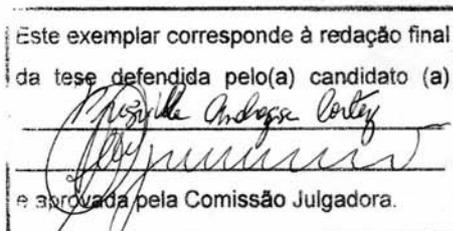


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**PRISCILA ANDRESSA CORTEZ**

**“EMBRIOLOGIA DE *Miconia albicans* (Sw.) Triana  
(MELASTOMATACEAE), ESPÉCIE AGAMOSPÉRMICA”**



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

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P371e

Cortez, Priscila Andressa  
Embriologia de *Miconia albicans* (Sw.) Triana  
(Melastomataceae), espécie agamospérmica / Priscila  
Andressa Cortez. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Sandra Maria Carmello-Guerreiro.  
Co-orientadora: Simone de Pádua Teixeira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Melastomataceae. 2. Apomixia. 3.  
Agamospermia. 4. Esporogênese. 5. Gametogênese. I.  
Carmello-Guerreiro, Sandra Maria. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Embriology of *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae), agamospermous species.

**Palavras-chave em inglês:** Melastomataceae; Apomixis; Agamospermy; Sporogenesis; Gametogenesis.

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal.

**Banca examinadora:** Sandra Maria Carmello-Guerreiro, Renata Carmo de Oliveira, Nelson Sabino Bittencourt Júnior.

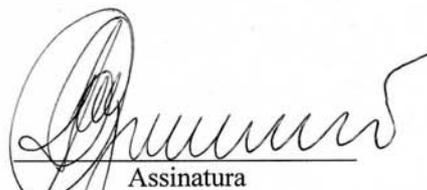
**Data da defesa:** 27/07/2007.

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

**Campinas, 27 de Julho de 2007.**

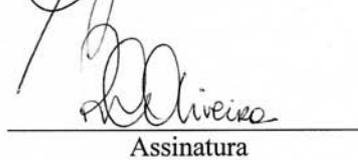
**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sandra Maria Carmello-Guerreiro (Orientadora)



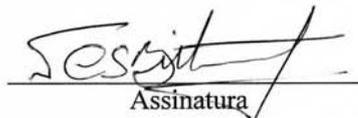
Assinatura

Prof. Dr. Renata Carmo de Oliveira



Assinatura

Prof. Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Ana Paula Stechhahn Lacchia

Assinatura

*A Márcio, Marilene e Taís, que sempre e em tudo me apoiaram, dedico este trabalho.*



EACH EGG REPRESENTS ONE OF LIFE'S CONCERNS AND THE GOAL IS TO GIVE EACH THE APPROPRIATE AMOUNT OF INDIVIDUAL ATTENTION WHILE SIMULTANEOUSLY WATCHING AND GUIDING ALL THE OTHERS.



*"O desconhecido exerce um fascínio tão sedutor que a sua beleza só pode ser classificada como mágica; uma paixão ardente, em que cada pedaço das vestimentas vai sendo retirado com deleite, revelando aos poucos a intimidade da realidade que se oculta sob um delicado véu de veludo; um Amor profundo que vai se conhecendo aos poucos, e que a cada dia, deseja-se conhecer ainda mais."*

## AGRADECIMENTOS

“Toda a vida - ainda das coisas que não tenham vida -, não é mais que uma união. Uma união de pedras é edifício, uma união de tábuas é navio, uma união de homens é exército. E sem esta união tudo perde o nome, e mais, perde o ser. O edifício sem união é ruína, o navio sem união é naufrágio, o exército sem união é despojo. Até o Homem - cuja vida consiste na união de alma e corpo -, com união é Homem. Sem união, é cadáver”.

(Sermão do Santíssimo Sacramento – Padre Antonio Vieira, 1662)

Pela união, agradeço,

- a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro;
- ao **Instituto Florestal**, pela autorização para as coletas realizadas na Estação Ecológica e Experimental de Itirapina e nos Parques Estaduais da Serra do Mar (Núcleo Picingüaba) e da Ilha Anchieta;
- ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp** e, principalmente, a sua eficiente e dedicada secretária, **Maria Roseli de Melo**;
- a **Ana Paula Gonçalves, Marília de Moraes Castro e Solange C. Mazzoni-Viveiros**, membros da banca de qualificação, pelas valiosas críticas e sugestões;
- a **Sandra Maria Carmello-Guerreiro**, por tudo o que me ensina como professora, orientadora, conselheira e amiga; por a cada dia despertar em mim o interesse pela ciência e, mais especificamente, pela Anatomia Vegetal; por ser meio psicóloga, meio mãe, sempre me incentivando e ajudando a crescer;
- a **Simone de Pádua Teixeira**, pela co-orientação neste trabalho, apoio, disposição e amizade; por me ajudar a transformar interrogações em exclamações (e em mais interrogações); por me resgatar quando eu me sinto perdida; por me receber tão prontamente e diversas vezes em sua casa;
- a **Rodrigo Augusto Santinelo Pereira**, *pelo auxílio com a “bendita” estatística; por dividir comigo os filhotes, para que me distraíssem com seus truques;*
- a **Fernando Roberto Martins**, *pela leitura e sugestões feitas à Introdução desta tese;*
- a **Jorge Tamashiro**, *pela ajuda com fotos, coletas, GPSs, prensas, identificação de plantas (Tamashiiiiiiiiiro!!!!), comilanças, mau-humor, enfim, pela amizade;*
- a **Ângela Borges Martins**, *pelo auxílio na identificação dos materiais botânicos e sugestões de leitura;*

aos **professores** e demais **funcionários** da EMEI Buriti, da EEPG São Vicente de Paula, das EEPGs Maria José de Mattos Gobbo e Heitor Penteado e, principalmente, do Instituto de Biologia da Unicamp, que ao longo de toda a minha formação escolar e acadêmica, sempre e em muito contribuíram para o meu “pensar científico”;

a **Ana Paula Caetano, Ângelo Cortelazzo, Bruno Carmo, Daniela Simão, Eliana Forni-Martins, Flávio dos Santos, Isabela Gardinal, Marcelo Dornelas, Maria do Carmo Amaral, Marlies Sazima, Renato Goldenberg**, a **Maria Lúcia Fernandes**, secretária do Departamento de Botânica da Unicamp, a **Gastão Rodrigues, Iara Bressan, João Carlos Galvão** e **Sebastião Militão Junior**, técnicos dos laboratórios do Departamento de Botânica da Unicamp, e a **José Maulin, Maria Ferreira “Tuca”** e **Tereza Maglia**, técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da USP-RP, pelo auxílio com indicação de leituras e com a “logística” desse trabalho, em campo ou no laboratório;

a **Carolina Poletto, Diego de Andrade, Elias Santos, Larissa Mayall** e **Marília Ferreira**, monitores do Parque Estadual da Ilha Anchieta, por me receberem sempre tão atenciosos e por vigiarem os períodos de floração e frutificação da “tal micônia”;

a **Flávia Marquifável, Juliana Paulino, Lígia Ferrucci** e **Marina Costa**, pesquisadoras na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-RP, pelos artigos, sugestões, conversas e bolos;

a **Mirella Crevellaro, Luís Gustavo “Garça”** e demais colegas da turma Biocrossêro, a **Adriana Salomão, Daniel Souza, Daniel Guerreiro, Fabíola Arrotéia, Fernando Perin, Flaviane Fernandes, Glenan Lago, Guilherme Menezes, Juliana José, Marcelo Albieri, Nara Helena, Paulo Matuki, Paulo “Miúdo” Guimarães, Pedro Ivo “Pará”, Renato Assis** e **Vanessa Rosa**, pelas conversas descompromissadas e pela torcida;

a **Ana Cristina Aguiar, Ana Paula Lacchia, Ana Paula Fortuna, Carolina Scatolin, Diego Demarco, Fabiano Scarpa, Gláucia Moretti, Gustavo Shimizu, Inara Moreira, Kayna Agostini, Leonardo Meirelles, Lívia Pedroso, Lívia Scorza, Luciana Uehara, Ludmila Mickeliunas, Marcinha Rocca, Mariana Mansanares, Poliana Cardoso, Raquel Antunes, Rosina Marasca, Sandra Obando, Vanessa Mancuso** e demais colegas do Departamento de Botânica da Unicamp, por tornarem este trabalho mais fácil de ser realizado; pelo auxílio e incentivo imprescindíveis em muitos momentos;

a **Fernanda Castro, Flávia “Flor” Marquitti, Fábio “Jau” Ometto, Marco Antônio “Palocci”, Norma Machado, Plínio Morita** e **Raquel Berg**, pela confiança, apoio, amizade e carinho;

a **Renato “Barrinho” Fernandes, Bianca Peres, Camila Piechotka, Andréa Borges, Fernandinha Bonon, Lissiene Neiva, Luzia Modolo, Mariana Lyra, Prizinha Carrara, Rafael Andrade, Shesterson Aguiar, Sílvia Strapasson, Taís Bonatti** e **Valéria Forni Martins**, grandes pessoas e grandes Amigos em todos os momentos; por me mostrarem sempre o valor de uma Amizade sincera;

