



LIANA CARNEIRO CAPUCHO

**“DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE POLÍADES EM ESPÉCIES DE
MIMOSOIDEAE (LEGUMINOSAE)”**

***“MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF POLYADS IN MIMOSOIDEAE
SPECIES (LEGUMINOSAE)”***

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

LIANA CARNEIRO CAPUCHO

**“DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE POLÍADES EM ESPÉCIES DE
MIMOSOIDEAE (LEGUMINOSAE)”**

***“MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF POLYADS IN MIMOSOIDEAE SPECIES
(LEGUMINOSAE)”***

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutor em
BIOLOGIA VEGETAL.

*Thesis presented to the Biology Institute of
the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for the
degree of Doctor in PLANT BIOLOGY.*

Orientador/ Supervisor: SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL

TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LIANA CARNEIRO
CAPUCHO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C175d Capucho, Liana Carneiro, 1984-
Diversidade morfológica de políades em espécies de Mimosoideae
(Leguminosae) / Liana Carneiro Capucho. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Simone de Pádua Teixeira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Pólen. 2. Pólen - Desenvolvimento. 3. Pólen - Morfologia. 4. Pólen -
Origem. I. Teixeira, Simone de Pádua. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Morphological diversity of polyads in Mimosoideae species
(Leguminosae)

Palavras-chave em inglês:

Pollen
Pollen - Development
Pollen - Morphology
Pollen - Origin

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Simone de Pádua Teixeira [Orientador]
Alessandra Ike Coan
Ana Paula Fortuna Perez
Cláudia Inês da Silva
Juliana Lischka Sampaio Mayer

Data de defesa: 31-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 31 de janeiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira (orientadora)



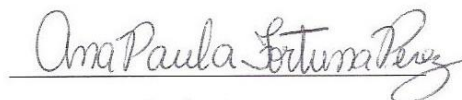
Assinatura

Profa. Dra. Alessandra Ike Coan



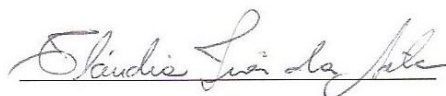
Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Fortuna Perez



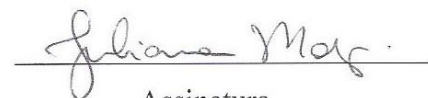
Assinatura

Profa. Dra. Cláudia Inês da Silva



Assinatura

Profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer



Assinatura

Prof. Dr. André Olmos Simões



Assinatura

Prof. Dr. Ary Gomes da Silva



Assinatura

Profa. Dra. Eliana Forni Martins



Assinatura

DEDICATÓRIA

*Ao meu amado pai, Jorge, por
me guarnecer de força e
perseverança todos os dias, e
ao pai dele, José (in
memoriam), amado avô.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Cosmos, por enviar anjos de luz em nosso auxílio, permitindo que conquistas como esta sejam possíveis.

À Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira pelos oito anos de orientação, profissional e pessoal, pela confiança e paciência dedicadas a mim desde o Mestrado.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP pela oportunidade. Em especial à secretária Maria Roseli de Melo, pela acessibilidade e solicitude.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP pela infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

Às professoras Ana Paula Fortuna, Alessandra Coan e Eliana Martins pelo carinho com que fizeram a avaliação prévia deste trabalho, contribuindo sobremaneira para o aprimoramento do mesmo.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite para a defesa desta tese, e aos suplentes pela leitura e disponibilidade.

Aos laboratórios de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP por disponibilizar os aparelhos.

Aos técnicos Edimárcio da Silva Campos (Laboratório de Botânica, FCFRP/USP), Maria Dolores Seabra Ferreira e José Augusto Maulin (FMRP/USP), Rodrigo Ferreira Silva (Departamento de Química, FFCLRP/USP), pelo auxílio nos processos laboratoriais.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente com as coletas de campo. Em especial: aos alunos e colegas de laboratório Giseli Pedersoli, Dra. Raquel Silva Costa, Dra. Cristina Ribeiro Marinho, João Paulo Basso Alves, e ao técnico Edimárcio da Silva Campos. Ao amigo Dr. Michael dos Santos Brito, ao Dr. Mike Hopkins (INPA), ao professor Vidal Mansano e aos alunos Rafael Barbosa Pinto e “Saíd” (Instituto de Pesquisas do JBRJ).

À Juliana Milani por me receber em sua casa durante a semana de qualificação em Campinas.

A todos os meus colegas de trabalho (Ana Paula, Camila, Cristina, Giseli, João Paulo, Juliana M., Juliana P., Marina, Priscila, Raquel, Thaís e Viviane) pela paciência e pelas discussões que contribuíram para iluminar as ideias. Em especial: a Ana Paula Caetano de Souza, pela leitura e discussões acerca do terceiro capítulo desta tese - ajuda valiosa!

À Dra. Juliana Villela Paulino, pelas horas e horas extras de sugestões em casa. À professora Dra. Priscila Andressa Cortez, por me guiar nos primeiros passos rumo à compreensão da poliembrião.

Agradeço muito especialmente ao professor Dr. Ettore Paciní (Department of Life Sciences, Università di Siena, Itália), pelo tempo dedicado a conhecer meu trabalho e a contribuir com o conhecimento de uma vida inteira dedicada ao estudo do pólen.

Agradeço também ao professor Dr. Luciano Paganucci de Queiroz (Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia) por me ajudar a compreender as mudanças nas relações filogenéticas em Mimosoideae.

Aos que viveram sob o mesmo teto que eu durante essa jornada, pela paciência e amizade: Juliana V. Paulino, Greice Lubini, Lidervan P. Melo e Aline Patrícia Viana. Muito obrigada!

À Andressa Uehara, Antônio Flávio, Michael Brito e Ronai Ramos pela amizade e companheirismo desde 2006.

Aos mestres que eu tive e que me conduziram até aqui, professores de graduação (ESFA - Santa Teresa, ES) e pós-graduação (USP, Ribeirão Preto, SP e UNICAMP, Campinas, SP), em especial ao professor Dr. Ary Gomes da Silva, o primeiro a aceitar o desafio de me orientar, com quem aprendi o método da pesquisa e a força de um trabalho bem feito.

Aos meus pais Jorge A. Capucho e Luziana G. Carneiro, e aos meus irmãos Helaine, Mariana e Rodrigo, pelo amor incondicional e por inspirarem sempre o melhor em mim. Amo muito vocês!

RESUMO

Dentre os diversos tipos de agrupamento polínico, encontrados em 42 famílias de angiospermas, as políades são de interesse especial, pois são registradas para apenas quatro destas famílias e sua ocorrência pode ser associada a uma redução no número de grãos de pólen por antera em uma espécie. Em Leguminosae, a maior em número de espécies e a mais amplamente distribuída dentre as quatro famílias com políades, essas estruturas ocorrem na subfamília Mimosoideae. Este trabalho apresenta dados sobre a origem, o desenvolvimento e a diversidade morfológica das políades, em nível estrutural e ultraestrutural (Capítulo 1); sobre a origem do adesivo polínico em *Calliandra brevipes*, substância encontrada tipicamente em políades de espécies do gênero; além de dados sobre a origem e desenvolvimento da políade nesta espécie (Capítulo 2, já publicado); a morfologia e fertilidade polínica em espécies poliembriônicas de *Inga* (Capítulo 3); e um estudo aprofundado da morfologia incomum das políades em *Parkia*, em nível estrutural e ultraestrutural (Capítulo 4). As políades são estruturas peculiares e ainda muito pouco estudadas, e o presente trabalho vem prover dados essenciais para a compreensão da origem e morfologia destas estruturas, e de sua funcionalidade na reprodução de espécies da subfamília Mimosoideae em Leguminosae. Para um entendimento mais completo acerca da função, valor adaptativo e seleção dessas estruturas, com ocorrência tão restrita a determinados grupos de plantas, estudos acerca da fisiologia do pólen, interação pólen-pistilo e de viabilidade de embriões formados após a fertilização dos óvulos, são requeridos.

Palavras-chave: grãos de pólen, agrupamento, desenvolvimento, origem, *Calliandra*, *Inga*, *Parkia*, *Senegalia*.

ABSTRACT

Among all different types of pollen aggregation, reported for 42 angiosperm families, polyads are of great interest, because they are reported for only four of these families and it is associated to a reduction on number of pollen grains per anther in a species. Among those four families, Leguminosae stands out because it is the most species-rich family and widely spread. In Leguminosae, polyads often occur in the subfamily Mimosoideae. This study highlighted new information on the origin, development and morphological diversity of the polyads, employing anatomic and ultrastructural analyses (Chapter 1); origin of pollen adhesive in *Calliandra brevipes*, sticky substance typically found in *Calliandra* polyads, in addition to data on polyad origin and development (Chapter 2, already published); polyad morphology and fertility in polyembryonic species of *Inga* (Chapter 3); and a meticulous analysis of the peculiar morphology of *Parkia* polyads (Chapter 4). Polyads are peculiar and still not well-known structures, and this study aims to contribute with essential data for its origin and morphology understanding, and its functionality in the reproduction of species comprised by subfamily Mimosoideae, in Leguminosae. For a more complete understanding on the function, adaptive value and selection of these structures, that are restricted to certain groups of plants, studies are required on the physiology of pollen, pollen-pistil interaction and viability of embryos formed after fertilization of the ovules.

Keywords: pollen grains, aggregation, development, origin, *Calliandra*, *Inga*, *Parkia*, *Senegalia*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO 1: Diversidade estrutural e ontogênica de políades em Mimosoideae.....	9
Resumo.....	9
Introdução	10
Material e Métodos	12
Resultados	15
Morfologia.....	15
Origem e algumas etapas da microsporogênese e microgametogênese	17
Citoquímica em políades maduras	17
Discussão.....	36
Referências bibliográficas	39
CAPÍTULO 2: Tapetal and parenchymatic anther tissues participate in polyad adhesive production in <i>Calliandra brevipes</i> (Leguminosae)	43
Abstract	43
Introduction	44
Material and Methods	46
Results	47
Discussion	55
Acknowledgments	57
References	57
CAPÍTULO 3: Desenvolvimento e fertilidade do pólen na políade de duas espécies de <i>Inga</i> Mill. com sementes poliembriônicas (Leguminosae, Mimosoideae).....	61
Resumo.....	61
Introdução	62
Material e Métodos	64
Resultados	66
Desenvolvimento dos grãos de pólen/políades	66
Fertilidade polínica.....	67

Referências bibliográficas	80
CAPÍTULO 4: Morfologia da políade cavitada de espécies Neotropicais de <i>Parkia</i> R. Br. (Leguminosae-Mimosoideae).....	83
Resumo.....	83
Material e Métodos	86
Resultados	87
Discussão.....	102
Referências bibliográficas	104
CONSIDERAÇÕES FINAIS	107

INTRODUÇÃO GERAL

As angiospermas produzem maior número de grãos de pólen do que de sementes, e as taxas de produção de sementes demonstram que a maioria dos grãos de pólen falha em sua principal função (Harder & Johnson 2008). Sendo assim, os baixos índices de sucesso impuseram forte seleção sexual e o agrupamento de grãos em unidades de dispersão é uma das adaptações adquiridas (Harder & Johnson 2008).

A liberação de grãos de pólen agrupados está frequentemente associada à menor razão pólen:óvulo (Cruden 1977, Cruden & Jensen 1979, Cruden 2000, Harder & Johnson 2008). Grãos de pólen agrupados, dispersos em unidades, promovem grande eficiência na fertilização de plantas compatíveis (Koptur 1984; Pennington 1997) e, além de reduzir o número de visitas necessárias para a remoção de todos os grãos da flor, pode também resultar numa forte competição local com indivíduos que produzem mais grãos que o necessário para fertilizar todos os óvulos disponíveis em uma flor (Harder & Johnson 2008). Neste caso, indivíduos que investirem mais em recursos reprodutivos para produção de óvulos e menos para produção de pólen contribuiriam com mais genes à prole, resultando na seleção para uma taxa mais baixa de pólen por óvulo (Harder & Johnson 2008).

Sabe-se que 42 famílias, com representantes para quase todos os grupos de angiospermas, apresentam alguma forma de agrupamento dos grãos de pólen para dispersão, o que tem sido relatado principalmente em espécies zoófilas. 34 dentre as 42 famílias também liberam mônades além de grãos agrupados. A análise mais parcimoniosa sugere que a evolução de pólen agrupado ocorreu independentemente entre as famílias em angiospermas e usualmente resultou em liberação de tétrades (Harder & Johnson 2008).

Existem várias formas de agrupamento de grãos de pólen, podendo ser estruturais, quando não há separação dos grãos de pólen durante sua produção, como é o caso das díades, encontradas em Ericaceae, Podostemaceae e Scheuchzeriaceae, tétrades - o tipo mais comum ocorrente em pelo menos 39 famílias, entre elas Orchidaceae, Leguminosae, Rubiaceae e Solanaceae, e políades, encontradas em Annonaceae, Celastraceae, Hydrocharitaceae e Leguminosae; e não-estruturais, quando os grãos

(mônades) são unidos por algum tipo de substância, geralmente “pollenkitt”, após seu desenvolvimento, como é o caso dos filamentos viscinais ou filamentos do pólen, encontrados em Ericaceae e Onagraceae, e das polínias, encontradas em Orchidaceae e Apocynaceae (Harder & Johnson 2008).

As políades são de interesse especial, pois sua ocorrência pode ser associada a uma redução no número de grãos de pólen por antera em uma espécie (Harder & Johnson 2008). Além disso, a dispersão de grãos de pólen em forma de políade evoluiu de forma independente pelo menos quatro vezes nas angiospermas, sendo um estado de caráter inovador, registrado para Annonaceae (Magnolídea), Celastraceae e Leguminosae (Eudicotiledônea) e Hydrocharitaceae (Monocotiledônea), ou seja, em apenas quatro famílias dentre as 42 que incluem espécies com algum tipo de agrupamento de grãos de pólen (Harder & Johnson 2008).

Leguminosae apresenta 751 gêneros e 19.500 espécies (Lewis 2013) que compõem de forma predominante quase todos os tipos de vegetação que ocorrem no mundo (Lewis *et al.* 2005), destacando-se dentre as quatro famílias, por ser a maior em número de espécies e a mais amplamente distribuída. No Brasil, são 210 gêneros, 2694 espécies, sendo 1458 endêmicas (Forzza *et al.* 2010). Em seguida, está Annonaceae com 128 gêneros e cerca de 2300 espécies, sendo 33 gêneros e cerca de 250 espécies ocorrentes no Brasil; depois Celastraceae com 55 gêneros e cerca de 855 espécies, dos quais 17 gêneros e cerca de 100 espécies ocorrem no Brasil; e por último Hydrocharitaceae, com representantes aquáticos, e a menor em número de espécies dentre as quatro famílias que apresentam políades, com 17 gêneros e cerca de 100 espécies, sendo sete gêneros e cerca de 10 espécies registradas para o Brasil (Souza & Lorenzi 2005, Judd *et al.* 2007).

Em Leguminosae, políades ocorrem na subfamília Mimosoideae, que apresenta quatro tribos e cerca de 3.270 espécies (Lewis *et al.* 2005). Informações gerais mostram que os representantes de Mimosoideae dispersam tétrades e políades constituídas de múltiplas tétrades, que surgem das divisões mitóticas das células esporogênicas, antecedendo o processo meiótico (Seijo & Neffa 2004, Harder & Johnson 2008). Porém, sabe-se que há variações no desenvolvimento que resultam em diversidades morfológica e quantitativa de políades, seja entre lóculos na antera, seja entre grãos por políade (Kenrick

& Knox 1979, Seijo & Neffa 2004). A ocorrência de mônades como unidades polínicas de dispersão em Mimosoideae é rara (Santos & Romão 2008).

Poucos trabalhos acerca deste tipo de dispersão polínica foram encontrados, e um número ainda mais reduzido aborda questões morfológicas, fisiológicas ou de desenvolvimento das políades. Foram encontrados apenas dois trabalhos de desenvolvimento para Annonaceae (Tsou & Fu 2007, Lora *et al.* 2009) e nenhum para Celastraceae e Hydrocharitaceae até o momento. Quanto à Leguminosae, características do pólen em gêneros de Mimosoideae têm sido elucidadas por alguns autores, sob diferentes abordagens. Com abordagem taxonômica, pode-se citar trabalhos com os gêneros *Acacia* (Arce & Banks 2001), *Calliandra* (Prenner & Teppner 2005, Santos & Romão 2008), *Mimosa* (Santos-Silva *et al.* 2013), *Parkia* (Feuer *et al.* 1985), *Piptadenia* (Caccavari 2002) e tribo Ingeae (Niezgoda *et al.* 1983). Este último trabalho trata da avaliação ultraestrutural da parede do pólen de todos os gêneros da tribo Ingeae, com exceção de *Wallaceodendron* (Niezgoda *et al.* 1983), definindo dois tipos de políades dentro da tribo, considerada de difícil delimitação taxonômica (Guinet 1989).

Constam na literatura estudos de desenvolvimento da políade para sete espécies de Mimosoideae (Kenrick & Knox 1979, Fitzgerald *et al.* 1993, Seijo & Neffa 2004, Teppner 2007). Este número baixo de trabalhos mostra o desconhecimento das etapas e dos mecanismos de formação das políades (tipo de microsporogênese – sucessiva ou simultânea; estágio e tempo da deposição da calose, tipo de composição das políades - várias tétrades ou díades; tipo de agregamento – estrutural ou não etc.), assim como dos processos morfo-fisiológicos, tanto em Leguminosae, quanto nas outras três famílias nas quais são relatados.

Sendo assim, o presente trabalho visou ao estudo morfológico detalhado das políades em oito espécies de Mimosoideae: *Calliandra brevipes* Benth. (Figura 1 A), *Inga edulis* Mart. (Figura 1 B), *I. laurina* (Sw.) Willd. (Figura 1 C) e *I. vera* Willd. (tribo Ingeae) (Figura 1 D), *Parkia multijuga* Benth. (Figura 1 E), *P. pendula* (Willd.) Benth. ex Walp. (Figura 1 F) e *P. ulei* (Harms) Kuhlm. (tribo Mimoseae), e *Senegalia polyphylla* (DC.) Britton & Rose in Britton & Killip. (tribo Acacieae) (Figura 1 G).

Estas espécies foram escolhidas com base na filogenia de Brown *et al.* (2008), a mais recente para Mimosoideae. Os gêneros escolhidos incluem um número elevado de espécies brasileiras endêmicas: 58 dentre 73 espécies em *Calliandra*, 52 de 127 em *Inga*, cinco de 17 em *Parkia*, e 33 de 52 em *Senegalia* (Forzza *et al.* 2013).

O trabalho foi, então, dividido em quatro capítulos, seguindo objetivos específicos:

❖ **Capítulo 1: Diversidade estrutural e ontogênica de políades em Mimosoideae (Leguminosae)** - Estudar a origem e algumas etapas da ontogenia das políades em *Inga edulis* Mart., *Calliandra brevipes* Benth., *Senegalia polyphylla* (DC.) Britton & Rose in Britton & Killip e *Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp., a fim de levantar estados de caracteres que possam contribuir para o estabelecimento de sinapomorfias no grupo. Evolução de caracteres ontogênicos também foi discutida;

❖ **Capítulo 2: Tapetal and parenchymatic anther tissues participate in polyad adhesive production in *Calliandra brevipes* (Leguminosae)** - Estudar o desenvolvimento das políades de *Calliandra brevipes* Benth. a fim de conhecer a origem da substância adesiva ('adesivo do pólen') encontrada em uma das extremidades da políade. Aspectos do desenvolvimento da parede da antera também foram estudados;

❖ **Capítulo 3: Desenvolvimento e fertilidade do pólen na políade de espécies de *Inga* Mill. com sementes poliembriônicas (Leguminosae, Mimosoideae)** – Verificar a viabilidade/funcionalidade das políades nas espécies poliembriônicas *Inga laurina* (Sw.) Willd. e *I. vera* Willd., por meio do estudo de seu desenvolvimento e sua fertilidade;

❖ **Capítulo 4: Morfologia da políade cavitada de espécies Neotropicais de *Parkia* R. Br. (Leguminosae, Mimosoideae)** – Estudar em detalhe a morfologia das políades pouco usuais de *Parkia multijuga* Benth., *P. ulei* (Harms) Kuhlmann e *P. pendula* (Willd.) Benth. ex Walp.



Figura 1. Fotografias de flores e inflorescências das espécies estudadas. A. *Calliandra brevipes*, B. *Inga edulis*, C. *Inga laurina*, D. *Inga vera*, E. *Parkia multijuga*, F. *Parkia pendula*, G. *Senegalia polyphylla*. Fotografias: Liana C. Capucho, exceto D, E, G (Web).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arce L. R., Banks H. 2001. A preliminary survey of pollen and other morphological characters in neotropical *Acacia* subgenus *Aculeiferum* (Leguminosae: Mimosoideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **135**: 263-270.
- Brown G. K., Murphy D. J., Miller J. T., Ladiges P. Y. 2008. *Acacia* s.s. and its relationship among tropical legumes, tribe Ingeae (Leguminosae: Mimosoideae). *Systematic Botany* **33**: 739- 751.
- Caccavari M. A. 2002. Pollen morphology and structure of Tropical and Subtropical genera of the *Piptadenia*-group (Leguminosae-Mimosoideae). *Grana* **41**: 130-141.
- Cruden R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* **31**: 32- 46.
- Cruden R. W. 2000. Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution* **222**: 143- 165.
- Cruden R. W., Jensen K. G. 1979. Viscin Threads, Pollination Efficiency and Low Pollen-Ovule Ratios. *American Journal of Botany* **66**: 875- 879.
- Feuer S. M., Niezgoda C. J., Nevling L. I. 1985. Ultrastructure of *Parkia* polyads (Mimosoideae:Leguminosae). *American Journal of Botany* **72**: 1871-1890.
- Fitzgerald M. A., Calder D. M., Knox R. B. 1993. Character states of development and initiation of cohesion between compound pollen grains of *Acacia paradoxa*. *Annals of Botany* **71**: 51- 59.
- Forzza R.C., Filardi F.L.R., Costa A., Carvalho Junior A.A., Peixoto A.L., Walter B.M.T., Bicudo C., Moura C.W.N., Zappi D., Costa D.P., Lleras E., Martinelli G., Lima H.C., Prado J., Stehmann J.R., Baumgratz J.F.A., Pirani J.R., Sylvestre L.S., Maia L.C., Lohmann L.G., Paganucci L., Alves M.V.S., Silveira M., Mamede M.M.H., Bastos M.N.C., Morim M.P., Barbosa M.R., Menezes M., Hopkins M., Secco R., Cavalcanti T. & Souza V.C., coords. 2013. Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. Andréa Jakobson Estúdio, Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2v.
- Guinet P. 1989. Pollen of *Obolonia zanonii* (Mimosaceae). *Brittonia* **41**: 173-174.
- Harder L. D., Johnson S. D. 2008. Function and evolution of aggregated pollen in angiosperms. *International Journal of Plant Science* **169**: 59- 78.
- Judd W. S., Campbell C. C., Kellog E. A., Stevens P. F., Donoghue M. J. 2007. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. 620p. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Kenrick J., Knox R. B. 1979. Pollen development and cytochemistry in some australian species of *acacia*. *Australian Journal of Botany* **27**: 413- 427.
- Koptur S. 1984. Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: breeding systems of neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). *Evolution* **38**: 1130- 1143.
- Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock M. 2005. *Legumes of the world*. The Royal Botanical Gardens, Kew.
- Lora J., Testillano P. S., Risueño M. C., Hormaza J. I. 2009. Pollen development in *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). Implications for the evolution of aggregated pollen. *BMC Plant Biology* **9**: 129.

- Niezgoda C. J., Feuer S. M., Nevling L. I. 1983. Pollen ultrastructure of the tribe Ingeae (Mimosoideae: Leguminosae). *American Journal of Botany* **70**: 650-667.
- Pennington T. D. 1997. *The Genus Inga Botany*. The Royal Botanic Gardens, Kew.
- Prenner, G., Teppner, H., 2005. Anther development, pollen presentation and pollen adhesive of parenchymatous origin in *Calliandra angustifolia* (Leguminosae – Mimosoideae – Ingeae). *Phyton* **45**: 267-286.
- Santos F. A. R., Romão C. O. 2008. Pollen morphology of some species of *Calliandra* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae) from Bahia, Brazil. *Grana* **47**: 101-116.
- Santos-Silva J., Simon M. F., Tozzi A. M. G. A. 2013. Pollen diversity and its phylogenetic implications in *Mimosa* ser. *Leiocarpae* Benth. (Leguminosae, Mimosoideae). *Grana* **52**: 15-25.
- Seijo J. G., Neffa V. G. S. 2004. The cytological origin of the polyads and their significance in the reproductive biology of *Mimosa bimucronata*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **144**: 343- 349.
- Souza V. C., Lorenzi H. 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. 640p. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Teppner H. 2007. Polyad development and karyology in *Inga* and *Calliandra* (Mimosaceae-Ingeae): a reply to a recent paper in Flora. *Phyton Annales Rei Botanicae* **47**: 1- 46.
- The Legume Phylogeny Working Group 2013. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* **62**: 217-248.
- Tsou C. H., Fu Y. L. 2007. Octad pollen formation in *Cymbopetalum* (Annonaceae): the binding mechanism. *Plant Systematic and Evolution* **263**: 13-23.

CAPÍTULO 1: Diversidade estrutural e ontogênica de políades em Mimosoideae

Resumo

Leguminosae é uma das quatro famílias que exibem representantes que dispersam grãos de pólen agrupados em políades (agrupamento de mais de quatro grãos de pólen) e, de acordo com o conhecimento atual, todos eles pertencentes à subfamília Mimosoideae. Sabe-se que a relação entre origem, forma e função de caracteres polínicos é informação básica para interpretações evolutivas. Este trabalho visou a comparar a estrutura, origem e algumas etapas do desenvolvimento de políades em quatro espécies de Mimosoideae: *Calliandra brevipes*, *Inga edulis*, *Parkia pendula* e *Senegalia polyphylla*. Para tal, foram feitas análises de superfície (microscopia eletrônica de varredura), de anatomia (microscopia de Luz), ultraestrutura (microscopia eletrônica de transmissão) e citoquímica das políades. Todas as espécies estudadas apresentaram lóculos subdivididos em sublóculos: dois em *I. edulis*, *C. brevipes* e *S. polyphylla*, e 10 em *P. pendula*, o que resulta em oito políades por antera nas três primeiras espécies, e 40 por antera na última. As políades são acalimadas em *I. edulis*, *S. polyphylla* e *P. pendula*, e calimadas em *C. brevipes*. As políades originam-se de apenas uma célula esporogênica inicial, que resulta em duas, quatro ou oito células-mãe de micrósporos, dependendo da espécie, resultando em diferentes números de grãos de pólen por políade. Os grãos de pólen nas políades apresentam carboidratos, proteínas e lipídeos como substâncias de reserva, havendo diferentes combinações nas espécies. Os resultados obtidos demonstram que a morfologia das políades neste grupo é bastante diversa, refletindo as variações encontradas em suas etapas de desenvolvimento. Algumas semelhanças encontradas entre as espécies, como número de sublóculos e de políades por antera, tipo de teto e ausência da camada basal da parede polínica em *I. edulis*, *C. brevipes* e *Senegalia polyphylla* corroboram com a filogenia atual para a subfamília e a distinção de *P. pendula* das demais indicam que provavelmente formam um grupo monofilético. A origem da políade, a partir de divisão mitótica de uma única célula esporogênica inicial, é comum a todo o grupo e pode constituir uma sinapomorfia, apoiando também a filogenia

atual para Mimosoideae. Comparações entre *S. polyphylla* e espécies de *Acacia* não apoiam a nova combinação realizada para a espécie, que antes pertencia à *Acacia*. Porém, estudos com o maior número possível de espécies da subfamília são requeridos para confirmação de tais inferências.

Introdução

O desenvolvimento do grão de pólen é um processo bem conhecido e pouco variável nas angiospermas (McCormick 1993). Trata-se de um tema de grande interesse por sua importância fundamental na reprodução das plantas, por promover interação única de gerações diplóide e haplóide, por ser um sistema modelo potencial para estudos de polaridade, padronização, sinalização e destino celular (McCormick 1993, Blackmore *et al.* 2007), além de prover informações de importância taxonômica e evolutiva (Muller 1979).

No processo de desenvolvimento de grãos de pólen, as células esporogênicas diferenciam-se em células-mãe de micrósporos que são isoladas por meio da deposição de uma fina camada de calose ao redor de suas paredes. Ao se dividir, cada célula-mãe de micrósporo origina uma tétrade, conjunto de quatro células-irmãs provenientes de meiose simultânea na maioria das plantas, que se mantêm unidas durante um curto espaço de tempo, envolvidas pela parede persistente da célula-mãe. Após, o tapete produz enzimas que dissolvem a calose e a parede da célula-mãe, liberando os micrósporos que se tornam independentes uns dos outros (Bedinger 1992, McCormick 1993, Lersten 2004). Os micrósporos passam por uma ou duas mitoses sucessivas e se diferenciam em grãos de pólen bi ou tri-nucleados, dispersos em mônades, unidades polínicas básicas e condição mais comumente encontrada nas angiospermas (Walker & Doyle 1975, Pacini & Franchi 1999).

Apesar disso, representantes de 42 famílias de angiospermas apresentam alguma forma de agrupamento dos grãos de pólen (Harder & Johnson 2008), condição considerada apomórfica (Walker & Doyle 1975, Harder & Johnson 2008), com surgimento independente nas angiospermas, principalmente em espécies zoófilas (Harder & Johnson 2008).

A eficiência da dispersão de grãos de pólen agrupados para a fertilização é grande (Koptur 1984, Pennington 1997). Este tipo de dispersão resulta em uma forte competição local entre indivíduos que produzem mais grãos de pólen que o necessário para fertilizar todos os óvulos disponíveis em uma flor, além de reduzir o número de visitas do agente polinizador, necessárias para a remoção de todos os grãos da flor. Ainda, espécies com grãos agrupados passam a investir mais recursos para produção de óvulos e menos para produção de pólen (Harder & Johnson 2008). Sendo assim, a liberação de grãos de pólen agrupados está frequentemente associada à menor razão pólen:óvulo por selecionar esta condição (Cruden 1977, Cruden & Jensen 1979, Cruden 2000, Harder & Johnson 2008).

As políades (agrupamento de mais de quatro grãos de pólen) são de interesse especial, pois ocorrem em apenas quatro das 42 famílias com agrupamento polínico: Annonaceae (Magnoliídea), Celastraceae e Leguminosae (Eudicotiledôneas) e Hydrocharitaceae (Monocotiledônea), sendo consideradas um estado de caráter inovador, associado a uma redução no número de grãos de pólen por antera em uma espécie (Harder & Johnson 2008). Dentre os quatro grupos, destaca-se Leguminosae, considerada a terceira maior família em número de espécies dentre as angiospermas, com 727 gêneros e 19.325 espécies descritas, que compõem de forma predominante quase todos os tipos de vegetação que ocorrem no mundo (Lewis *et al.* 2005). A ocorrência de políades nesta família está restrita a representantes da subfamília Mimosoideae, de acordo com o conhecimento atual (Doyle & Luckow 2003, Harder & Johnson 2008), que apresenta quatro tribos e 3270 espécies descritas (Lewis *et al.* 2005).

Dados sobre o desenvolvimento de políades foram encontrados apenas para Annonaceae (Tsou & Fu 2007, Lora *et al.* 2009) e Leguminosae (Fitzgerald *et al.* 1993, Kenrick & Knox 1979, Teppner 2007, Seijo & Neffa 2004; Capucho & Teixeira 2013); nesta última com informações para sete espécies de Mimosoideae: *Acacia paradoxa* DC. (Fitzgerald *et al.* 1993), *A. conferta* A. Cunn. ex Benth., *A. iteaphylla* F. Muell. ex Benth. e *A. subulata* Bonpl. (Kenrick & Knox 1979), *Calliandra angustifolia* Spruce ex. Benth. (Teppner 2007), *C. brevipes* Benth. (Capucho & Teixeira 2013) e *Mimosa bimucronata* (DC.) Kuntze (Seijo & Neffa 2004).

Estudos acumulados desde o início do século XX sobre estruturas florais e processos diretamente responsáveis pela produção de sementes revelam que existe enorme variação entre famílias e espécies. A sistematização destes dados é essencial para estudos taxonômicos e evolutivos (Johri 1984, Lersten 2004). Em geral, o gametófito masculino é ainda pouco estudado. Apenas 10% de aproximadamente 250.000 espécies de plantas têm sido investigadas acerca da morfologia do grão de pólen, sendo esta porcentagem ainda menor quando se consideram estudos anatômicos (Hesse *et al.* 2009).

