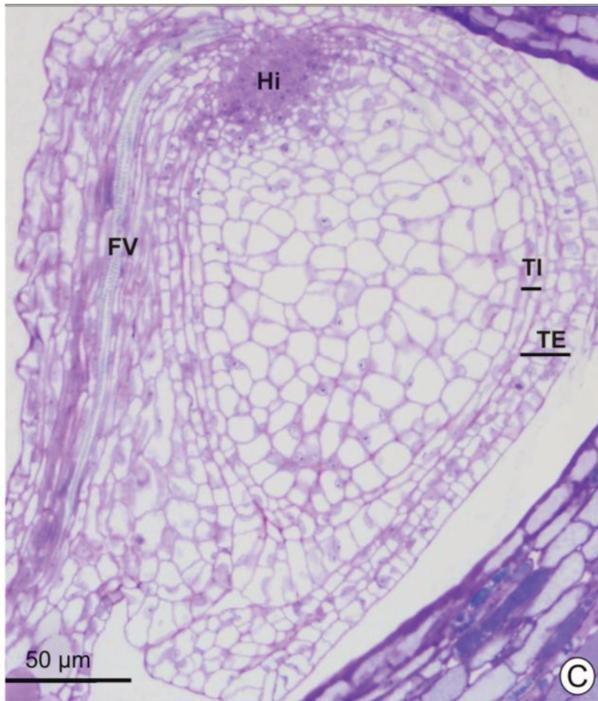
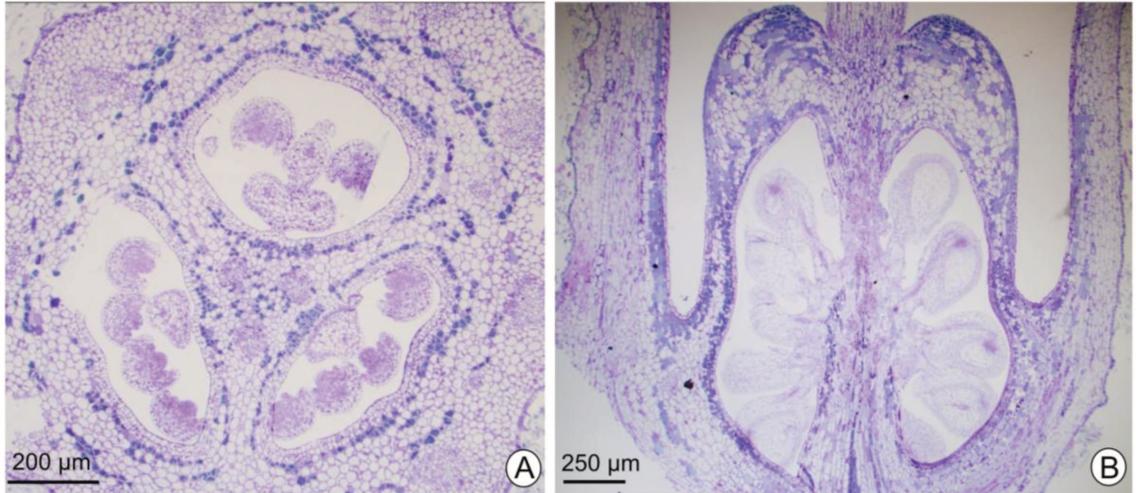
Fase dos botões	Características marcantes em cada estágio de desenvolvimento dos óvulos	
Botão 1: ≤ 0,5 mm	Tegumentos em início de desenvolvimento.	
Botão 2: 0,5 à 1,0 mm	Tegumentos em início de desenvolvimento. Célula arquesporial diferenciada.	
Botão 3: 1,0 à 1,5 mm	Tegumentos recobrem cerca de três quartos do nucelo. Célula-mãe de megásporos se diferenciando.	
Botão 4: 1,5 à 2,0 mm	Tegumentos totalmente desenvolvidos, formando a micrópila. Célula-mãe de megásporos diferenciada e em divisão meiótica.	
Botão 5: 2,0 à 3,0 mm	Célula-mãe de megásporos em meiose. Tétrades de megásporos.	
Pré-antese: 3,0 à 4,0 mm	Degeneração dos três megásporos micropilares. Saco embrionário nos estádios bi e tetranucleado.	
Flor aberta	Saco embrionário maduro.	