- a **Suzana Alcantara**, por fazer diferença em minha vida; pela Amizade rara e incondicional;
- a **Claudemir Dias Filho, Márcio Lorencini e Taís Mazzola**, irmãos que conheci depois de grande, por serem parte tão importante da minha vida e por me fazerem rir de minhas chatices e manias; ao **Clau**, pelos colos e broncas, por ter me feito pensar sempre nas duas faces da verdade, por ter me ensinado a ser forte; ao **Má**, pelas longas conversas, conselhos, carinho, pelos copos d'água antes do boa-noite e até pelos momentos autistas que me irritam tanto; a **tá**, por ser amiga, irmã, mãe, cúmplice, confidente, anjo, por ter me ensinado a me orgulhar de quem sou, por estar sempre presente, “por tudo o que fez e ainda fará em minha vida”;
- a **Flávio Cavalcante**, pela Amizade, paciência e companheirismo; por estar ao meu lado e agüentar minhas noites mal-dormidas e meu mau-humor; pelo carinho, incentivo e apoio incondicionais; por me fazer, a cada dia, querer ser uma pessoa melhor; por topar se aventurar comigo pelos próximos capítulos de teses e vida (e a sua família, **Zezo, Edileusa e Luana**, pelo carinho e confiança);
- a **Afonso e Conceição** (em memória) **Cortez e Ernesto e Rosa Cavasini**, meus avós, pelo carinho e preces de incentivo;
- a **Niraldo, Márcia e Karen Mazzola**, “família que a vida me deu”, pela calorosa torcida ao longo desses sete anos; por fazerem parte da minha vida de forma tão presente e especial;
- a **Márcio Júnior e Rafael**, irmãos queridos, pela cumplicidade e por tudo o que passamos juntos; pelas artes, brigas, conquistas; por serem tão especiais e importantes em minha vida;
- e
- a **Márcio e Marilene**, meus pais, por tudo o que me ensinaram e ensinam; pelo exemplo de caráter que são e pela nobreza de espírito e ações, nas quais tento sempre me espelhar; por compreenderem minhas ausências e partilharem os meus sonhos; pelo “achamento” de uma de “nossas” populações e pelo interesse pelo “nosso” trabalho, projeto e plantinhas; pelo empenho em entender o que eu “tanto faço na Unicamp e na frente do computador”; por relevarem as pilhas de artigos espalhadas pela casa e os surtos na fase final dessa caminhada; por apoiarem e vibrarem a cada passo meu; por todo o Amor, carinho e dedicação, que estão em tudo o que sou e tento ser (Amo vocês!).

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Mecanismos de Reprodução .....	4
1. Reprodução Sexuada (Anfimixia).....	5
2. Reprodução Assexuada (Apomixia) .....	8
OBJETIVOS .....	14
MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
Espécie Estudada.....	15
Áreas de Estudo.....	16
Locais de Coleta.....	17
Tabela 1.....	18
1. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).....	18
2. Valério I, Pedregulho, Graúna.....	19
3. Praia Vermelha do Centro, Praia da Fortaleza, Praia da Picingüaba.....	20
4. Ilha Anchieta.....	22
Coletas e Processamento dos Materiais.....	22
1. Ontogenia dos Estratos Parietais da Antera e Androsporogênese .....	24
1.1. Microscopia de Luz .....	23
1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	25
2. Viabilidade polínica .....	25
3. Ontogenia do Óvulo, do Ginófito e dos Estádios Iniciais do Embrião e do Endosperma.....	26
3.1. Microscopia de Luz .....	26
3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
4. Porcentagem de Óvulos que se Desenvolvem em Sementes .....	27
Tabela 2. ....	28
5. Viabilidade das Sementes .....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
Ilustrações. ....	43

<b>CAPÍTULO 1. Ontogenia dos Estratos Parietais da Antera e Androsporogênese em <i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana (Melastomataceae), Espécie Agamospérmica.....</b>	<b>54</b>
<b>Ilustrações.. ..</b>	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO 2. Ontogenia do Óvulo, do Ginófito e dos Estádios Iniciais do Embrião Agamospérmico e do Endosperma Autônomo de <i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana (Melastomataceae).....</b>	<b>99</b>
<b>Ilustrações .....</b>	<b>126</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>147</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>149</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>149</b>

## RESUMO

*Miconia albicans* (Melastomataceae) mostrou-se uma espécie com agamospermia obrigatória do tipo diplosporia e viabilidade polínica nula em populações do Cerrado e da Floresta Atlântica. A inviabilidade polínica não esteve restrita a um único estágio de desenvolvimento dos andrófitos e a principal anormalidade observada nas anteras de flores em pré-antese foi a deformidade das células reprodutivas, principalmente aquelas em estágio de andrósporos livres. A intensa vacuolação das células androsporogênicas e tapetais, bem como a precoce degeneração das células do tapete, podem ser características relacionadas à esterilidade masculina da espécie. A ontogenia dos estratos parietais diferiu da observada em outros membros do gênero, corroborando a sua classificação como irregular. Anteras em estágio de pré-deiscência apresentaram a região de deiscência coberta por uma provável epiderme com características distintas daquela observada no restante da mesma. Diferenças ambientais foram observadas apenas na quantidade de células encontradas nas anteras de flores em pré-antese, cerca de 50% maior nos indivíduos provenientes do Cerrado. A ontogenia do óvulo e do ginófito se assemelhou àquela observada em outras espécies do gênero, exceção feita a divisão da célula arqueosporial e a supressão da meiose em *M. albicans*. Os embriões agamospérmicos foram originados no interior do ginófito, a partir da oosfera ou de uma das duas sinérgides. Evidências sugerem que o endosperma autônomo do tipo nuclear foi originado por expansões de cada um dos núcleos da célula central, e não por sua fusão. A porcentagem de aborto de óvulos na espécie foi de cerca de 50% e as sementes maduras produzidas apresentaram uma porcentagem de germinação bastante variável, provavelmente em decorrência da alta incidência de fungos observada nos experimentos realizados. Os frutos formados em botões florais apresentaram características semelhantes às observadas nas demais unidades, incluindo a viabilidade das sementes.

**Palavras-chave:** Melastomataceae, Apomixia, Agamospermia, Esporogênese, Gametogênese.

## ABSTRACT

*Miconia albicans* (Melastomataceae) is a species with diplosporic obligate agamospermy and no pollen viability in “Cerrado” and Atlantic Forest vegetations. The sterility of pollen grains wasn’t restricted to one developmental stage and the major abnormality of the cells from pre-anthesis flower anthers was the deformation of the reproductive cell wall, mainly in the free microspore stage. Intense vacuolation of both sporogenous and tapetal cells as well as the precocious degeneration of the tapetal cells may be related to male sterility in this species. The ontogeny of the parietal layers was different from that observed in another species of the genus and was in agreement with its classification of irregular type. The anthers in pre-dehiscence stage showed the dehiscence region probable closed with an epidermis with papilous cells, differently from that observed in the another anther regions. Ambient differences were restricted to the number of cells observed in the pre-anthesis anthers, which was about 50 percent up in the Atlantic Forest vegetation in relation to the Cerrado one. The ovule and embryo sac ontogeny was similar to that observed in another species of the genus, except for the division of the arquesporic cell and the suppression of the meiotic division during the gametogenesis, both observed only in *M. albicans*. The agamospermous embryos were originated in the embryo sac from the egg cell or one of two synergids. Evidence suggested that the nuclear autonomous endosperm was originated from expansions in both nucleus of the central cell, and not from the fusion of both. The percentage of ovule abortion was about 50 percent and the mature seeds showed a variable germination percentage probably due to fungi incidence which occurred in the seeds from both environments. The ontogenetic characteristics observed in fruits from both floral buds and flowers were similar, as well as the seeds viability.

Key-words: **Melastomataceae, Apomixis, Agamospermy, Sporogenesis, Gametogenesis.**

## INTRODUÇÃO GERAL

As Angiospermae (do grego, sementes protegidas), divisão Magnoliophyta, são reconhecidas como a atual flora dominante nos ambientes terrestres. Dados advindos de registros fósseis remetem o surgimento do grupo ao início do Período Cretáceo, há cerca de 130 milhões de anos, seguido de sua extraordinária expansão a uma ampla gama de habitats terrestres e aquáticos, constituindo hoje, um componente significativo da biosfera (Gifford & Foster 1989, Greyson 1994, Crane *et al.* 2004, Boavida *et al.* 2005). O sucesso biológico do grupo está relacionado à sua extensiva especiação, o que faz dela o maior grupo de embriófitas, com cerca de 260.000 espécies em 457 famílias e 45 ordens (Drinnan *et al.* 1994, APG 2003, Soltis & Soltis 2004).

Apesar da enorme diversidade, as Angiospermae compartilham várias sinapomorfias, entre elas a dupla fecundação com a conseqüente formação de endosperma, a presença de carpelos, determinados aspectos da estrutura e da ontogenia do gametófito, e a presença de elementos de tubo crivado e de células companheiras no floema (Doyle & Donoghue 1986, Soltis *et al.* 2004). Embora essa diversidade de caracteres esteja presente também nas estruturas vegetativas, é na estrutura, organização e função dos elementos reprodutivos que ela alcança seu grau mais elevado, sendo, por isso, as características da flor o principal foco dos estudos taxonômicos clássicos realizados nos membros do grupo (Eyde 1975, Greyson 1994, Lersten 2004, Soltis & Soltis 2004, Boavida *et al.* 2005).

As alterações ocorrentes no meristema do ápice vegetativo que levam, em última instância, à formação de flores fazem parte de um processo coordenado denominado evocação (Greyson 1994). Vários estudos têm sido realizados no intuito de entender os mecanismos envolvidos no controle desse fenômeno, e muitos genes relacionados direta ou indiretamente a

ele já foram descritos. Sabe-se que, em *Arabidopsis thaliana*, espécie-modelo amplamente utilizada nesses estudos, pelo menos seis genes estão relacionados com a regulação da identidade e do padrão de desenvolvimento do meristema floral, o que levou à criação do modelo ABC de desenvolvimento floral, simples e aplicável a uma ampla gama de espécies (Coen 1991, Okamoto *et al.* 1993, Meyerowitz 1994, Busch *et al.* 1999, Jack 2004, Park *et al.* 2004). Tais genes e seus ortólogos em outras espécies pertencem a uma classe de genes regulatórios que recebeu o nome de homeóticos pelo fato de seus mutantes determinarem a formação de órgãos e tecidos em locais onde eles normalmente não ocorreriam.