Assim, este trabalho visa a estudar a origem e algumas etapas da ontogenia das políades em *Calliandra brevipes* Benth., *Inga edulis* Mart., *Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp. e *Senegalia polyphylla* (DC.) Britton & Rose in Britton & Killip, espécies de Mimosoideae selecionadas segundo a filogenia mais recente para Mimosoideae (ver Brown *et al.* 2008). A evolução de estados de caracteres ontogênicos das políades é discutida e aqueles que possam contribuir para o estabelecimento de sinapomorfias no grupo são ressaltados por meio da comparação dos dados aqui obtidos aos disponíveis na literatura para os mesmos gêneros (Prenner & Teppner 2005, Teppner 2007, Capucho & Teixeira 2013) e outros relacionados (Kenrick & Knox 1979, Fitzgerald *et al.* 1993, Seijo & Neffa 2004).

Material e Métodos

Espécies estudadas

Quatro espécies pertencentes à subfamília Mimosoideae foram escolhidas para este trabalho: (1) *Calliandra brevipes*, conhecida como esponjinha ou manduruvá, espécie arbustiva que chega a medir de um a dois metros de altura, muito utilizada para fins ornamentais (Lorenzi & Souza 1995); (2) *Inga edulis*, conhecida como Ingá, espécie arbórea amplamente distribuída na América do Sul, ocorrendo na Colômbia e região tropical a leste dos Andes, estendendo-se ao sul pela região noroeste da Argentina, e na costa Atlântica brasileira, sendo seu cultivo muito difundido nestas regiões e introduzido na América Central (Pennington 1997); (3) *Parkia pendula*, conhecida como fava de bolota,

espécie arbórea amplamente distribuída, ocorrendo em florestas de terra-firme de regiões de várzea de Honduras, do sul da América Central à Floresta Atlântica do Estado do Espírito Santo, no Brasil (Hopkins 1986); e (4) *Senegalia polyphylla*, conhecida como monjoleiro, espécie arbórea e pioneira que ocorre do México a Argentina (Queiroz 2009); no Brasil ocorre da região Amazônica até o Paraná, sendo frequente nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (Lorenzi 2002).

Calliandra brevipes, *I. edulis* e *S. polyphylla* são espécies polinizadas por insetos, principalmente abelhas. Apresentam flores típicas para a subfamília, sendo poliândricas, com filetes unidos na base, formando o tubo estaminal, e livres na porção exerta (Pennington 1997, Martius & Eichler 1840–1906, Lorenzi 2002). Já *P. pendula* é uma espécie quiopterófila, com flores dispostas em capítulos globosos de cor vermelha, que se apresentam pêndulos por um longo pedúnculo (cerca de 60 cm) (Hopkins 1984). *C. brevipes* também apresenta suas flores em capítulos, que são brevemente pedunculados (Martius & Eichler 1840 – 1906).

Material testemunha foi depositado no Herbário SPFR, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, sob os números S. P. Teixeira 77 (*C. brevipes*), S. P. Teixeira 53 (*I. edulis*), S. P. Teixeira 28 (*S. polyphylla*), e no herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob o número H. C. Lima 5693 (*P. pendula*).

Metodologia

Botões em vários estádios de desenvolvimento e flores das quatro espécies foram coletados, sendo as anteras removidas e fixadas em Karnovsky em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) por 24 horas (Karnovsky 1965) e em FAA 50 por 24 horas (Johansen 1940), submetidas à série etanólica e estocadas em álcool 70%.

A ornamentação da exina e a posição dos grãos de pólen nas políades e das políades nas anteras foram examinadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, anteras de flores previamente fixadas foram desidratadas em série etanólica, submetidas ao ponto crítico em um aparelho Bal Tec CPD 030, montadas em suportes metálicos em fita adesiva de carbono, perfuradas para a exposição das políades e, então,

cobertas com ouro em um metalizador Bal Tec SCD 050. As observações e as imagens foram feitas em microscópio eletrônico de varredura de alto vácuo Shimadzu SS – 550, e em microscópio eletrônico JEOL JSM 5200.

Estudos sobre a origem, as etapas de desenvolvimento, o contato das políades com o tapete e o tipo de substâncias de reserva polínica foram realizados em anteras em vários estádios de desenvolvimento, previamente fixadas, incluídas em historresina (Gerrits 1991) e seccionadas transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo com espessura de 3 μm . As lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,01% pH 4,4 (O'Brien *et al.* 1964), submetidas a testes com reagente de PAS para detecção de polissacarídeos (Feder & O'Brien 1968), xylidine de Ponceau para proteínas (O'Brien & McCully 1981) e sudan black B para lipídeos (Pearse 1980) e, então, observadas em microscópio de luz Leica DME.

A estratificação da parede do grão de pólen e a confirmação dos resultados obtidos para os testes citoquímicos foram obtidas em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para isso, parte do material fixado em Karnovsky (Karnovsky 1965) foi pós-fixada em tetróxido de ósmio a 1% (tampão fosfato 0,1M e pH 7,3) por 2 horas, desidratada gradualmente em série acetônica e incluída em resina epóxi Araldite 502 Polysciences. Após, as amostras foram seccionadas com auxílio de um ultramicrotomo Leica ultracut S Reichert para a obtenção de cortes semifinos (0,5 μm), que foram corados com azul de Toluidina 0,05% (O'Brien *et al.* 1964) e observados em microscopia de luz para a escolha das regiões onde serão realizados os cortes ultrafinos. Os cortes ultrafinos (60 a 70 nm) foram coletados em grade de malha fina, contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% por 15 minutos (Watson 1958) e citrato de chumbo por 15 minutos (Reynolds 1963) e observados em um microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208.

A terminologia utilizada na descrição dos resultados segue Hesse *et al.* (2009), Evert (2006) e Lersten (2004).

Resultados

Morfologia

As anteras das quatro espécies são dorsifixas, com duas tecas, quatro sacos polínicos com lóculos subdivididos (sublóculos), e deiscência longitudinal (Figura 1 A-D).

Em *C. brevipes*, *I. edulis* e *S. polyphylla* os lóculos são subdivididos em duas partes (dois sublóculos por saco polínico), cada uma contendo uma políade, o que resulta um total de quatro políades por teca, oito por antera (Figura 1 A-C). Já em *P. pendula* o número de sublóculos é maior, chegando a 10, cada um contendo uma políade, totalizando 20 políades por teca, 40 por antera (Figura 1 D).

As políades de *I. edulis* e *S. polyphylla* são circulares, achatadas e acalimadas, com grãos de pólen quadrangulares (Figura 2 A-D). Porém, diferem no número de grãos de pólen e tipo de ornamentação da exina. Em *I. edulis* as políades apresentam 32 grãos de pólen, sendo os centrais com ornamentação da exina entre fossulada e psilada, tornando-se mais lisa nas laterais, região de contato entre os grãos de pólen na políade. Os grãos de pólen periféricos apresentam ornamentação levemente distinta dos grãos centrais, com aspecto mais liso, com ornamentação do tipo psilada (Figura 2 E, G). Já *S. polyphylla* apresenta 16 grãos de pólen por políade, com ornamentação psilada (Figura 2 F). Os grãos estão dispostos em oito centrais e oito periféricos na políade, sendo que os oito centrais formam uma camada dupla que, quando vista frontalmente, permite distinguir apenas quatro grãos centrais (Figura 2 H).

A ornamentação da exina em *C. brevipes* é do tipo fossulada (Figura 3 A). Suas políades são elipsoidais, em forma de gota e achatadas, apresentando um grão de pólen de formato pontiagudo na extremidade da políade, onde é depositada uma substância adesiva (Figura 3 C). Políades com oito grãos de pólen e apenas um central também podem ser encontradas (Figura 3 C); porém, geralmente apresentam dois grãos centrais, envoltos por seis grãos heteromórficos periféricos (Figura 3 E), constituindo o tipo calimado (Figura 3 F). Em *P. pendula*, as políades também apresentam ornamentação fossulada (Figura 3 B); no entanto são globosas (esféricas) (Figura 3 D) e acalimadas (Figura 3 G), com 32 grãos

de pólen periféricos, delimitando um espaço interno amplo e circular preenchido por exudato (Figura 3 G).

Todas as camadas da parede do grão de pólen apresentam espessura semelhante entre si em *S. polyphylla*, sendo o teto contínuo e o infrateto granular (Figura 4 A). A parede dos grãos na região interna da políade (região de contato entre os grãos de pólen) apresenta como última camada a endexina, contínua e esponjosa, sendo a camada basal (*footlayer*) ausente (Figura 4 B). Em *I. edulis* a intina e a endexina são contínuas e compactas, além de mais finas em relação à espessura do infrateto columelar, estruturado sob um teto relativamente descontínuo (Figura 4 C). A parede dos grãos na região interna da políade apresenta, além da endexina, vestígios do infrateto (Figura 4 D). A camada basal é ausente nesta espécie.

A intina apresenta espessura semelhante à da endexina em *P. pendula*, que é contínua e compacta; a camada basal é presente e mais fina que o infrateto granular sob o teto descontínuo e espesso (Figura 5 A). A parede dos grãos de pólen na região interna da políade apresenta endexina e apenas vestígios da camada basal e infrateto (Figura 5 B). Em *C. brevipes* a intina é consideravelmente mais espessa que a endexina, contínua e compacta; o infrateto é columelar, de espessura semelhante à da intina, e o teto contínuo e menos espesso que o infrateto; a camada basal é ausente (Figura 5 C). Todas as camadas presentes na parede dos grãos na região externa da políade são encontradas nas paredes dos grãos na região interna (Figura 5 D).

As políades de *C. brevipes*, *I. edulis* e *S. polyphylla* são achatadas, formando uma ou duas camadas de grãos de pólen, contatando as células do tapete (Figura 6 A-C). Em *P. pendula* as políades são globosas (esféricas), porém devido ao espaço interno amplo, todos os grãos de pólen contatam as células do tapete (Figura 6 D).

Os grãos de pólen de *C. brevipes* (Figura 6 C), *I. edulis* (Figuras 2 C, 6 A) e *S. polyphylla* (Figura 13 B) apresentam 4-5 poros nas regiões de junção de um grão e outro. Já *P. pendula* apresenta três poros, sendo um deles voltado para a região interna da políade (Figura 7 A-B).

Origem e algumas etapas da microsporogênese e microgametogênese

Uma célula esporogênica inicial passa por divisões mitóticas e suas células-filhas diferenciam-se em duas células-mãe de micrósporo em *C. brevipes* (Figura 8), oito em *I. edulis* (Figura 9) e *P. pendula* (Figura 10), quatro em *S. polyphylla* (Figura 11). Durante este processo, a célula esporogênica inicial ocupa todo o espaço do sublóculo e as células do tapete mantêm-se uninucleadas.

Em *P. pendula* ocorre deposição de calose em regiões periféricas das células esporogênicas, onde não há contato entre as células (Figuras 10 D) e, posteriormente, também nas regiões de contato entre os grãos (Figura 10 F). O desenvolvimento dos lóculos e sublóculos é assincrônico. À medida que o diâmetro sublocular aumenta, as células-mãe de micrósporos se organizam em círculo e contatam as células do tapete. Em *S. polyphylla* observa-se que no estágio de vacuolação avançada dos micrósporos e no estágio bicelular dos grãos de pólen, as células do tapete se encontram em degeneração ou completamente degeneradas, e muitos orbículos são observados no sublóculo da antera, constituindo a membrana tapetal (Figura 12). Não foi possível observar este estágio nas outras espécies estudadas.

A Tabela 1 compara as características morfológicas e ontogenéticas descritas para as políades das quatro espécies estudadas.

Citoquímica em políades maduras

Lipídeos foram detectados na esporoderme dos grãos de pólen em todas as espécies, sendo que em *C. brevipes* também foram detectadas proteínas (Tabela 2).

Quanto às substâncias de reserva contidas no citoplasma da célula vegetativa dos grãos de pólen, diferentes combinações foram encontradas. *C. brevipes* apresentou proteínas e polissacarídeos, *I. edulis* apresentou lipídeos e polissacarídeos em pouca quantidade, *S. polyphylla* apenas proteínas e *P. pendula* proteínas e lipídeos (Tabela 2).

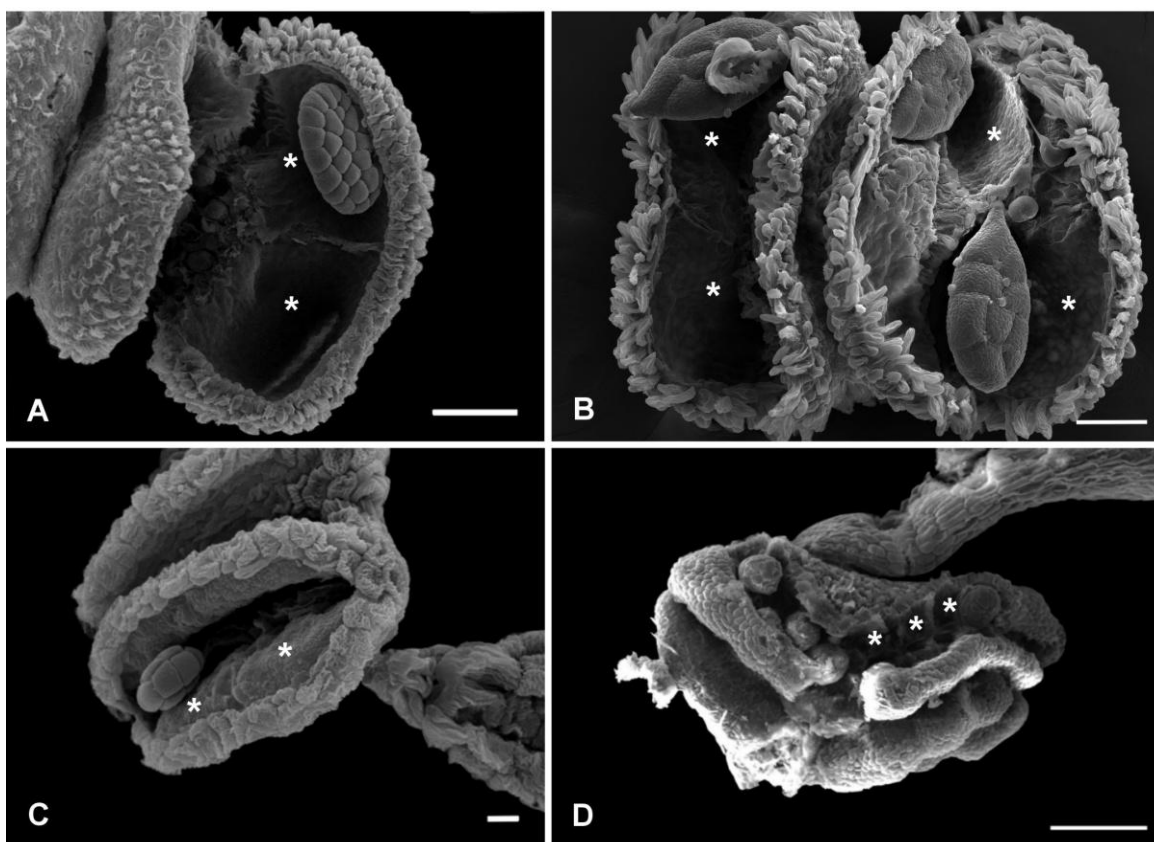


Figura 1. Eletromicrografias (MEV) de anteras mostrando a deiscência longitudinal e o número de sublóculos (*) em *Inga edulis* (A); *Calliandra brevipes* (B); *Senegalia polyphylla* (C); e *Parkia pendula* (D). Escalas: A = 100 μ m, B = 50 μ m, C = 10 μ m, D = 200 μ m.

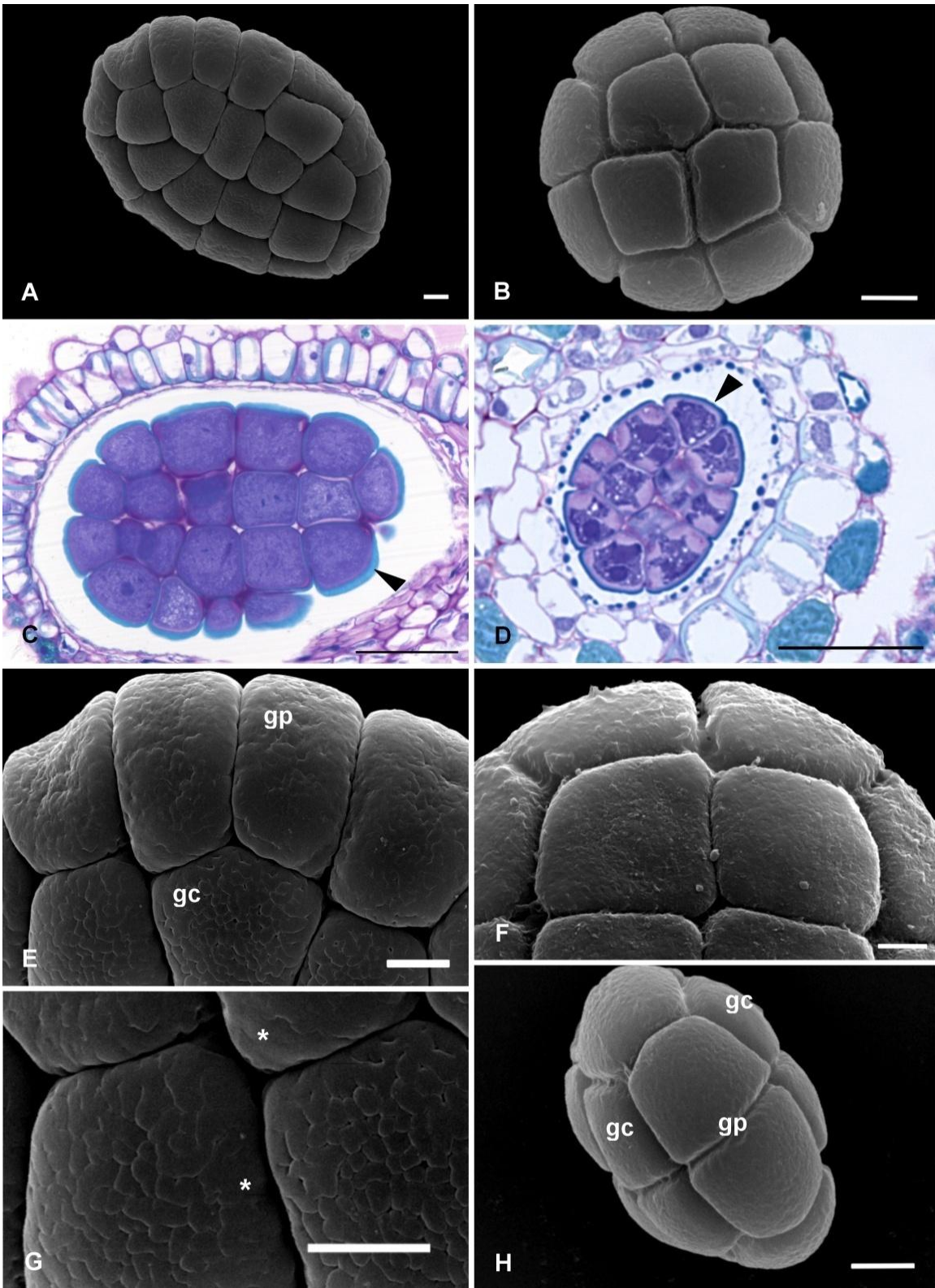


Figura 2. Morfologia externa e interna de políades de *Inga edulis* (A, C, E, G) e *Senegalia polyphylla* (B, D, F, H). A, B, E-H: Eletromicrografias (MEV); C, D: Fotomicrografias de cortes longitudinais. A-B. Vista geral das políades de *I. edulis* e *S. polyphylla*, respectivamente; C-D. Políades acalimadas de *I. edulis* e *S. polyphylla*. Note a presença de ectexina apenas na superfície externa dos grãos de pólen periféricos da políade nas duas espécies (cabeças-de-seta), e produção de orbículos no sublóculo em D. E. Detalhe da políade de *I. edulis* destacando a diferença na ornamentação psilada (gp) dos grãos de pólen periféricos em relação à ornamentação fossulada (gc) dos grãos centrais. F. Detalhe da políade de *S. polyphylla* destacando a ornamentação psilada da exina. G. Detalhe dos grãos de pólen centrais da políade de *I. edulis*. Note que a ornamentação da exina se torna psilada na região periférica do grão (*). H. Vista lateral da políade de *S. polyphylla* mostrando os grãos de pólen periféricos (gp) e a organização dos grãos de pólen centrais em duas camadas (gc). Escalas: A,E,G = 10 µm; B,H = 5 µm; C = 50 µm; D = 20 µm; F = 2 µm.

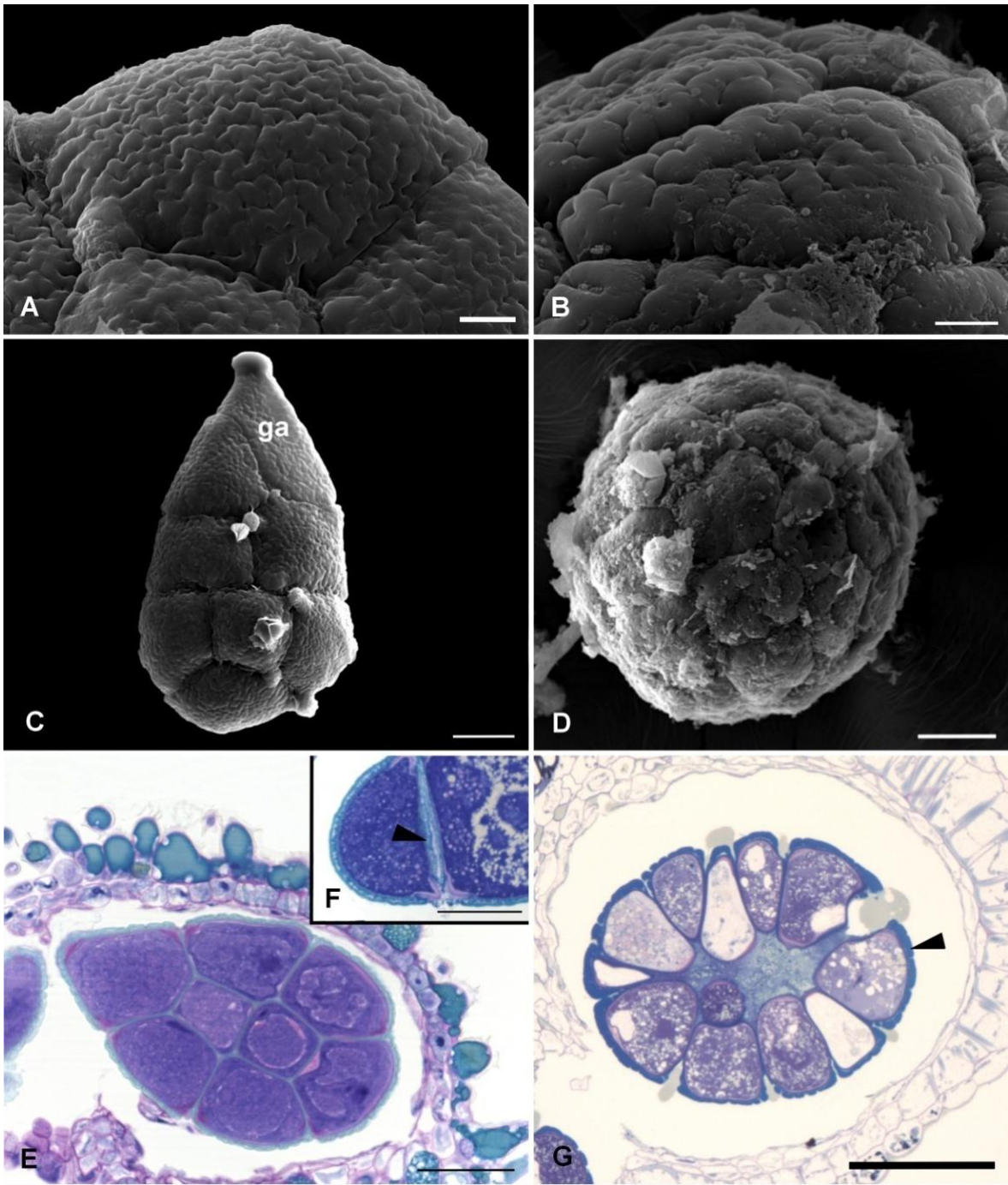


Figura 3. Morfologia externa e interna de políades de *Calliandra brevipes* (A, C, E, F) e *Parkia pendula* (B, D, G). A-D: Eletromicrografias (MEV) das políades; E-G: Fotomicrografias das políades em seções transversal e longitudinal. A-B. Detalhe das políades evidenciando a ornamentação fossulada da exina; C. Políade de *C. brevipes* em forma de gota com oito grãos de pólen, apenas um central. Note a heteromorfia dos grãos e o formato distinto do grão apical (ga) onde é depositada a substância adesiva; D. Políade de *P. pendula* com formato globoso (esférico); E. Vista lateral da políade calimada de *C. brevipes* com seis grãos de pólen periféricos e dois centrais; F. Detalhe da políade de *C. brevipes* em corte transversal destacando a presença de ectexina também na parede interna do grão de pólen da políade, na região de contato entre os grãos(cabeça-de-seta); G. Seção transversal da políade acalimada de *P. pendula*. Note a presença de ectexina apenas na parede externa dos grãos de pólen (cabeça-de-seta). Escalas: A,B = 5 µm; C,D,F = 20 µm; E,G = 50 µm.

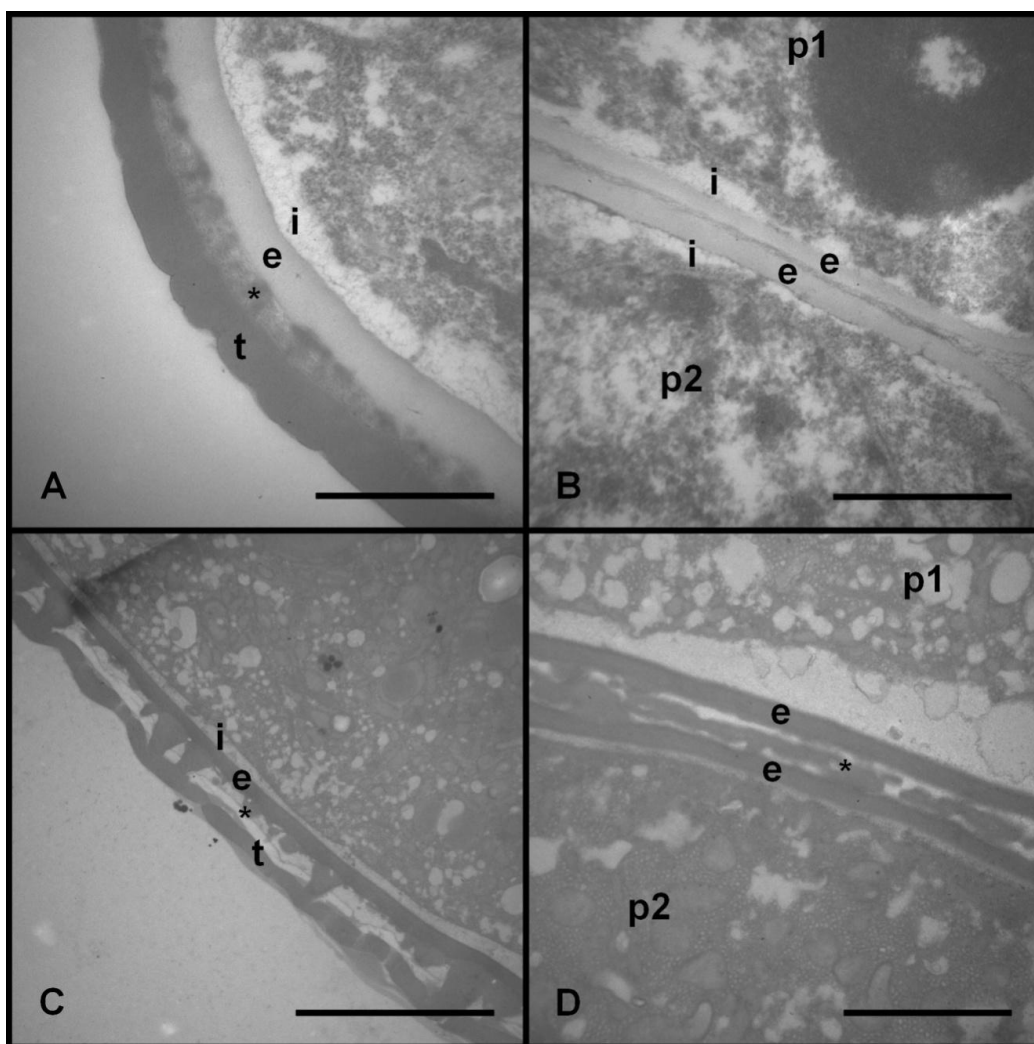


Figura 4. Eletromicrografias (MET) de políades de *Senegalia polyphylla* (A, B) e *Inga edulis* (C, D). A. Parede de um grão de pólen, região externa da políade, de *S. polyphylla*, apresentando intina (i), endexina (e) contínua e esponjosa, infrateto granular (*) e teto contínuo (t) de espessuras semelhantes. A camada basal (“footlayer”) é ausente; B. Paredes de dois grãos de pólen (p1 e p2) na região interna de uma políade em *S. polyphylla*, apresentando intina (i) e endexina (e) como última camada; C. Parede de um grão de pólen na região externa da políade de *I. edulis* apresentando intina (i) e endexina (e) contínua e compacta de espessuras finas em relação ao infrateto columelar (*), que é mais espesso que o teto (t) descontínuo. A camada basal é ausente; D. Paredes de dois grãos de pólen (p1 e p2) na região interna da políade em *I. edulis* apresentando endexina (e) e apenas vestígios do infrateto (*). Escalas: A,B = 1,5 μ m; C = 7 μ m; D = 3 μ m.

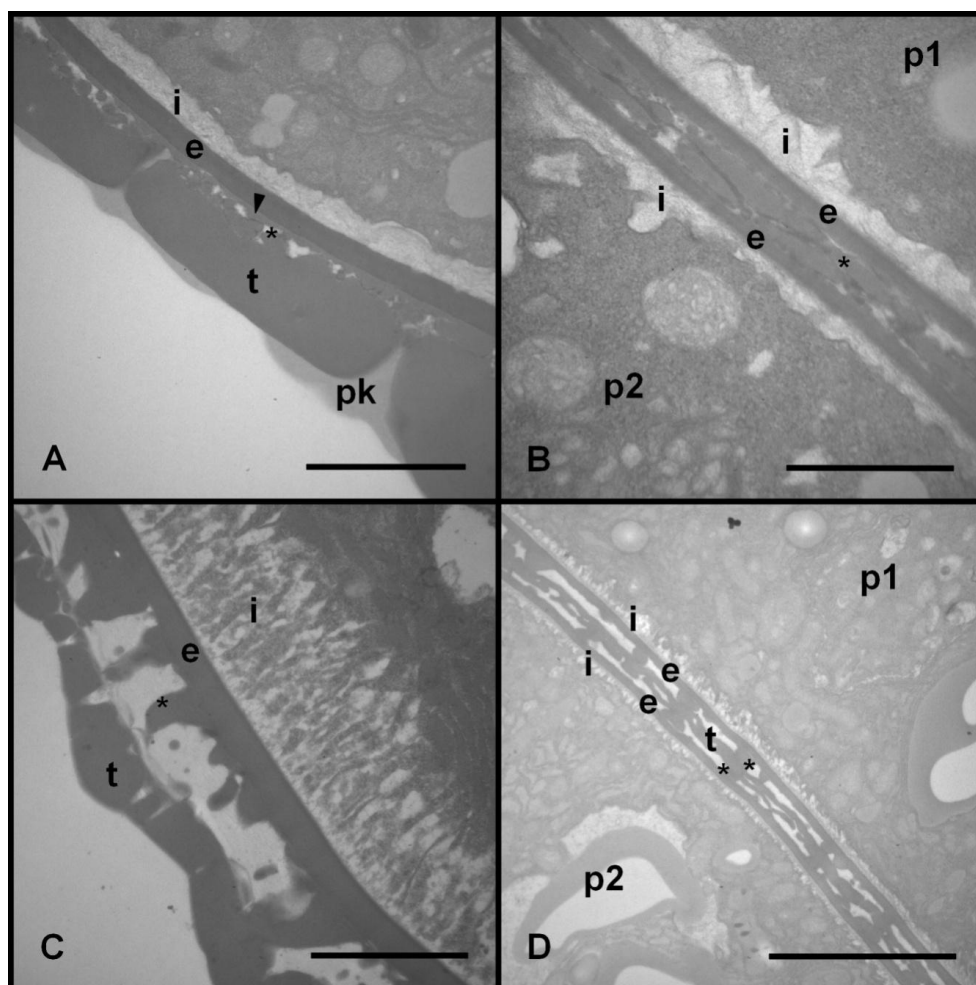


Figura 5. Eletromicrografias (MET) de políades de *Parkia pendula* (A, B) e *Calliandra brevipes* (C, D). A. Parede de um grão de pólen na região externa da políade de *P. pendula* apresentando intina (i) e endexina (e) contínua e compacta de espessuras semelhantes, camada basal fina (“footlayer”) (cabeça-de-seta), infrateto granular (*) e teto espesso e descontínuo (t). B. Paredes de dois grãos de pólen em contato (p1 e p2) na região interna da políade em *P. pendula*, apresentando intina (i), endexina (e) contínua e compacta, e apenas vestígios da camada basal e infrateto (*). C. Parede de um grão de pólen na região externa da políade de *C. brevipes* apresentando intina (i) muito mais espessa que a endexina (e) contínua e compacta, e infrateto columelar (t) mais espesso que o teto (t) contínuo. D. Paredes de dois grãos de pólen (p1 e p2) em contato na região interna da políade em *C. brevipes* apresentando todas as camadas: intina (i), endexina (e) infrateto columelar (*) e teto contínuo (t). Escalas: A = 3 μ m, B = 1,5 μ m, C = 3 μ m, D = 7 μ m.