**Quadro 2.** Relação entre as fases dos botões florais, determinadas pelo comprimento dos mesmos em milímetros, e as características marcantes em cada estágio de desenvolvimento dos óvulos em *M. pepericarpa*.

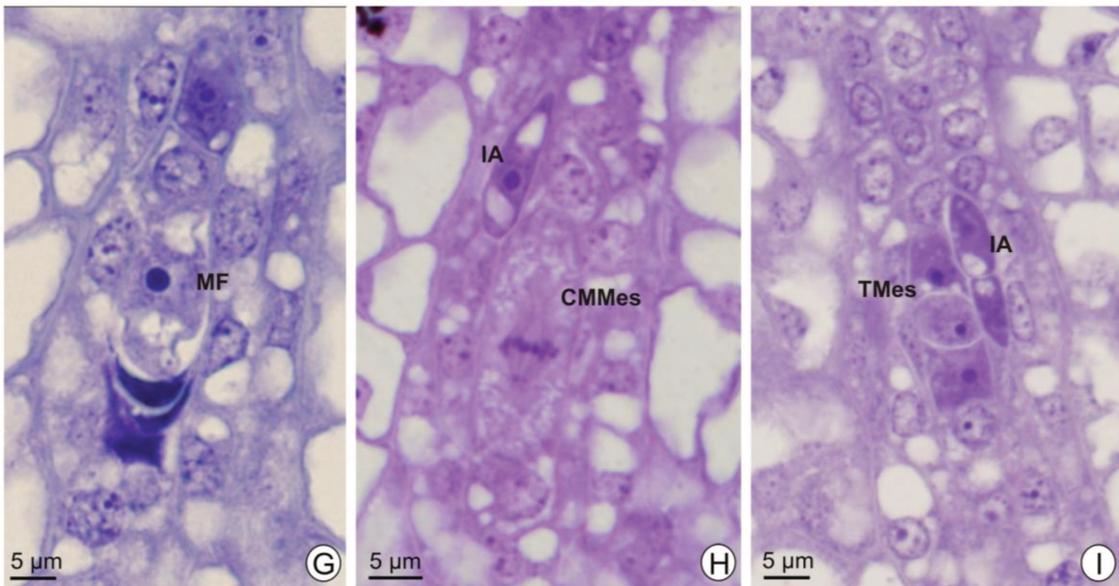
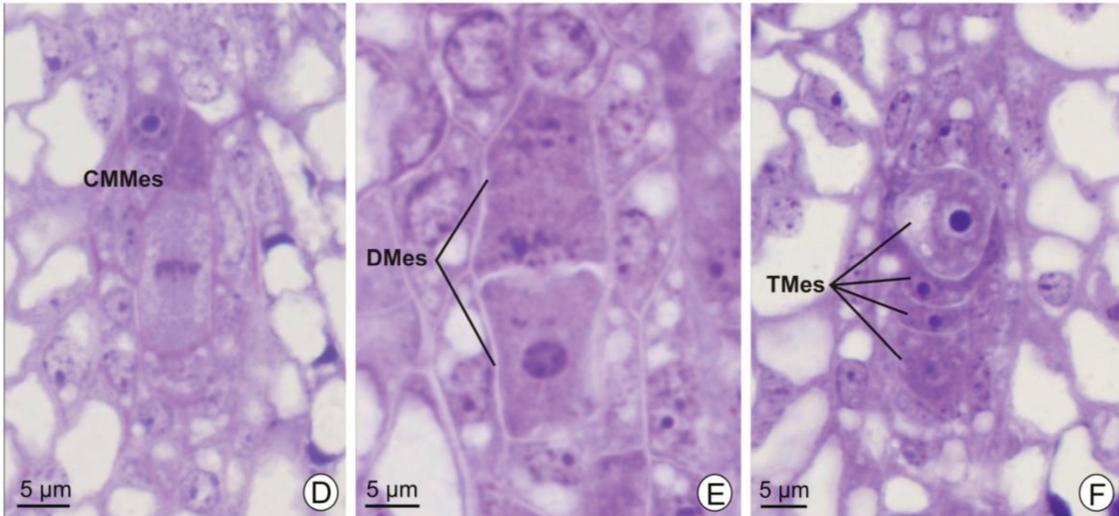
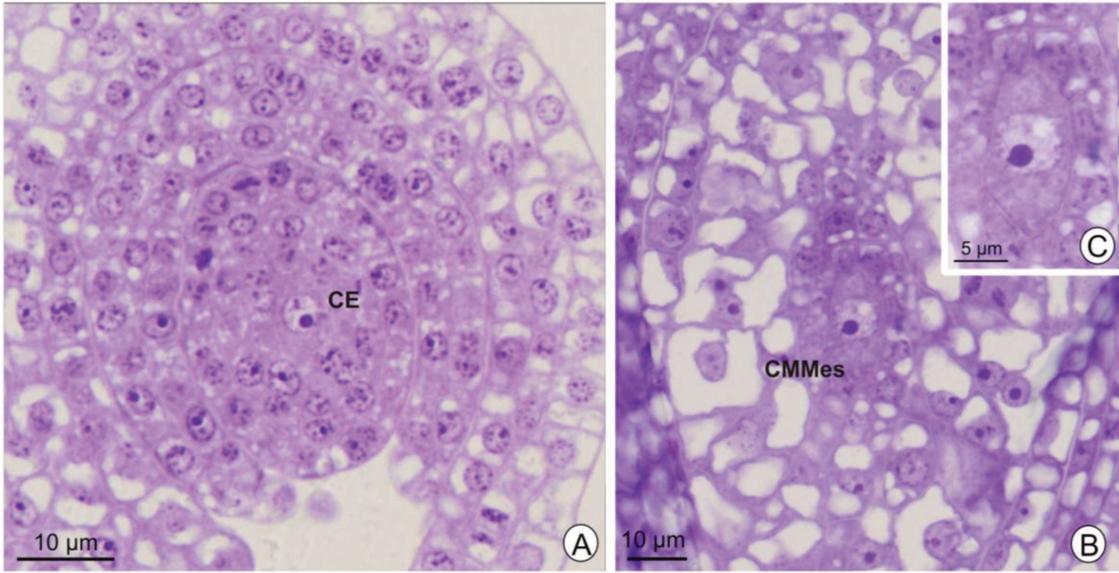
Fase dos botões	Características marcantes em cada estágio de desenvolvimento dos óvulos	
Botão 1: 1,0 à 2,0: mm	Tegumentos em início de desenvolvimento.	
Botão 2: 2,0 à 3,0 mm	Tegumentos cobrindo cerca da metade do nucelo. Célula esporogênica diferenciada	
Botão 3: 3,0 à 3,5 mm	Tegumentos já recobrem quase todo o nucelo. Célula-mãe de megásporos se diferenciando.	
Botão 4: 3,5 à 4,0 mm	Tegumento externo formando o exóstoma. Tegumento interno em final de desenvolvimento. Célula-mãe de megásporos diferenciada.	
Botão 5: 4,0 à 5,0 mm	Tegumentos formados: já recobriram o ápice do nucelo, formando a micrópila. Célula-mãe de megásporos em meiose, formando tétrades lineares de megásporos. Células iniciais apospóricas se diferenciam no nucelo.	
Pré-antese: 5,0 à 6,0 mm	Degeneração dos três megásporos micropilares. Saco embrionário nos estádios bi e tetranucleado. Diferenciação de células iniciais apospóricas. Desenvolvimento dos sacos embrionários apospóricos.	
Flor aberta	Presença de mais de um saco embrionário em diversos dos óvulos analisados. Saco embrionário sexuado maduro e apospóricos em desenvolvimento.	