Várias hipóteses tentam explicar o surgimento da flor das Angiospermae e tão grande quanto o número de hipóteses formuladas é o número de críticas feitas a elas. A teoria foliar, elaborada há mais de 200 anos e confirmada por estudos genéticos (Aloni *et al.* 2006), é uma das mais aceitas. Segundo ela, a flor é um ramo altamente especializado composto por entrenós e nós aos quais estão anexados apêndices que representam folhas modificadas relacionadas aos mecanismos de reprodução (Esau 1974, Batygina 2002, Lersten 2004, Mariath *et al.* 2006).

Apesar da sua inquestionável importância e complexidade de estrutura, as flores são unidades efêmeras na fase ou geração esporofítica das Angiospermae e podem aparecer isoladas ou agrupadas em inflorescências de inúmeros tipos. Embora haja uma enorme combinação de número, arranjo e forma dos elementos florais, uma flor típica é constituída por brácteas, por uma haste denominada pedicelo, geralmente com sua porção terminal dilatada, o receptáculo, no qual estão inseridos bractéolas que podem estar ausentes, sépalas e pétalas, que quando indiferenciadas recebem o nome de tépalas, além de estames e/ou carpelos (Esau 1974, Batygina 2002, Lersten 2004, Mariath *et al.* 2006). Flores constituídas pelos quatro grupos de órgãos – sépalas, pétalas, estames e carpelos – são denominadas completas, em oposição às incompletas; flores constituídas por ambos, estames e carpelos, são denominadas perfeitas, em oposição às

imperfeitas (estaminadas ou pistiladas)<sup>1</sup>. Os estames, coletivamente denominados androceu (do grego, “lar masculino”), e os carpelos ou pistilos, coletivamente denominados gineceu (do grego, “lar feminino”), representam os elementos férteis da flor e são, por isso, de particular interesse aos estudos reprodutivos (Esau 1974, Greyson 1994, Lersten 2004, Mariath *et al.* 2006).

Os estames variam em número, forma, tamanho, posição e grau de fusão, mas são geralmente compostos pelo filete e pela antera (Greyson 1994, Batygina 2002). O filete é uma estrutura relativamente simples, responsável pela sustentação e pelo posicionamento do estame na flor, e cuja vascularização é responsável pela nutrição dos tecidos da antera; a antera é uma estrutura formada geralmente por quatro sacos polínicos (lóculos), no interior dos quais se diferencia o androsporângio (microsporângio), isto é, o tecido produtor de andrósporos (microsporos) (Greyson 1994, Irish 1999, Batygina 2002, Lersten 2004).

Cada androsporângio é envolvido por um conjunto de camadas celulares concêntricas, denominadas estratos parietais, cujo desenvolvimento é coordenado geneticamente (Goldberg *et al.* 1993). Tais camadas são delimitadas externamente pela epiderme, derivada da protoderme, e se diferenciam em endotécio, camada(s) médias(s) e tapete<sup>2</sup> (Bhandari 1984, Bedinger 1992, Clément & Pacini 2001, Batygina 2002, Lersten 2004). O endotécio é uma camada subepidérmica geralmente uniestratificada e com espessamentos fibrosos especializados nas paredes de suas células, freqüentemente relacionada aos mecanismos de deiscência da antera e, em algumas espécies, responsável pela produção de substâncias constituintes do fluido locular durante o desenvolvimento dos andrósporos e andrófitos (Bhandari 1984). As camada(s) média(s) são geralmente efêmeras e acredita-se que desempenhem, em algumas espécies, função

---

<sup>1</sup> Os termos “hermafrodita”, “masculina” e “feminina”, embora ainda recorrentes na literatura, são considerados equivocados e tendem a ser abandonados (Cocucci 1980), exceto quando se referem às estruturas produtoras de gametas (gametófitos).

<sup>2</sup> Lersten (2004) considera o tapete como parte do saco polínico e não da parede da antera.

semelhante ao endotécio, podendo, inclusive, apresentar espessamentos nas paredes de suas células (Bhandari 1984). Entretanto, a formação de andrófitos (microgametófitos ou grãos-de-pólen) viáveis depende, principalmente, da presença do tapete, tecido responsável pela produção e secreção de hormônios, enzimas, nutrientes e precursores para a síntese de exina (Heslop-Harrison 1964, Frankel *et al.* 1969, Vithanage & Knox 1980, Bhandari 1984, Pacini *et al.* 1985, Bedinger 1992, Mariath *et al.* 2006, Gonzáles-Sánchez *et al.* 2004, Aloni *et al.* 2006).

Os carpelos são estruturas florais também bastante diversificadas (Batygina 2002). Podem ser únicos ou múltiplos, livres ou fundidos, mas são, geralmente, diferenciados em estigma, porção comumente apical com tecido especializado na recepção dos andrófitos; em estilete, região que sustenta o estigma e por meio da qual cresce o tubo polínico; e em ovário, porção basal dilatada que contém a placenta, tecido a partir do qual se origina um ou mais óvulos (primórdios seminais). É o óvulo o sítio de formação do ginósporo (megásporo), do desenvolvimento do ginófito (megagametófito ou saco embrionário) e da fecundação; é constituído pelo(s) tegumento(s), raramente ausente(s), e pelo nucelo, que representa o (megasporângio), ou seja, produtor de ginósporos (Greyson 1994, Lersten 2004, Mariath *et al.* 2006).

### **Mecanismos de Reprodução**

A função primária de todo organismo é passar à próxima geração tantas cópias de seus genes quanto possível e, nesse sentido, genes que proporcionam aos seus portadores maximizar sua representação no “pool” gênico da próxima geração tornar-se-ão predominantes (Mogie 1992). A principal consequência dessa luta pelo sucesso reprodutivo é a evolução de complexas estratégias ecológicas, comportamentais e reprodutivas, que determinam uma variedade de ciclos reprodutivos e estratégias de história de vida (Mogie 1992). Os mecanismos de reprodução nas

Angiospermae são governados por fatores intrínsecos e ambientais que coordenam as atividades do meristema floral (Okamuro *et al.* 1993).

A existência de mecanismos de reprodução nas plantas superiores, particularmente nas Angiospermae, é reconhecida há bastante tempo, sendo os primeiros registros constituídos por ilustrações e esculturas que datam de 885-860 a.C. (Cocucci 1969). Além da variedade na estrutura floral, a variedade de sistemas reprodutivos presentes nas Angiospermae tem sido considerada a grande responsável pela variedade estrutural e pelo sucesso ecológico observados nesse grupo (Richards 1997). Sistema reprodutivo, como comumente referido, reúne mecanismos de reprodução sexuada e/ou assexuada e, juntamente com o sistema meiótico, determina o grau de recombinação genética presente nas espécies (Grant 1981, Borges 1991).

A meiose, processo citogenético comum à androsporogênese e à ginosporogênese, é responsável pela separação entre as fases ou gerações esporofíticas e gametofíticas, permitindo redução pela metade no número cromossômico da espécie ( $2n \rightarrow n$ ) e geração de variabilidade genética devido aos mecanismos de “crossing-over” e segregação independente das cromátides, fenômenos sobre os quais podem atuar os mecanismos de seleção natural (Mogie 1992, Greyson 1994, Caryl *et al.* 2003).

### **1. Reprodução Sexuada (Anfimixia)**

A reprodução sexuada ou anfimixia envolve obrigatoriamente produção e fusão de gametas haplóides e é a principal forma de reprodução encontrada nas Angiospermae (Nogler 1984, Asker & Jerling 1992) (Fig. 1). Inúmeras células diplóides ( $2n$ ) do androsporângio diferenciam-se em células-mãe de andrósporos e, por meio de meiose, originam cada uma, quatro andrósporos haplóides ( $n$ ), geralmente de arranjo tetraédrico, que são envolvidos por uma parede de calose, num conjunto de eventos celulares denominado androsporogênese. Os andrósporos

unicelulares representam o início da fase ou geração gametofítica; alterações em sua forma, tamanho, conteúdo citoplasmático e características da parede são acompanhadas por uma divisão mitótica assimétrica que origina uma célula vegetativa (sifonogênica) e uma célula generativa (gametogênica), ambas haplóides ( $n$ ). A célula generativa tem, inicialmente, posição periférica, sendo posteriormente englobada pelo citoplasma da célula vegetativa, resultando na formação do andrófito bicelular. O núcleo da célula vegetativa e a célula generativa se aproximam gradativamente, constituindo a unidade germinativa masculina (Mariath *et al.* 2006), sendo que em cerca de 70% das Angiospermae estudadas o andrófito é liberado em sua forma bicelular após a deiscência da antera (Greyson 1994, Lersten 2004).

Já no interior do óvulo, no ginosporângio, comumente há diferenciação de uma única célula-mãe de ginósporo diplóide ( $2n$ ). Num conjunto de eventos denominado ginosporogênese, o ginósporo, por meio de meiose, origina quatro ginósporos haplóides ( $n$ ) geralmente de arranjo linear. Diferentemente do que ocorre na androsporogênese, na maioria das Angiospermae (Greyson 1994, Lersten 2004, Mariath *et al.* 2006) apenas um dos ginósporos produzidos é funcional, geralmente aquele que ocupa posição calazal, sendo que os outros três degeneram (monosporia). A formação de um ginósporo funcional marca o início da fase ou geração gametofítica e, após três ciclos mitóticos, dá origem a um ginófito haplóide ( $n$ ) geralmente constituído por sete células e oito núcleos, sendo três antípodas, duas sinérgides e uma oosfera, todas elas uninucleadas, e uma célula central com dois núcleos polares. As duas sinérgides e a oosfera são conjuntamente denominadas aparelho oosférico (Willemse & Went 1984) e, juntamente com a célula central, constituem a unidade germinativa feminina (Dumas *et al.* 1984, Huang & Russel 1992). Diferentemente do andrófito, o ginófito não é liberado após sua maturação, permanecendo retido no interior do ginosporângio, do qual recebe proteção mecânica, física e nutrição.