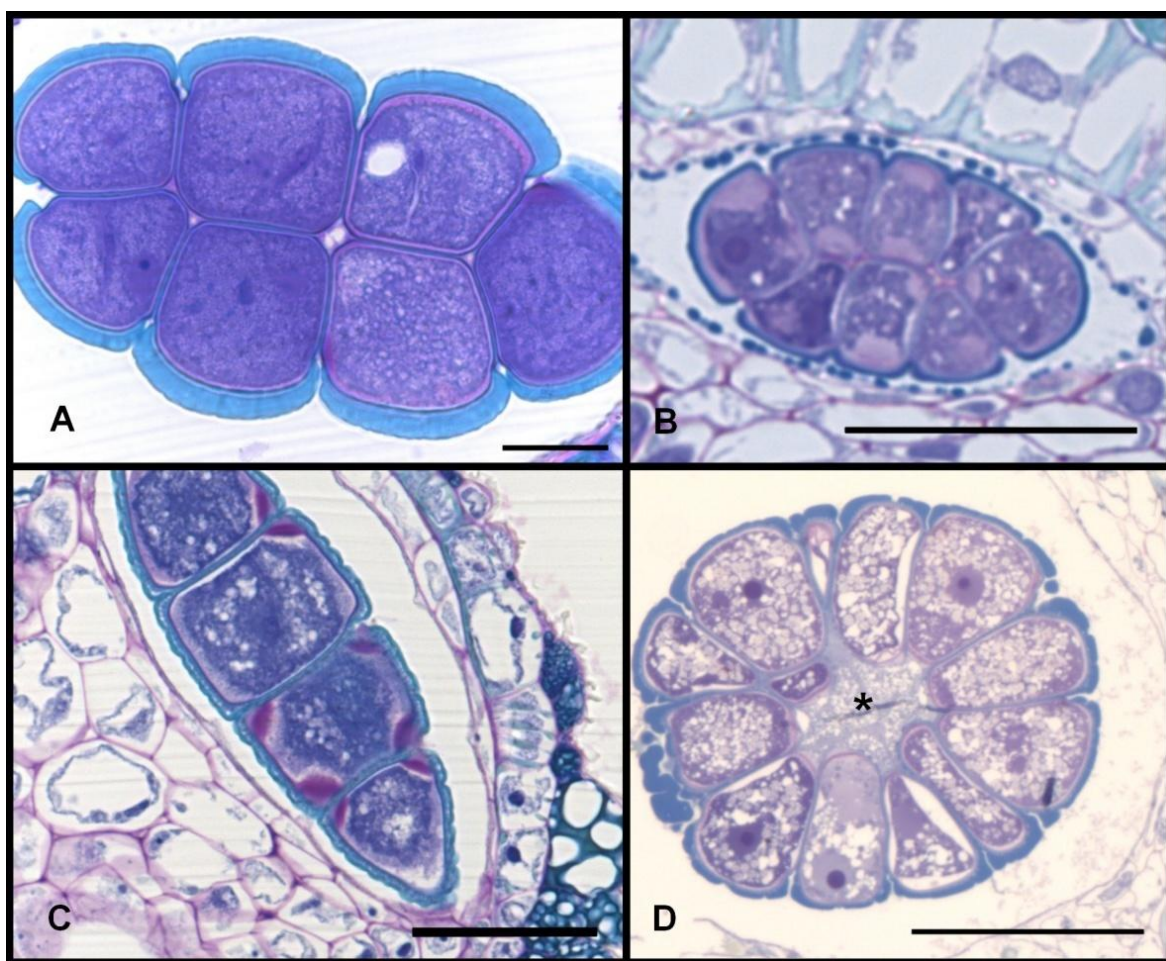


Figura 6. Fotomicrografias de políades de *Inga edulis* (A), *Senegalia polyphylla* (B), *Calliandra brevipes* (C) e *Parkia pendula* (D) em seções transversal e longitudinal. A e B. Seção transversal das políades de *I. edulis* (A) e *S. polyphylla* (B) mostrando a organização dos grãos de pólen em camada dupla; C. Seção longitudinal da políade de *C. brevipes* com organização dos grãos de pólen em camada única; D. Seção transversal de políade globosa e cavitada (*) de *P. pendula*. Escalas: A,B = 20 μ m; C,D = 50 μ m.

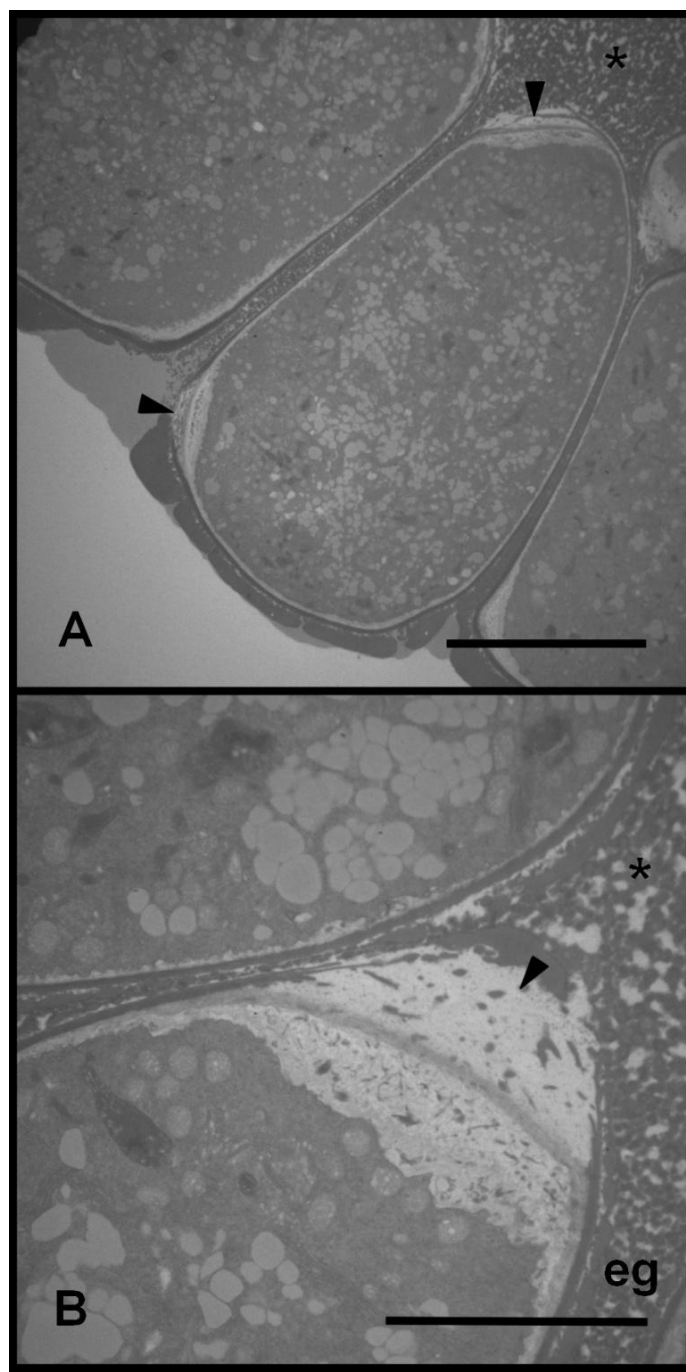


Figura 7. Eletromicrografias (MET) de políades cavitadas de *Parkia pendula*. A. Presença de poros (cabeças-de-seta) voltados à região externa e interna da políade (*). B. Detalhe da parede de um grão de pólen na região interna da políade (*), evidenciando o poro (cabeça-de-seta). Note o espaço formado entre os grãos de pólen da políade (eg) preenchido por exudato. Escalas: A = 20 μm , B = 7 μm .

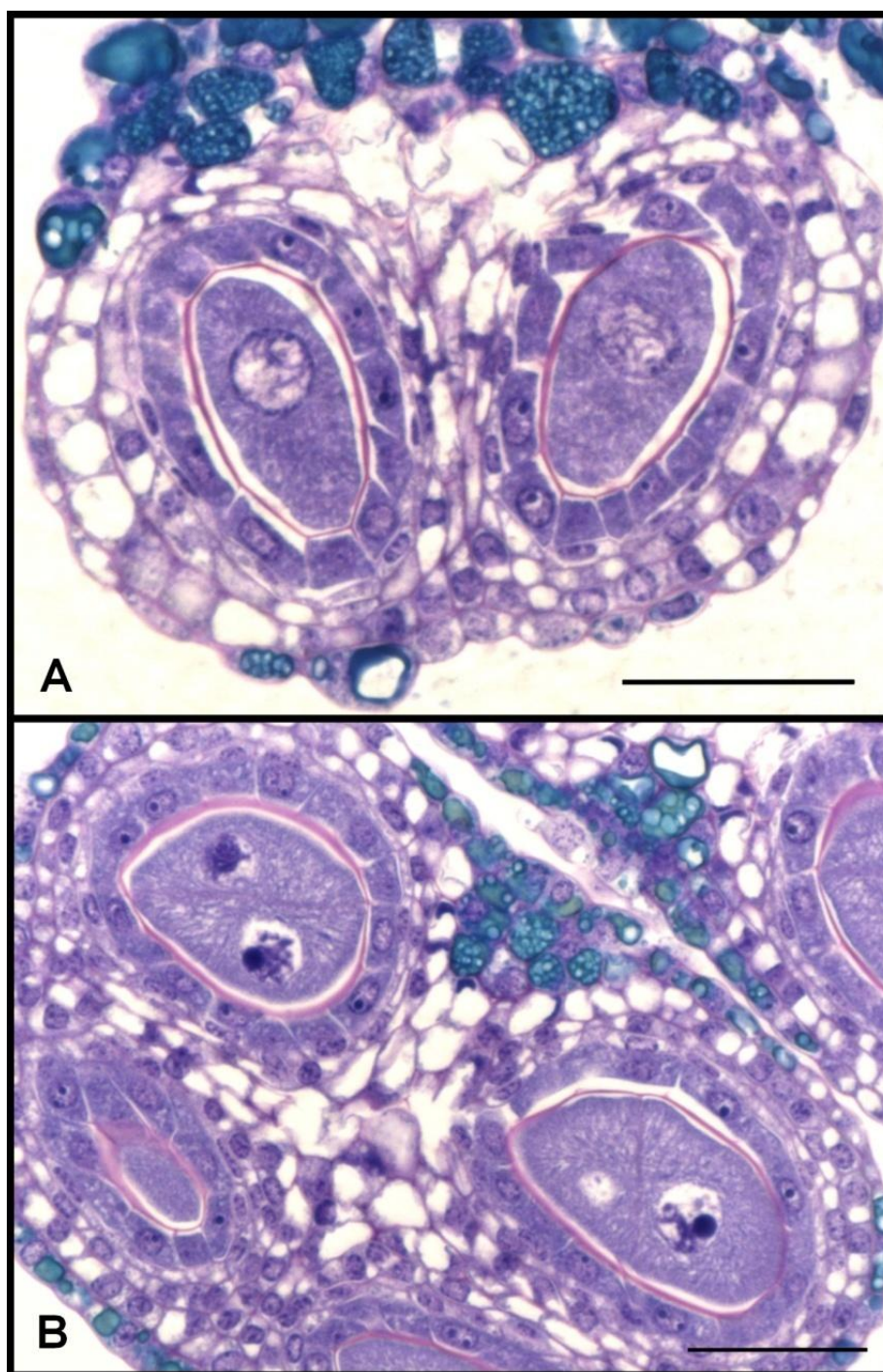


Figura 8. Fotomicrografias de células-mãe de micrósporos em cortes transversais (A) e longitudinais (B) de anteras de *Calliandra brevipes*. A. Corte transversal de antera mostrando apenas uma das duas células-mãe de micrósporos nos sublóculos. B. Corte longitudinal de antera mostrando as duas células-mãe de micrósporos nos sublóculos. Escalas = 50 μ m.

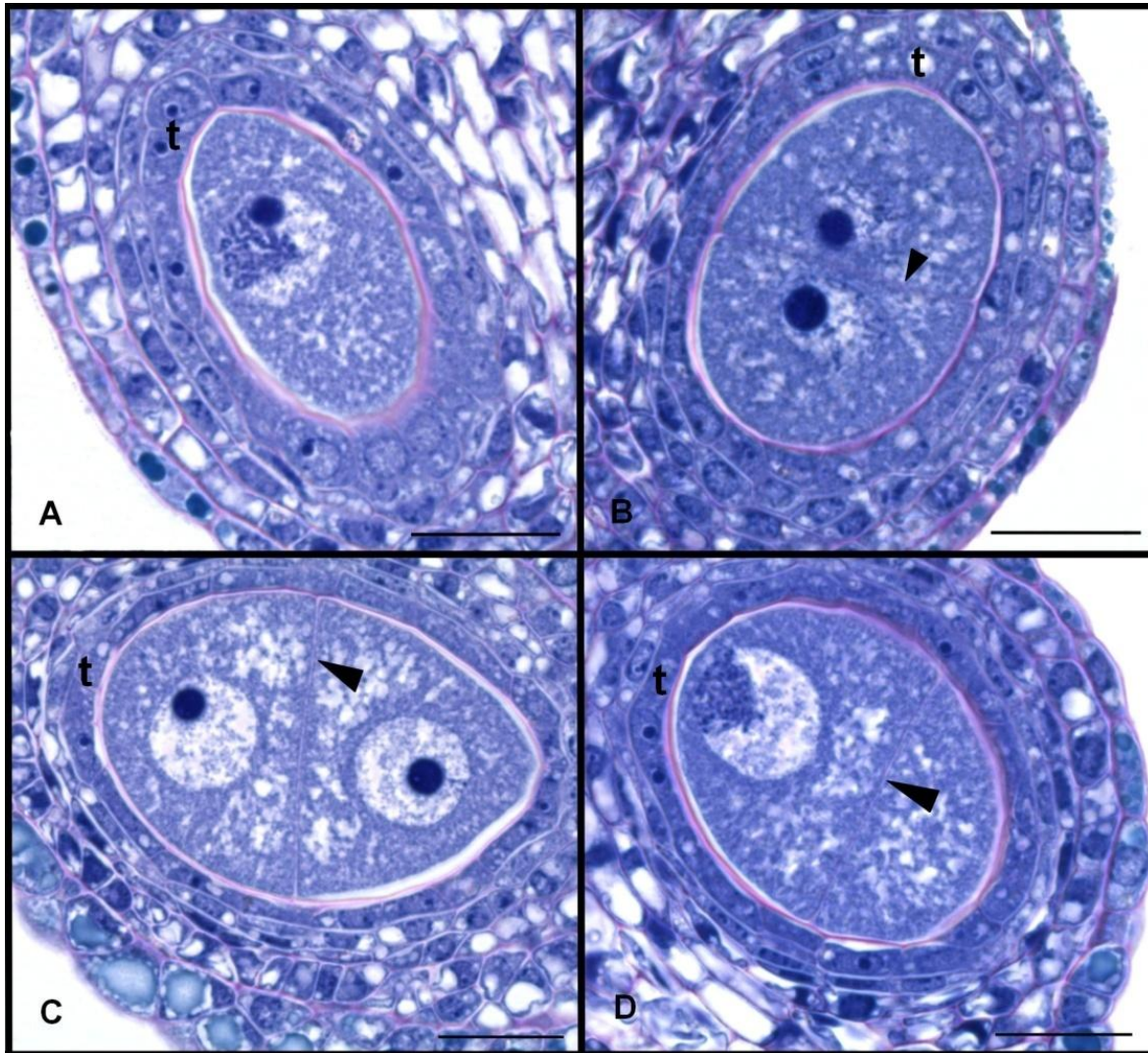


Figura 9. Fotomicrografias de células esporogênicas em cortes longitudinais de anteras de *Inga edulis*. A. Célula esporogênica em prófase mitótica. B. Duas células esporogênicas logo após a primeira divisão mitótica. Deposição da parede iniciada (cabeça-de-seta). C. Duas células esporogênicas com nucléolos conspícuos e cariolinfa clara. A parede está indicada pela cabeça-de-seta. D. Célula esporogênica em prófase mitótica indicando o início da segunda divisão. A parede formada após a primeira divisão mitótica está indicada pela seta. Note que as células do tapete (t) apresentam-se uninucleadas durante toda a fase representada nestas figuras. Escalas = 20 μ m.

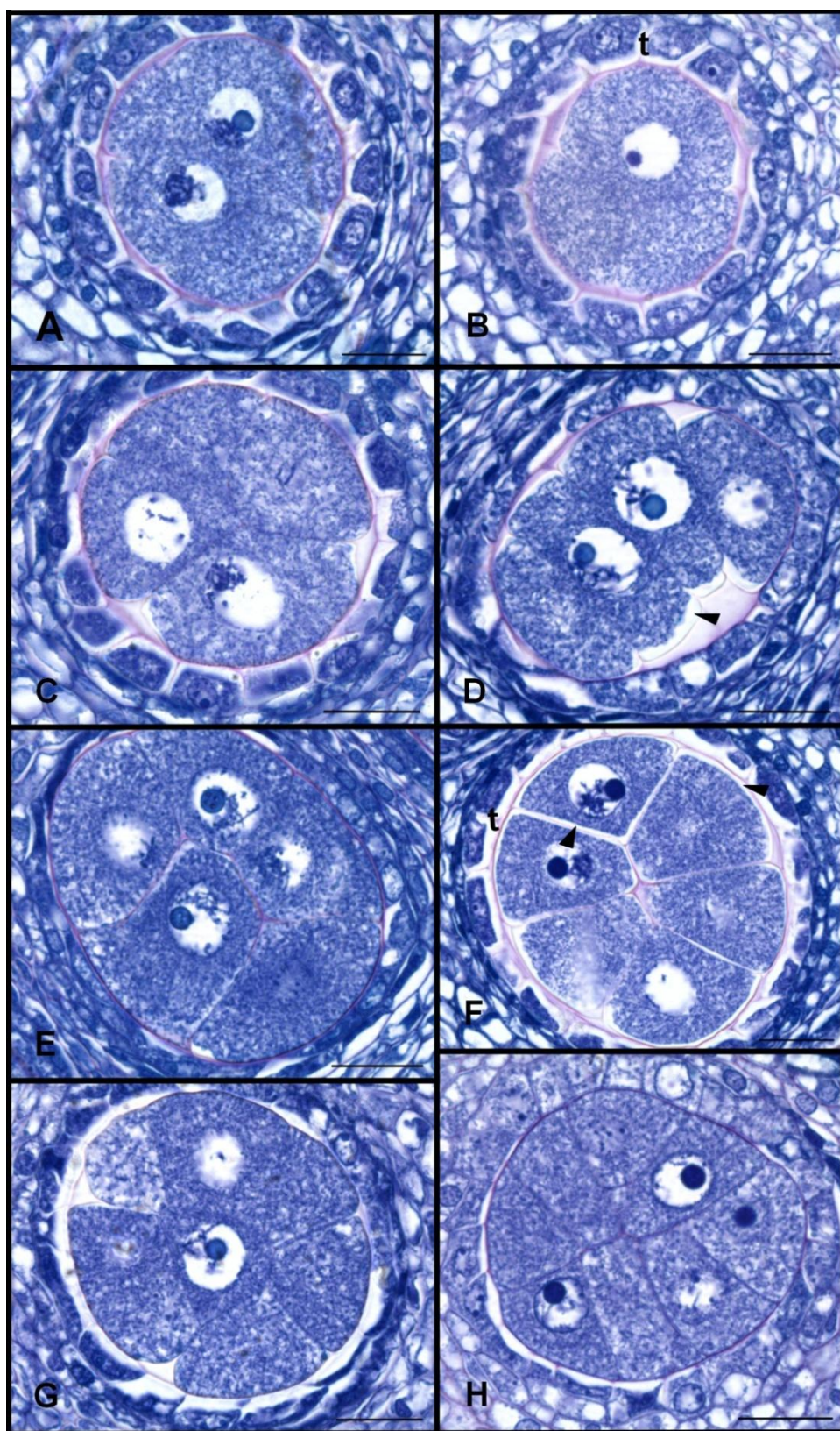


Figura 10. Fotomicrografias de células esporogênicas em cortes longitudinais de anteras de *Parkia pendula*. A. Duas células esporogênicas em prófase mitótica após a primeira divisão; B. Três células esporogênicas formadas após a segunda divisão mitótica; C. Quatro células esporogênicas em prófase mitótica formadas após a terceira divisão; D. Quatro células esporogênicas dispostas em fileira. Note que aparentemente há deposição de calose em regiões específicas das células (cabeça-de-seta); E. Cinco células esporogênicas formadas após a quarta divisão mitótica; F. Seis células esporogênicas formadas após a quinta divisão mitótica, duas delas em prófase. Note que existe uma fina camada de calose nas células (cabeças-de-seta); G. Sete células esporogênicas formadas após a sexta divisão mitótica. Uma delas encontra-se na fase de prófase mitótica, indicando início da sétima e última divisão; H. Oito células-mãe de micrósporos. Note que a parede entre as células apresenta-se inconspícua na maioria das imagens, e o tapete (t) permanece uninucleado por todas as fases representadas nestas figuras. Escalas = 20 μ m.

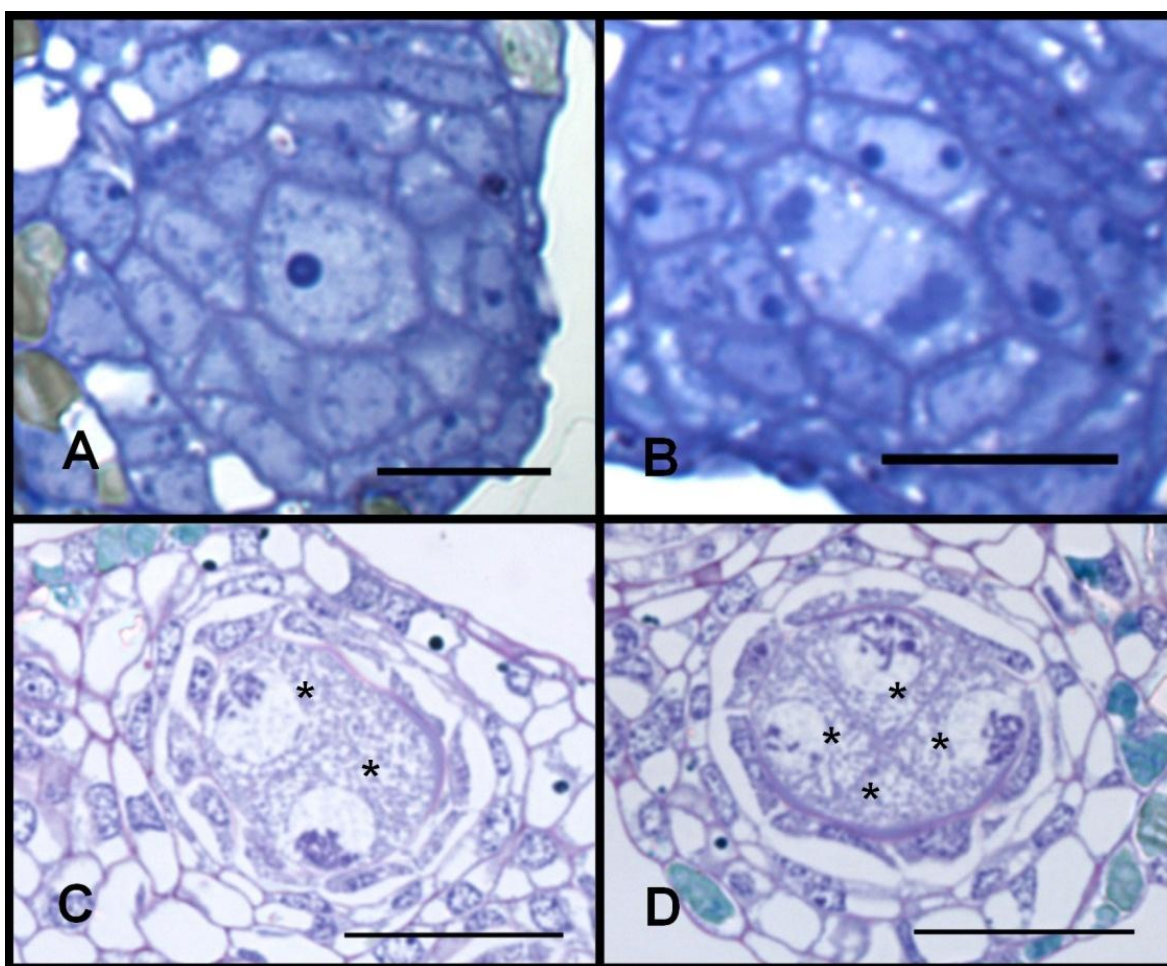


Figura 11. Fotomicrografias de células esporogênicas em cortes longitudinais e transversais de anteras de *Senegalia polyphylla*. A. Célula esporogênica inicial; B. Primeira divisão mitótica. C. Duas células esporogênicas (*) provenientes da primeira divisão mitótica em prófase. D. Quatro células esporogênicas (*) que se diferenciarão em células-mãe de micrósporos. Escalas: A,B = 10 μ m; C,D = 20 μ m.

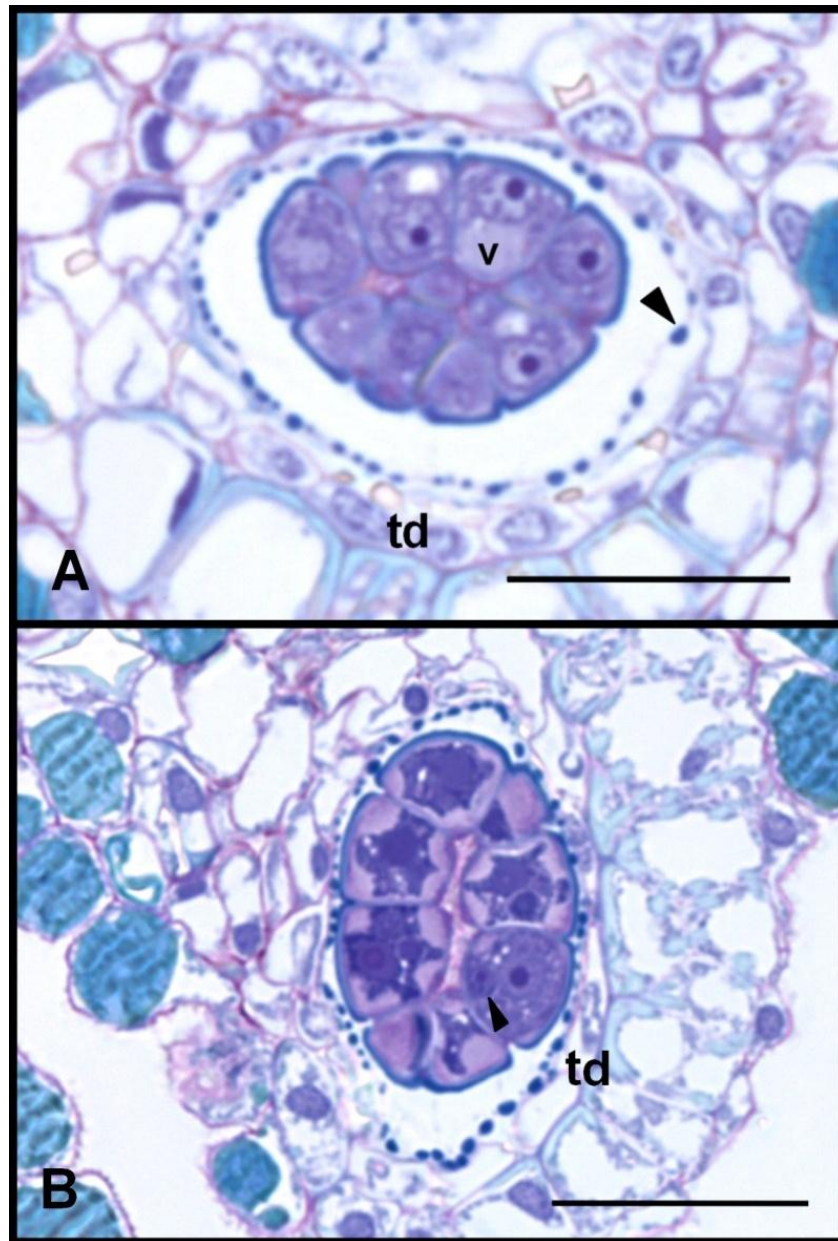


Figura 12. Fotomicrografias de políades de *Senegalia polyphylla*. A. Políade com micrósporos em estágio de vacuolação avançada. Note a presença de um grande vacúolo na célula (v). Nesta fase, o tapete encontra-se no início do processo de degeneração de suas células (td), enquanto uma grande quantidade de orbículos é acumulada no sublóculo (cabeça-de-seta) e a parede (exina) é depositada. B. Políade com micrósporos vacuolados e grãos de pólen. Note a presença da célula generativa (cabeça-de-seta). As células do tapete apresentam-se em processo de degeneração (td). Escalas = 20 μm .

Tabela 1. Características morfológicas das políades de *Inga edulis*, *Calliandra brevipes*, *Senegalia polyphylla* e *Parkia pendula*.

Características		Espécies			
		<i>Inga edulis</i>	<i>Calliandra brevipes</i>	<i>Senegalia polyphylla</i>	<i>Parkia pendula</i>
Origem da políade	Nº de células esporogênicas	1	1	1	1
	Nº de células-mãe de micrósporos	8	4	2	8
Número e morfologia das políades	Nº de sublóculos por saco polínico	2	2	2	10
	Nº de políades por antera	8	8	8	40
	Revestimento	Acalimada	Calimada	Acalimada	Acalimada
	Nº de grãos de pólen	32	8	16	32
Estratificação da parede polínica	Ornamentação da exina	Mista (Fossulada/psilada)	Fossulada	Psilada	Fossulada
	Tipo de teto	Descontínuo	Contínuo	Contínuo	Descontínuo
	Tipo de infrateto	Columelar	Columelar	Granular	Granular
	Camada basal	Ausente	Ausente	Ausente	Presente

Tabela 2. Resultados obtidos para os testes citoquímicos realizados e confirmados por análise ultraestrutural (MET) em grãos de pólen/políades de *Inga edulis*, *Calliandra brevipes*, *Senegalia polyphylla* e *Parkia pendula*. Símbolos: - = ausência; + = presença; +* = fracamente positivo ou pouca quantidade.

Substâncias	Espécies estudadas e região do pólen analisada							
	<i>I. edulis</i>		<i>C. brevipes</i>		<i>S. polyphylla</i>		<i>P. pendula</i>	
	Citoplasma da célula vegetativa	Esporoderme	Citoplasma da célula vegetativa	Esporoderme	Citoplasma da célula vegetativa	Esporoderme	Citoplasma da célula vegetativa	Esporoderme
Polissacarídeos	+	-	+	-	-	-	-	-
Lipídeos	+	+	-	+	-	+	+	+
Proteínas	-	-	+	+	+	-	+	-

Tabela 3. Características morfológicas das políades e anteras de espécies de Mimosoideae provenientes do presente estudo e de dados da literatura. As espécies na tabela estão organizadas de acordo com a filogenia atual de Mimosoideae (Brown *et al.* 2008). Informações não disponíveis ou não observadas estão representadas por um traço (-).