# FIGURAS

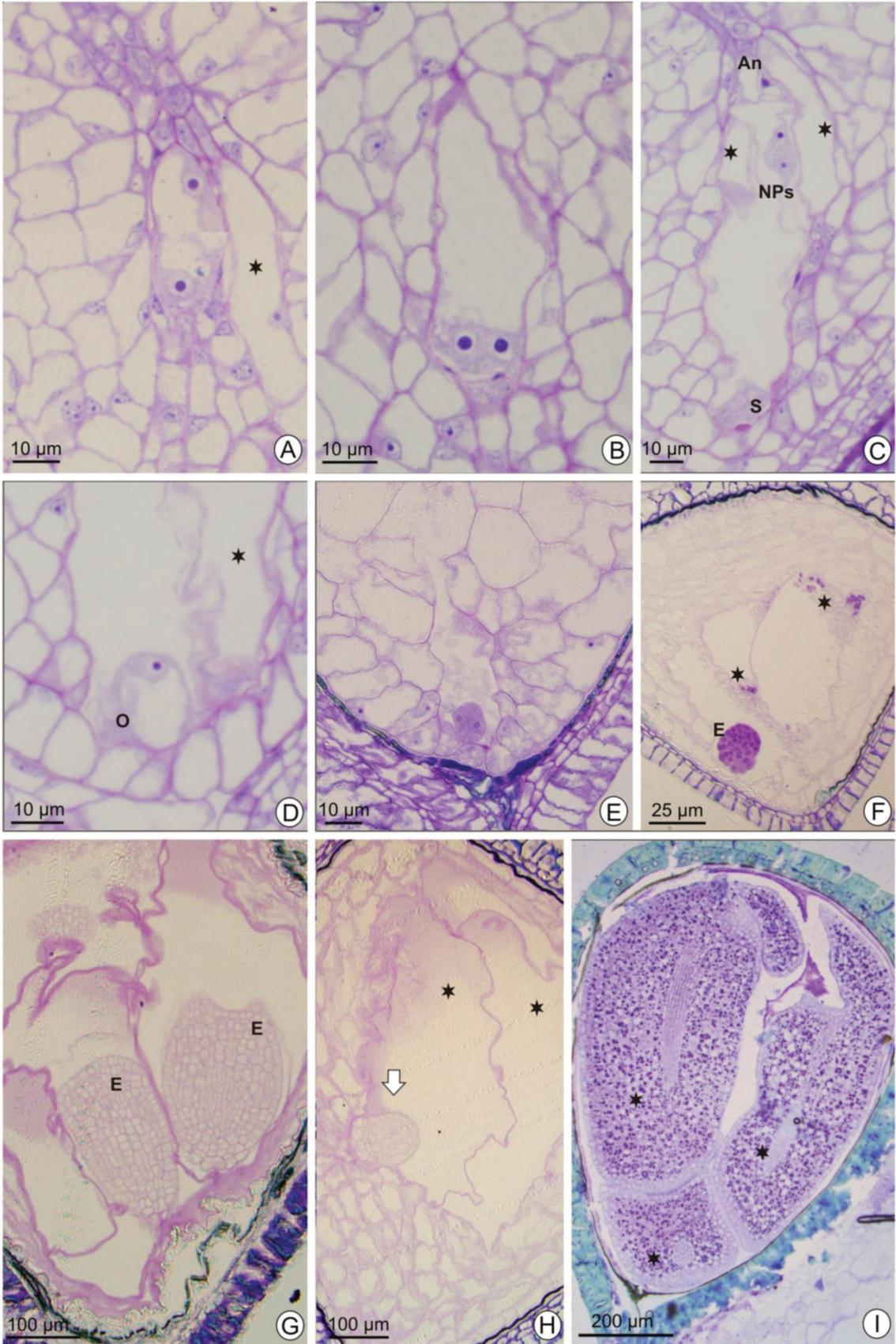
**Figura 1.** *Miconia fallax*. **A: Botão 1.** Corte transversal do ovário trilocular, com vários óvulos em início de desenvolvimento. **B-F: Botão em pré-antese.** **B:** Corte longitudinal do ovário, evidenciando os óvulos com placentação axial. **C:** Corte longitudinal do óvulo; é possível distinguir os dois tegumentos, a hipóstase e o feixe vascular. **D:** Detalhe da região calazal do óvulo. **E:** Detalhe da região micropilar do óvulo, formada por ambos os tegumentos; nesta região o tegumento externo é formado por mais de três camadas (★). **F:** Corte longitudinal de uma região do ovário, mostrando a inserção dos óvulos na placenta e a vascularização do óvulo. **G:** Corte transversal da semente em início de desenvolvimento, evidenciando o acúmulo de compostos fenólicos na região da hipóstase. FV: feixe vascular; Hi: hipóstase; Mi: micrópila; TE: tegumento externo; TI: tegumento interno.