A liberação (ou retirada) dos andrófitos das anteras maduras é seguida pelo fenômeno da polinização, que é o depósito do andrófito na superfície estigmática do gineceu e envolve várias e complexas interações celulares, incluindo mecanismos de reconhecimento, seleção e de compatibilidade e incompatibilidade genéticas (Went & Willemse 1984, Bittencourt Jr. 2003, Lersten 2004). A maioria das espécies de Angiospermae libera os andrófitos em unidades bicelulares simples e a hidratação deles no estigma receptivo tem como consequência a germinação, que se dá com o crescimento da célula vegetativa, formando o tubo polínico (Knox 1984, Lersten 2004, Mariath *et al.* 2006). O tubo se projeta através de uma das aberturas da parede do andrófito e cresce no interior do estilete em direção ao ovário. Nessas espécies segue-se a divisão mitótica da célula generativa haplóide ( $n$ ) originando duas células espermáticas, ambas haplóides ( $n$ ), resultando no andrófito tricelular. O núcleo da célula vegetativa e as duas células espermáticas estão organizados muito próximos, integrando ainda a unidade germinativa masculina (Dumas *et al.* 1985, Mogensen 1992), que migra pelo tubo polínico e é descarregada, após penetrar o aparelho filiforme, no interior de uma das sinérgides, juntamente com seu conteúdo citoplasmático (Knox 1984, Went & Willemse 1984, Lersten 2004).

Segue-se o fenômeno da dupla fecundação, que embora seja considerada sinapomorfia das Angiospermae, não é um evento exclusivo do grupo (Magallon & Sanderson 2002, Mariath *et al.* 2006): um dos núcleos da célula espermática funde-se ao núcleo da oosfera originando o zigoto diplóide ( $2n$ ), e o outro núcleo espermático funde-se aos núcleos polares já fundidos ou ainda separados da célula central originando a célula endospermica primária, geralmente triplóide ( $3n$ ). Após mitoses sucessivas o zigoto dará origem ao embrião e a célula primária do endosperma, ao endosperma, tecido este do qual o embrião irá se nutrir principalmente durante os estádios iniciais do seu desenvolvimento (Maheshwari 1950, Knox 1984, Went & Willemse

1984, Willemse & Went 1984, Endress 1994, Greyson 1994, Drews *et al.* 1998, Raven *et al.* 1999, Lersten 2004, Mariath *et al.* 2006).

## **2. Reprodução Assexuada (Apomixia)**

A reprodução assexuada é considerada, em muitos membros das Angiospermae, como uma forma natural alternativa ou mesmo obrigatória de reprodução, em que novos indivíduos geneticamente iguais ou semelhantes à planta-mãe são originados sem que haja fusão entre gametas (Mogie 1992). A terminologia aplicada aos vários casos de reprodução assexuada é confusa, numerosa e não aceita universalmente, dificultando as discussões e o entendimento claro dos fenômenos nela envolvidos (Maheshwari 1950, Nogler 1984, Asker & Jerling 1992, Mogie 1992, Naumova 1993, Richards 1997).

A primeira classificação foi fornecida em 1908 por Winkler (*apud* Asker & Jerling 1992), que introduziu o termo apomixia (“sem mistura”) para designar os vários tipos de reprodução assexuada conhecidos até então. O desenvolvimento de novas técnicas experimentais permitiu grandes avanços no campo da embriologia e, com eles, o surgimento de vários e complexos sistemas de classificação (Asker & Jerling 1992). O sistema criado por Gustafsson (1946, 1947a, b *apud* Naumova 1993), que procurou sintetizar o conhecimento disponível até a época, é considerado um dos mais completos, lógicos e simples, sendo por isso, um dos mais aceitos atualmente.

Segundo Gustafsson (1946, 1947a, b *apud* Naumova 1993) apomixia é sinônimo de reprodução assexuada, e inclui a propagação vegetativa e a agamospermia; a agamospermia, por sua vez, inclui a diplosporia, a aposporia e a embriogenia adventícia. Muitos dos trabalhos recentemente publicados, embora sigam essa classificação, comumente empregam o termo apomixia em seu sentido restrito, como sinônimo de agamospermia (Nogler 1984, Asker &

Jerling 1992, Koltunow *et al.* 1995, Richards 1997, Judd *et al.* 1999, Crane 2001, Grossniklaus *et al.* 2001a, Bicknell & Koltunow 2004, Albertini *et al.* 2005, Bradley *et al.* 2007). No presente trabalho o termo apomixia será utilizado como sinônimo de reprodução assexuada.

A agamospermia é uma forma de reprodução considerada derivada dos sistemas reprodutivos sexuados, sendo, portanto, um método alternativo de propagação via sementes (Richards 1997, Bhat *et al.* 2005). As sementes produzidas nesse tipo de reprodução devem ser viáveis e o embrião deve ser formado sem que haja fusão de gametas (Brown 1978, Asker & Jerling 1992, Mogie 1992, Greyson 1994, Grossniklaus *et al.* 2001a). Os primeiros estudos que revelaram a presença de agamospermia nas Angiospermae datam da metade do século XIX e seu padrão de distribuição no grupo indica uma origem polifilética (Asker & Jerling 1992, Naumova 1993, Grossniklaus *et al.* 2001a, Spillane *et al.* 2001). Acredita-se que as espécies agamospérmicas retêm algum grau de sexualidade (agamospermia facultativa) (Naumova 1993, Koltunow & Grossniklaus 2003), sendo que a existência de espécies estritamente agamospérmicas (agamospermia obrigatória) chega mesmo a ser contestada (Asker & Jerling 1992).

Dois tipos básicos e distintos de agamospermia são reconhecidos. A agamospermia esporofítica (embriogenia adventícia) foi o primeiro tipo de reprodução assexuada descoberto nas Angiospermas e é o tipo mais freqüente de agamospermia ocorrente em populações naturais (Naumova 1993). Nela o embrião é formado diretamente a partir de uma célula inicial (embriócito) localizada no tegumento (embriogenia tegumentar) ou, mais comumente, no nucelo (embriogenia nucelar) do óvulo (Nogler 1984, Koltunow *et al.* 1995, Richards 1997, Crane 2001, Grossniklaus *et al.* 2001a, Richards 2003). Essa propriedade ilustra a totipotência das células ovulares (Batygina 2005), característica de interessante aplicação prática, principalmente por ser

observada naturalmente em várias espécies de importância econômica como *Citrus* e *Mangifera* (Naumova 1993, Bhat *et al.* 2005).

Devido à possibilidade de diferenciação de mais de um embriócito, com a conseqüente formação de mais de um embrião por óvulo, a embriogenia adventícia está freqüentemente associada ao fenômeno da poliembrionia (Crane 2001, Bhat *et al.* 2005). Além disso, em grande parte dos casos, num mesmo óvulo pode ser observada a ocorrência em paralelo da embriogenia adventícia e da reprodução sexuada (Richards 2003), o que pode levar, também, à poliembrionia (Naumova 1993).

A agamospermia gametofítica envolve a formação de um ginófito a partir de uma célula inicial não-reduzida, em conseqüência de meiose irregular (aneumeiose) ou ausente (apomeiose) (Nogler 1984). Esse tipo de agamospermia é subdividido em diplosporia e aposporia, embora muitas vezes a distinção entre eles seja difícil; na diplosporia (subtipos *Taraxacum*, *Ixeris*, *Antennaria*, *Allium*, *Blumea*, *Elymus* e *Eragrostis*) o ginófito se desenvolve diretamente a partir de uma célula-mãe de ginósporo, e na aposporia (subtipos *Hieracium* e *Panicum*), a partir de células somáticas do óvulo, freqüentemente do nucelo (Asker & Jerling 1992, Naumova 1993, Richards 1997, Crane 2001). Em ambos os casos o embrião se desenvolve autonomamente a partir da oosfera (partenogênese) ou, mais raramente, de outra célula do ginófito que não a oosfera (Koltunow *et al.* 1995). Esses dois principais componentes da agamospermia gametofítica, aneumeiose ou apomeiose e partenogênese, permitem a manutenção da alternância de gerações sem que haja alteração no nível de ploidia, ou seja, as fases ou gerações gametofítica e esporofítica possuem o mesmo nível de ploidia.

O desenvolvimento de um endosperma funcional é importante para a viabilidade da semente e, em espécies agamospérmicas, freqüentemente requer adaptações especiais do desenvolvimento do ginófito e dos processos de fecundação (Nogler 1984, Grossniklaus *et al.*

2001b, Vinkenoog *et al.* 2000). Embora o embrião seja formado sem que haja singamia, a formação do endosperma geralmente só acontece após a fusão entre o núcleo espermático e os núcleos polares, e as plantas que apresentam esse tipo de agamospermia são denominadas pseudogâmicas (Maheshwari 1950, Nogler 1984, Naumova 1993, Koltunow *et al.* 1995, Vielle-Calzada *et al.* 1996, Grossniklaus *et al.* 2001a, 2001b, Bhat *et al.* 2005), fenômeno este que prevalece entre as espécies apospóricas (Asker & Jerling 1992, Richards 1997).