	Espécies	Tipo de políade	Estados de caráter			Referências
			Nº de células-mãe	Nº de grãos de pólen	Nº de sublóculos por saco polínico	
Basal  Derivado	<i>Parkia pendula</i>	Acalimada	8	32	10	Presente estudo
	<i>Mimosa bimucronata</i>	-	Cerca de 500 complexos de 2 células-mãe	8	ausente	Seijo & Neffa 2004
	<i>Senegalia polyphylla</i>	Acalimada	4	16	2	Presente estudo
	<i>Calliandra brevipes</i>	Calimada	2	8	2	Presente estudo
	<i>C. angustifolia</i>	Calimada	2	8	2	Prenner & Teppner 2005
	<i>Inga edulis</i>	Acalimada	8	32	2	Presente estudo
	<i>Inga feuillei</i>	-	8-12	32-48	2-3	Teppner 2007
	<i>Acacia paradoxa</i>	Acalimada	2	8	-	Fitzgerald <i>et al.</i> 1993
	<i>A. conferta</i>	Acalimada	4	16	2	Kenrick & Knox 1979

Discussão

A morfologia das políades na subfamília Mimosoideae é bastante diversa (exemplos são a políade elipsoidal de *Calliandra*, globosa e cavitada em *Parkia*, circular em *Inga* e *Senegalia*), refletindo as variações encontradas em suas etapas de desenvolvimento (ver Tabelas 1 e 3). No entanto, *Inga edulis*, *Calliandra brevipes* e *Senegalia polyphylla* compartilham algumas características, tais como: dois sublóculos por saco polínico, oito políades por antera, teto contínuo e ausência de camada basal na parede polínica (*foot layer*) (ver Tabela 1). *Parkia pendula* é a espécie que mais se distingue das demais, e pertence à tribo Mimoseae, grupo basal que, segundo Lewis *et al.* (2005) é parafilético. A origem da políade, a partir de divisão mitótica de uma única célula esporogênica, é comum a todo o grupo e pode constituir uma sinapomorfia. O número de células-mãe de micrósporo (2 a 8) e, conseqüentemente, o de grãos de pólen produzido (8 a 32) varia até no mesmo gênero (ex. *Acacia*, ver Tabela 3), e deve estar mais relacionado ao tamanho e à forma da políade e do estigma, e ao número de óvulos por ovário, do que com a proximidade filogenética do grupo.

A ornamentação da exina em *Inga edulis*, *Calliandra brevipes*, *Senegalia polyphylla* e *Parkia pendula* é bastante semelhante, embora *P. pendula* (quiropterófila) não compartilhe o mesmo polinizador com as outras espécies (melitófilas). Associações entre características do pólen, em especial a ornamentação da exina, e o tipo de polinizador são comumente encontradas na literatura (ver Howell 1974, Baker & Baker 1979, Ferguson & Skvarla 1982, Ferguson 1990, Ackerman 2000, Hesse 2000, Roulston & Cane 2000, Franchi *et al.* 2002, Edlund *et al.* 2004, and Pacini & Hesse 2005). No entanto, trabalhos como os de Stroo (2000) e Basso-Alves e colaboradores (2011) não corroboram esta informação. Em especial, em espécies polinizadas por morcegos, como *P. pendula* (presente estudo) e outras estudadas por Stroo (2000), a ornamentação polínica tem pouca associação com o polinizador. Tais informações provocam uma série de questionamentos a respeito da evolução da parede polínica. A condição calimada e a heteromorfia dos grãos na políade, por exemplo, devem ter surgido de forma independente em *Calliandra*, sendo as condições acalimada da políade e isomorfia dos grãos predominantes no grupo.

O significado biológico da deposição total de parede em todos os grãos de uma políade é de difícil interpretação, provavelmente associado ao desprendimento ou não dos grãos após a deposição e germinação no estigma. Os grãos de pólen das políades acalimadas de *Inga edulis*, por exemplo, desprendem-se ao emitirem tubos polínicos no estigma, enquanto que em *Calliandra brevipes*, espécie com políades calimadas, isso não ocorre (observação pessoal). Outros estados de caráter da parede polínica como teto contínuo, infrateto columelar e ausência da camada basal (“footlayer”), observados aqui em espécies posicionadas em nós mais distantes do ancestral (*Inga edulis*, *Calliandra brevipes* e *Senegalia pollyphylla*), também são considerados apomórficos na literatura (Muller 1979, Crepet 1984, Hesse *et al.* 2009). Teto descontínuo, infrateto granular e presença da camada basal são condições observadas em *Parkia pendula*.

As políades de *Calliandra brevipes* (presente estudo) e *C. depauperata* (Buriel *et al.* 2010) são achatadas e uniplanares, com uma única camada de grãos de pólen, diferente das outras espécies aqui estudadas. Este formato sugere que citocinese do tipo sucessivo ocorre no grupo, segundo conceito de Hesse *et al.* (2009), embora a alternância do tipo simultâneo para o sucessivo também tenha sido relatada em *Calliandra* (Greissl 2006). Citocinese sucessiva é raramente encontrada em angiospermas (McCormick 1993), predominando entre as e monocotiledôneas, o que leva a acreditar que este seja um estado de caráter apomórfico nas angiospermas (Furness & Rudall 1999, Ressayre 2001, Furness *et al.* 2002, Penet *et al.* 2005, Nadot *et al.* 2006).

Interessante notar a estrutura peculiar das políades de *Parkia pendula*, descrita anteriormente por Feuer *et al.* (1985), mas com menor detalhamento, em especial o fato de apresentarem espaço interno amplo e grãos de pólen contendo poros voltados para o interior da políade. A mesma estrutura é observada em *P. multijuga* Benth. e *Parkia ulei* (Harms) Kuhl., porém o espaço interno da políade nessas espécies é menor, formando uma estrutura globosa mais compacta (observação pessoal). É provável que o espaço interno central e os poros atuem no fluxo de fluidos importantes para a germinação do pólen. Informações a este respeito não foram encontradas na literatura. Este tipo de políade não foi relatado em outros táxons e deve ser um estado compartilhado com o ancestral do grupo. Outras características interessantes desta espécie são (1) o menor número de poros

em relação aos outros gêneros (presente estudo, Hesse *et al.* 2009, Buriel *et al.* 2010), provavelmente devido ao formato do grão (piramidal) e sua disposição na políade; e (2) o número grande de sublóculos das anteras, com uma políade em cada um, adicionado ao número elevado de flores por inflorescência (1148 flores férteis – Hopkins 1984), resultando em números de políades muito acima dos encontrados para as outras espécies estudadas (ver Tabela 2). Número elevado de políades por antera e assincronia no desenvolvimento das políades entre os sacos polínicos são compartilhados por *P. pendula* (presente estudo) e *Mimosa bimucronata* (D.C.) Kuntze, também pertencente à tribo Mimoseae (Seijo & Neffa 2004, ver Tabela 3).

A morfologia da políade de *Senegalia polyphylla*, foi comparada à de espécies de *Acacia* Mill. (*S. polyphylla* estava inserida no gênero *Acacia*). Embora diferenças tenham sido encontradas quanto ao número de células-mãe de micrósporos, continuidade da exina (teto) dos grãos de pólen, tipo de ornamentação da exina e estrutura da políade (número e posição dos grãos de pólen) entre *S. polyphylla* (presente estudo) e *Acacia paradoxa* D.C. (Fitzgerald *et al.* 1993), características como presença de orbículos nos lóculos, 16 grãos de pólen com oito arranjados em dupla camada no centro da políade, ocorrência de infrateto granular e ausência da camada basal também são compartilhadas por várias outras espécies de *Acacia* (ver Kenrick & Knox 1979, Arce & Banks 2001). Atualmente, o gênero *Senegalia* forma um grupo parafilético (Miller & Seigler 2012) e uma proposta de criar uma nova tribo Acacieae, que inclua a tribo Ingeae e todas as espécies de *Acacia* segregadas (exceto *Vachellia*), compreendendo mais de 2000 das 3200 espécies que compõem a subfamília Mimosoideae, tem sido discutida pelos sistematas (Sixth International Legume Conference 2013).

Esforços têm sido concentrados no desenvolvimento de um novo sistema de classificação para a família Leguminosae, o que constituiu o tema central do Sixth International Legume Conference (2013), tendo sido feita uma compilação acerca do assunto e publicada recentemente pelo Grupo de Trabalho em Filogenia de Leguminosae (ver The Legume Phylogeny Working Group 2013). Em Mimosoideae, enfatizou-se a filogenia e classificação de *Acacia*, a filogenia da tribo Ingeae, considerada por Brown e colaboradores (2008) como o grupo das “leguminosas esquecidas”, e na filogenia da

subfamília como um todo. Sendo assim, comparações acerca da origem, morfologia e desenvolvimento das políades, condição restrita à subfamília Mimosoideae em Leguminosae (Doyle & Luckow 2003, Harder & Johnson 2008), juntamente com estudos futuros envolvendo o um maior número de espécies da subfamília, podem prover informações bastante relevantes para o estabelecimento de novas classificações no grupo. A dispersão polínica em políades é considerada uma condição especial e ainda pouco estudada em angiospermas, principalmente no que concerne aos padrões de desenvolvimento, o que torna este estudo uma importante contribuição ao conhecimento desta estrutura polínica e aos estudos de evolução de caracteres no grupo.

Referências bibliográficas

- Ackerman J.D. 2000. Abiotic pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 167–185.
- Arce L. R., Banks H. 2001. A preliminary survey of pollen and other morphological characters in neotropical *Acacia* subgenus *Aculeiferum* (Leguminosae: Mimosoideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **135**: 263-270.
- Baker H. G., Baker I. 1979. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *American Journal of Botany* **66**: 591- 600.
- Basso-Alves J. P., Agostini K., Teixeira S. P. 2011. Pollen and stigma morphology of some Phaseoleae species (Leguminosae) with different pollinators. *Plant Biology* **13**: 602-610.
- Bedinger P.A. 1992. The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* **4**: 879-887.
- Blackmore S., Wortley A. H., Skarvala J. J., Rowley J. R. 2007. Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist* **174**: 483-498.
- Brown G. K., Murphy D. J., Miller J. T., Ladiges P. Y. 2008. *Acacia* s.s. and its relationship among tropical legumes, tribe Ingeae (Leguminosae: Mimosoideae). *Systematic Botany* **33**: 739- 751.
- Buril M. T., Santos F. A. R., Alves M. 2010. Diversidade polínica das Mimosoideae (Leguminosae) ocorrentes em uma área de caatinga, Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **24**: 53-64.
- Capucho L. C., Teixeira S. P. 2013. Tapetal and parenchymatic anther tissues participate in polyad adhesive production in *Calliandra brevipes* (Leguminosae). *South African Journal of Botany* **89**: 227–233.
- Crepet W. L. 1984. Advanced (constant) insect pollination mechanisms: pattern of evolution and implications vis-a-vis angiosperm diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **71**: 607-630.
- Cruden R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* **31**: 32- 46.

- Cruden R. W., Jensen K. G. 1979. Viscin Threads, Pollination Efficiency and Low Pollen-Ovule Ratios. *American Journal of Botany* **66**: 875- 879.
- Cruden R. W. 2000. Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution* **222**: 143- 165.
- Doyle J. J., Luckow M. A. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* **131**: 900–910.
- Edlund A.F., Swanson R., Preuss D. 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell* **16**: 84–97.
- Evert R. F. 2006. *Esau's Plant Anatomy: meristems, cells and tissues of the plant body – Their structure, function and development*. Third edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Feder N., O'Brien T. P. 1968. Plant Microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**: 123- 142.
- Ferguson I.K., Skvarla J.J. 1982. Pollen morphology in relation to pollinators in Papilionoideae (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **84**: 183–193.
- Ferguson I.K. 1990. The significance of some pollen morphological characters of tribe Amorphae and the genus Mucuna (tribe Phaseoleae) in the biology and systematic of subfamily Papilionoideae (Leguminosae). *Review of Palaeobotany and Palynology* **64**: 129–136.
- Feuer S. M., Niezgodka C. J., Nevling L. I. 1985. Ultrastructure of *Parkia* polyads (Mimosoideae:Leguminosae). *American Journal of Botany* **72**: 1871-1890.
- Fitzgerald M. A., Calder D. M., Knox R. B. 1993. Character states of development and initiation of cohesion between compound pollen grains of *Acacia paradoxa*. *Annals of Botany* **71**: 51- 59.
- Franchi G.G., Nepi M., Dafni A., Pacini E. 2002. Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutionary significance. *Plant Systematics and Evolution* **234**: 211–227.
- Furness C. A., Rudall P. J. 1999. Microsporogenesis in monocotyledons. *Annals of Botany* **84**: 475-499.
- Furness C. A., Rudall P. J., Sampson F. B. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* **163**: 235–260.
- Gerrits P. O. 1991. *The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles*. Netherlands: Departament of Anatomy and Embryology, State University Groningen.
- Greissl R. 2006. Ontogeny of the *Calliandra* – massulae (Mimosaceae: Ingeae), and the associated viscin body. *Flora* **201**: 570-587.
- Harder L. D., Johnson S. D. 2008. Function and evolution of aggregated pollen in angiosperms. *International Journal of Plant Science* **169**: 59- 78.
- Hesse M., Halbritter H., Zetter R., Weber M., Buchner R., Frosch-Radivo A., Ulrich S. 2009. *Pollen Terminology: an illustrated handbook*. Springer Wien, New York.
- Hesse M. 2000. Pollen wall stratification and pollination. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 1–17.
- Hopkins H. C. F. 1986. Monograph 43 - *Parkia* (Leguminosae:Mimosoideae). In: *Flora Neotropica*. The New York Botanical Garden, New York.

- Hopkins H. C. F. 1984. Floral biology and pollination ecology of the Neotropical species of *Parkia*. *Journal of Ecology* **72**: 1- 23.
- Howell D. J. 1974. Bats and pollen: physiological aspects of the syndrome of chiropterophily. *Comparative Biochemistry Physiology* **48A**: 263-276.
- Johansen D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company Inc., New York.
- Johri B.M. 1984. *Embryology of Angiosperms*. (Berlin: Springer-Verlag).
- Karnovsky M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A-138A.
- Kenrick J., Knox R. B. 1979. Pollen Development and Cytochemistry in some Australian Species of *Acacia*. *Australian Journal of Botany* **27**: 413- 427.
- Koptur S. 1984. Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: breeding systems of neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). *Evolution* **38**: 1130- 1143.
- Lersten N. R. 2004. *Flowering Plant Embryology*. 1st edition. Blackwell Publishing, EUA.
- Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock M. 2005. *Legumes of the world*. The Royal Botanical Gardens, Kew.
- Lora J., Testillano P. S., Risueño M. C., Hormaza J. I. 2009. Pollen development in *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). Implications for the evolution of aggregated pollen. *BMC Plant Biology* **9**: 129.
- Lorenzi H., Souza H. M. 1995. *Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. Editora Plantarum. Nova Odessa, SP.
- Lorenzi, H. 2002. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Editora Plantarum, Nova Odessa, SP.
- Martius C. F. P., Eichler A. G. 1840 – 1906. *Flora Brasiliensis*. Vol. XV, Part II, Fasc. 70, Coluna 415 – 416.
- McCormick S. 1993. Male gametophyte development. *The Plant Cell* **5**: 1265-1275.
- Muller J. 1979. Form and function in angiosperm pollen. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **66**: 593-632.
- Nadot S., Forchioni A., Penet L., Sannier J., Ressayre A. 2006. Links between early pollen development and aperture pattern in monocots. *Protoplasma* **228**: 55–64.
- O'Brien T.P., Feder N., Mccully M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- O'Brien T. P., Mccully M. E. 1981. *The study of plant structure: principles and selected methods*. Melbourne: Termarcaphy PTY Ltd.
- Pacini E., Franchi G. G. 1999. Pollen grain sporoderm and types of dispersal units. *Acta Soc. Bot. Pol.* **68**: 299-305.
- Pacini E., Hesse M. 2005. Pollenkitt – its composition, forms and functions. *Flora* **200**: 399-415.
- Pearse A. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. Vol. II, 4th ed. Longman Group Limited.
- Penet L., Nadot S., Ressayre A., Forchioni A., Dreyer L., Gouyon P. H. 2005. Multiple developmental pathways leading to a single morph: monosulcate pollen (examples from the Asparagales) *Annals of Botany* **95**: 331–343.
- Pennington T. D. 1997. *The Genus Inga Botany*. The Royal Botanic Gardens, Kew.

- Prenner, G., Teppner, H., 2005. Anther development, pollen presentation and pollen adhesive of parenchymatous origin in *Calliandra angustifolia* (Leguminosae – Mimosoideae – Ingeae). *Phyton* **45**: 267-286.
- Queiroz L. P. 2009. *Leguminosas da Caatinga*. Universidade Estadual de Feira de Santana, associada ao The Royal Botanic Gardens, Kew e Associação Plantas do Nordeste.
- Ressayre A. 2001. Equatorial aperture pattern in monocots: same definition rules as in eudicots? The example of two species of Pontederiaceae. *International Journal of Plant Sciences* **162**: 1219-1224.
- Reynolds E. W. 1963. Use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. **17**: 208-212.
- Roulston T.H., Cane J.H. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 187–209.
- Seijo J. G., Neffa V. G. S. 2004. The cytological origin of the polyads and their significance in the reproductive biology of *Mimosa bimucronata*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **144**: 343-349.
- Stroo A. 2000. Pollen morphological evolution in bat pollinated plants. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 225- 242.
- Teppner H. 2007. Polyad development and karyology in *Inga* and *Calliandra* (Mimosaceae-Ingeae): a reply to a recent paper in Flora. *Phyton Annales Rei Botanicae* **47**: 1-46.
- The Legume Phylogeny Working Group 2013. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* **62**: 217-248.
- Tsou C. H., Fu Y. L. 2007. Octad pollen formation in *Cymbopetalum* (Annonaceae): the binding mechanism. *Plant Systematic and Evolution* **263**: 13-23.
- Walker J. W., Doyle J. A. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: palynology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **62**: 664-723.
- Watson M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**: 475-478.

CAPÍTULO 2: Tapetal and parenchymatic anther tissues participate in polyad adhesive production in *Calliandra brevipes* (Leguminosae)

Publicado – South African Journal of Botany (2013) 89: 227–233

Abstract

Calliandra brevipes Benth. is an American shrubby species largely used for ornamental purposes. Like all other *Calliandra* species it has heteromorphic pollen grains shed in ellipse-shaped, calymmate polyads and a unique mode of pollen presentation by producing a sticky substance called “pollen adhesive”. The present study aimed to investigate in detail the origin of polyad adhesive in *C. brevipes*. Serial microtome sections of anthers in various developmental stages were used and histochemical tests applied to detect the adhesive production sites and investigate the subcellular characteristics of the anther cells under transmission electron microscopy. The pollen adhesive in *C. brevipes* is not only produced by parenchymatic cells of the anther transversal septum, as it is described for *Calliandra angustifolia*, but parenchymatic cells and tapetal cells next to the polyad apical pollen grain also participate in the pollen adhesive production. The cytoplasm of the degenerating tapetum cells contains oleoplasts and fibrogranular material inside the vacuoles which mixes with the adhesive produced by adjacent parenchymatic cells and which therefore contributes to its composition. Vacuoles containing fibrogranular material are very similar to those found in tryphine producing tapetal cells, and the subcellular structures of parenchymatic and tapetal cells are similar to each other. The fact that the pollen adhesive becomes solid in contact with the environment is attributed to dehydration and the presence of the protein fibrogranular material and lipid substances since resin could not be found in its composition. It seems that the sites of pollen adhesive production in *Calliandra* may vary among its members. Studies of polyad adhesive production in the genus should be standardized in order to verify the information already available in the literature.

Keywords: anther wall, Fabaceae, heteromorphic pollen grains, sticky substance, ultrastructure.

Introduction

Calliandra Benth. (Leguminosae, Mimosoideae, Ingeae) was revised by Barneby (1998), who excluded the African and Asian members in a way that, in its current circumscription, the group is exclusively Neotropical with about 130 species of trees and shrubs. Its representatives have flowers generally organized into paniculate racemes, with 10 to 100 stamens and their filaments are fused at the base, forming a tube at the non-exposed region (hidden by corolla) and free at the exposed region (Martius and Eichler, 1840–1906; Macqueen and Hernández, 1997).

They have a unique mode of pollen presentation and produce a sticky substance called “pollen adhesive” (Prenner and Teppner, 2005; Teppner and Stabentheiner, 2007; Santos and Romão, 2008). Inside of each septate locule of the anther are two drop-shaped polyads which lie longitudinally and parallel to the anther axis (Prenner and Teppner, 2005). *Calliandra* polyads are calymmate and comprise eight heteromorphic pollen grains: two central grains surrounded by another six, one being the apical, which is different from the others in shape and position, forming an acute portion by which the polyad is attached to the anther by the pollen adhesive (Santos and Romão, 2008).

These peculiar palynological characteristics distinguish *Calliandra* species from other genera with polyads in Mimosoideae (Greissl, 2006). Pollen adhesive production in *Calliandra* seems to occur before the anther opening and is internal to the extra-tapetal layer (Prenner and Teppner, 2005; Teppner, 2007b). It has been considered a lysigenous product of the parenchymatic tissue within the locules (Prenner and Teppner, 2005), and stored in hemispherical cavities (“mucilage chambers”) of the transversal septum formed by lysis of the anther middle layer cells (Teppner, 2007b). This information disproved the hypothesis that pollen adhesive could be produced by tapetum cells, such as the pollenkitt (Pacini and Hesse, 2005). Pollen adhesive is a lipophilic mixture composed of wax-like free fats and unsaturated fatty acids covered by a thin protein layer (Greissl, 2006). However, tests for resin substances produced by some Leguminosae species and

used by many groups of bees to build their nests (Armbruster, 1984; Leonhardt and Bluthgen, 2009) were not performed. The studies by Armbruster (1984), Mariani and Wolters-Arts (2000), Pacini and Hesse (2005), Leonhardt and Bluthgen (2009), and Hesse (2010) show that these sticky substances originating from plant reproductive structures, or from other structures associated with them, have many different functions related to pollination processes such as: enabling secondary pollen presentation; gluing pollen grains together at dispersion time; protecting pollen grains from excessive loss of water; increasing the attractiveness of pollen grains to animals or repelling the animals who eat them; and allowing pollen grain adhesion to the visitor body (pollinator).

The attractive flowers of *Calliandra* are visited by a wide range of pollinators, such as moths and butterflies (Haber and Fankie, 1989), hummingbirds (Arroyo, 1981) and bats (Chamberlain and Hubert, 2001). The structural characteristics of *Calliandra* polyads may have evolved in response to this variety of visitors, in particular the size of the polyad (considered big) and its sophisticated mode of transportation. Hence, studies regarding anther and polyad development and morphology in *Calliandra* species are becoming more frequent.

Current literature provides ontogenetic studies for four species: *Calliandra angustifolia* Spruce ex Benth. (Prenner and Teppner, 2005), *Calliandra calothyrsus* Meisn., *Calliandra haematocephala* Hassk. and *Calliandra tweedii* Benth., and one synonym, *Zapoteca tetragona* (Willd.) H.M. Hern. (*Zapoteca* syn. *Calliandra* p.p.) (Greissl, 2006); pollen morphology studies for 21 species (herbarium samples): *Calliandra asplenoides* (Nees) Renvoize, *Calliandra bahiana* Renvoize, *Calliandra bella* (Mart. ex Spreng.) Benth., *Calliandra coccinea* Renvoize, *Calliandra depauperata* Benth., *Calliandra elegans* Renvoize, *Calliandra ganevii* Barneby, *Calliandra germana* Barneby, *Calliandra harrisii* (Lindl.) Benth., *Calliandra hirsuticaulis* Harms, *Calliandra hirtiflora* Benth., *Calliandra hygrophila* Mackinder & G.P. Lewis, *Calliandra lanata* Benth., *Calliandra leptopoda* Benth., *Calliandra lintea* Barneby, *Calliandra macrocalyx* Harms, *Calliandra semisepulta* Barneby, *Calliandra sessilis* Benth., *Calliandra spinosa* Ducke, *Calliandra stelligera* Barneby and *Calliandra viscidula* Benth. (Santos and Romão, 2008); and studies of floral morphology, anther opening patterns and pollen presentation for four species: *C.*

angustifolia, *C. haematocephala*, *Calliandra tergemina* (L.) Benth. and *C. tweediei* (Teppner, 2007a, b; Teppner and Stabentheiner, 2007).

With the goal of expanding our knowledge of the pollen adhesive origin, we studied the ontogeny of polyads and anthers in *Calliandra brevipes* Benth., an ornamental species, widely distributed in Brazil (Lorenzi and Souza, 1995), emphasizing subcellular features of the cells adjacent to the anther locule.

Material and Methods

Buds of various sizes and flowers of *Calliandra brevipes* were collected, fixed in Karnovsky in phosphate buffer 0.1M (pH 7.3) for 24 hours (Karnovsky, 1965) and in FAA 50 for 24 hours (Johansen, 1940), dehydrated in ethanolic series and stored in 70% alcohol.

Anatomic studies of the developing anther wall and pollen grains were made with anthers from buds in various development stages, previously fixed in Karnovsky in phosphate buffer 0.1M (pH 7.3) for 24 hours (Karnovsky, 1965), embedded in historesin (Gerrits, 1991) and sectioned transversally and longitudinally using a Leica RM2245 microtome at 3 μ m. Sections were stained with Toluidine blue 0.01% pH 4.4 (O'Brien et al., 1964), observed and illustrated under a Leica DM5000B light microscope.

Histochemical tests were performed to locate the production sites of the pollen adhesive substances in anatomical sections, using PAS reagent to detect carbohydrates (Feder and O'Brien, 1968), xylidine de Ponceau to detect proteins (O'Brien and McCully, 1981) and Sudan black B for lipids (Pearse, 1980). Presence of resin in pollen adhesive composition was tested, using fresh samples of anthers gently macerated in Cupric acetate at 7% (Johansen, 1940) with a glass rod to expose the polyads from the inside of anthers. The samples were left for 15 to 25 minutes in the solution and observed under light microscopy. Positive control was made with *Pinus* sp. leaves containing resin.

Ultrastructural characteristics of the anther wall cells and polyad pollen grains were verified by means of transmission electron microscopy (TEM). To do so, part of the Karnovsky fixed material (Karnovsky, 1965) was post-fixed in Osmium tetroxide at 1% (phosphate buffer 0.1M and pH 7.3) for 2 hours, dehydrated in a graded acetone series and

embedded in Araldite 502 Polysciences epoxy resin. Semi-thin sections (0.5 μm) were obtained using a Leica ultracut S Reichert ultramicrotome, stained with 0.05% Toluidine blue (O'Brien et al., 1964) and observed under light microscopy. Ultra-thin sections (60 to 70 nm) were collected on a fine mesh grid, contrasted in 2% uranyl acetate in aqueous solution for 15 minutes (Watson, 1958) and lead citrate for 15 minutes (Reynolds, 1963). Analyses and illustrations were made using a Philips EM 208 transmission electron microscope.

Terminology in this study follows Prenner and Teppner (2005) and Hesse et al. (2009).

Results

Polyads of *Calliandra brevipes* originate from two pollen mother cells (Fig. 1A) that give rise to one tetrad each, resulting in one drop-shaped polyad with eight pollen grains (Fig. 1B). Polyads are calymmate (Fig. 1C) and flattened (Fig. 1D) and one of the peripheral pollen grains (apical grain) forms an acute apex, where slightly before anthesis and anther opening a sticky substance is deposited (Fig. 1E).

After complete formation of the androspores, when each one is still surrounded by callose wall and tapetum cells are still intact although showing vacuoles – the beginning of the degeneration process (Figs. 2 A-B), transversal septum cells of the anther present high metabolic activity, showing conspicuous nucleus, or many of them, in addition to mitotic figures (Fig. 2C).

Then, when the pollen wall deposition is complete and callose walls are dissolved, parenchymatic cells close to the locule and immediately next to the tapetum cells also present high metabolic activity, showing conspicuous nucleus and chromatin densification inside (Fig. 2D). At this stage, both transversal septum cells and cells adjacent to the locule start the production and accumulation of pollen adhesive (Fig. 2E).

Pollen adhesive-producing cells present conspicuous nuclei with densified chromatin, a cytoplasm which is rich in rough and smooth endoplasmic reticulum (Fig. 2F) and which contains mitochondria, lipids and vacuoles with fibrogranular material (Fig. 2G).

Pollen adhesive accumulation takes place at the intercellular spaces of the parenchyma (Fig. 3A). As the accumulation increases (Fig. 3B), producing cells initiate vacuolation process (Fig. 3C) and the vacuole rapidly becomes larger, dislocating the cytoplasm to the periphery, close to the cell wall (Fig. 3D).

At the end of the vacuolation process, producing cells undergo lysis, forming a linking-space between adhesive-producing parenchymatic region and the locule, allowing pollen adhesive to overrun it (Fig. 4A). Thereby, cytoplasmic content of the degenerating tapetum cells (non-cellularized) (Fig. 4B), containing fibrogranular material inside vacuoles (Fig. 4C, D - see arrow heads) and droplets of lipid (Fig. 4D - labeled as l) and, very similar to those found in parenchymatic producing cells, mixes with the pollen adhesive and contributes to its composition.

Chemical tests indicated that the pollen adhesive comprises mainly lipids and small amounts of carbohydrates (Figs. 5A-B). Proteins and resin substances were not detected (Figs. 5C-D).

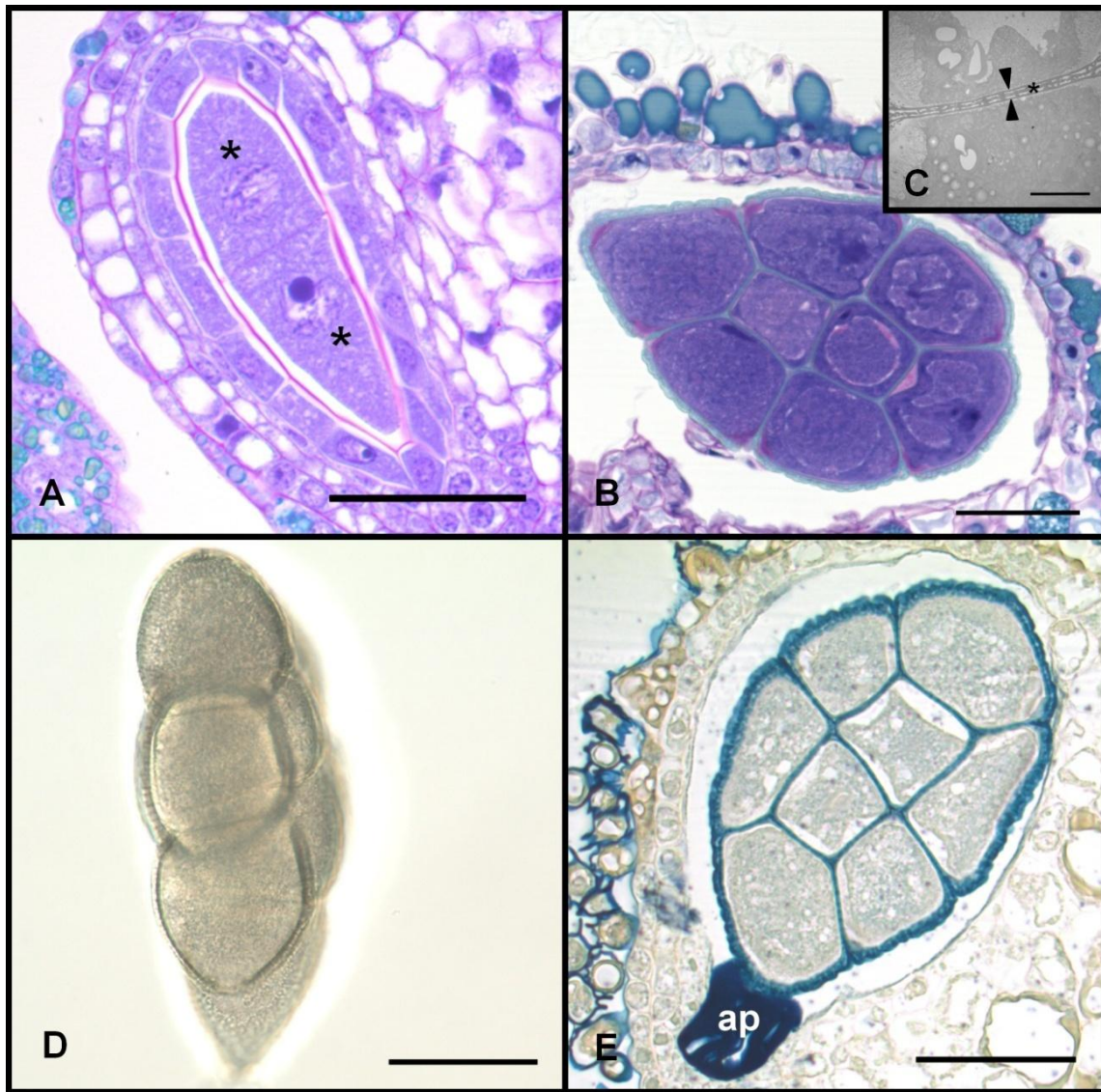


Fig. 1. *Calliandra brevipes* pollen mother cells and polyads under light microscopy (A and B, Toluidine blue staining; D, fresh and untreated material in immersion oil; and E, Sudan black B staining) and transmission electron microscopy (TEM, C). A. Pollen mother cells (*). B. Ellipsoidal, drop-shaped polyad formed by eight pollen grains. C. Contact region between pollen grains in the inner portion of the polyad, showing the exine (calymmate polyad). Note presence of endexine (arrow heads), columellae and tectum (*). D. Polyad lateral view showing its flattened shape, with only one layer of pollen grains. E. Viscous pollen adhesive (ap) attached to the apical pollen grain of the polyad in pre-anthesis anther. Scale bars: A, B, D, E = 50 μ m; C = 10 μ m.