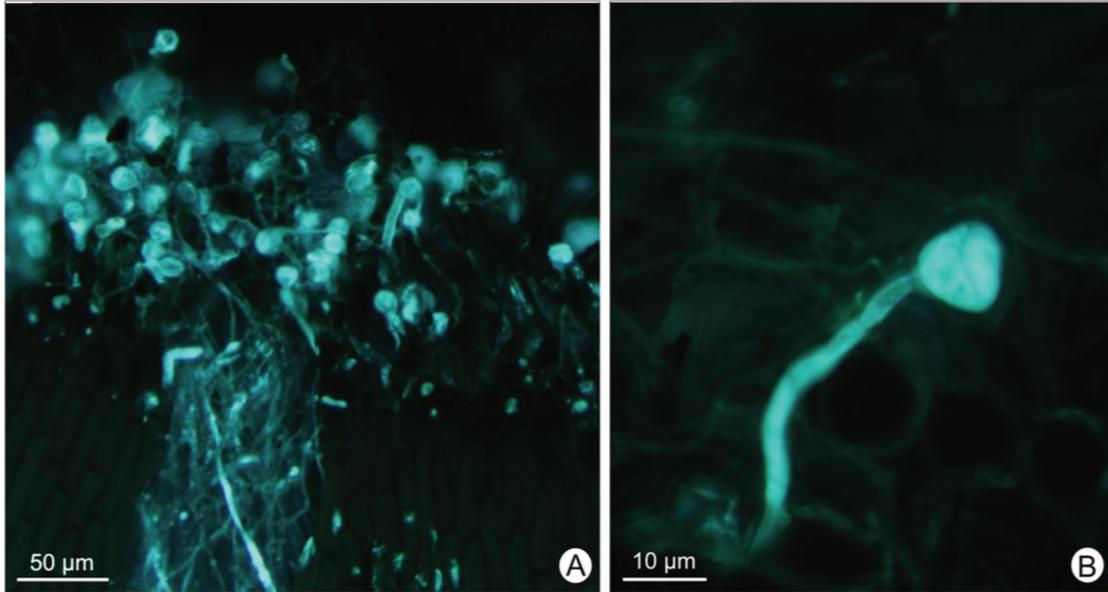
**Figura 2.** *Miconia fallax*. **A: Botão 2.** Célula esporogênica diferenciada entre as células nucelares. **B-C: Botão 3.** Célula-mãe de megásporos, maior e com citoplasma mais denso quando comparada as células nucelares. **C:** Detalhe da célula-mãe de megásporos da figura B. **D-I: Botão 4.** **D:** Célula-mãe de megásporos em metáfase I. **E:** Final da meiose I, com formação de uma díade de megásporos. **F:** Final da meiose II, com formação de uma tétrade linear de megásporos. **G:** Megásporo funcional calazal, com vacúolos nos dois pólos da célula e núcleo central, e os outros três megásporos em degeneração. **H:** Célula-mãe de megásporos acompanhada por uma célula inicial apospórica. **I:** Tétrade de megásporos associada a duas células iniciais apospóricas. CE: célula esporogênica; CMMes: célula-mãe de megásporos; DMes: díade de megásporos; IA: Inicial apospórica; MF: megásporo funcional; TMes: tétrade de megásporos.



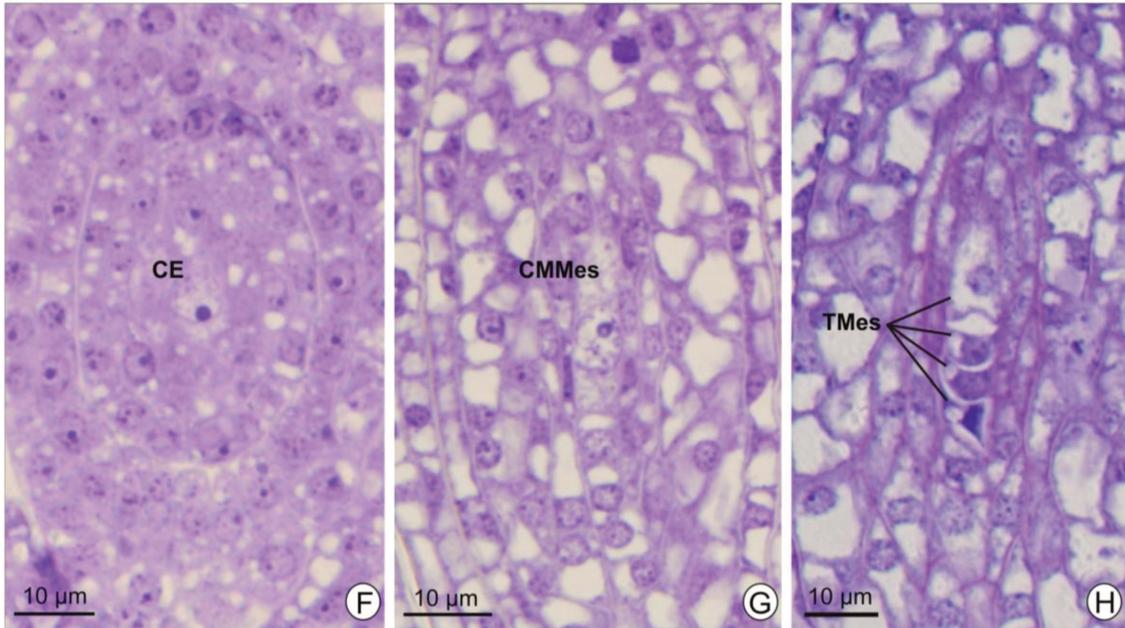
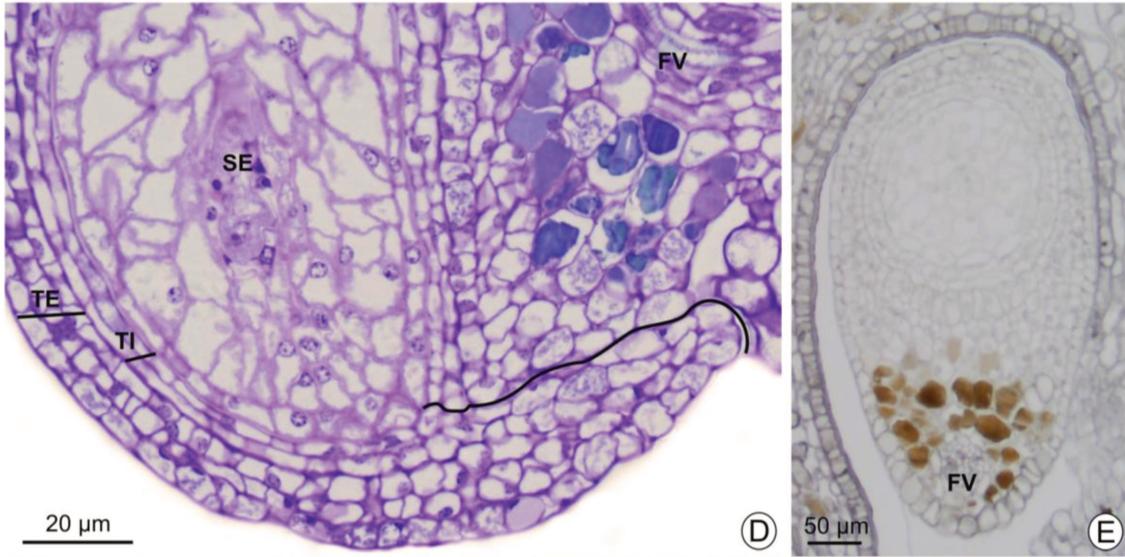
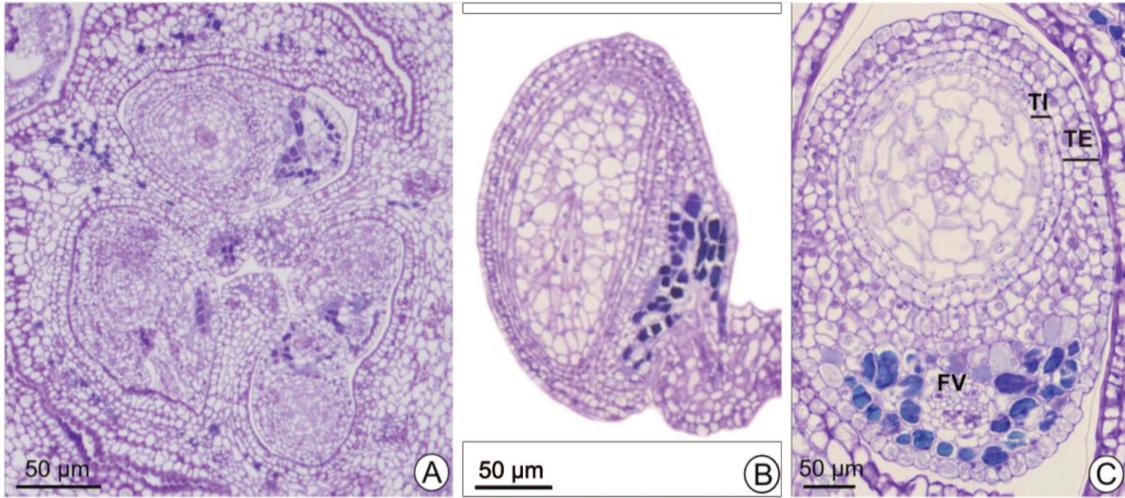
**Figura 3.** *Miconia fallax*. **A-B: Pré-antese.** Saco embrionário binucleado, associado a outro saco embrionário em desenvolvimento (★). **B:** Saco embrionário tetranucleado, na figura é possível visualizar os dois núcleos no pólo micropilar. **C-E: Flor aberta.