Espécies com endospermogênese autônoma, como alguns membros de Compositae (Chaudhury *et al.* 2001), dispensam a fusão entre núcleos haplóides para a formação desse tecido. Provavelmente devido à raridade desse fenômeno entre as espécies agamospérmicas (Koltunow & Grossniklaus 2003), pouco se conhece sobre os mecanismos fisiológicos ou genéticos que o regulam (Richards 1997). Além disso, há casos em que o embrião aparentemente se desenvolve sem que um endosperma funcional esteja presente, como observado em *Garcinia*, Clusiaceae (Richards 1990, Baarlen *et al.* 1999).

Nos casos de endospermogênese autônoma, em que a formação do endosperma dispensa a fusão entre o núcleo espermático e os núcleos polares, a presença de andrófitos funcionais é desnecessária e sua formação pode sofrer interferência de processos degenerativos como alterações nas células do tapete e/ou no processo meiótico das células-mãe de andrósporos (Nogler 1984, Gonzáles-Sánchez *et al.* 2004, Kapoor & Takatsuji 2006, Kawanabe *et al.* 2006), embora os mecanismos moleculares reguladores desses processos não tenham sido ainda elucidados (Bhat *et al.* 2005). Segundo Asker & Jerling (1992), esse tipo de agamospermia ocorre principalmente em associação com a diplosporia.

Várias características expressadas pelas espécies agamospérmicas têm evidente aplicação na agricultura, dentre elas a possibilidade de fixação de genótipos estáveis (clones) e a produção

e manutenção de híbridos (Asker & Jerling 1992, Naumova 1993, Vielle-Calzada *et al.* 1996, Richards 1997, Bhat *et al.* 2005) e, nos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos em espécies economicamente importantes (Koltunow *et al.* 1995, Vielle-Calzada *et al.* 1996, Drews *et al.* 1998, Grossniklaus & Schneitz 1998, Savidan *et al.* 2001, Araujo & Falcão 2003, Albarouki & Peterson 2007). Grande parte dos trabalhos realizados com espécies agamospérmicas procura estabelecer as bases genéticas e moleculares da agamospermia e de seu controle, e muitas mutações que afetam o desenvolvimento e a função do óvulo têm sido isoladas, com especial atenção àquelas que alteram o desenvolvimento do ginófito (Drews *et al.* 1998, Grossniklaus *et al.* 2001a, Albertini *et al.* 2005). Entretanto, estudos anatômicos do desenvolvimento do embrião agamospérmico e das alterações ontogenéticas dos andrófitos em espécies não-domesticadas, principalmente aqueles de caráter comparativo, são ainda bastante raros (Naumova 1993).

Como já mencionado, agamospermia e reprodução sexuada não são eventos mutuamente exclusivos, e atualmente é admitida a existência de 300 a 400 espécies distribuídas em 34-57 famílias, com agamospermia facultativa ou obrigatória, sendo o fenômeno especialmente comum entre os membros de Gramineae, Asteraceae e Rosaceae (Nogler 1984, Asker & Jerling 1992, Carman 1997, Richards 1997, Judd *et al.* 1999, Grossniklaus *et al.* 2001a, Spillane *et al.* 2001). Estudos recentes têm revelado um grande número de espécies agamospérmicas também entre as Melastomataceae, particularmente no gênero *Miconia* (Renner 1989, Borges 1991, Sartor 1994, Goldenberg & Shepherd 1998, Caetano *et al.* 2005, Cortez *et al.* 2007a, b). Segundo Goldenberg & Shepherd (1998), se os dados obtidos até o momento sobre o sistema reprodutivo das Melastomataceae forem extrapolados à família como um todo, particularmente à tribo Miconieae, estaremos diante do maior complexo agamospérmico dentre as famílias até hoje estudadas. Entretanto, tal “status” se mantém apenas como mera suposição quando levamos em conta que,

até o momento, apenas 100 das cerca de 4500 espécies reconhecidas para a família foram investigadas quanto ao sistema reprodutivo (Renner 1989, Borges 1991, Sartor 1994, Goldenberg & Shepherd 1998).

A família Melastomataceae Juss. (ordem Myrtales) compõe a flora de diversas formações vegetais, sendo uma das famílias mais ricas e abundantes dentre as Angiospermae. Melastomataceae compreende de 150-166 gêneros e cerca de 4570 espécies ocorrentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Welle & Koek-Noorman 1981, Wurdack & Kral 1982, Renner 1989, 1993, Martins *et al.* 1996). Nos Neotrópicos podem ser encontrados cerca de 106 gêneros e 3000 espécies (Renner 1989), das quais 250 ocorrem no Brasil, sendo que até 1996, 53 já haviam sido coletadas no estado de São Paulo (Martins *et al.* 1996). *Miconia* (tribo Miconieae DC.) é o maior gênero da família, e um dos maiores gêneros neotropicais, com 1056 espécies conhecidas, todas nativas das Américas (Goldenberg 2000).

As Melastomataceae apresentam diversidade de estruturas vegetativas, reprodutivas e de hábitos, podendo ser herbáceas, arbustivas, subarbustivas, arbóreas, trepadeiras e epífitas. Entretanto, com exceção de poucos gêneros, seus indivíduos podem ser facilmente reconhecidos pela nervação foliar acródroma e pela morfologia dos estames. As flores são perfeitas, tetrâmeras ou pentâmeras, organizadas em inflorescências principalmente do tipo cimosa, sendo a autogamia evitada pela eficiente separação espacial entre estigma e anteras (hercogamia), sendo estas tubulares com poros apicais ou subapicais; o fruto é principalmente bacáceo, com polpa geralmente suculenta e açucarada, as sementes variam de uma a muitas, são pequenas, exalbuminosas e exariladas (Wurdack & Kral 1982, Renner 1989, 1993, Romero & Martins 2002).

## OBJETIVOS

Este trabalho, incluído no projeto temático “Composição Florística, Estrutura e Funcionamento da Floresta Ombrófila Densa dos Núcleos Picingüaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar”, teve como objetivo geral contribuir com novos dados sobre o sistema reprodutivo e sobre a embriologia de espécies com ocorrência registrada tanto para a Floresta Atlântica quanto para o Cerrado por meio da análise embriológica de populações de *M. albicans*.

Os objetivos específicos deste trabalho foram analisar e descrever estruturalmente a ontogenia dos estratos parietais da antera, a androsporogênese, a ontogenia do óvulo e do ginófito, a ginogametogênese, o desenvolvimento inicial do embrião agamospérmico e do endosperma da espécie. Além disso, foram calculadas a viabilidade polínica, a razão óvulo/semente e a porcentagem de germinação das sementes da espécie.

Dessa forma, este trabalho procurou responder às seguintes questões:

- 1) A ontogenia dos estratos parietais da antera e o número de estratos constituinte da antera madura se assemelham àqueles descritos para outras espécies de Melastomataceae?
- 2) A inviabilidade dos andrófitos, observada em populações de Cerrado, é característica compartilhada pelas populações da Floresta Atlântica?
- 3) A inviabilidade dos andrófitos está restrita a um único estágio da androsporogênese e/ou da androgametogênese?
- 4) A ontogenia do óvulo e do ginófito se assemelha àquela descrita para outras espécies de Melastomataceae?
- 5) O embrião agamospérmico é formado no interior do ginófito ou fora dele?
- 6) Há formação de endosperma? Em caso positivo, seu tipo se assemelha àquele descrito para outras espécies de Melastomataceae?

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Espécie Estudada

*Miconia albicans* (Sw.) Triana (Fig. 2, 3), Trans. Linn. Soc. Bot. 28(1): 116. 1871.

*Melastoma albicans* Sw., Prodr. 3: 70. 1788.

Arbustos ou pequenas árvores 0,8-2,0 m de altura. Ramos 3,0-5,0 mm de largura, cilíndricos, quando jovens lanosos, canescentes, depois glabrescentes. Folhas com pecíolo 0,5-1,5 cm de comprimento, lâmina 5-11 x 2,5-4,5, discolor, elíptico-oblonga ou oval-oblonga, base arredondada, cordada, aguda ou atenuada, ápice arredondado, agudo ou levemente acuminado, margem inteira a sinuosa (crenulada), face adaxial primeiramente furfuráceo-estrelada, depois glabrescente, face abaxial densamente lanosa, canescente, 2 pares de nervuras acródomas basais, sendo um par bem marginal. Inflorescências 8-14 cm de comprimento, panículas escorpióides, terminais ou axilares, brácteas e bractéolas reduzidas, persistentes, triangulares, cerca de 1 mm. Flores 5-meras, sésseis; hipanto cerca de 2 mm de comprimento, campanulado, lanoso, oblongo, tomentoso-ferrugíneo; cálice com lacínias persistentes, ápice obtuso, 1,5 mm de comprimento, triangulares, internas e externas fundidas; pétalas 3 mm de comprimento, brancas, obovadas, levemente assimétricas, ápice obtuso a arredondado, margem não ciliada. Estames 10, subisomorfos, filetes 4 mm de comprimento, anteras 2 a 3 mm de comprimento, oblongas, ápice atenuado, uniporosa, poro inclinado ventralmente, conectivo prolongado, 0,3-0,5 mm abaixo das tecas, espessado no dorso, antepétalos: calcar dorsal, apêndice trilobado com dois lobos laterais voltados para a face ventral e um lobo maior, intermediário, dorsal, unidos entre si formando uma membrana basal. Ovário 3-locular, glabro, adnato ao hipanto até a metade; estilete 4 mm de comprimento, glabro, alargado no ápice; estigma captado. Fruto baga 5 mm de comprimento,

polispérmico, lacínias persistentes no fruto, verde-jade quando madura. Sementes poliédricas, angulosas, cerca de 1 mm, testa lisa.