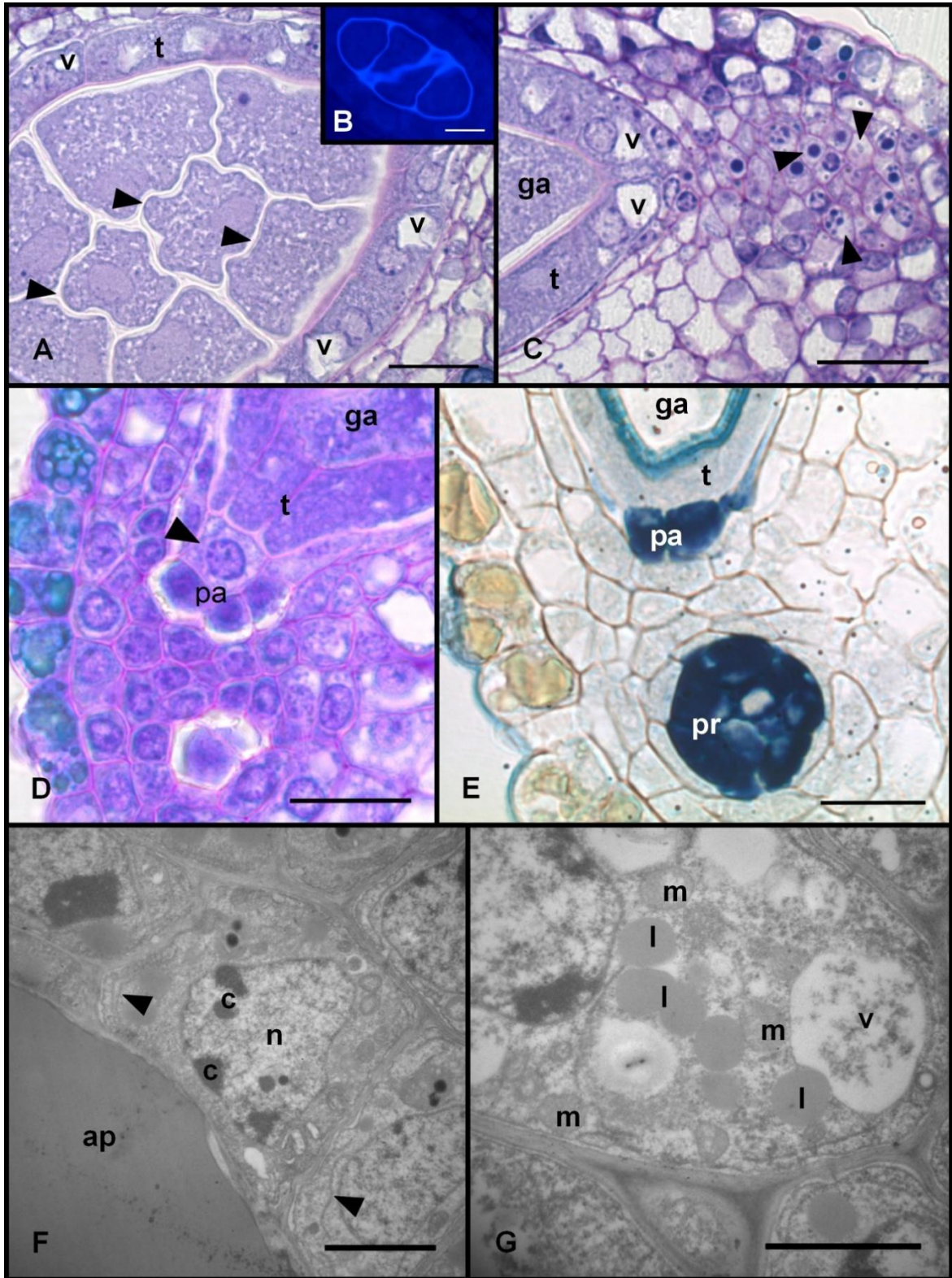


Fig. 2. Polyads and anther cells of *Calliandra brevipes* under light microscopy (A, C and D, Toluidine blue staining; B, Aniline blue staining – fluorescence; E, Sudan black B staining) and transmission electron microscopy (TEM, F and G). A. Androspores surrounded by callose (arrow heads). Tapetum cells (t) are starting to degenerate (presence of vacuoles - v). B. Fluorescing callose wall. C. Transversal septum region of the anther showing cells with high metabolic activity, represented by its conspicuous nucleus and manifold mitotic figures (arrow heads). Note the proximity of these cells in relation to the locule, at the apical pollen grain region (ga) surrounded by tapetal cells (t) containing vacuoles (v). D. Cells of the adjacent parenchyma (pa) showing conspicuous nucleus and densified chromatin (arrow head). Tapetum (t) is still cellularized next to the polyad apical pollen grain (ga). E. Adjacent parenchyma (pa) immediately next to tapetum (t) and to the apical pollen grain (ga) of the polyad, presenting initial pollen adhesive accumulation, composed mainly of lipids (stained in blue). The same phenomenon is observed in anther transversal septum parenchymatic cells (pr). F. Pollen adhesive-producing cell showing conspicuous nucleus (n) with densified chromatin (c) and many smooth and rough endoplasmic reticulum in its cytoplasm (arrow heads). Note the pollen adhesive accumulation (ap). G. Pollen adhesive-producing cell with large number of mitochondria (m) and droplets of lipids (l) in its cytoplasm. Note the large vacuole containing fibrogranular material (v). Scale bars: A, B, C, D, E = 20 μ m; F, G = 3 μ m.

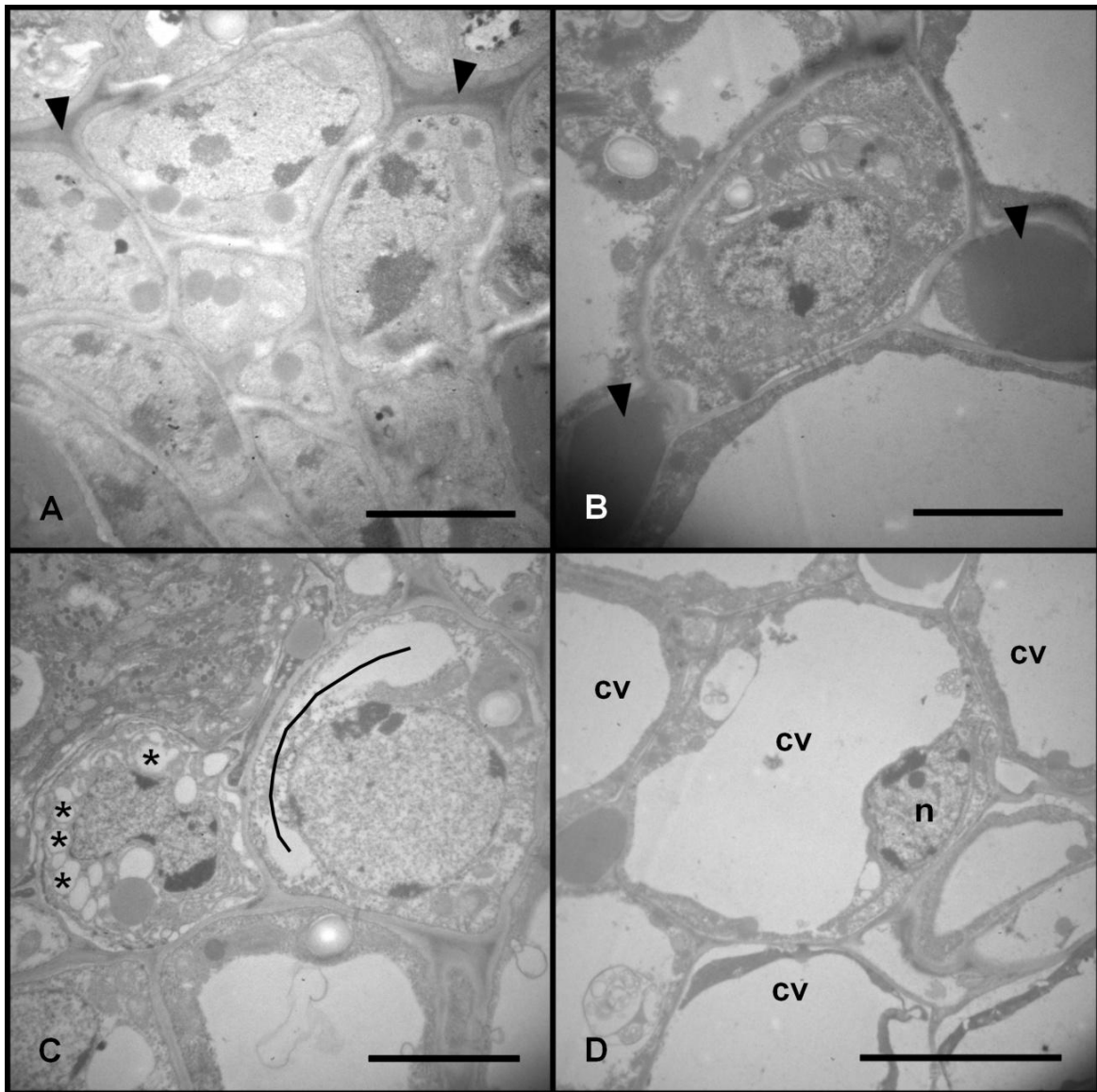


Fig. 3. Transversal septum with parenchymatic cells of the anther, and pollen adhesive producing cells in *Calliandra brevipes* (TEM). A. Early accumulation of pollen adhesive in the intercellular spaces (arrow heads). B. Advanced stage of adhesive accumulation. Large amount of pollen adhesive has accumulated in the intercellular spaces (arrow heads). C. Begin of the vacuolation process in adhesive producing cells. Note the presence of small vacuoles (*) in the cytoplasm that later coalesce, forming only one large vacuole (line). D. Adhesive producing cells in advanced stage of vacuolation (cv). Note the cell nucleus leaning to the cell wall (n). Scale bars: A, B, C = 5 μm ; D = 10 μm .

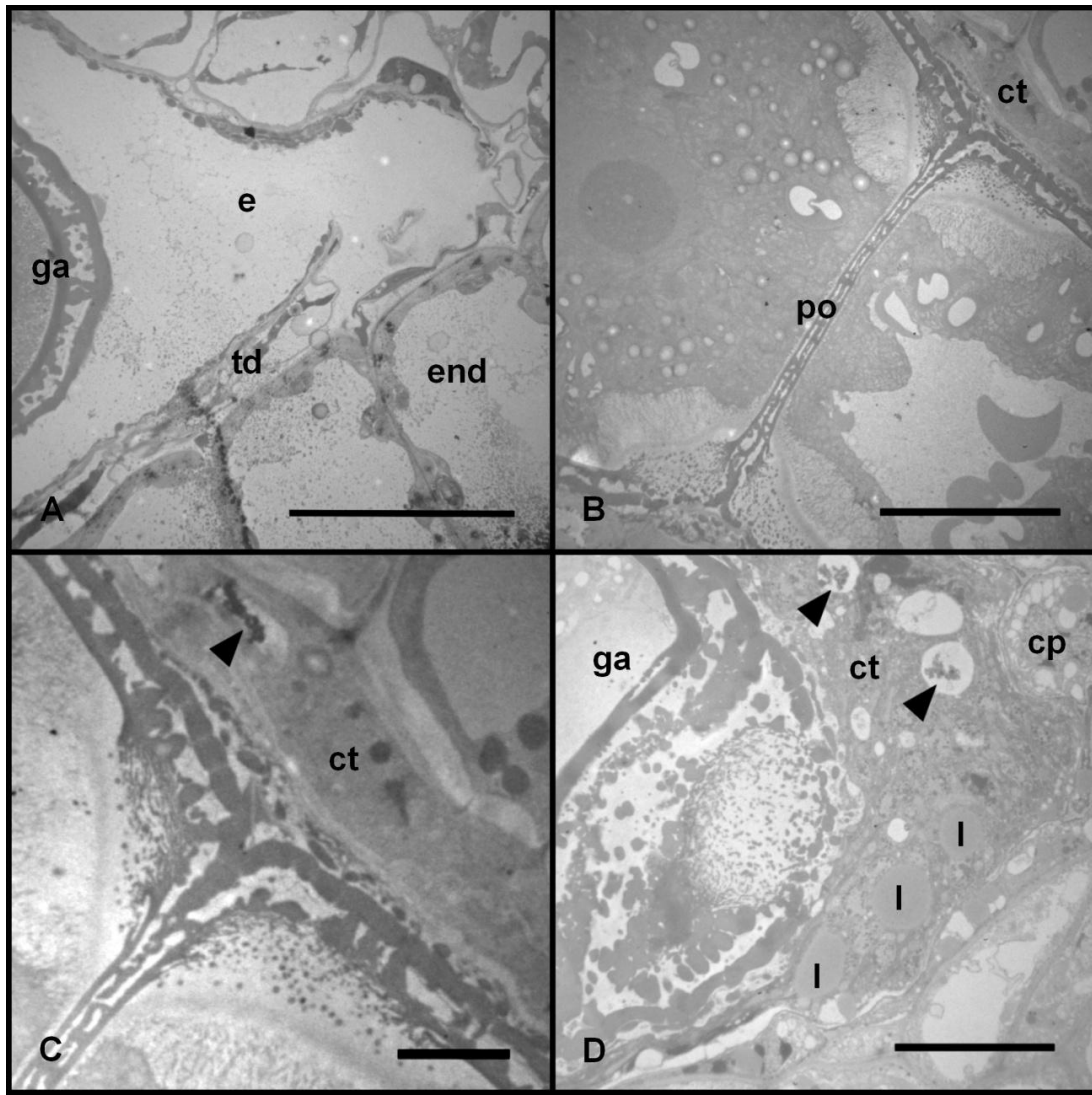


Fig. 4. Anther locule region of *Calliandra brevipes* (TEM). A. Space (e) resulting from degeneration of the parenchymatic cells adjacent to the locule and transversal septum cells of the anther, linking the adhesive accumulation region to the apical pollen grain (ga). Note remnants of the middle layers (td) near to the endothecium (end). B. Cytoplasmic content (ct) of the degenerating tapetum on the side of the polyad (po). C. Degenerating tapetum cytoplasmic content (ct) showing vacuoles with fibrogranular material inside (arrow head). D. Locule region next to the apical pollen grain (ga) filled with cytoplasmic content (ct) of the tapetum showing droplets of lipid (l) and vacuoles containing fibrogranular material (arrow heads). Note adhesive-producing cells (cp) in which the degeneration process (lysis) starts by vacuolation. Scale bars: A, B = 20 μm ; C = 5 μm ; D = 10 μm .

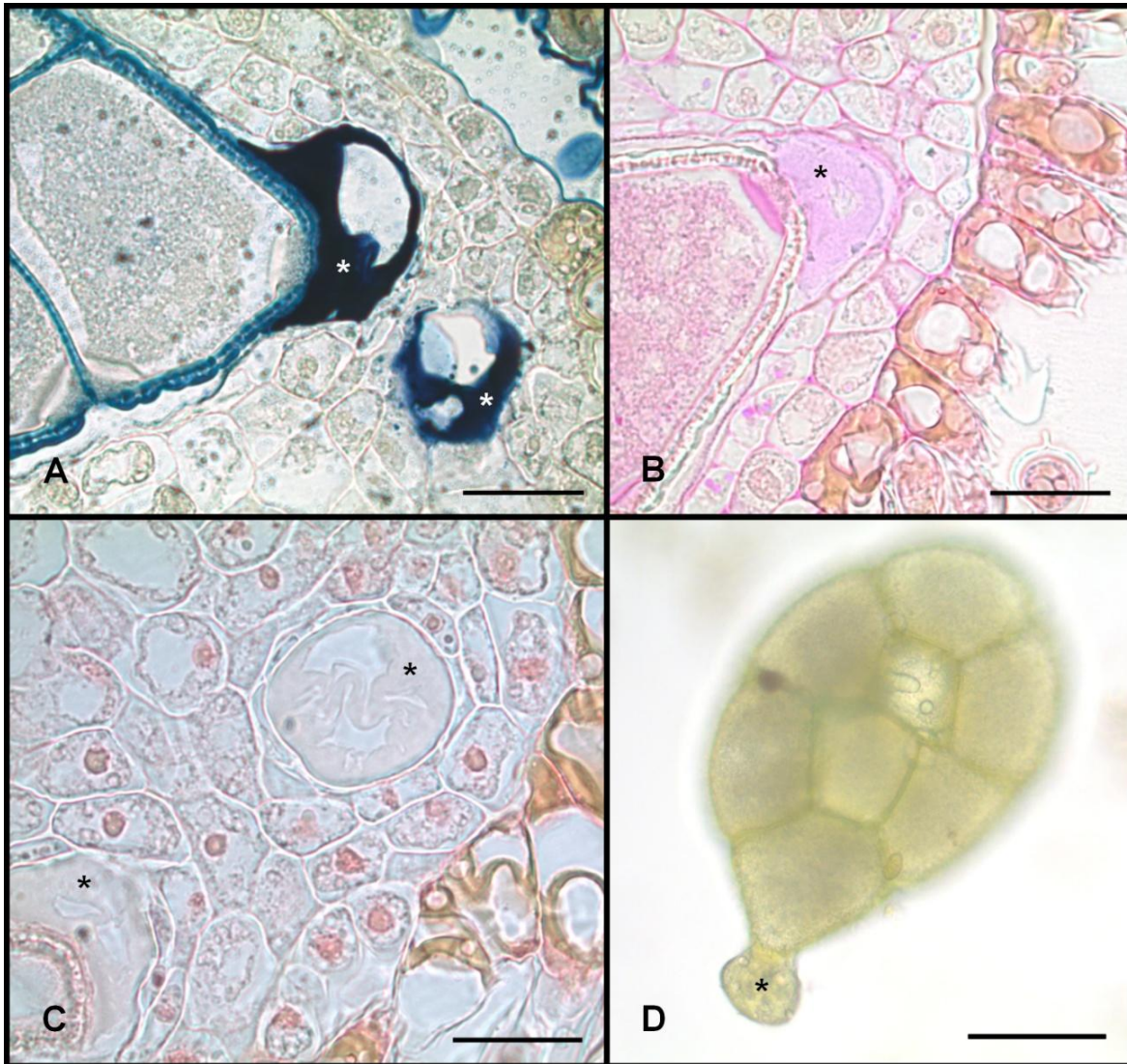


Fig. 5. Pollen adhesive in polyads of *Calliandra brevipes* (A, Sudan black B staining; B, PAS reaction; C, xylidine de Ponceau staining; D, fresh living material in cupric acetate at 7%). A. Pollen adhesive showing positive reaction for lipids (*). B. Pollen adhesive showing low positive reaction for carbohydrates (*). C. Pollen adhesive showing no reaction for proteins (*). D. Pollen adhesive showing no reaction for resin substances (*). Scale bars: A, B, C = 20 µm; D = 50 µm.

Discussion

We found that, unlike *Calliandra angustifolia* (Prenner and Teppner, 2005; Teppner, 2007b), pollen adhesive of *C. brevipes* is not only produced by parenchymatic cells of the anther transversal septum but also by parenchymatic cells adjacent to the locule at the apical pollen grain region. Moreover, the tapetum also contributes to the chemical composition of the pollen adhesive since its cytoplasm mixes with the adhesive substance produced by the adjacent parenchymatic cells. Therefore, considering that many similarities were found, pollen adhesive in *C. brevipes* can be compared with other two adhesive substances, the pollenkitt and the tryphine (Dickinson and Lewis, 1973; Pacini and Hesse, 2005), which are the main pollen coat forms known so far (Hesse, 2010).

Pollenkitt and tryphine are similar to each other in many respects because both substances are formed by fusion of elaiosomes and spherosomes produced in tapetum cells (Platt et al., 1998). Unlike these substances, no plastids participate in the formation of the lipid droplets of the elastoviscin, an adhesive substance present in Orchidaceae species also produced by tapetum cells (Pacini and Hesse, 2005; Hesse, 2010). Regarding the pollen adhesive in *Calliandra*, it is more similar to the tryphine than to the pollenkitt because organelles, cytoplasmic remnants and lipids from degenerated tapetum cells participate in its composition, while pollenkitt has only the lipidic fraction of the tapetum cell plastids and endoplasmic reticulum in its composition (Hesse, 2010). Furthermore, the cellular machinery of the pollen adhesive-producing cells in *C. brevipes* is quite similar to the subcellular features of the tryphine-producing tapetum in *Raphanus* (Brassicaceae) (Dickinson and Lewis, 1973).

Tryphine is composed of substances released inside the anther locule when tapetum cells disintegrate. It fills the cavities of the pollen wall between the columellae (bacula) of the exine (Mariani and Wolters-Arts, 2000), and covers the pollen grains in the same way as the pollenkitt (Pacini and Hesse, 2005). Its function in relation to the pollination process and pollen-stigma recognition has been discussed by Dickinson and Lewis (1973) and Mariani and Wolters-Arts (2000). In *Arabidopsis* and other Brassicaceae, a tryphine conversion forms a lipid and protein foot between the pollen grain and the

papillae of the stigmatic surface and establishes a hydraulic contact that allows pollen rehydration and germination (Mariani and Wolters, 2000). However, in *C. brevipes* the adhesive deposition occurs only on the apical pollen grain, suggesting that its ecological function is only related to polyad transportation (adherence to the pollinator body) and secondary pollen presentation. The polyad adherence to the anther during the first polyad presentation (early anthesis) seems to be the responsibility of the pollenkitt found on the polyad surface (Teppner, 2007b). The polyad of *Calliandra* is considered large, which could impede its transportation success if it were not aerodynamically shaped (flattened) and if it did not have the pollen adhesive, which guarantees the transfer of the pollen (usually shed in small amounts in this genus) to the stigmas (Greissl, 2006).

No reports were found in the literature of pollen adhesive which is comprised of derivatives from tapetum cells mixed with derivatives from extra-tapetal cells. Nevertheless, a rare type of adhesive substance, different from pollenkitt and tryphine, is found in some Araceae (monocot) species, originating not only from tapetum cells but also from locular substances during pollen mother cell stage, forming the so called “pollen droplets” or “pollen-strands” (Hesse et al., 2010).

Although protein was not detected in pollen adhesive of *Calliandra brevipes* in histochemical tests, a fibrogranular material very similar to those found in tryphine composition with proteinaceous nature was revealed by ultrastructural analysis (Dickinson and Lewis, 1973). Furthermore, ontogenetic studies made by Greissl (2006) demonstrated that pollen adhesive, wrongly called “viscin body” in his study, contains small amounts of protein forming a thin layer covering the wax-like mixture (Greissl, 2006). The presence of this substance seems to maintain adhesive structure after its dehydration and stiffening provided by its contact with the air during anthesis, when *C. brevipes* polyads are exposed, such as in tryphine (Dickinson and Lewis, 1973), since resin substances could not be detected in the performed tests.

Our data show that the sites of pollen adhesive production in *Calliandra* may vary among species, perhaps depending on the pollinator behavior and the way the flower is exposed in the plant. However, we believe that studies of polyad adhesive production in

the genus should be standardized in order to verify the information already available in literature.

Acknowledgments

We thank the following people for their contributions to this study: M.D. S. Ferreira, J. A. Maulin (FMRP/USP), and E. S. Campos (FCFRP/USP) for technical assistance; D. Litwiller (University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada) for English revision. CNPq supported LCC and SPT (process number 302204/2012-1).

References

- Armbruster, W.S., 1984. The role of resin in angiosperm pollination: ecological and chemical considerations. *American Journal of Botany* 71, 1149-1160.
- Barneby, R.C., 1998. Silk Tree, Guanacaste, Monkey's Earring: A generic system for the synandrous Mimosaceae of the Americas. Part III. *Calliandra*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 74, 1-223.
- Chamberlain, J.R., Hubert, J.D., 2001. *Calliandra calothyrsus*. An agroforestry tree for the humid tropics. *Tropical Forestry Papers*. 40, 12-27.
- Dickinson, H.G., Lewis, D., 1973. The formation of the tryphine coating the pollen grains of *Raphanus*, and its properties relating to the self-incompatibility system. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 184, 149-165.
- Feder, N., O'Brien, T.P., 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55, 123-142.
- Gerrits, P.O., 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology, State University Groningen, Netherlands.
- Greissl, R., 2006. Ontogeny of the *Calliandra* – massulae (Mimosaceae: Ingeae), and the associated viscin body. *Flora* 201, 570-587.
- Haber, W.A., Fankie, G.W., 1989. A tropical hawkmoth community: Costa Rican dry forest Sphingidae. *Biotropica* 21, 155-172.
- Hesse, M., Halbritter, H., Zetter, R., Weber, M., Buchner, R., Frosch-Radivo, A., Ulrich, S., 2009. Pollen terminology: an illustrated handbook. Springer Wien, New York.
- Hesse, M., 2010. Bonding single pollen grains together: how and why? In: Von Byern, J., Greenwold, I. (Eds.), *Biological adhesive systems. From nature to technical and medical application*. E-book Springer, Berlin, pp. 3-12.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York.

- Arroyo, K.M.T., 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill, R.M., Raven, P.H. (Eds.), *Advances in Legume Systematics. Part 2*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 723-769.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27, 137A-138A.
- Leonhardt, S.D., Bluthgen, N., 2009. A sticky affair: resin collection by Bornean stingless bees. *Biotropica* 41, 730-736.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M., 2005. *Legumes of the world*. The Royal Botanical Gardens, Kew.
- Lorenzi, H., Souza, H.M., 1995. *Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. Editora Plantarum, Nova Odessa.
- MacQueen, D.J., Hernández, H.M., 1997. A Revision of *Calliandra* Series *Racemosae* (Leguminosae: Mimosoideae). *Kew Bulletin* 52, 1- 50.
- Mariani, C., Wolters-Arts, M., 2000. Complex waxes. *The Plant Cell* 12, 1795- 1798.
- Martius, C.F.P., Eichler, A.G., 1840-1906. *Flora Brasiliensis*. Vol. XV, Part II, Fasc. 70, Coluna 415-416.
- Moyano, F., Cocucci, A., Sérsic, A., 2003. Accessory pollen adhesive from glandular trichomes on the anthers of *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae). *Plant Biology* 5, 411-418.
- O'Brien, T.P., Feder, N., MacCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.
- O'Brien, T.P., MacCully, M.E., 1981. *The study of plants structure. Principles and selected methods*. Thermarcaphy Ltd., Melbourne.
- Pacini, E., Hesse, M., 2005. Pollenkitt – its composition, forms and functions. *Flora* 200, 399-415.
- Pearse, A., 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. Vol. II, 4th ed. Longman Group Limited, Harlow.
- Platt, K.A., Huang, A.H.C., Thomson, W.W., 1998. Ultrastructural study of lipid accumulation in tapetal cells of *Brassica napus* L. Cv. Westarduring microsporogenesis. *International Journal of Plant Sciences* 159, 724-737.
- Prenner, G., Teppner, H., 2005. Anther development, pollen presentation and pollen adhesive of parenchymatous origin in *Calliandra angustifolia* (Leguminosae – Mimosoideae – Ingeae). *Phyton* 45, 267-286.
- Reynolds, E.W., 1963. Use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17, 208-212.
- Santos, F.A.R., Romão, C.O., 2008. Pollen morphology of some species of *Calliandra* Benth. (Leguminosae - Mimosoideae) from Bahia, Brazil. *Grana* 47, 101-116.
- Teppner, H., 2007a. Notes on terminology for *Mimosaceae* polyads, especially in *Calliandra*. *Phyton* 46, 231-236.
- Teppner, H., 2007b. Polyad development and karyology in *Inga* and *Calliandra* (Mimosaceae-Ingeae): a reply to a recent paper in *Flora*. *Phyton* 47, 1-46.
- Teppner, H., Stabentheiner, E., 2007. Anther opening, polyad presentation, pollenkitt and pollen adhesive in four *Calliandra* species (Mimosaceae-Ingeae). *Phyton* 47, 291-320.

Watson, M.L., 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.
The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 4, 475-478.

CAPÍTULO 3: Desenvolvimento e fertilidade do pólen na políade de duas espécies de *Inga* Mill. com sementes poliembriônicas (Leguminosae, Mimosoideae)

Resumo

Inga se destaca entre as leguminosas por incluir alguns representantes poliembriônicos e dispersar o pólen em políades, duas condições pouco usuais na família. A coocorrência de poliembrionia (presença de dois ou mais embriões na mesma semente) e políade (agregado de grãos de pólen) em um táxon surpreende e levanta questões acerca do funcionamento destes mecanismos. Assim, o desenvolvimento e a fertilidade dos grãos de pólen nas políades foram estudados em duas espécies de *Inga* relatadas como poliembriônicas, *I. laurina* e *I. vera*, a fim de verificar a funcionalidade do pólen neste grupo. Para isso, anteras em vários estádios de desenvolvimento foram coletadas e processadas para análises histológicas, e políades retiradas de material fresco foram submetidas a testes de germinação *in vitro*. As políades de *I. laurina* e *I. vera* apresentam desenvolvimento semelhante ao de outras espécies de Mimosoideae. Porém, há permanência prolongada das células do tapete, o que geralmente causa aborto polínico, e é provável que as espécies sejam poliploides, o que pode resultar nas baixas taxas de germinação polínica encontradas. Anormalidades morfológicas no decorrer do desenvolvimento da políade foram observadas apenas em *I. vera*. A ocorrência da poliembrionia somada à formação de megagametófitos sexuais e a germinabilidade dos grãos de pólen indica provável ocorrência de apomixia facultativa nestas espécies.

Introdução

Políades são unidades de dispersão polínica formadas por duas ou mais tétrades unidas estruturalmente entre si. Assim como outras formas de agrupamento polínico, são resultado da forte seleção sexual e de fecundidade (Harder & Johnson 2008) que promovem grande eficiência na fertilização de óvulos (Koptur 1984, Pennington 1997), com seleção de menor razão pólen:óvulo (Cruden 1977, Cruden & Jensen 1979, Cruden 2000, Harder & Johnson 2008).

A dispersão dos grãos de pólen em forma de políades evoluiu de forma independente nas angiospermas e sua ocorrência é registrada para apenas quatro famílias deste grupo: Annonaceae (Magnolídea), Celastraceae e Leguminosae (Eudicotiledônea), e Hydrocharitaceae (Monocotiledônea) (Harder & Johnson 2008). Leguminosae apresenta 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies que compõem majoritariamente a maioria dos tipos de vegetação que ocorrem no mundo (Lewis *et al.* 2005), destacando-se, portanto, entre as quatro famílias, por ser a maior em número de espécies e a mais amplamente distribuída.

A ocorrência de políades em Leguminosae é muito frequente na subfamília Mimosoideae, que apresenta quatro tribos, e cerca de 3.270 espécies (Lewis *et al.* 2005). Trabalhos de caracterização polínica na subfamília são encontrados para os gêneros *Calliandra* (Prenner & Teppner 2005, Santos & Romão 2008, Capucho & Teixeira 2013), *Piptadenia* (Caccavari 2002), *Parkia* (Feuer *et al.* 1985) e *Acacia* (Arce & Banks 2001). Além destes, uma avaliação mais detalhada da parede do pólen foi realizada na tribo Ingeae (Niezgoda *et al.* 1983), considerada de difícil delimitação taxonômica (Guinet 1989), resultando na definição de dois tipos de políades na tribo: (1) políades de *Calliandra* com oito grãos de pólen e calimadas; e (2) políades do restante dos gêneros da tribo, incluindo algumas espécies de *Calliandra*, com 16 grãos de pólen, predominantemente acalimadas (Niezgoda *et al.* 1983).

O gênero *Inga* Mill. (tribo Ingeae) exhibe espécies que apresentam e liberam políades contendo 16 a 32 grãos de pólen, e a variação interespecífica na quantidade de grãos de pólen por políade é similar à de número de óvulos por ovário (Pennington 1997). *Inga* compreende cerca de 300 espécies de árvores ou arbustos com ocorrência restrita à

América tropical e a estrutura seminal de seus representantes, com embrião envolto por uma sarcotesta, branca e açucarada, atrativa aos dispersores, distingue este gênero de todos os outros de Mimosoideae (Pennington 1997).