** **C:** Saco embrionário maduro (central), associado a outros dois sacos embrionários em desenvolvimento (★). **D:** Detalhe da oosfera e saco embrionário adicional (★). **E:** Embrião em início de desenvolvimento. **F:** Corte transversal de uma semente em desenvolvimento. É possível observar três sacos embrionários, um com embrião e os outros dois com núcleos do endosperma (★). **G:** Corte longitudinal de uma semente poliembrionica, sendo possível visualizar dois embriões na região micropilar. **H:** Corte transversal da semente, com presença de dois sacos embrionários (★) e um embrião adventício crescendo do nucelo em direção a um dos sacos embrionários (seta). **I:** Corte longitudinal de uma semente madura com três embriões (★). An: antípodas; E: embrião; NPs: núcleos polares; O: oosfera; S: sinérgide.



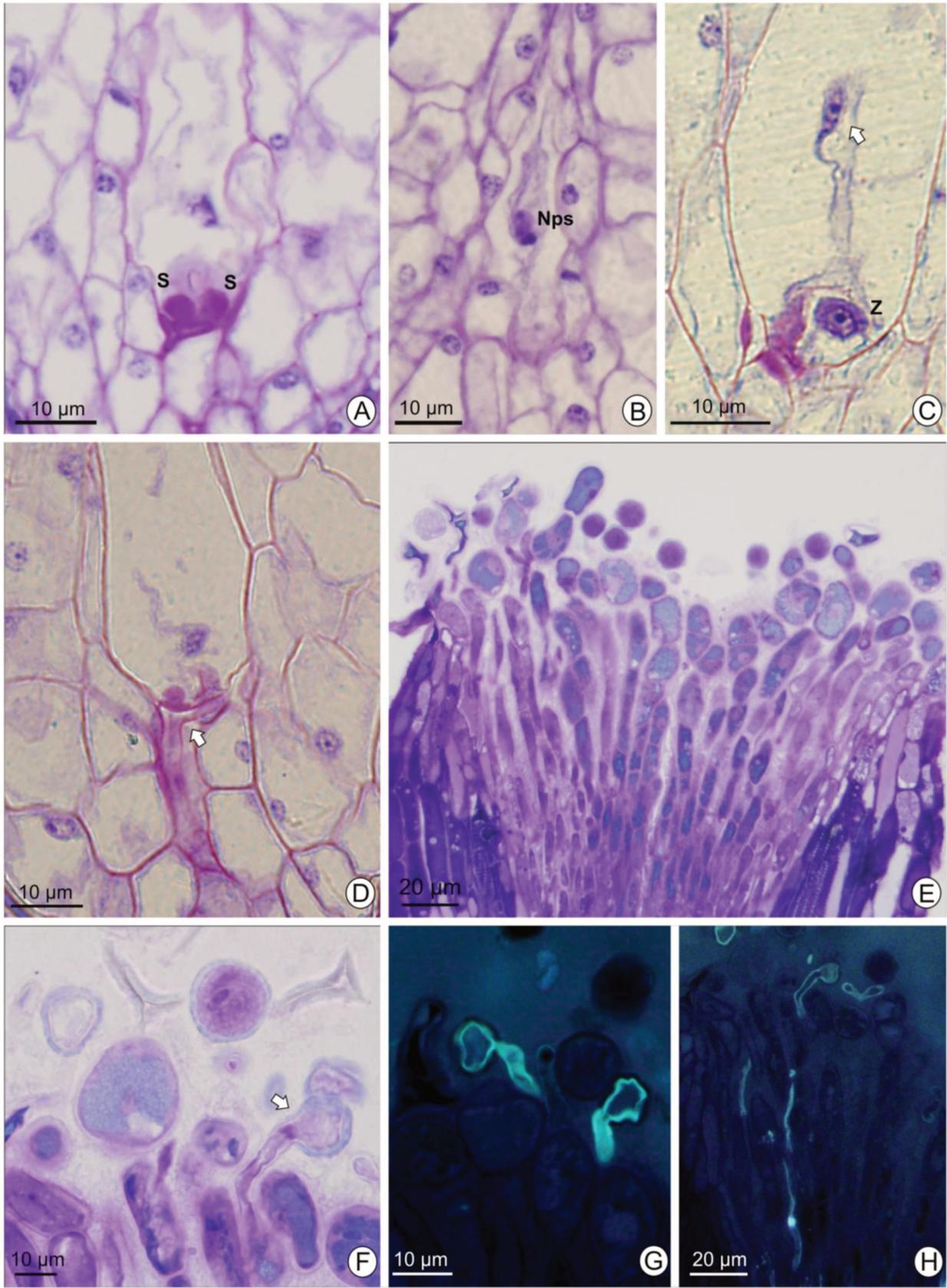
**Figura 4.** *Miconia fallax*. **A-B:** Reação com azul de anilina em microscópio de fluorescência, evidenciando os grãos de pólen germinando na superfície estigmática. **C-E:** Sementes com um, dois e quatro embriões germinando, respectivamente. Em D, a seta indica a germinação de uma plântula invertida, com cotilédone voltado para a região micropilar. Em E, as setas apontam para as raízes dos