*M. albicans* é considerada espécie agamospérmica obrigatória (Renner 1989, Sartor 1994, Goldenberg & Shepherd 1998), característica de vegetações do Cerrado, mas que também pode ser encontrada em áreas de Floresta Atlântica do litoral brasileiro, embora, neste ambiente, não haja estudos sobre o seu sistema reprodutivo. Na América ocorre do sul do México e Antilhas até o Paraguai, e em quase todos os estados brasileiros (Romero & Martins 2002, Candido 2005).

### **Áreas de Estudo**

As coletas foram realizadas em áreas de Cerrado e de Floresta Atlântica do estado de São Paulo, escolhidas levando-se em consideração a abundância de indivíduos da espécie em cada área e a facilidade de acesso aos indivíduos.

O Cerrado é considerado o segundo maior bioma do país em área, representando 22% do território nacional, e ocupa predominantemente a região do Planalto Central brasileiro, ao lado ou em mosaico com áreas menores pertencentes a outros biomas. Sua vegetação é caracterizada pela variação fisionômica, florística e fitossociológica, que inclui extremos como o Campo Limpo e o Cerradão, e outras consideradas intermediárias. As árvores e arbustos possuem, predominantemente, baixa estatura e ramificações irregulares e retorcidas, e se destacam, sobretudo, pela escleromorfia foliar, pela suberificação caulinar e pela presença de raízes longas (Cole 1960, Joly 1970, Goodland 1971, Ratter *et al.* 1997, Ribeiro & Walter 1998, Furley 1999, Durigan *et al.* 2003, Durigan & Ratter 2006).

A Floresta Atlântica ocorre praticamente de norte a sul do Brasil, principalmente nas regiões costeiras, e possui como tipo vegetacional predominante a Floresta Ombrófila Densa, anteriormente denominada Floresta Pluvial Tropical, que compreende florestas úmidas, perenes,

latifoliadas, tropicais e subtropicais, caracterizadas pela alta diversidade florística e pelo alto índice de endemismos (Mori *et al.* 1981, IBGE 1992, Ribeiro & Walter 1998, Thomas *et al.* 1998, Tabarelli & Mantovani 1999, Oliveira-Filho & Fontes 2000, Genini *et al.* 2005, Scudeller *et al.* 2001, Scudeller 2002).

Apesar da inquestionável importância ecológica, o Cerrado e a Floresta Atlântica apresentam-se ainda hoje sob contínua e intensa fragmentação, fato resultante da ação antrópica degradativa e agravado pela proteção insuficiente que lhes é destinada, sendo os remanescentes representados por áreas altamente fragmentadas, com forte ação antrópica degradativa e com alto risco de extinção de espécies vegetais e animais (Turner 1996, Ranta *et al.* 1998, Thomas *et al.* 1998, Morellato & Haddad 2000, Tabanez & Viana 2000, Webb *et al.* 2005). Ambos foram, recentemente, incluídos entre os 25 “hotspots” da Terra, que são áreas reconhecidas internacionalmente para conservação devido aos altos níveis de endemismos vegetais que apresentam e à ameaça de destruição a que estão submetidas (CI 2007, Myers *et al.* 2000, Genini *et al.* 2005). Dentre as famílias de Angiospermae mais comuns em número de espécies nesses ambientes destacam-se Myrtaceae, Leguminosae, Rubiaceae, Melastomataceae, Poaceae e Asteraceae (Oliveira-Filho & Fontes 2000).

### **Locais de Coleta**

Em cada formação vegetacional foram escolhidas quatro populações de *M. albicans*, identificadas como PI, PII, PIII e PIV, e em cada população, três indivíduos, que foram identificados como  $\Delta I$ ,  $\Delta II$  e  $\Delta III$ . Cada um dos 24 indivíduos escolhidos recebeu uma fita de identificação para facilitar sua localização e teve suas coordenadas geográficas e altitude obtidas com a utilização de um aparelho para sistema de posicionamento (“GPS”) eTrex Ouro (Tabela 1).

**Tabela 1.** Coordenadas geográficas das populações (P) e indivíduos ( $\Delta$ ) de *M. albicans* estudados no Cerrado e na Floresta Atlântica.

Formação Vegetacional	Município	P	Localização	$\Delta$	Coordenada Geográfica	Altitude (m)	
Cerrado	Campinas	I	Laboratório	I	22°48'09,5"S e 47°03'19,2"W	610	
			Nacional de Luz	II	22°48'10,3"S e 47°03'18,3"W	607	
			Síncrotron	III	22°48'10,6"S e 47°03'18,3"W	607	
	Itirapina	II	Valério I		I	22°13'21,4"S e 47°51'15,5"W	753
					II	22°13'21,3"S e 47°51'15,4"W	756
					III	22°13'20,4"S e 47°51'15,8"W	755
		III	Pedregulho		I	22°14'21,0"S e 47°49'43,9"W	780
					II	22°14'24,8"S e 47°49'43,6"W	782
					III	22°14'26,4"S e 47°49'43,1"W	786
	IV	Graúna		I	22°15'55,1"S e 47°47'51,3"W	811	
				II	22°15'55,4"S e 47°47'50,5"W	811	
				III	22°15'56,1"S e 47°47'50,8"W	813	
Floresta Atlântica	Ubatuba	I	Praia Vermelha do Centro	I	23°27'41,8"S e 45°02'01,3"W	132	
				II	23°27'41,9"S e 45°02'01,5"W	132	
				III	23°27'41,8"S e 45°02'28,8"W	130	
		II	Praia da Fortaleza	I	23°30'50,4"S e 45°09'59,4"W	31	
				II	23°31'02,1"S e 45°10'00,2"W	46	
				III	23°31'05,0"S e 45°09'49,7"W	51	
	III	Praia da Picingüaba	I	23°22'22,0"S e 44°50'10,8"W	42		
			II	23°22'17,8"S e 44°50'07,7"W	37		
			III	23°22'15,7"S e 44°50'05,9"W	35		
	IV	Ilha Anchieta		I	23°32'14,9"S e 45°03'47,3"W	19	
				II	23°32'15,5"S e 45°03'48,1"W	15	
				III	23°32'14,0"S e 45°03'47,3"W	19	

### 1. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (22° 48' S e 47° 03' W) está localizado no município de Campinas (22° 55' S e 47° 05' W), porção centro-leste do estado de São Paulo, Brasil, a cerca de 100 km da capital paulista e a uma altitude média de 660 m. Os solos apresentam características diversas conforme sua localização na área cristalina ou sedimentar, sendo que nas áreas de boa drenagem predominam os Latossolos Vermelho e Vermelho-Amarelo, enquanto que nos fundos dos vales e terraços aluviais, que são ambientes de má drenagem, predomina o Gleissolos Háplicos (Resende & Resende 1996, Batistella *et al.* 2004). O clima é do tipo Cwa de Köeppen (1948), tropical de altitude, com uma estação fria e seca

(inverno) de abril a setembro, e uma estação quente e úmida (verão) com alta disponibilidade hídrica e precipitações médias anuais de 1371 mm de outubro a março; a temperatura média anual está em torno de 21°C (Lazutin *et al.* 1996, Toniato 1998, Batistella *et al.* 2004, Rodrigues *et al.* 2004). Atualmente a vegetação se encontra bastante reduzida e fragmentada, sendo constituída por um mosaico de formações com predominância de remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual entremeadas por fragmentos isolados de Cerrado, principalmente campo limpo, cerrado “*lato sensu*” e cerradão (Rodrigues *et al.* 2004, Batistella *et al.* 2004).

O fragmento de Cerrado do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, escolhido como População I (PI), possui vegetação classificada como cerrado “*stricto sensu*”, subtipo denso (F.R. Martins, comunicação pessoal) (Fig. 4). Os três indivíduos ( $\Delta I$ ,  $\Delta II$  e  $\Delta III$ ) escolhidos nessa área estão localizados na borda da formação.

## **2. Valério I, Pedregulho, Graúna**

Os fragmentos de Cerrado Valério I (22° 13' S e 47° 51' W), Pedregulho (22° 14' S e 47° 49' W) e Graúna (22° 15' S e 47° 47' W) estão localizados no município de Itirapina (22° 15' S e 47° 49' W), porção central do estado de São Paulo, Brasil, a cerca de 200 km da capital paulista e a uma altitude média de 770 m. Na região são encontrados vários tipos de solos, dentre eles Latossolos Vermelho-Escuro e Vermelho-Amarelo (Sarmiento 1984, Gianotti & Leitão-Filho 1992, Silva 2005). O clima é do tipo Cwa de Köppen (1948), definido como mesotérmico (Gianotti & Leitão-Filho 1992), com uma estação fria e seca (inverno) de abril ou maio a setembro e uma estação quente e úmida (verão) de outubro a março, precipitações médias anuais de cerca de 1450 mm e temperatura média anual de 22°C (Dansa & Rocha 1992, Delgado *et al.* 2004, Tannus & Assis 2004, Silva 2005). A vegetação natural é composta principalmente por cerrado “*stricto sensu*” (Goodland 1971 *apud* Dansa & Rocha 1992), mas inclui grandes áreas de

plantações de espécies de *Pinus* e *Eucalyptus*, embora seja parte da Área de Preservação Ambiental (APA) de Corumbataí (Gianotti & Leitão-Filho 1992, SMA 2001).

O fragmento de Cerrado Valério I, escolhido como População II (PII), está incluído na Estação Experimental e Ecológica de Itirapina, uma das unidades da Divisão de Florestas e Estações Experimentais do Instituto Florestal, e possui vegetação classificada como cerradão ou cerrado “stricto sensu” subtipo denso (Ribeiro *et al.* 1983, Ribeiro & Walter 1998) (Fig. 4). Os três indivíduos ( $\Delta I$ ,  $\Delta II$  e  $\Delta III$ ) escolhidos nessa área estão localizados no interior da formação.