Outro fenômeno interessante encontrado em *Inga* é a poliembrionia, que consiste na produção de um ou mais embriões em uma mesma semente (Lersten 2004, Batygina & Vinogradova 2006). A origem dos embriões supranumerários ainda não é conhecida neste grupo; sabe-se que eles podem surgir espontaneamente a partir de células do saco embrionário (origem gametofítica, herança biparental), ou de tecidos do óvulo e do embrião (origem esporofítica, herança uniparental) (Batygina & Vinogradova 2006), e que podem tanto se desenvolver junto ao embrião sexuado como substituí-lo completamente (Lersten 2004).

Em Leguminosae, casos de poliembrionia têm sido relatados em poucas espécies, incluídas nas três subfamílias: Mimosoideae - *Inga laurina* (Mendes-Rodrigues *et al.* 2007, Mendes-Rodrigues 2010), *I. vera* (Mendes-Rodrigues *et al.* 2007), *I. feuillei* (Boelcke 1946) e *Acacia polyphylla* (Salomão & Allem 2001, Mendes-Rodrigues 2010); Caesalpinioideae - *Copaifera langsdorffii* (Salomão & Allem 2001, Mendes-Rodrigues 2010), *Hymenaea courbaril*, *Senna macranthera* e *Senna sylvestris* (Mendes-Rodrigues 2010); Papilionoideae - *Tipuana tipu* (Villari 1990-1991), *Dalbergia* sp. (Moreira & Moreira 1996), *Machaerium acutifolium* e *Ormosia arborea* (Mendes-Rodrigues 2010). Porém, a ocorrência de poliembrionia em *Acacia polyphylla*, *Copaifera langsdorffii* (V. G. Leite, comunicação pessoal) e *Tipuana tipu* (Martins e Oliveira 2001) não foi confirmada, mostrando que este fenômeno tem sido pouco estudado e provavelmente subestimado entre as leguminosas.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que relacionem a ocorrência de poliembrionia ao desenvolvimento do pólen em espécies com políades. Esta relação é considerada de grande interesse, pois a ocorrência de políades, estruturas consideradas capazes de fertilizar todos os óvulos de uma flor compatível aos seus grãos de pólen viáveis (Koptur 1984, Pennington 1997), é concomitante à de um fenômeno que pode depender ou não da fertilização para produção dos embriões supranumerários. Sabendo-se que a esterilidade masculina está frequentemente relacionada à produção de embriões assexuados

(Richards 1997), o estudo do desenvolvimento e da fertilidade dos grãos de pólen em espécies com sementes poliembriônicas pode prover informações importantes para a compreensão da coocorrência desses fenômenos em uma espécie.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo verificar a viabilidade/funcionalidade das políades nas espécies poliembriônicas *Inga laurina* (Sw.) Willd. e *I. vera* Willd., por meio do estudo de seu desenvolvimento e sua fertilidade. A ocorrência de anormalidades morfológicas no decorrer do desenvolvimento das políades é enfatizada. Os dados de desenvolvimento obtidos serão discutidos também com vistas a subsidiar a sistemática do grupo.

Material e Métodos

Espécies estudadas

Foram selecionadas duas espécies poliembriônicas de *Inga*, pertencentes a seções diferentes, de acordo com Pennington (1997): *Inga laurina* (Sw.) Willd., pertencente à seção *Bourgonia*; e *I. vera* Willd., pertencente à seção *Inga*.

O material foi coletado de cinco indivíduos de cada espécie, localizados no campus da USP de Ribeirão Preto, SP, e no Parque Municipal Maurílio Biagi, também em Ribeirão Preto, SP. A ocorrência de poliembrionia nestes mesmos indivíduos foi comprovada por Raquel Silva Costa por meio de testes de germinação e cortes anatômicos das sementes (comunicação pessoal).

Material testemunha foi depositado no Herbário SPFR, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, sob os números S. P. Teixeira 74 (*I. laurina*), e S. P. Teixeira 75 (*I. vera*).

Desenvolvimento dos grãos de pólen/políades

A ocorrência de anormalidades morfológicas no decorrer do desenvolvimento das políades foi examinada em estudos anatômicos. Anteras foram removidas de botões florais de vários

tamanhos e de flores e fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 horas, lavadas em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3), ou em FAA 50 também por 24 horas (Johansen 1940). O material foi, então, desidratado em série etanólica, estocado em álcool 70%, e incluído em historresina (Gerrits 1991). Secções transversais e longitudinais, com 2 a 3 µm, foram obtidas em micrótomo rotativo Leica RM 2245 e coradas com azul de toluidina 0,05% pH 4,4 (O'Brien *et al.* 1964).

Secções semifinas (0,5 µm) também foram obtidas a partir de material fixado em Karnovsky (Karnovsky 1965), pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% (tampão fosfato 0,1M e pH 7,3) por 2 horas, desidratado gradualmente em série acetônica, incluído em resina epóxi Araldite 502 Polysciences, seccionado com auxílio de um ultramicrotomo Leica ultracut S Reichert. As secções foram coradas com azul de Toluidina 0,05% (O'Brien *et al.* 1964) e observadas em microscopia de luz.

Fotomicrografias foram obtidas em um fotomicroscópio Leica DM 4500 B acoplado a uma câmera digital Leica DFC 320, sendo as escalas obtidas nas mesmas condições ópticas.

A terminologia utilizada na descrição dos resultados segue Hesse e colaboradores (2009), Evert (2006) e Lersten (2004).

Fertilidade polínica

Testes de germinação *in vitro* foram realizados em políades removidas de anteras de 10 flores, provenientes de 10 inflorescências diferentes, coletadas em cinco indivíduos de cada espécie. Dez políades por flor, 100 por indivíduo, foram analisadas para a contagem dos tubos polínicos, um total de 8000 grãos de pólen analisados para *Inga laurina*, e 12000 para *I. vera* (Tabela 1).

A composição do meio de germinação utilizado foi de 2% de gelatina incolor, 20% de sacarose, 0,01% de ácido bórico e 0,05% de nitrato de cálcio. Os grãos de pólen/políades colocados no meio de germinação foram incubados no escuro e em temperatura ambiente por até 24 horas (metodologia modificada de Santos & Mariath 1997). Posteriormente, o material foi analisado em microscópio de luz para a contagem de

tubos polínicos emitidos. Foram considerados férteis os grãos de pólen apresentando tubo polínico com comprimento mínimo equivalente ao dobro do diâmetro do grão de pólen ao qual pertence, como padronizado por Stiehl-Alves & Martins-Corder (2007) para germinação de políades em *Acacia mearnsii* De Wild.

Resultados de fertilidade polínica obtidos para cinco indivíduos de *Inga edulis* Mart., espécie monoembriônica, foram utilizados para fins de comparação do método.

Resultados

Desenvolvimento dos grãos de pólen/políades

Inga laurina - cada sublóculo contém uma única célula esporogênica inicial que passa por divisões mitóticas que originam quatro células-mãe de micrósporos (Figura 1 A). Cada célula-mãe de micrósporo passa por divisões meióticas simultâneas originando uma tétrade tetraédrica, cujos micrósporos se mantêm unidos e envoltos por uma parede de calose que os isolam uns dos outros e das células do tapete (Figura 1 B). Durante a deposição da primexina, os micrósporos ainda estão envolvidos por calose (Figura 1 C). Com a deposição da exina, as paredes de calose são dissolvidas, mas os micrósporos se mantêm unidos. As células do tapete permanecem, tomando forma periplasmodial (Figura 1 D), degenerando-se pouco antes da antese, quando é possível observar orbículos formando a membrana tapetal (Figura 1 E). As políades são compostas por 16 grãos de pólen, são acalimadas, com as paredes entre os grãos contendo apenas endexina (Figura 1 E). Nota-se que os grãos de pólen são facilmente destacáveis uns dos outros (Figura 1 F), em especial no momento da deposição da políade no estigma.

Inga vera – cada sublóculo contém uma única célula esporogênica inicial, que passa por subseqüentes divisões mitóticas (Figura 2 A), que dão origem a seis células-mãe de micrósporos (Figura 2 B). Cada célula-mãe passa por divisões meióticas simultâneas originando uma tétrade tetraédrica, cujos micrósporos se mantêm unidos e envolvidos por uma espessa parede de calose (Figura 2 C). Cada um dos micrósporos também se apresenta envolvido por uma segunda parede de calose (Figura 2 C). Após a deposição da primexina,

as paredes de calose são degradadas e os micrósporos se mantêm unidos (Figura 2 D). Nesta fase é possível observar a formação de pequenos vacúolos nas células do tapete (Figura 2 D), as quais, no entanto, permanecem até o final da deposição da exina, tomando forma periplasmodial (Figura 2 E). A degeneração do tapete só ocorre ao final do desenvolvimento das anteras, próximo ao processo de deiscência. Orbículos não foram observados nesta espécie. As políades de *I. vera* são acalimadas e apresentam 24 grãos de pólen fracamente coesos (Figura 2 F).

Algumas anormalidades foram observadas na morfologia de células-mãe de micrósporos e grãos de pólen/políades de *Inga vera*, tanto na esporogênese quanto na gametogênese (Figura 3): células-mãe de micrósporos com núcleos contendo regiões não ocupadas pela cariolinfa (aspecto vazio) durante a prófase mitótica, enquanto as células da camada média apresentam-se vacuoladas, porém com paredes celulares íntegras (Figura 3 A); políades apresentando deformações nas paredes dos grãos de pólen em anteras contendo células do tapete persistentes, cujas paredes se desprendem, adotando aspecto periplasmodial (Figura 3 B); políades com grãos de pólen apresentando parede completamente formada e citoplasma em processo de degeneração, em anteras com células da camada média completamente degeneradas, como esperado para este estágio (Figura 3 C) e/ou políades apresentando grãos de pólen com citoplasma completamente degenerado (Figura 3 D).

Em *Inga laurina* não foram observadas anormalidades morfológicas no decorrer no desenvolvimento das políades.

Os dados de desenvolvimento e morfologia dos grãos de pólen/políades obtidos para as duas espécies estão resumidos e comparados entre si e aos dados encontrados na literatura para *Inga feuillei* DC., outra espécie do gênero com semente poliembriônica, na Tabela 2.

Fertilidade polínica

As taxas de germinação polínica foram menores que 52% nas três espécies de *Inga*, chegando a 0,2% em um dos indivíduos. As taxas médias foram mais baixas para *I. laurina*

(13,1±8,7) e *I. vera* (4,9±7,9), espécies com sementes poliembriônicas, comparadas à de *I. edulis* (30,2±17,2), espécie com semente monoembriônica (Tabela 3).

Tabela 1. Número amostral utilizado nos testes de germinação *in vitro* do tubo polínico em grãos de pólen/políades de *Inga laurina* e *I. vera*.

Material analisado	Espécies estudadas	
	<i>I. laurina</i>	<i>I. vera</i>
Nº de indivíduos	5	5
Nº de flores por indivíduo	10	10
Total de flores por espécie	50	50
Nº de políades analisadas por flor	10	10
Nº de grãos de pólen por políade	16	24
Total de grãos de pólen analisados por flor	160	240
Total de grãos de pólen analisados por indivíduo	1600	2400
Total de grãos de pólen analisados por espécie	8000	12000

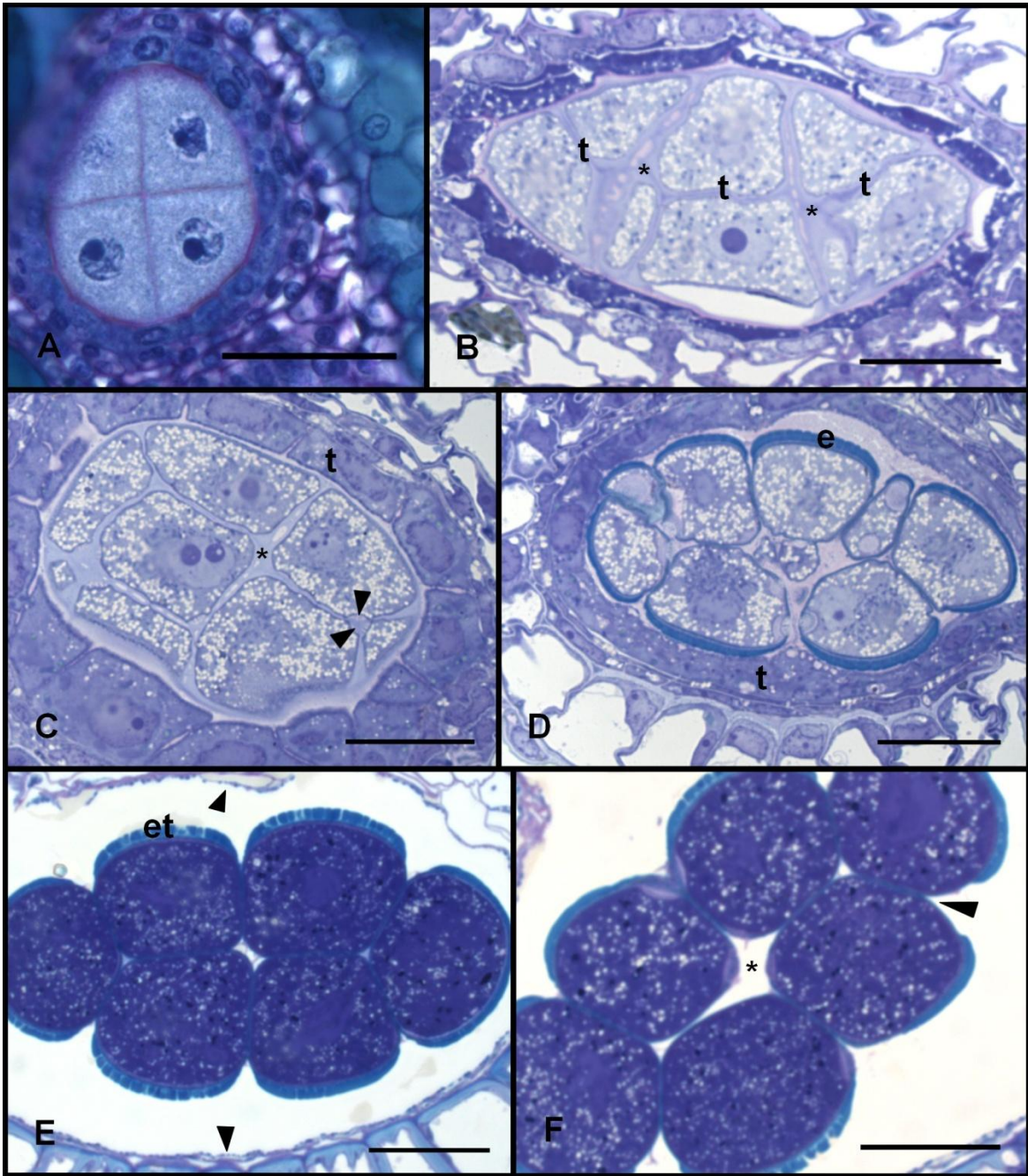


Figura 1. Fotomicrografias de políades em cortes transversais de anteras de *Inga laurina* (coloração: azul de Toluidina). A. Células-mãe de micrósporos. B. Três tétrades tetraédricas evidentes (t) com paredes de calose isolando-as umas das outras (*). C. Micrósporos ainda envolvidos pelas paredes de calose (*), com deposição da primexina iniciada e tapete celularizado (t); note a presença de numerosos grãos de amido no citoplasma da célula vegetativa e que o processo de formação das aberturas polínicas é iniciado (cabeças-de-seta). D. Políade com deposição da exina completa (e); note que o tapete permanece, porém toma forma periplasmodial neste estágio (t). E. Políade acalimada na fase de antese, apresentando ectexina apenas na região externa (et); note a presença de orbículos formando a membrana tapetal (cabeças-de-seta). F. Políade em antera deiscente; note que apenas endexina está presente na região de contato entre os grãos (seta), e os espaços entre eles (*) sugere que se desprendem facilmente uns dos outros. Escalas = 20 μm .

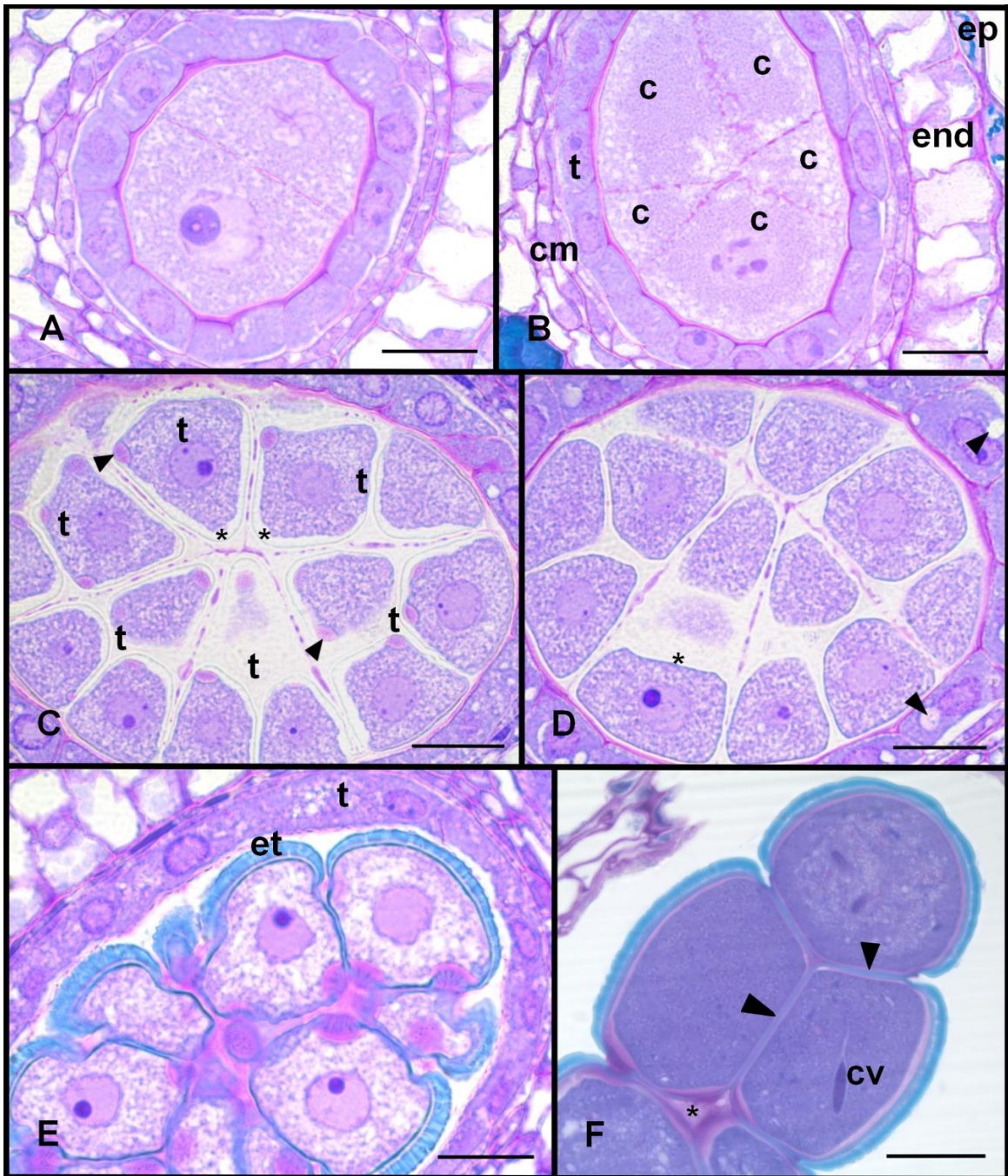


Figura 2. Fotomicrografias de políades em cortes longitudinais de anteras de *Inga vera* (coloração: azul de Toluidina). A. Duas células-mãe (c) originadas da primeira divisão mitótica da célula esporogênica. B. Cinco células-mãe de micrósporos discerníveis (c), envoltos pela camada única de células do tapete (t), adjacente às células da camada média (cm); note também as células vacuoladas do endotécio (end) e algumas células da epiderme (ep) da antera. C. Seis tétrades tetraédricas (t) com paredes de calose isolando-as umas das outras e uma segunda parede de calose isolando cada grão de pólen na tétrade (*); note o início da formação das aberturas polínicas nesta fase (setas). D. Micrósporos ainda envolvidos por calose com deposição de primexina iniciada; note que a segunda parede de calose, que envolvia cada grão, foi degradada (*) e a formação de pequenos vacúolos nas células do tapete (setas). E. Políade acalimada com deposição total da parede polínica; note a deposição de ectexina apenas na região externa da políade (et) e a permanência do tapete, que toma forma periplasmodial nesta fase (t). F. Políade em antera deiscente; note o núcleo da célula vegetativa em um dos grãos (cv) e que apenas a endexina está presente na região de contato entre os grãos (setas); o espaço entre os grãos (*) sugere o fácil desprendimento dos mesmos. Escalas = 20 µm.

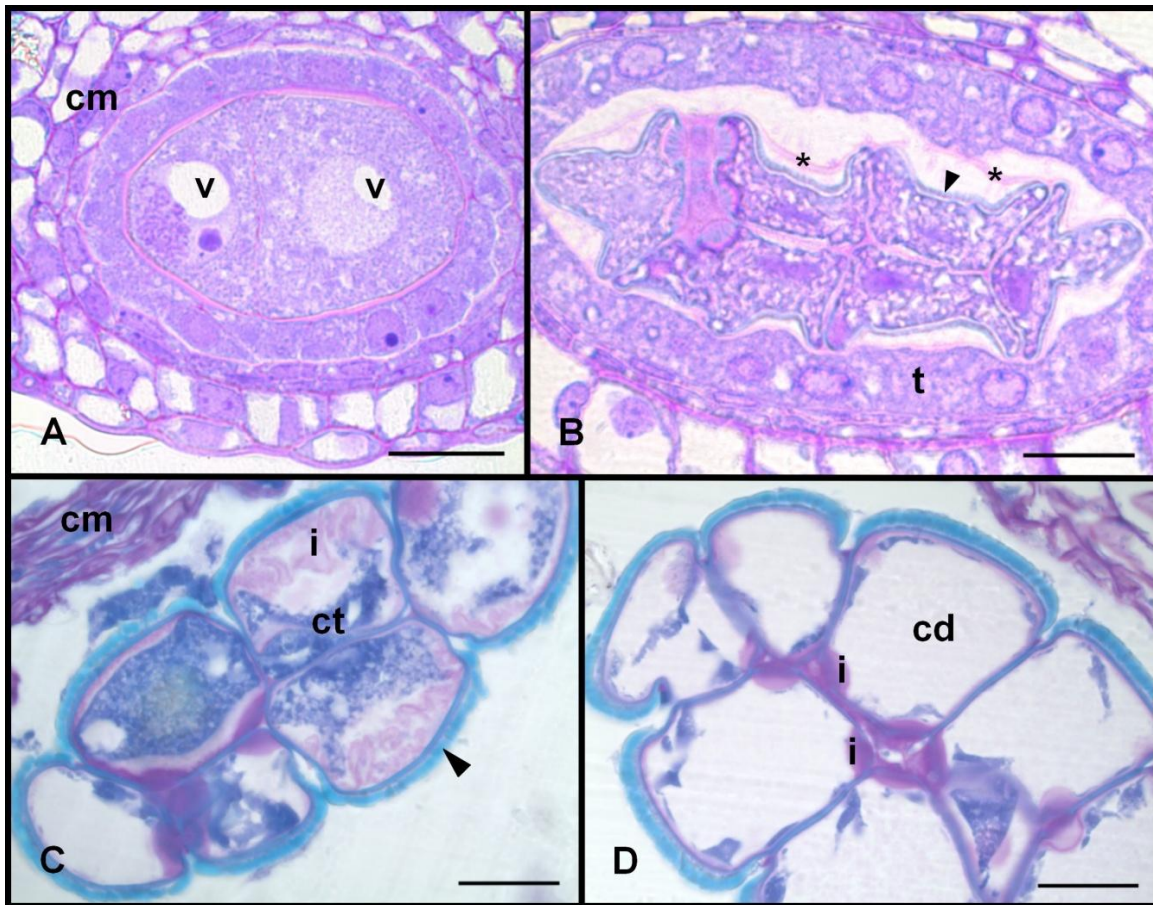


Figura 3. Fotomicrografias de células-mãe e políades de *Inga vera* apresentando anormalidades morfológicas (coloração: azul de Toluidina). A. Duas células-mãe apresentando núcleos contendo regiões não ocupadas pela cariolinfa durante a prófase mitótica, dando aspecto vazio (v); note que as células da camada média apresentam-se vacuoladas e com paredes celulares íntegras (cm). B. Políade apresentando deformações nas paredes dos grãos de pólen (cabeça-de-seta); note que as paredes das células do tapete voltadas para o lóculo se desprendem (*), e as células adotam aspecto periplasmoidal (t). C. Políade madura apresentando grãos de pólen com parede completamente formada (cabeça-de-seta) e citoplasma em degeneração; note a intina (i) e o restante do citoplasma (ct) em processo de degeneração; as células da camada média apresentam-se completamente degeneradas (cm) como esperado para este estágio. D. Políade apresentando grãos de pólen com citoplasma completamente degenerado (cd); note que a intina encontra-se estruturada na região dos poros (i). Escalas = 20 μ m.

Tabela 2. Resumo comparado das características do desenvolvimento de grãos de pólen/políades de espécies poliembriônicas de *Inga*. Célula vazia indica ausência de informação.

Características do desenvolvimento	<i>I. laurina</i>	<i>I. vera</i>	<i>I. feuillei</i>
Número de células-mãe de micrósporos	4	6	8-12
Número de paredes de calose na fase de tétrade	1	2	1
Tempo de permanência das paredes de calose	Início da deposição da parede polínica e formação dos poros	Início da deposição da parede polínica e formação dos poros	Deposição completa da parede polínica
Tempo de permanência das células do tapete	Deposição completa da parede polínica	Deposição completa da parede polínica	Deposição completa da parede polínica e formação dos poros
Tipo de políade formada	Acalimada	Acalimada	
Número de grãos de pólen por políade	16	24	32-48
Ocorrência de membrana tapetal	Presente	Ausente	Presente
Referência	Presente estudo	Presente estudo	Teppner (2007)

Tabela 3. Taxas de fertilidade (%) dos grãos de pólen/ políades de *Inga laurina*, *I. vera* (poliembriônicas) e *I. edulis* (monoembriônica).

Espécies	% de germinação de grãos de pólen		
	Variação entre indivíduos		Média
	Mín.	Máx.	
<i>I. laurina</i>	2,5	22,8	13,1±8,7
<i>I. vera</i>	0,2	17	4,9±7,9
<i>I. edulis</i>	7,8	52,4	30,2±17,2

Discussão

Os grãos de pólen das políades de *Inga laurina* e *I. vera* são capazes de emitir tubos polínicos e potencialmente fertilizar as células do saco embrionário, o que demonstra ausência de esterilidade masculina total nestas espécies. Além disso, a ocorrência da poliembria somada à formação de megagametófitos sexuais (R. S. Costa-Gerolineto, dados não publicados) e a germinabilidade dos grãos de pólen (presente estudo) sugerem a utilização do aparato sexual nestas espécies, indicando a ocorrência de apomixia facultativa (Nogler 1984).

A apomixia é uma forma de reprodução assexuada que utiliza alguns ou todos os aparatos sexuais, exceto a dupla fertilização e meiose completa, para produzir sementes viáveis (Koltunow & Grossniklaus 2003, Bicknell & Koltunow 2004, Lersten 2004, Bhat *et al.* 2005). Existem dois tipos de apomixia: gametofítica – surgimento de embriões supranumerários a partir de células do saco embrionário (herança biparental); e esporofítica – surgimento de embriões supranumerários a partir de tecidos do óvulo e do embrião (herança uniparental) (Batygina & Vinogradova 2006). Ambos os tipos podem ocorrer de forma obrigatória ou facultativa, em que apenas as etapas reprodutivas que envolvem o saco embrionário são afetadas, sendo os gametas masculinos produzidos normalmente (Bhat *et al.* 2005). A funcionalidade das sementes produzidas geralmente depende do desenvolvimento de um endosperma funcional (Nogler 1984) que, em espécies apomíticas, pode ser autônomo ou dependente da fecundação, fenômeno conhecido como pseudogamia (Asker & Jerling 1992, Koltunow 1993). Em espécies apomíticas (agamospérmicas) facultativas, o desenvolvimento do endosperma geralmente só ocorre após a fusão do núcleo da célula espermática aos núcleos haploides da célula média (Nogler 1984, Naumova 1993, Koltunow *et al.* 1995, Bhat *et al.* 2005).

As taxas de fertilidade polínica encontradas para todas as espécies estudadas de *Inga* são mais baixas que o encontrado para outras leguminosas com políades, como *Calliandra portoricensis*, que apresentou 98,2% de grãos de pólen viáveis (Gill & Husaini 1982). Além disso, as médias encontradas para *I. laurina* e *I. vera*, espécies com sementes poliembriônicas, não chegam à metade do valor encontrado para *I. edulis*, espécie com

semente monoembriônica (ver Tabela 3). As espécies apomíticas geralmente apresentam poliploidia (Carman 1997, Savidan 2007), e as espécies poliploides de origem híbrida, especialmente, podem apresentar baixas taxas de fertilidade polínica. A combinação de dois genomas em um híbrido interespecífico pode resultar em anormalidades na meiose (Nijs & Menken 1996, Risso-Paschotto *et al.* 2006), o que poderia explicar as anormalidades morfológicas encontradas em alguns estádios de desenvolvimento das políades de *I. vera*.

Apesar das baixas taxas de germinação do pólen, *I. laurina* não apresentou tais anormalidades (presente estudo), assim como *I. feuillei* (Teppner 2007), outra espécie poliembrionica. Teppner (2007) constatou também que *I. feuillei* não apresenta poliploidia, o que indica que a espécie se reproduza também sexualmente. A maioria das espécies com esterilidade masculina citoplasmática não apresenta anormalidades anatômicas durante o desenvolvimento do micrósporo até o momento do aborto (Laser & Lersten 1972), que pode ocorrer em quase todos os estádios de desenvolvimento do pólen (Laser & Lersten 1972). Além disso, diversos outros fatores podem influenciar a viabilidade dos grãos de pólen, podendo ser, inclusive, ambientais: níveis de nitrogênio disponível, umidade, temperatura, entre outros (Dafni & Firmage 2000), o que poderia explicar as baixas taxas de germinação encontradas para *I. edulis* ($30,2 \pm 17,2$) que, apesar de mais altas em relação às duas espécies poliembrionicas, não são condizentes ao esperado para uma planta xenogâmica. Estudos de sistema reprodutivo devem ser conduzidos a fim de se concluir se *I. edulis* trata-se de uma espécie sexual ou apomítica monoembriônica.

Outros fatores podem explicar as baixas taxas de fertilidade polínica encontradas neste estudo, como a permanência prolongada das células do tapete observada tanto em *I. laurina* quanto em *I. vera*, característica não observada em *I. edulis* (observação pessoal). Embora o aborto polínico seja frequentemente relacionado a irregularidades na meiose em células-mãe de micrósporos (e.g. Dujardin & Hanna 1984, Grigg *et al.* 1988, Boff & Schifino-Wittman 2002) associadas à degeneração precoce das células do tapete (Warmke & Lee 1977, Shnable & Wise 1998, Wu & Cheung 2000), a permanência prolongada das células do tapete também é comum em plantas estéreis (Laser & Lersten 1972). O tempo de atividade das células do tapete é regulado pela morte celular programada e sua persistência nas duas espécies está provavelmente relacionada a um

atraso da entrada adequada deste programa. Este atraso geralmente compromete a contribuição de seu conteúdo citoplasmático com a finalização da escultura da parede polínica e com moléculas adesivas de naturezas lipídica e proteica e de sinalização, essenciais ao sucesso da interação pólen-pistilo durante a polinização (Wu & Cheung 2000). Além disso, a ocorrência de espaços não ocupados pela cariolinfa (aspecto vazio) nos núcleos das células esporogênicas em *I. vera* também pode estar associada à morte celular programada, em que o núcleo é o principal alvo da maquinaria de degradação celular (Bozhkov *et al.* 2005), causando condensação da cromatina, fragmentação do DNA, e desarranjo da estrutura involucral (Earnshaw 1995, Bozhkov *et al.* 2005).