embriões. **F:** Plântula originada de semente com um embrião. **G:** Plântulas com tamanho semelhante, originadas de semente com dois embriões. **H:** Plântulas com tamanhos distintos, originada de semente com dois embriões. **I-J:** Plântulas com diferenças de tamanho e morfologia, originadas de sementes com três e quatro embriões, respectivamente.



**Figura 5.** *Miconia pepericarpa*. **A-D: Pré-antese.** **A:** Corte transversal do ovário trilobular, com um ou dois óvulos em cada lóculo. **B:** Corte longitudinal do óvulo. **C:** Corte transversal do óvulo. **D:** Detalhe da região micropilar do óvulo. **E:** Material obtido a partir da fixação em sulfato ferroso em formalina, evidenciando a presença de compostos fenólicos em células ao redor do feixe vascular. **F: Botão 3.** Célula esporogênica. **G: Botão 4.** Célula-mãe de megásporos. **H: Botão 5.** Tétrade de megásporos, com megásporo calazal funcional. CE: Célula esporogênica; CMMes: célula-mãe de megásporos; FV: feixe vascular; SE: saco embrionário; TE: tegumento externo; TI: tegumento interno; TMes: tétrade de megásporos.



**Figura 6.** *Miconia pepericarpa*. **A-D: Flor aberta.