O fragmento de Cerrado Pedregulho, escolhido como População III (PIII), está incluído na Estação Experimental e Ecológica de Itirapina, uma das unidades da Divisão de Florestas e Estações Experimentais do Instituto Florestal, e possui vegetação classificada como cerrado “stricto sensu” e cerradão (Sasaki *et al.* 1999, Simabukuro *et al.* 1999) (Fig. 4). Os três indivíduos ( $\Delta I$ ,  $\Delta II$  e  $\Delta III$ ) escolhidos nessa área estão localizados na borda da formação.

O fragmento de Cerrado Graúna, escolhido como População IV (PIV), está incluído em uma propriedade particular e possui vegetação classificada como cerrado “stricto sensu” (Ribeiro *et al.* 1983) (Fig. 4). Os três indivíduos ( $\Delta I$ ,  $\Delta II$  e  $\Delta III$ ) escolhidos nessa área estão localizados no interior da formação.

### **3. Praia Vermelha do Centro, Praia da Fortaleza, Praia da Picingüaba**

As áreas de Floresta Atlântica da Praia Vermelha do Centro (23° 27' S e 45° 02' W), da Praia da Fortaleza (23° 30' S e 45° 09' W) e da Praia da Picingüaba (23° 22' S e 44° 50' W) localizam-se no município de Ubatuba (23° 26' S e 45° 04' W), litoral norte do estado de São Paulo, Brasil, a cerca de 250 km da capital paulista e a uma altitude média de 3 m. O município encontra-se em uma região denominada Serra do Mar. Nessa região encontra-se o Parque Estadual da Serra do Mar, que abrange a maior área contínua de Floresta Atlântica preservada do

Brasil. Os solos são predominantemente Latossolos Vermelho-Amarelo. O clima é do tipo Cf de Köeppen (1948), definido como tropical chuvoso, com verão quente e superúmido de outubro a abril, e inverno com chuvas menos frequentes, embora sem déficit hídrico, de maio a setembro, precipitações médias anuais superiores a 2.000 mm, temperatura média anual em torno de 22°C e umidade relativa do ar superior a 85% (Talora & Morellato 2000, Almeida-Neto *et al.* 2006). A vegetação é classificada como Floresta Ombrófila Densa (Almeida-Neto *et al.* 2006), Mata de Restinga e Manguezal.

A área de Floresta Atlântica da Praia Vermelha do Centro, escolhida como População I (PI), fica próxima às praias Grande e do Tenório e possui vegetação classificada como Floresta Ombrófila Densa (Fig. 4). Os três indivíduos ( $\Delta I$ ,  $\Delta II$  e  $\Delta III$ ) escolhidos nessa área estão localizados na borda da formação.

A área de Floresta Atlântica da Praia da Fortaleza, escolhida como População II (PII), localiza-se a 27 km do centro de Ubatuba, no km 69 da Rodovia Rio-Santos, e possui vegetação classificada como Floresta Ombrófila Densa (Fig. 4). Os indivíduos ( $\Delta I$ ,  $\Delta II$  e  $\Delta III$ ) escolhidos estão localizados na borda da formação, na estrada que dá acesso à praia.

A área de Floresta Atlântica da Praia da Picingüaba, escolhida como População III (PIII), localiza-se a 46 km do centro de Ubatuba e faz parte do Núcleo Picingüaba, unidade de conservação do Parque Estadual da Serra do Mar, com superfície de 54.271,29 ha. (César & Monteiro 1995). Possui vegetação classificada como Floresta Ombrófila Densa (Fig. 4). Os três indivíduos ( $\Delta I$ ,  $\Delta II$  e  $\Delta III$ ) escolhidos nessa área estão localizados na borda da formação, na estrada que dá acesso a vila de pescadores.

#### **4. Ilha Anchieta**

A área de Floresta Atlântica da Ilha Anchieta (23° 32' S e 45° 03' W) pertence ao município de Ubatuba (23° 26' S e 45° 04' W), litoral norte do estado de São Paulo, Brasil, a cerca de 250 km da capital paulista e a uma altitude média de 3 m. A Ilha Anchieta possui 828 ha. de área, sendo considerada a segunda maior ilha do litoral norte do estado de São Paulo; localiza-se a cerca de 500 m do continente e faz parte do Parque Estadual da Ilha Anchieta (PEIA), unidade de conservação administrada pelo Instituto Florestal, órgão da secretaria do Meio Ambiente do estado de São Paulo. Hoje, os remanescentes possuem características de floresta secundária em diferentes estádios de sucessão (Genini *et al.* 2005).

A área de Floresta Atlântica da Ilha Anchieta, escolhida como População IV (PIV), localiza-se na trilha de 530 m de extensão que dá acesso à Prainha do Engenho a partir da Praia do Presídio. Possui vegetação classificada como Floresta Ombrófila Densa (Fig. 4). Os três indivíduos ( $\Delta I$ ,  $\Delta II$  e  $\Delta III$ ) escolhidos nessa área estão localizados na borda da formação.

#### **Coletas e Processamento dos Materiais**

As coletas foram realizadas durante os períodos de floração e frutificação de *Miconia albicans*, entre os meses de agosto e setembro e entre outubro e novembro, respectivamente (Sartor 1994), no decorrer dos anos de 2004 a 2006. Quatro inflorescências correspondentes em tamanho e em estágio de desenvolvimento foram escolhidas em cada um dos 24 indivíduos; duas delas foram mantidas como controle e duas foram ensacadas com tecido do tipo voal antes da exposição da superfície estigmática, e assim mantidas até a maturação dos frutos (Fig. 3).

Ramos em estágio vegetativo e/ou reprodutivo foram coletados como materiais-testemunho dos indivíduos estudados, herborizados, e as exsiccatas, depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) sob os números 146996 a 147006.

Primórdios de inflorescência e botões florais em vários estádios de desenvolvimento, além de flores das inflorescências controle e ensacada (Fig. 5), foram coletados, medidos com auxílio de paquímetro digital e fixados separadamente em FAA (1:1:18, formalina:ácido acético glacial:etanol 50% (v/v)) (Johansen 1940), em solução de Karnovsky (glutaraldeído a 1% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2; paraformaldeído a 4%) (Karnovsky 1965) e em solução de Carnoy modificada (6:3:1, etanol absoluto:clorofórmio:ácido acético glacial) (Solt & Wurdack 1980).

Os materiais botânicos, logo após terem sido colocados no fixador, foram submetidos a cerca de cinco ciclos de vácuo leve para facilitar a fixação dos tecidos mais internos, e mantidos em bomba de vácuo por um período de 24 h. Em seguida os materiais fixados em FAA foram lavados em etanol 50% (v/v) e armazenados em etanol 70% (v/v); os materiais fixados em solução de Karnovsky foram lavados repetidas vezes no mesmo tampão do fixador, desidratados gradualmente em série etanólica (10, 30, 50% (v/v)) e estocados em etanol 70% (v/v); e aqueles fixados em solução de Carnoy modificada foram transferidos diretamente para etanol 70% (v/v).

Frutos em estádios iniciais de desenvolvimento das inflorescências controle e ensacada (Fig. 5) foram coletados, medidos com auxílio de paquímetro digital e fixados separadamente em FAA (1:1:18, formalina:ácido acético glacial:etanol 50% (v/v)) (Johansen 1940). Logo após terem sido colocados no fixador, os materiais foram submetidos a cerca de cinco ciclos de vácuo leve para facilitar a fixação dos tecidos mais internos, e mantidos em bomba de vácuo por um período de 24 h. Em seguida os materiais foram lavados em etanol 50% (v/v) e armazenados em etanol 70% (v/v).

Frutos maduros (Fig. 3) foram coletados para todos os indivíduos possíveis a partir das inflorescências controle e ensacada, dissecados, e as sementes (Fig. 3), separadas da polpa e estocadas em frascos plásticos após secagem sob condições naturais (Cortez & Carmello-

Guerreiro, dados não-publicados). Durante o processamento das sementes os frutos foram mantidos em sacos plásticos sob refrigeração para retardar o apodrecimento.

## **1. Ontogenia dos Estratos Parietais da Antera e Androsporogênese**

### **1.1. Microscopia de Luz**

Para o estudo ontogenético dos estratos parietais da antera e dos andrósporos foram utilizados cinco unidades de cada estágio de desenvolvimento - primórdios de inflorescência, botões florais em vários estádios de desenvolvimento e flores (Fig. 5) -, fixadas em FAA ou em solução de Karnovsky e estocadas em etanol 70% (v/v), para cada um dos 24 indivíduos. A inclusão das unidades foi feita em resina plástica HistoResin Leica após desidratação gradual em série etanólica (96% (v/v), absoluto) (Gerrits & Smid 1983) e/ou em Paraplast após desidratação gradual em série butílica (70, 85, 95% (v/v), absoluto) (Johansen 1940).

Os blocos montados com os materiais incluídos foram seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo manual com navalha do tipo C entre 6 µm e 10 µm de espessura, e as secções obtidas foram aderidas a lâminas de vidro. As lâminas confeccionadas com materiais incluídos em resina plástica foram submetidas à coloração simples com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato 0,1M e pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) por 5 min, montadas com água destilada e lamínula de vidro apenas no momento da observação, e aquelas confeccionadas com materiais incluídos em Paraplast foram submetidas à dupla coloração com solução aquosa a 1% de safranina e azul de astra (Gerlach 1969), e montadas com resina sintética Permout e lamínula de vidro. As lâminas foram observadas em microscópio de luz Olympus BX 51. Após análise morfológica e ontogenética, os botões florais foram agrupados em I (Fig. 2E), II, III e IV (Fig. 5A).