A ocorrência exclusiva de reprodução vegetativa por longos períodos de tempo pode resultar na perda da capacidade de reproduzir-se sexualmente, por consequência do acúmulo de mutações que afetam a fertilidade de óvulos e grãos de pólen (Barrett 1980). Em *Pennisetum macrostachyum* (Poaceae), por exemplo, a esterilidade masculina está relacionada ao desenvolvimento predominante de sacos embrionários assexuados (Dujardin & Hanna 1984), e em *Oxalis pes-caprae* (Oxalidaceae), espécie que se reproduz apenas vegetativamente, as taxas de germinação polínica são muito baixas, apresentando altas taxas de aborto (Rodriguez-Riano & Dafni 2000). Sendo assim, estudos concernentes à progênie de *I. laurina* e *I. vera* são necessários para determinar o grau de investimento destas espécies em um ou outro mecanismo de reprodução, por meio da obtenção de porcentagem de plântulas originadas sexuada ou assexuadamente nas sementes, sendo possível assim, inferir sobre as implicações ecológicas dos diferentes processos para o sucesso reprodutivo nestas espécies.

O fenômeno da poliembrião tem sido pouco estudado e provavelmente subestimado entre as leguminosas, sendo raros os relatos de sua ocorrência nesta família. Assim, o presente estudo torna-se uma importante contribuição para o conhecimento e entendimento deste fenômeno e suas possíveis consequências para o desenvolvimento do gametófito masculino.

Referências bibliográficas

- Arce L. R., Banks H. 2001. A preliminary survey of pollen and other morphological characters in neotropical *Acacia* subgenus *Aculeiferum* (Leguminosae: Mimosoideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **135**: 263-270.
- Asker S. E., Jerling L. 1992. *Apomixis in plants*. Boca Raton: CRC Press.
- Stiehl-Alves E. M., Martins-Corder M. P. 2007. *Acacia mearnsii* (Fabaceae) reproductive biology: pollen tube viability and growth. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **7**: 29-35.
- Barrett S. C. H. 1980. Sexual reproduction in *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth). I. Fertility of clones from diverse regions. *Journal of Applied Ecology* **17**: 101-112.
- Batygina T. B., Vinogradova G. Yu. 2006. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology* **38**: 126-151.
- Bicknell R. A., Koltunow A. M. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell* **16**: 228-245.
- Boelcke O. 1946. Estudio morfológico de las semillas de Leguminosas Mimosoideas y Caesalpinioideas de interés agronómico en la Argentina. *Darwiniana* **7**: 240- 321.
- Boff T., Schifino-Wittmann M. T. 2002. Pollen fertility and meiotic behaviour in accessions and species of *Leucaena*. *Tropical Grasslands* **36**: 54-58.
- Bozhkov P. V., Suarez M. F., Filonova L. H., Daniel G., Zamyatin Jr. A. A., Rodriguez-Nieto S., Zhivotovsky B., Smertenko A. 2005. Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 14463-14468.
- Caccavari M. A. 2002. Pollen morphology and structure of Tropical and Subtropical genera of the *Piptadenia*-group (Leguminosae-Mimosoideae). *Grana* **41**: 130-141.
- Capucho L. C., Teixeira S. P. 2013. Tapetal and parenchymatic anther tissues participate in polyad adhesive production in *Calliandra brevipes* (Leguminosae). *South African Journal of Botany* **89**: 227-233.
- Carman J. G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixes, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* **61**: 51-94.
- Cruden R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* **31**: 32- 46.
- Cruden R. W., Jensen K. G. 1979. Viscin Threads, Pollination Efficiency and Low Pollen-Ovule Ratios. *American Journal of Botany* **66**: 875- 879.
- Cruden R. W. 2000. Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution* **222**: 143- 165.
- Dafni A., Firmage D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 113-132.
- Dujardin M., Hanna W. 1984. Microsporogenesis, reproductive behavior, and fertility in five *Pennisetum* species. *Theoretical and Applied Genetics* **67**: 197-201.
- Earnshaw W. C. 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* **7**: 337-343.

- Evert R. F. 2006. *Esau's Plant Anatomy: meristems, cells and tissues of the plant body – Their structure, function and development*. Third edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Feuer S. M., Niezgoda C. J., Nevling L. I. 1985. Ultrastructure of *Parkia* polyads (Mimosoideae:Leguminosae). *American Journal of Botany* **72**: 1871-1890.
- Gerrits P. O. 1991. *The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles*. Netherlands: Departament of Anatomy and Embryology, State University Groningen.
- Gill L. S., Husaini S. W. H. 1982. Cytology of some arborescent Leguminosae of Nigeria. *Silvae Genetica* **31**: 117-122.
- Grigg F. D. W., Smith P. R., Stenersen M. A., Murray B. G. 1988. Variable pollen fertility and abnormal chromosome behaviour in the pepino (*Solanum muricatum* Ait., Solanaceae). *Scientia Horticulturae* **35**: 259-268.
- Guinet P. 1989. Pollen of *Obolonia zanonii* (Mimosaceae). *Brittonia* **41**: 173-174.
- Harder L. D., Johnson S. D. 2008. Function and evolution of aggregated pollen in angiosperms. *International Journal of Plant Science* **169**: 59- 78.
- Hesse M., Halbritter H., Zetter R., Weber M., Buchner R., Frosch-Radivo A., Ulrich S. 2009. *Pollen Terminology: an illustrated handbook*. Springer Wien, New York.
- Johansen D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company Inc., New York.
- Karnovsky M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A-138A.
- Koltunow A. M., Soltys K., Nito N., McClure S. 1995. Anther, ovule, seed, and nuclear embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Canadian Journal of Botany* **73**: 1567-1582.
- Koltunow A. M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* **5**: 1425-1437.
- Koltunow A.M., Grossniklaus U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 547-574.
- Koptur S. 1984. Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: breeding systems of neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). *Evolution* **38**: 1130-1143.
- Laser K. D., Lersten N. R. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *The Botanical Review* **38**: 425-454.
- Lersten N. R. 2004. *Flowering Plant Embryology*. 1st edition. Blackwell Publishing, EUA.
- Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock M. 2005. *Legumes of the world*. The Royal Botanical Gardens, Kew.
- Martins M. A. G., Oliveira D. M. T. 2001. Morfo-anatomia e ontogênese do fruto e da semente de *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze (Fabaceae: Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* **24**: 109- 121.
- Mendes-Rodrigues C., Ferreira W. R., Lima J. A. De, Dornelles M. C., Ranal M., Santana D. G. 2007. Germinação de embriões de duas espécies de *Inga* (Mimosaceae). *Revista Brasileira de Biociências* **5**: 561-563.
- Mendes-Rodrigues C. 2010. *Ecologia de espécies poliembriônicas com ênfase no Bioma Cerrado*. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de Uberlândia, MG.

- Moreira F. M. S., Moreira F. W. 1996. Características da germinação de sementes de 64 espécies de leguminosas florestais nativas da Amazônia, em condições de viveiro. *Acta Amazônica* **26**: 3- 16.
- Niezgoda C. J., Feuer S. M., Nevling L. I. 1983. Pollen ultrastructure of the tribe Ingeae (Mimosoideae: Leguminosae). *American Journal of Botany* **70**: 650-667.
- Nijs H.C.M., Menken S.B.J. 1996. Relations between breeding system, ploidy level, and taxonomy in some advanced sections of *Taraxacum*. In: *Advances in Compositae systematics* (Hind, H.D.N., Beentje, H.J. eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Nogler G.A. 1984. Gametophytic apomixis. In: *Embryology of angiosperms* (Johri B.M., ed). Springer-Verlag, New York.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- Pennington T. D. 1997. The Genus *Inga* Botany. The Royal Botanic Gardens, Kew.
- Prenner G., Teppner H. 2005. Anther development, pollen presentation and pollen adhesive of parenchymatous origin in *Calliandra angustifolia* (Leguminosae-Mimosoideae-Ingeae). *Phyton* **45**: 267-286.
- Richards A.J. 1997. *Plant Breeding Systems*. 2nd ed. Allen & Unwin, London.
- Risso-Pascotto C., Pagliarini M.S., Valle C.B. 2006. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* Stapf (Poaceae: Paniceae). *Genetics and Molecular Research* **5**: 837-845.
- Rodriguez-Riano T., Dafni A. 2000. A new procedure to asses pollen viability. *Sexual Plant Reproduction* **12**: 241-244.
- Salomão A. N., Allem A. C. 2001. Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian cerrado and caatinga vegetation. *Acta Botanica Brasilica* **15**: 369-378.
- Santos F. A. R., Romão C. O. 2008. Pollen morphology of some species of *Calliandra* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae) from Bahia, Brazil. *Grana* **47**: 101-116.
- Santos, R.P., Mariath, J.E.A. 1997. A single method for fixing, dehydrating and embedding pollen tubes cultivated in vitro for optical and transmission electron microscopy. *Biotechnic and Histochemistry* **72**: 315-319.
- Schnable P. S., Wise R. P. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science - reviews* **3**: 175-180.
- Teppner H. 2007. Polyad development and karyology in *Inga* and *Calliandra* (Mimosaceae-Ingeae): a reply to a recent paper in Flora. *Phyton Annales Rei Botanicae* **47**: 1-46.
- Villari, R. 1990-1991. Embryological observations on *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze (Dalbergieae, Papilionaceae). *Giornale Botanico Italiano* **124**: 293-300.
- Warmke H. E., Lee S. J. 1977. Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers. *The Journal of Heredity* **68**: 213-222.
- Wu H., Cheung A. Y. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* **44**: 267-281.

CAPÍTULO 4: Morfologia da políade cavitada de espécies Neotropicais de *Parkia* R. Br. (Leguminosae-Mimosoideae)

Resumo

Parkia apresenta grande diversidade morfológica em suas políades, inflorescências e flores, além de diferentes agentes polinizadores. Essa diversidade de agentes polinizadores deve se refletir na grande diversidade estrutural das políades, que são submetidas a pressões seletivas, em especial no tamanho, na forma e no tipo de substâncias de reserva polínicas. Sendo assim, este trabalho visou a detalhar a morfologia cavitada das políades de três espécies de *Parkia* (*P. multijuga* Benth., *P. ulei* (Harms) Kuhlm. e *P. pendula* (Willd.) Benth. ex Walp.), e sugerir funções às adaptações dessas estruturas para o sucesso reprodutivo das espécies. Detalhes da ultra-estrutura e do desenvolvimento da políade são fornecidos para *P. pendula*, escolhida como modelo por apresentar espaço interno da políade muito evidente. As políades das espécies de *Parkia* são globosas e exibem um espaço interno que varia em tamanho, sendo conspícuo em *P. pendula*. Outras diferenças exibidas pelas espécies estão relacionadas ao tamanho da políade à ornamentação da exina dos grãos de pólen e ao tipo de substâncias de reserva polínica. *P. pendula* apresenta exudato no interior do espaço interno da políade que pode estar relacionado à germinação dos grãos de pólen através dos poros internos e/ou translocação de substâncias do meio externo para o interno ou vice-versa. Tal inferência apoia-se no fato que existe espaço entre os grãos de pólen preenchido também por exudato, o que não corrobora as informações encontradas na literatura com relação à maneira como os grãos de pólen estão unidos uns aos outros. A morfologia e as substâncias de reserva dos grãos de pólen das políades de *Parkia* parecem estar mais relacionadas à sua funcionalidade e aos processos fisiológicos do que com o tipo de polinizador que atua em cada espécie.

Introdução

Embora a maioria das angiospermas libere seus grãos de pólen em mônades (individualmente), 42 famílias apresentam alguma forma de agrupamento dos grãos para dispersão. Tais agrupamentos são encontrados principalmente em espécies zoófilas, podendo ser estruturais, quando não há separação dos grãos de pólen durante sua produção - o caso das díades, tétrades e das políades; e não-estruturais, quando os grãos (mônades) são unidos por algum tipo de substância (geralmente pollenkit) após seu desenvolvimento, como é o caso dos filamentos viscinais ou filamentos do pólen e das polínias (Harder & Johnson 2008).

A dispersão dos grãos de pólen em forma de políades é registrada para apenas quatro famílias de angiospermas, e evoluiu de forma independente pelo menos quatro vezes neste grupo. As famílias com ocorrência de políades registrada são Annonaceae (Magnolídea), Celastraceae e Leguminosae (Eudicotiledônea), e Hydrocharitaceae (Monocotiledônea) (Harder & Johnson 2008). Leguminosae contém 727 gêneros e 19.325 espécies que compõem majoritariamente a maioria dos tipos de vegetação que ocorrem no mundo (Lewis *et al.* 2005), destacando-se portanto, dentre as quatro famílias por ser a maior em número de espécies e a mais amplamente distribuída. Em seguida, está Annonaceae, com 128 gêneros e cerca de 2300 espécies, sendo 33 gêneros e cerca de 250 espécies ocorrentes no Brasil; depois Celastraceae, com 55 gêneros e 855 espécies, dos quais 17 gêneros e cerca de 100 espécies ocorrem no Brasil; e por último Hydrocharitaceae, com 17 gêneros e cerca de 100 espécies, todas aquáticas, das quais cerca de 10, pertencentes a sete gêneros, são registradas para o Brasil (Judd *et al.* 2007; Souza & Lorenzi 2005).

Sabe-se, até o momento, que a ocorrência de políades em Leguminosae é restrita à subfamília Mimosoideae, que apresenta quatro tribos, e cerca de 3.270 espécies (Lewis *et al.* 2005). Neste grupo, informações mostram que as políades são constituídas de múltiplas tétrades que se formam, em geral, por duas divisões mitóticas da célula esporogênica, dando origem a quatro células-mãe do grão de pólen que, por sua vez, dividem-se meioticamente (Kenrick & Knox 1979; Seijo & Neffa 2004). Porém, sabe-se

que variações no desenvolvimento resultam em variações na morfologia e quantidade de políades por lóculo da antera, e quantidade de grãos por políade (Kenrick & Knox 1979; Seijo & Neffa 2004).

Dentre os grupos de Mimosoideae nos quais constam relatos morfológicos de políades, é de particular interesse o gênero pantropical *Parkia* R. Br., tanto pela diversidade morfológica de suas políades, inflorescências e flores (Hopkins 1984; Hopkins 1986; Feuer *et al.* 1985), quanto por seus diferentes agentes polinizadores (Luckow & Hopkins 1995; Baker & Harris 1957; Hopkins 1986).

Parkia compreende cerca de 34 espécies arbóreas, sendo 18 relatadas para a Amazônia, quatro para a África e Madagascar, e 12 para a região Indo-Pacífica (Lewis *et al.* 2005; Hopkins 1984; Hopkins 1986). A unidade de polinização é constituída por um capítulo globoso com muitas flores pequenas, classificadas em três tipos básicos: férteis, secretoras de néctar e estaminodiais (Hopkins 1984). As políades podem apresentar 16, 28 ou 32 grãos de pólen (Hopkins 1984), unidos por fusão (característica única de *Parkia* entre as Mimosoideae), adesão ou compressão das ectexinas adjacentes (nas porções lateral, proximal e/ou distal), sendo os grãos individuais claramente definidos ou não. Além disso, há variação no tipo de ornamentação (inclusive entre grãos de uma mesma políade), e também na posição das aberturas dos grãos de pólen (Feuer *et al.* 1985). A maioria de seus representantes é polinizada por morcegos, sendo considerado um dos grupos com maior número de espécies quiropterófilas conhecidas (Luckow & Hopkins 1995), mas há também algumas espécies neotropicais entomófilas diurnas e noturnas (Baker & Harris 1957; Hopkins 1986).

Este trabalho detalha a morfologia das políades cavitadas de três espécies amazônicas e quiropterófilas de *Parkia*: *P. multijuga* Benth., *P. pendula* (Willd.) Benth. ex Walp. e *P. ulei* (Harms) Kuhlman, e infere funções às adaptações dessas estruturas para o sucesso reprodutivo das espécies. Detalhes da ultraestrutura e do desenvolvimento da políade são fornecidos para *P. pendula*, escolhida como modelo por apresentar espaço interno da políade muito evidente.

Material e Métodos

Espécies estudadas – coleta e material testemunha

Capítulos florais de *Parkia multijuga* e *P. ulei* foram coletados em Manaus, sendo o material testemunha depositado no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob os números M. J. G. Hopkins 2270 e F. N. Cabral 111, respectivamente. Os capítulos florais de *P. pendula* foram coletados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ), sendo o material testemunha depositado no herbário RB do JBRJ sob o número H. C. Lima 5693.

Metodologia

Anteras de flores das três espécies foram removidas e fixadas em Karnovsky em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) por 24 horas (Karnovsky 1965) e em FAA 50 por 24 horas (Johansen 1940), submetidas à série etanólica e estocadas em álcool 70%.

A ornamentação da exina foi examinada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, anteras de flores previamente fixadas foram desidratadas em série etanólica, submetidas ao ponto crítico em um aparelho Bal Tec CPD 030, montadas em suportes metálicos em fita adesiva de carbono, perfuradas para a exposição das políades e, então, cobertas com ouro em um metalizador Bal Tec SCD 050. As observações e as imagens foram feitas em microscópio eletrônico de varredura de alto vácuo Shimadzu SS – 550, e em microscópio eletrônico JEOL JSM 5200.

Para o estudo anatômico das políades, anteras previamente fixadas foram incluídas em historresina (Gerrits 1991) e seccionadas transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo com espessura de 3 µm. As lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,01% pH 4,4 (O'Brien *et al.* 1964). Para análise do tipo de reserva polínica contida nas políades de cada espécie, testes citoquímicos para os principais tipos de reservas encontrados em grãos de pólen foram realizados. As lâminas foram submetidas a testes com reagente de PAS para detecção de polissacarídeos (Feder & O'Brien 1968),

xylydine de Ponceau para proteínas (O'Brien & McCully 1981) e sudan black B, e sudan IV para lipídeos (Pearse 1980). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Leica DME.

Etapas finais do desenvolvimento da políade e análise ultraestrutural da políade completamente desenvolvida foram obtidas para *Parkia pendula*. Para tal, anteras em vários estádios de desenvolvimento, previamente fixadas, foram incluídas em historresina (Gerrits 1991) e seccionadas transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo com espessura de 3 µm. As lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,01% pH 4,4 (O'Brien *et al.*1964) e observadas em microscópio de luz Leica DME. Parte do material fixado em Karnovsky (Karnovsky 1965) foi pós-fixada em tetróxido de ósmio a 1% (tampão fosfato 0,1M e pH 7,3) por 2 horas, desidratada gradualmente em série acetônica e incluída em resina epóxi Araldite 502 Polysciences. Após, as amostras foram seccionadas com auxílio de um ultramicrotomo Leica ultracut S Reichert para a obtenção de cortes semifinos (0,5 µm), que foram corados com azul de Toluidina 0,05% (O'Brien *et al.*1964) e observados em microscopia de luz para a escolha das regiões onde serão realizados os cortes ultrafinos. Os cortes ultrafinos (60 a 70 nm) foram coletados em grade de malha fina, contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% por 15 minutos (Watson 1958) e citrato de chumbo por 15 minutos (Reynolds 1963) e observados em um microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208.

Resultados

As políades das três espécies estudadas são globosas, acalimadas e apresentam um espaço interno central variável em tamanho, sendo denominadas cavitadas (ver Capítulo 1). Diferem também quanto ao tamanho, número de grãos de pólen, e espessura e tipo de ornamentação da ectexina (Figuras 1 A-F, 2 A-F).

Parkia multijuga apresenta políades com cerca de 32 grãos de pólen (número estimado), com ornamentação da exina do tipo verrucada (Figura 1 A, B), espaço interno na maioria das vezes pouco evidente (Figura 2 A); quando presente é inconspícuo (Figura 2 B). Apresenta ectexina espessa e interrompida, e um dos poros voltados ao espaço interno

da políade (Figura 2 B). O citoplasma da célula vegetativa reage positivamente para a presença de lipídeos, proteínas e polissacarídeos (Figura 3 A-C), e o espaço interno da políade apresenta reação positiva apenas para lipídeos (Figura 3 A).

Parkia ulei apresenta as menores políades dentre as espécies estudadas (ca. 60 μm) com cerca de 28 grãos de pólen (número estimado) e ornamentação da exina do tipo fossalada (Figura 1 C, D). O espaço interno é geralmente pouco evidente e, quando presente, inconspícuo (Figura 2 C, D). Seus grãos de pólen apresentam ectexina mais ou menos interrompida, e um dos poros voltados à região interna da políade (Figura 2 D). O citoplasma da célula vegetativa reage positivamente para lipídeos, proteínas e polissacarídeos, enquanto o espaço interno da políade não apresenta reação positiva para qualquer uma das substâncias (Figuras 3 D-F).

Parkia pendula apresenta políades de tamanho semelhante ao de *P. multijuga* (ca. 100 μm), contendo 32 grãos de pólen (ver Capítulo 1), e ornamentação da exina do tipo fossalada (Figura 1 E, F), com estrutura mais semelhante à de *P. ulei* (Figura 2 F). O espaço interno é amplo e circular (Figura 2 E, F). A célula vegetativa dos grãos de pólen desta espécie exibe citoplasma densamente corado, que reage positivamente para lipídeos (embora apareça em pouca quantidade), proteínas e polissacarídeos (Figura 3 G-I), e o espaço interno da políade não apresenta reação para a presença de proteínas (Figura 3 H). Apesar disso, análises em microscopia eletrônica de transmissão mostraram que o espaço interno das políades de *P. pendula* é preenchido por fluido lipo-proteico, elétron-denso, com aparência floculada (Figura 4 A), semelhante ao que preenche os espaços entre os grãos de pólen da políade (Figura 4 B). É formado durante as últimas etapas da esporogênese, que é assincrônica (Figura 5 A), quando oito células-mãe de micrósporos são observadas. À medida que o diâmetro sublocular aumenta, as células-mãe se afastam, contatando as células do tapete (Figura 5 A-D), e formam um espaço amplo no centro, que engloba parte do fluido locular (sublocular) (Figura 5 C, D). A intensidade da coloração deste fluido sofre modificações durante o desenvolvimento da políade, sendo mais forte no estágio final, quando as células do tapete já estão degeneradas (comparar Figura 5 D, E).

Os grãos de pólen apresentam três poros, sendo um deles voltado para o interior da políade, contatando diretamente o fluido do espaço central da políade (Figura 6 A, B).

O citoplasma da célula vegetativa é rico em mitocôndrias, plastídeos, retículos endoplasmáticos lisos, oleoplastos e retículo endoplasmático rugoso (Figura 7 A, B).

“Pollenkitt” é observado sobre a ectexina e acumulada nos espaços formados pelo teto descontínuo e entre grãos de pólen (Figura 8 A, B).

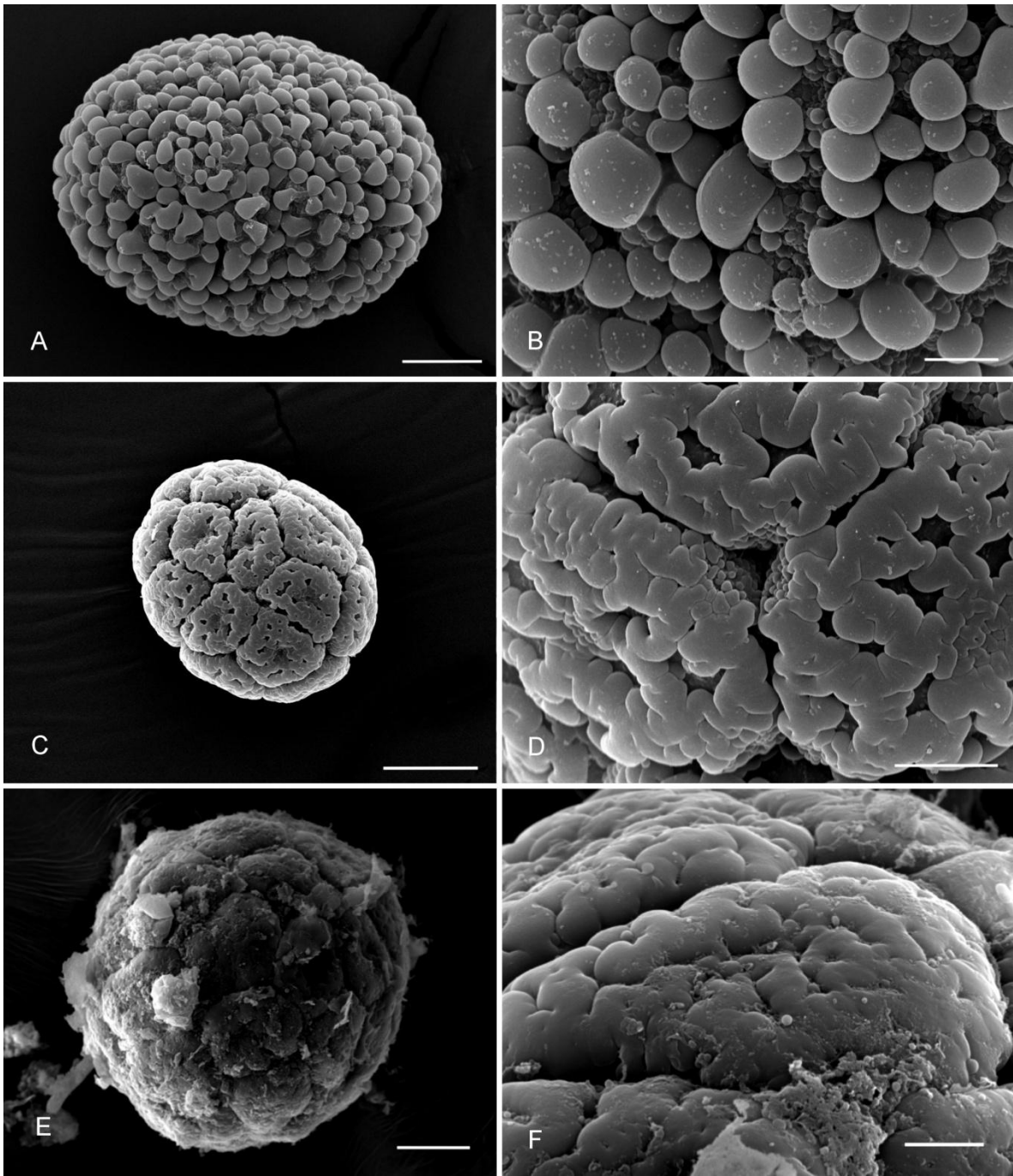


Figura 1. Eletromicrografias (MEV) de políades de *Parkia multijuga* (A-B), *P. ulei* (C-D) e *P. pendula* (E-F). A. Formato. B. Detalhe da ornamentação verrucada da exina. C. Formato. D. Detalhe da ornamentação reticulada da exina. E. Formato. F. Detalhe da ornamentação fossulada da exina. Escalas: A,C = 20 μm ; B,D,F = 5 μm ; E = 50 μm .

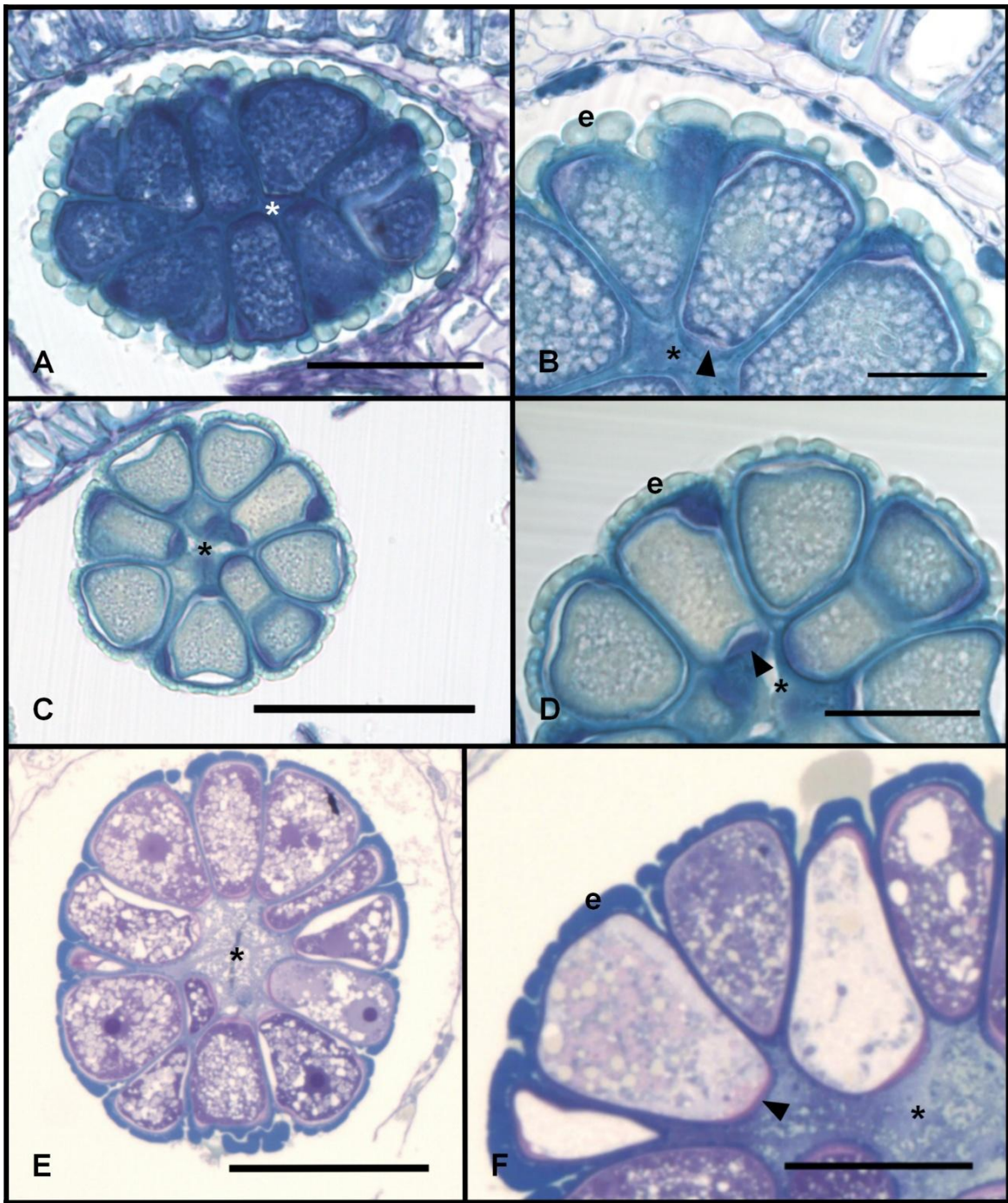


Figura 2. Morfologia interna de políades de *Parkia multijuga* (A, B), *P. ulei* (C, D) e *P. pendula* (E, F). A. Políade globosa de *P. multijuga* com todos os grãos de pólen em contato uns com os outros na região interna da políade espaço interno pequeno (*). B. Detalhe da políade de *P. multijuga* apresentando espaço interno inconspícuo (*), e grãos de pólen com ectexina interrompida, verrucada (e) e poros voltados para a região interna da políade (cabeça-de-seta). C. Políade globosa de *P. ulei* apresentando espaço interno inconspícuo (*). D. Detalhe da políade de *P. ulei* apresentando grãos de pólen com ectexina mais ou menos interrompida (e), e poros voltados para a região interna da políade (cabeça-de-seta), que apresenta espaço inconspícuo (*). E. Políade globosa de *P. pendula* apresentando espaço interno amplo e circular preenchido por exudato (*). F. Detalhe da políade de *P. pendula* apresentando poros dos grãos de pólen voltados para a região interna da políade (cabeça-de-seta) e ectexina mais ou menos interrompida (e). Escalas: A,C,E = 50 μm ; B,D = 20 μm ; F = 25 μm .