** **A:** Detalhe das sinérgides com aparato filiforme em evidência, corado em rosa. **B:** Núcleos polares da célula média. **C:** Zigoto e um dos núcleos do endosperma (seta). **D:** Tubo polínico chegando à região do saco embrionário e penetrando uma das sinérgides (seta). **E:** Superfície estigmática com grãos de pólen. **F:** Detalhe da germinação de um grão de pólen na superfície estigmática (seta). **G, H:** Reação com azul de anilina sob microscópio de fluorescência, evidenciando a germinação dos grãos de pólen no estigma e crescimento do tubo polínico no estilete (H). NPs: núcleos polares; S: sinérgide; Z: zigoto.



## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através do presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- *Miconia fallax* pode ser classificada como uma apomítica facultativa, já que preserva os mecanismos que possibilitam a reprodução sexuada, incluindo os processos de formação de grãos de pólen viáveis e o desenvolvimento de sacos embrionários sexuados, formados a partir de um megásporo reduzido.
- A espécie apomítica *M. fallax*, parece apresentar dois tipos diferentes de mecanismos de apomixia: a aposporia e a embrionia adventícia.
- A espécie apomítica *M. fallax* é poliplóide, o que acarreta uma menor proporção de grãos de pólen viáveis formados, em comparação com a espécie sexuada;
- A apomixia em *M. fallax*, além de estar relacionada à poliploidia, também está relacionada com a formação de sementes poliembriônicas.