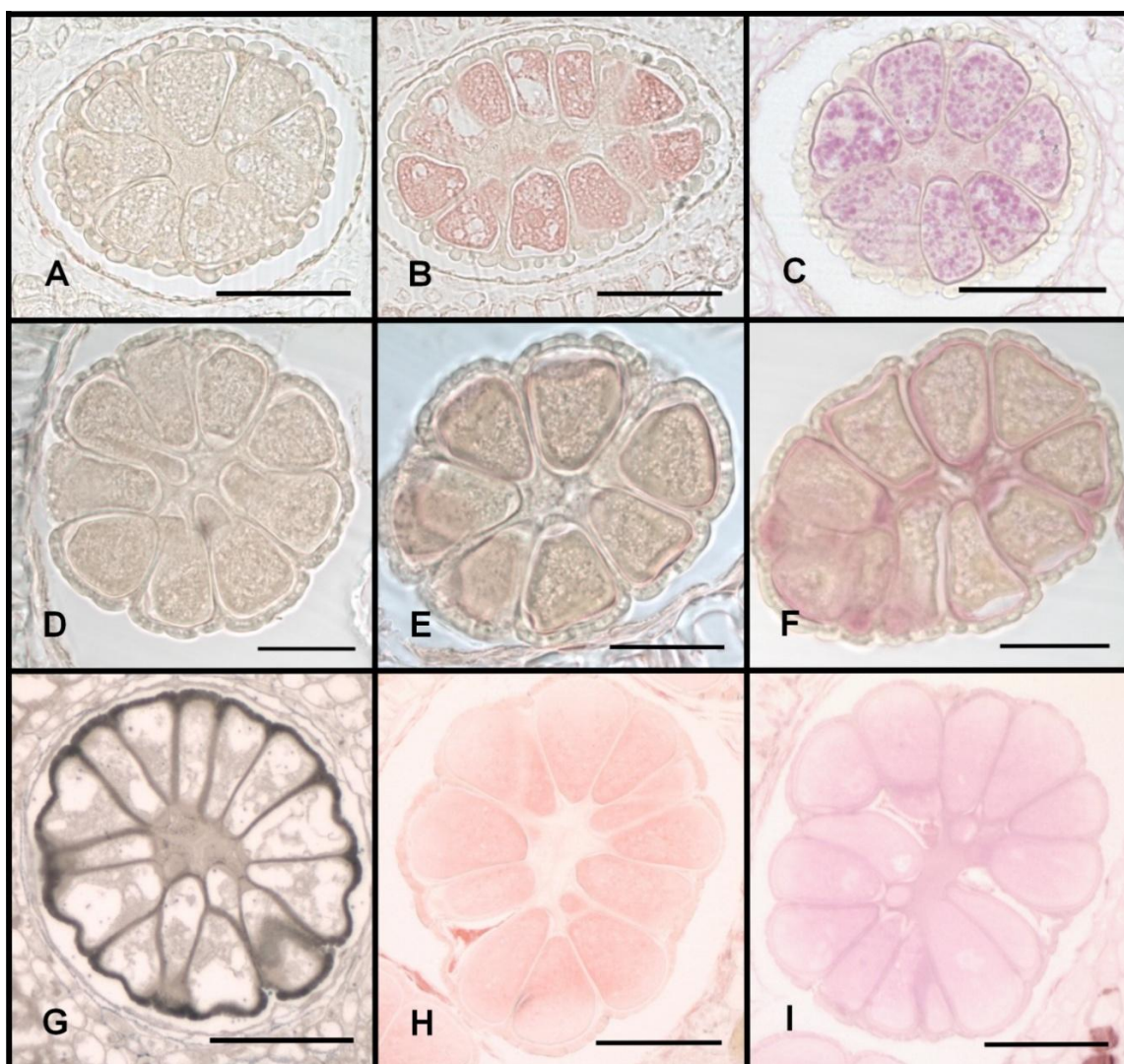


Figura 3. Fotomicrografias de políades de *Parkia multijuga* (A-C), *P. ulei* (D-F) e *P. pendula* (G-I) submetidas a testes citoquímicos para detecção de lipídeos (A e D – Sudan IV; G – Sudan Black B), proteínas (B, E e H – xylidine de Ponceau), e polissacarídeos (C, F e I – reagente de PAS). A. Reação positiva para lipídeos no citoplasma da célula vegetativa e no espaço interno da políade em *P. multijuga*. B. Reação positiva para proteínas no citoplasma da célula vegetativa e negativa no espaço interno da políade de *P. multijuga*. C. Políade de *P. multijuga* apresentando reação positiva para polissacarídeos na célula vegetativa e negativa no espaço interno. D. Políade de *P. ulei* apresentando reação positiva para lipídeos no citoplasma da célula vegetativa dos grãos de pólen e negativa no espaço interno. E. Reação positiva para proteínas no citoplasma da célula vegetativa dos grãos de pólen e negativa no espaço interno da políade de *P. ulei*. F. Reação positiva para polissacarídeos no citoplasma da célula vegetativa dos grãos de pólen e negativa no espaço interno da políade de *P. ulei*. G. Políade de *P. pendula* apresentando reação positiva para lipídeos no espaço interno da políade, estando presentes em pouca quantidade no citoplasma da célula vegetativa dos grãos de pólen. H. Políade de *P. pendula* apresentando reação positiva para proteínas no citoplasma da célula vegetativa dos grãos de pólen e negativa no espaço interno. I. Reação positiva para polissacarídeos no citoplasma da célula vegetativa dos grãos de pólen e no espaço interno da políade de *P. pendula*. Escalas = 50 µm.

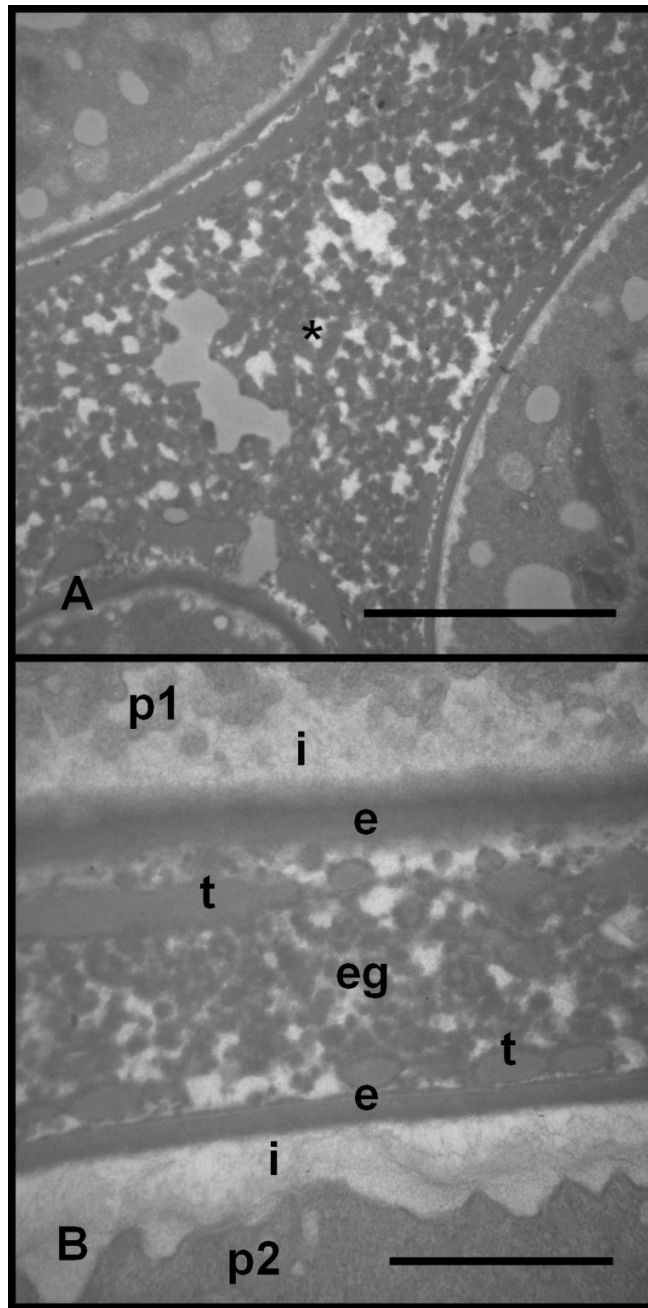


Figura 4. Eletromicrografias (MET) de políades de *Parkia pendula*. A. Espaço central da políade (*) contendo exudato constituído de glomérulos elétron-densos semelhantes aos encontrados no espaço entre os grãos mostrado na figura B. B. Detalhe do espaço (eg) entre dois grãos de pólen (p1 e p2) que apresentam intina espessa (i), e endexina (e) próxima a vestígios do teto (t). Note os glomérulos elétron-densos no espaço entre os grãos de pólen (eg). Escalas: A = 5 μ m; B = 1,5 μ m.

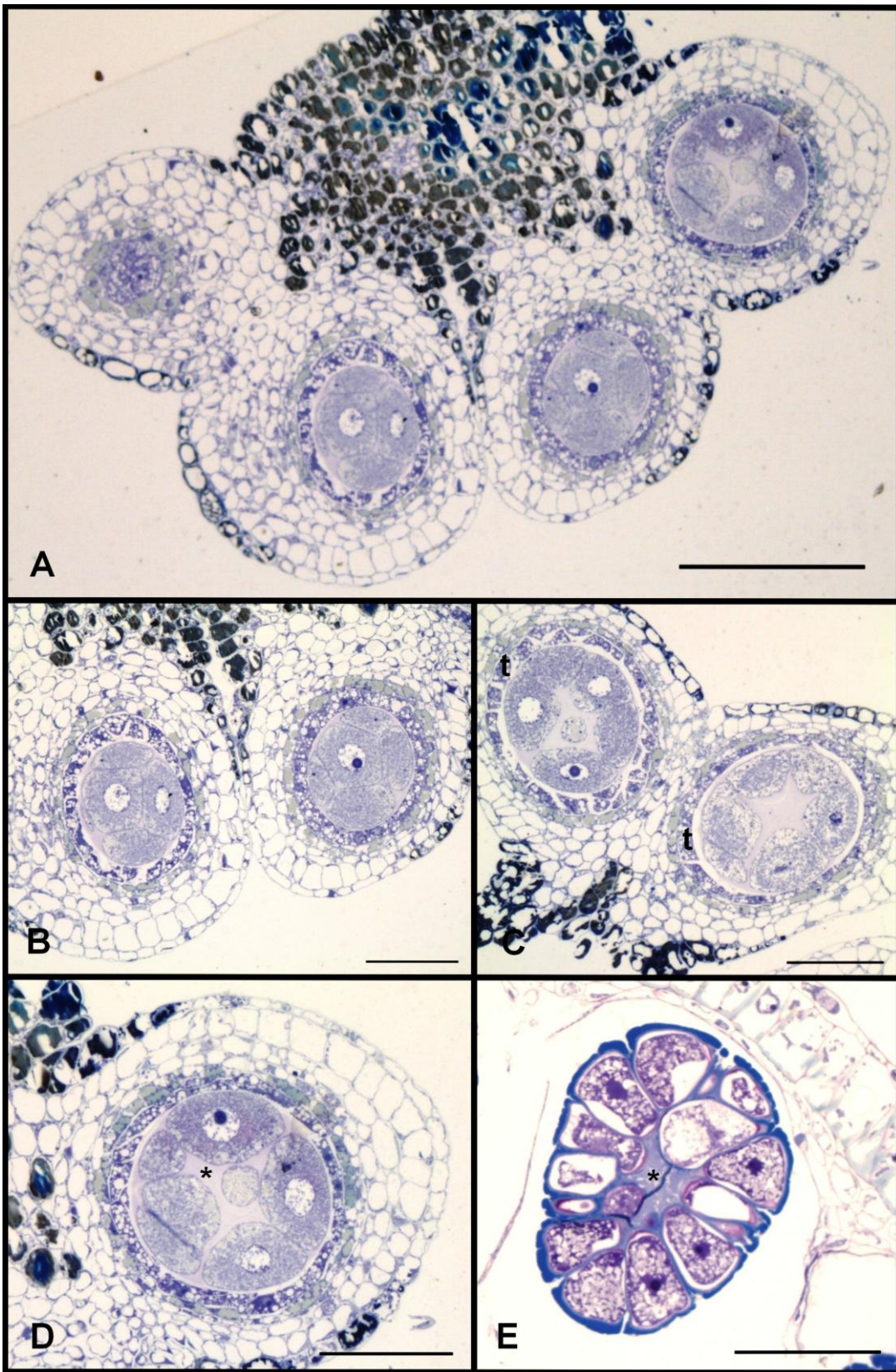


Figura 5. Fotomicrografias de anteras de *Parkia pendula* em seções transversais. A. Desenvolvimento assincrônico das políades nos lóculos (sublóculos). Note o aumento do diâmetro dos lóculos da esquerda para a direita da imagem. B. Sublóculos ainda jovens com células esporogênicas ocupando toda a cavidade. C. Sublóculos em estádios mais avançados do desenvolvimento. Note a organização das células esporogênicas em círculo, acompanhando o aumento do diâmetro sublocular e mantendo-se próximas às células do tapete (t). D. Note a substância sublocular corada em azul claro (*) ocupando toda a cavidade. E. Políade cavitada com exudato em seu interior (*). Escalas: A = 100 μm ; B,C,D,E = 50 μm .

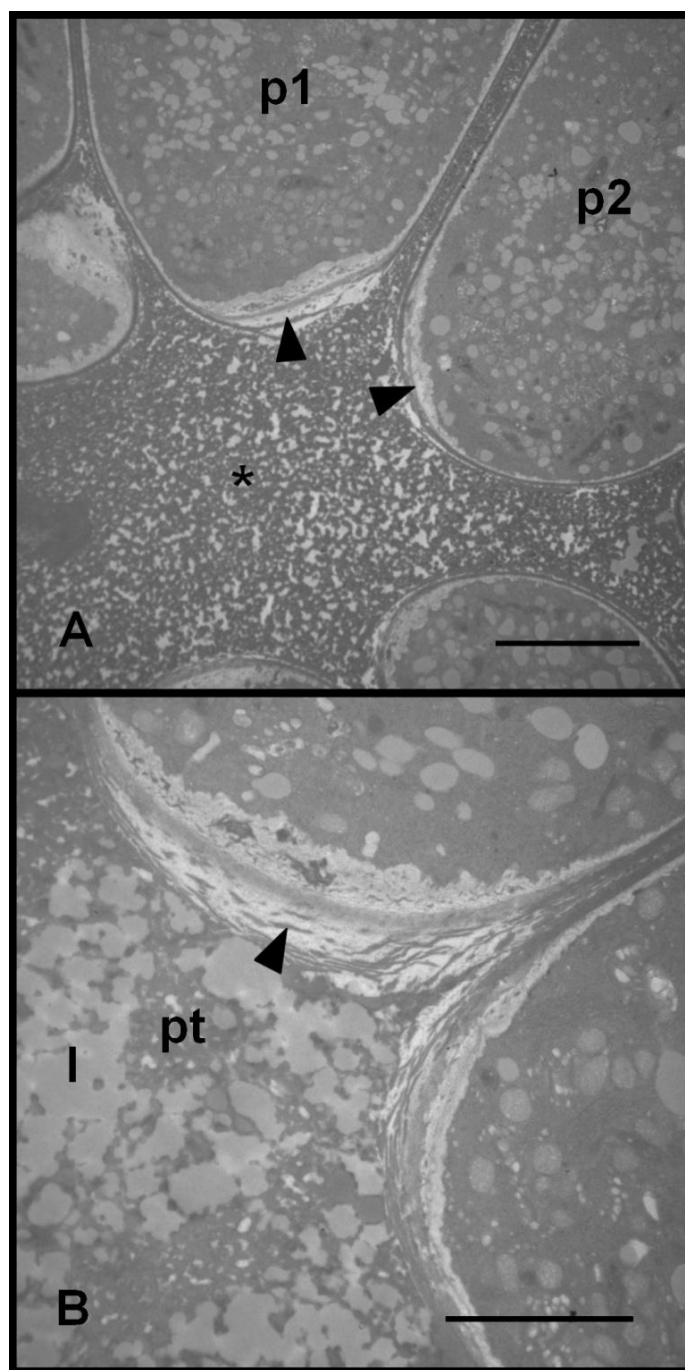


Figura 6. Eletromicrografias (MET) de políades de *Parkia pendula*. A. Espaço interno da políade (*), com dois grãos de pólen (p1 e p2) apresentando poros voltados a ele (cabeças-de-seta). B. Detalhe do espaço interno da políade preenchido por substâncias proteicas de aspecto granuloso (pt) e lipídicas (l) em contato com o poro interno (cabeça-de-seta) de um dos grãos de pólen. Escalas: A = 10 μm ; B = 5 μm .

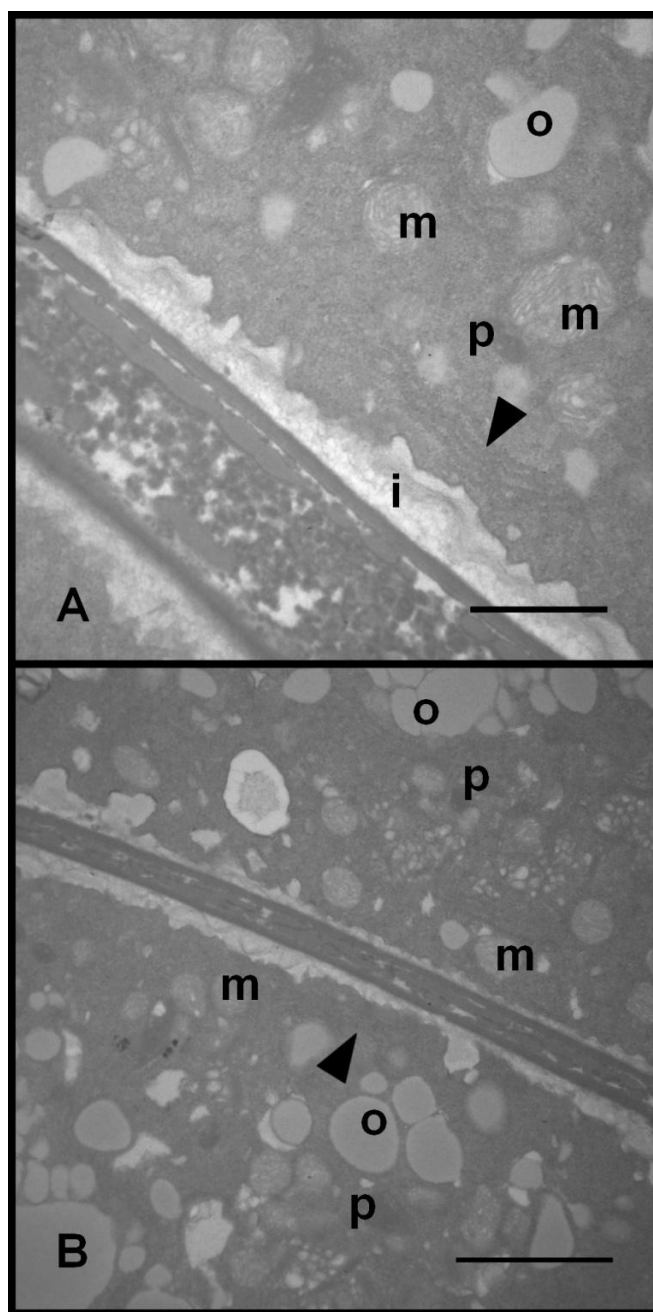


Figura 7. Eletromicrografias (MET) de políades de *Parkia pendula*. A. Detalhe do citoplasma da célula vegetativa de um dos grãos de pólen, com oleoplastos (o), mitocôndrias (m) e plastídeos (p), apresentando retículo endoplasmático rugoso (cabeça-de-seta) conspícuo próximo à intina (i). B. Região de contato entre dois grãos de pólen, evidenciando citoplasmas das células vegetativas ricos em oleoplastos (o), plastídeos (p), mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático liso (cabeça-de-seta). Escalas: A = 1,5 μm ; B = 3 μm .

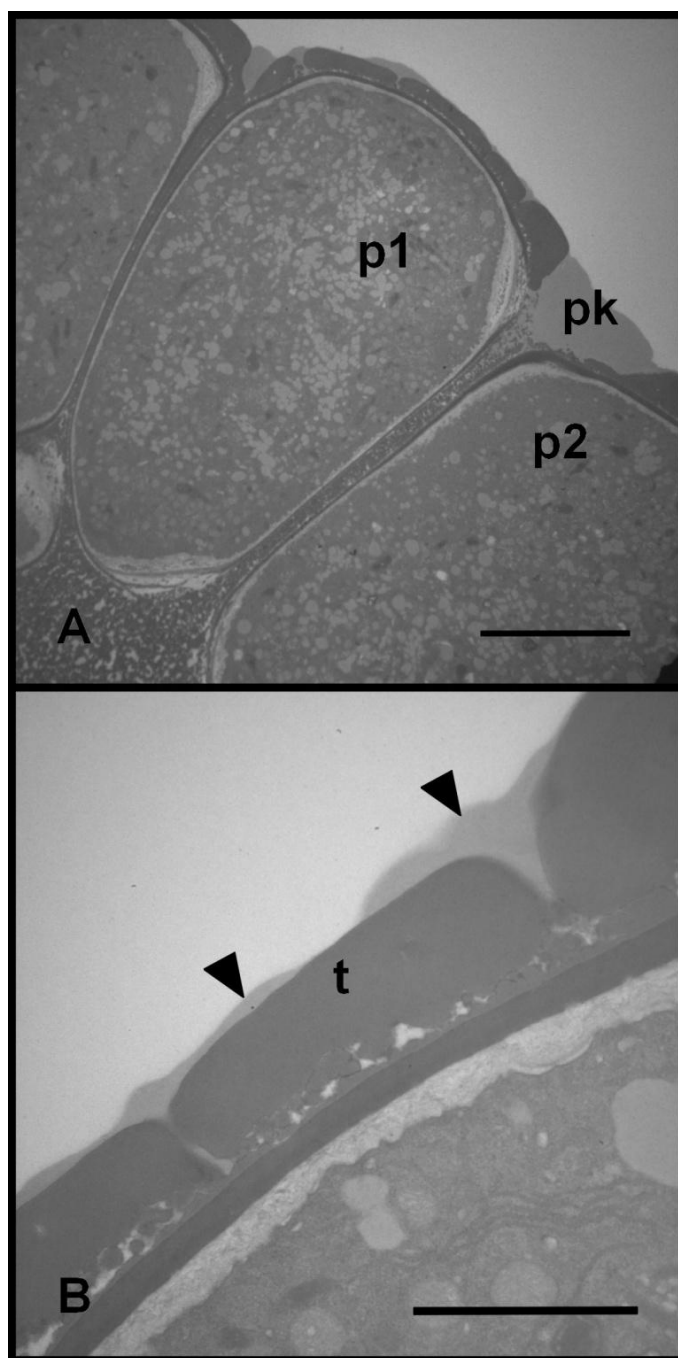


Figura 8. Eletromicrografias (MET) de políades de *Parkia pendula*. A. Acúmulo de “pollenkitt” (pk) no espaço externo entre dois grãos de pólen (p1 e p2). B. O “pollenkitt” também é observado recobrindo o teto da exina dos grãos de pólen, acumulando-se nos espaços formados pela descontinuidade do mesmo (cabeças-de-seta). Escalas: A = 15 μm ; B = 3 μm .

Discussão

As políades encontradas em gêneros de Mimosoideae são comumente achatadas, contendo uma ou duas camadas de grãos de pólen (ver Capítulo 1, Kenrick & Knox 1979, Niezgodá *et al.* 1983, Fitzgerald *et al.* 1993, Arce & Banks 2001, Seijo & Neffa 2004, Prenner & Teppner 2005, Teppner 2007, Harder & Johnson 2008, Santos & Romão 2008), sendo *Parkia* o único a apresentar políades globosas e cavitadas. Diferente do encontrado por Feuer e colaboradores (1985) em algumas espécies de *Parkia*, as políades de *P. multijuga*, *P. ulei* e *P. pendula* aqui estudadas não apresentaram variação do tipo de exina entre grãos de pólen de uma mesma políade e nem variação na posição das aberturas polínicas nos grãos de pólen. Além disso, os dados ultraestruturais de *P. pendula* não corroboram a informação de que há fusão, adesão ou mesmo compressão das ectexinas adjacentes (nas porções lateral, proximal e/ou distal) (Feuer *et al.* 1985), havendo inclusive espaço preenchido por exudato entre os grãos de pólen.

Interessante notar que o espaço interno das políades são frequentes em *Parkia pendula*, e pouco evidentes em *P. multijuga* e *P. ulei*. O exudato contido no espaço interno, composto de substâncias proteicas e lipídicas, e a presença de poros voltados a esta região sugerem que exista uma relação deste exudato com a possível germinação dos grãos de pólen através dos poros internos na políade, o que poderia substituir a falta de contato dos grãos com a superfície estigmática, por exemplo. O estigma de *Parkia pendula* apresenta uma cavidade onde há espaço para a deposição de apenas uma políade, que contém 32 grãos de pólen (ver Capítulo I) e aproximadamente o mesmo número de óvulos no ovário (observação pessoal). Sendo assim, o exudato, que também preenche os espaços entre os grãos de pólen, pode funcionar como translocador de substâncias entre eles, diminuindo a competição entre os grãos de pólen e garantindo condições de germinação a todos eles, permitindo que apenas uma políade possa fertilizar todos os óvulos presentes no ovário.

É provável que o exudato da políade seja produzido pelas células do tapete e lançado ao lóculo da antera, como parte do fluido locular, sendo retido no interior da políade ao longo do desenvolvimento. A densidade do exudato aumenta nos estádios finais do desenvolvimento da políade, o que pode ser devido a um maior acúmulo de substâncias

proteicas e lipídicas, e uma diminuição na quantidade de água, o que impediria a germinação precoce dos grãos de pólen. Além disso, uma maior concentração de proteínas poderia acarretar em recurso nutricional extra ao polinizador, no caso de *P. pendula*, aos morcegos (Hopkins 1984).

O tamanho das políades e o tipo de ornamentação diferem entre as espécies de *Parkia*. Tanto o tamanho quanto a ornamentação dos grãos de pólen são frequentemente relacionados ao tipo de polinizador (ver Howell 1974, Baker & Baker 1979, Ferguson & Skvarla 1982, Ferguson 1990, Ackerman 2000, Hesse 2000, Roulston & Cane 2000, Franchi *et al.* 2002, Edlund *et al.* 2004, Pacini & Hesse 2005), e segundo Stroo (2000), espécies polinizadas por morcegos apresentam grãos de pólen maiores do que espécies filogeneticamente relacionadas a elas e que apresentam outro tipo de polinizador. Nossos dados corroboram esta correlação, já que *P. pendula* é quiropterófila (Hopkins 1984), *P. multijuga* apresenta indivíduos com antese vespertina (Luckow & Hopkins 1995), e indivíduos que recebem visitas de morcegos durante a noite e de insetos durante o dia (Hopkins 1984), e *P. ulei* apresenta antese diurna, ausência de néctar e odor bastante doce e agradável, características compatíveis à entomofilia (Hopkins 1984).

A ocorrência de ornamentação polínica do tipo verrucada é frequentemente associada à ocorrência de quiropterofilia, mas não há dados consistentes para se afirmar que exinas mais ásperas estejam relacionadas à polinização por morcegos (Stroo 2000), correlação esta também não corroborada por Basso-Alves e colaboradores (2011). Os dados do presente estudo corroboram a inconsistência da correlação, já que *P. pendula*, espécie estritamente quiropterófila (Hopkins 1984), apresenta ornamentação do tipo fossulada (ver Capítulo I), diferente das duas outras espécies, com ornamentação verrucada. Além disso, a presença de oleoplastos e proteínas como substâncias de reserva presentes no citoplasma da célula vegetativa dos grãos de pólen é mais comumente relacionada à polinização por abelhas (Baker & Baker 1979, Roulston & Cane 2000).

A morfologia e as substâncias de reserva dos grãos de pólen das políades de *Parkia* parecem estar mais relacionadas à sua funcionalidade e aos processos fisiológicos do que com o animal polinizador que atua em cada espécie. No entanto, estudos adicionais

acerca da biologia da polinização e interação pólen-pistilo devem ser feitos para dar consistência às inferências aqui colocadas.

Referências bibliográficas

- Ackerman J.D. 2000. Abiotic pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 167–185.
- Arce L. R., Banks H. 2001. A preliminary survey of pollen and other morphological characters in neotropical *Acacia* subgenus *Aculeiferum* (Leguminosae: Mimosoideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **135**: 263-270.
- Baker H. G., Baker I. 1979. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *American Journal of Botany* **66**: 591- 600.
- Baker H. G., Baker I. 1979. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *American Journal of Botany* **66**: 591- 600.
- Baker H. G., Harris B. J. 1957. The pollination of *Parkia* by bats and its attendant evolutionary problems. *Evolution* **11**: 449- 460.
- Basso-Alves J. P., Agostini K., Teixeira S. P. 2011. Pollen and stigma morphology of some Phaseoleae species (Leguminosae) with different pollinators. *Plant Biology* **13**: 602-610.
- Edlund A.F., Swanson R., Preuss D. 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell* **16**: 84–97.
- Feder N., O'Brien T. P. 1968. Plant Microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**: 123- 142.
- Ferguson I.K., Skvarla J.J. 1982. Pollen morphology in relation to pollinators in Papilionoideae (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **84**: 183–193.
- Ferguson I.K. 1990. The significance of some pollen morphological characters of tribe Amorpheae and the genus *Mucuna* (tribe Phaseoleae) in the biology and systematic of subfamily Papilionoideae (Leguminosae). *Review of Palaeobotany and Palynology* **64**: 129–136.
- Feuer S. M., Niezgoda C. J., Nevling L. I. 1985. Ultrastructure of *Parkia* polyads (Mimosoideae: Leguminosae). *American Journal of Botany* **72**: 1871-1890.
- Fitzgerald M. A., Calder D. M., Knox R. B. 1993. Character states of development and initiation of cohesion between compound pollen grains of *Acacia paradoxa*. *Annals of Botany* **71**: 51- 59.
- Franchi G.G., Nepi M., Dafni A., Pacini E. 2002. Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutionary significance. *Plant Systematics and Evolution* **234**: 211–227.
- Gerrits P. O. 1991. *The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles*. Netherlands: Departament of Anatomy and Embryology, State University Groningen.
- Guinet P. 1989. Pollen of *Obolanga zanonii* (Mimosaceae). *Brittonia* **41**: 173-174.
- Harder L. D., Johnson S. D. 2008. Function and evolution of aggregated pollen in angiosperms. *International Journal of Plant Science* **169**: 59- 78.

- Hesse M. 2000. Pollen wall stratification and pollination. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 1–17.
- Hopkins H. C. F. 1986. Monograph 43 - *Parkia* (Leguminosae:Mimosoideae). In: *Flora Neotropica*. The New York Botanical Garden, New York.
- Hopkins H. C. F. 1984. Floral biology and pollination ecology of the Neotropical species of *Parkia*. *Journal of Ecology* **72**: 1- 23.
- Howell D. J. 1974. Bats and pollen: physiological aspects of the syndrome of chiropterophily. *Comparative Biochemistry Physiology* **48A**: 263-276.
- Johansen D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company Inc., New York.
- Judd W. S., Campbell C. C., Kellogg E. A., Stevens P. F., Donoghue M. J. 2007. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. 620p. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Karnovsky M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A-138A.
- Kenrick J., Knox R. B. 1979. Pollen Development and Cytochemistry in some Australian Species of *Acacia*. *Australian Journal of Botany* **27**: 413- 427.
- Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock M. 2005. *Legumes of the world*. The Royal Botanical Gardens, Kew.
- Luckow M., Hopkins H. C. F. 1995. A Cladistic Analysis of *Parkia* (Leguminosae: Mimosoideae). *American Journal of Botany* **82**: 1300- 1320.
- Niezgoda C. J., Feuer S. M., Nevling L. I. 1983. Pollen ultrastructure of the tribe Ingeae (Mimosoideae: Leguminosae). *American Journal of Botany* **70**: 650-667.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- O'Brien T. P., McCully M. E. 1981. *The study of plants structure. Principles and selected methods*. Thermacarphy Ltd., Melbourne, Austrália.
- Pacini E., Hesse M. 2005. Pollenkitt – its composition, forms and functions. *Flora* **200**: 399-415.
- Pearse A. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. Vol. II, 4th ed. Longman Group Limited.
- Reynolds E. W. 1963. Use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208-212.
- Roulston T.H., Cane J.H. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 187–209.
- Santos F. A. R., Romão C. O. 2008. Pollen morphology of some species of *Calliandra* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae) from Bahia, Brazil. *Grana* **47**: 101-116.
- Seijo J. G., Neffa V. G. S. 2004. The cytological origin of the polyads and their significance in the reproductive biology of *Mimosa bimucronata*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **144**: 343- 349.
- Souza V. C., Lorenzi H. 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. 640p. Instituto Plantarum, Nova Odessa.

- Stroo A. 2000. Pollen morphological evolution in bat pollinated plants. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 225- 242.
- Teppner H. 2007. Polyad development and karyology in *Inga* and *Calliandra* (Mimosaceae-Ingeae): a reply to a recent paper in Flora. *Phyton Annales Rei Botanicae* **47**: 1- 46.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos de desenvolvimento são de grande importância para a compreensão das vias pelas quais são formadas as estruturas e para a determinação de sua origem, dados que podem ser utilizados tanto para estabelecer uma relação com suas funções ecológicas, quanto para enriquecer estudos taxonômicos em um determinado grupo. As políades são estruturas peculiares e ainda muito pouco estudadas, e o presente trabalho vem prover dados essenciais para a compreensão da origem e morfologia destas estruturas, e de sua funcionalidade na reprodução de espécies da subfamília Mimosoideae em Leguminosae.

Estudos acerca da fisiologia do pólen, interação pólen-pistilo e de viabilidade de embriões formados após a fertilização dos óvulos, atrelados aos resultados aqui obtidos, são requeridos para um entendimento mais completo acerca da função, valor adaptativo e seleção dessas estruturas, que são tão restritas a determinados grupos de plantas.