## **1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para o exame da superfície da antera na região de deiscência foram utilizadas duas anteras isoladas de botões florais em pré-antese e duas de flores (Fig. 5), fixadas em solução de Karnovsky e estocadas em etanol 70% (v/v), para os indivíduos PIAIII e PIIΔI do Cerrado e para os indivíduos PIAI e PIVΔIII da Floresta Atlântica, num total de quatro anteras para cada indivíduo. As unidades foram desidratadas em série etanólica crescente, submetidas à secagem ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido em aparelho Balzers CPD 030, coladas sobre suportes metálicos com fita adesiva dupla face de carbono e metalizadas com ouro em aparelho Balzers SCD 050. As observações foram feitas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5200.

## **2. Viabilidade Polínica**

Para o estudo da viabilidade polínica foram utilizados cinco botões em pré-antese (Fig. 5A) coletados a partir de cinco inflorescências, sendo um botão flor por inflorescência, para cada um dos 24 indivíduos. As unidades foram fixadas em FAA, em solução de Karnovsky ou em solução de Carnoy modificada e armazenadas em etanol 70% (v/v). Os botões foram dissecados e todas as anteras de cada um deles foram esmagadas em lâmina de vidro, sendo uma lâmina por botão, coradas com carmim acético a 1,2% (Medina & Conagin 1964), cobertas com lamínula e observadas imediatamente em microscópio de luz Olympus BX 51. Aproximadamente 200 estruturas celulares foram contadas em cada lâmina e avaliadas quanto à forma e à presença de coloração no citoplasma, num total de cerca de 1000 estruturas por indivíduo, que foram comparadas morfológicamente àquelas observadas nos vários estádios da androsporigênese, e classificadas em tétrades de andrósporos (T), andrósporos livres (A) e andrófitos (Af). As estruturas morfológicamente íntegras e com citoplasma corado foram consideradas normais, isto é, potencialmente viáveis, enquanto aquelas com aparência distinta daquelas consideradas

normais (disforme) e/ou com aparência vazia foram consideradas inviáveis. As estruturas que apresentaram coloração fraca no citoplasma também foram consideradas normais.

### **3. Ontogenia do Óvulo, do Ginófito e dos Estádios Iniciais do Embrião e do Endosperma**

#### **3.1. Microscopia de Luz**

Para o estudo ontogenético do óvulo e da ginogametogênese foram utilizados cinco unidades de cada estágio de desenvolvimento - primórdios de inflorescência, botões florais em vários estádios de desenvolvimento, além de flores e frutos em estádios iniciais de desenvolvimento (Fig. 5) obtidos das inflorescências controle e ensacada -, fixadas em FAA ou em solução de Karnovsky e estocadas em etanol 70% (v/v), para cada um dos 24 indivíduos. A inclusão das unidades foi feita em resina plástica HistoResin Leica após desidratação gradual em série etanólica (96% (v/v), absoluto) (Gerrits & Smid 1983) e/ou em Paraplast após desidratação gradual em série butílica (70, 85, 95% (v/v), absoluto) (Johansen 1940).

Os blocos montados com os materiais incluídos foram seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo manual com navalha do tipo C entre 6 e 10  $\mu$ m de espessura, e as secções obtidas foram aderidas a lâminas de vidro. As lâminas confeccionadas com materiais incluídos em resina plástica foram submetidas à coloração simples com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato 0,1M e pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) por 5 min, montadas com água destilada e lamínula de vidro apenas no momento da observação, e aquelas confeccionadas com materiais incluídos em Paraplast foram submetidas à dupla coloração com solução aquosa a 1% de safranina e azul de astra (Gerlach 1969), e montadas com resina sintética Permout e lamínula de vidro. As lâminas foram observadas em microscópio de luz Olympus BX

51. Após análise morfológica e ontogenética, os botões florais foram agrupados em I, II, III e IV (Fig. 5).

### **3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para a verificação da deposição de andrófitos na superfície estigmática das flores foram utilizados um estilete isolado de botão em pré-antese e um de flor (Fig. 5), fixados em solução de Karnovsky e estocadas em etanol 70% (v/v), para os indivíduos PIIII e PIIII do Cerrado e os indivíduos PIIII e PIVIII da Floresta Atlântica, num total de dois estiletos para cada indivíduo. As unidades foram desidratadas em série etanólica crescente, submetidas à secagem ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido em aparelho Balzers CPD 030, coladas sobre suportes metálicos com fita adesiva dupla face de carbono e metalizadas com ouro em aparelho Balzers SCD 050. As observações foram feitas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5200.

### **4. Porcentagem de Óvulos que se Desenvolvem em Sementes**

A porcentagem de óvulos que se desenvolvem em sementes foi obtida para se estimar a porcentagem de aborto dos óvulos produzidos pela espécie, ou seja, dos óvulos que não originaram sementes maduras. Para isso foram obtidos os números médios de óvulos por botão floral em pré-antese ou por flor, e de sementes maduras por fruto maduro.

O número médio de óvulos por flor foi obtido para a espécie a partir de 10 botões florais em pré-antese ou flor (Fig. 5) fixadas em FAA e estocadas em etanol 70% (v/v), para cada um dos 24 indivíduos escolhidos, num total de 240 flores. Como não foram observadas diferenças entre o número médio de sementes maduras produzidas por fruto maduro entre os tratamentos controle e ensacada, o número médio de sementes maduras por fruto maduro foi obtido a partir de 10 frutos maduros (Fig. 3) coletados das inflorescências controle ou ensacada, preferencialmente

do controle. Exceção foi feita ao indivíduo PIVΔII da Floresta Atlântica (controle), para o qual foi possível obter apenas três frutos maduros (Tabela 2), e aos indivíduos PIVΔI e PIVΔIII, para os quais não foi possível obter nenhuma unidade; dessa forma, o número total de frutos analisados foi igual a 213. Os ovários e frutos foram dissecados e os óvulos e sementes, contados com auxílio de estereomicroscópio. A porcentagem de óvulos que se desenvolvem em sementes foi calculada a partir da Fórmula 1:

**Fórmula 1:**

$$P = \frac{\text{número médio de sementes maduras} \times 100}{\text{número médio de óvulos}}$$

**Tabela 2.** Número de frutos maduros obtidos nos tratamentos controle e ensacada e utilizados na obtenção da porcentagem de óvulos que se desenvolvem em sementes (P) no Cerrado e na Floresta Atlântica. P=população. Δ=indivíduo.

	Cerrado		Floresta Atlântica
	controle	ensacada	controle
PIΔI	10	0	10
PIΔII	10	0	10
PIΔIII	10	0	10
PPIΔI	10	0	10
PPIΔII	10	0	10
PPIΔIII	10	0	10
PPIIΔI	10	0	10
PPIIΔII	10	0	10
PPIIΔIII	10	0	10
PIVΔI	10	0	0
PIVΔII	0	10	3
PIVΔIII	10	0	0

## 5. Viabilidade das Sementes

Para o estudo da viabilidade das sementes foi utilizada uma amostra de 100 sementes maduras (Fig. 3) e secas, para cada indivíduo possível, já que frutos maduros não foram obtidos das inflorescências ensacadas em parte dos indivíduos escolhidos (ver item anterior). Dois procedimentos foram realizados. No primeiro, as sementes foram deixadas durante 10 min em solução de hipoclorito de sódio a 10%, lavadas sucessivamente em água destilada e colocadas em

caixas plásticas do tipo gerbox sobre papel-filtro simples umedecido com água destilada (Cortez & Carmello-Guerreiro 2004); no segundo, as sementes foram deixadas durante 10 min em solução de hipoclorito de sódio a 10%, lavadas sucessivamente em água destilada e colocadas em placas de petri previamente autoclavadas sobre papel-filtro duplo umedecido com água destilada (Fig. 5). Tanto as caixas gerbox quanto as placas de petri foram colocadas em câmara de germinação com iluminação fluorescente branca contínua e temperatura constante de 28°C. As sementes foram observadas diariamente quanto à viabilidade e número de embriões formados, por um período de 30 dias após o início da germinação, sendo retiradas da amostra aquelas que germinaram em cada observação.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Albarouki, E. & Peterson, A. 2007. Molecular and morphological characterization of *Crataegus* L. species (Rosaceae) in southern Syria. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 255-263.
- Albertini, E., Marconi, G., Reale, L., Barcaccia, G., Porceddu A., Ferranti, F. & Falcinelli, M. 2005. SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiology* 138: 2185-2199.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. & Ullrich, C.I. 2006. Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Planta* 223: 315-328.
- Almeida-Neto, M., Machado, G., Pinto-da-Rocha, R. & Giaretta, A.A. 2006. Harvestman (Arachnida: Opiliones) species distribution along three Neotropical elevational gradients: an alternative rescue effect to explain Rapoport's rule? *Journal of Biogeography* 33: 361-375.

- APG (Angiosperm Phylogeny Group). 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.
- Araujo, A.C.G. & Falcão, R. 2003. Múltiplos sacos embrionários em ovários do acesso sexual de *Brachiaria brizantha* (Poaceae). EMBRAPA, Brasília.
- Asker, S.E. & Jerling, L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- Batistella, M., Panciera, F. & Guimarães, M. 2004. Geoinformação e planejamento (do uso e cobertura das terras) no município de Campinas-SP. *In Livro de Resumos do VI Congresso Brasileiro de Geógrafos, Goiânia-GO.*
- Batygina, T.B. 2002. Embryology of flowering plants: terminology and concepts. v1. Science Publishers, USA.
- Batygina, T. 2005. Sexual and asexual processes in reproductive systems of flowering plants. *Acta Biologica Cracoviensia* 47: 51-60.
- Bhandari, N.N. 1984. The microsporangium. *In Embryology of angiosperms* (Johri, B.M., ed). Springer-Verlag, New York. p. 53-121.
- Bhat, S.R., Prakash, S., Kirti, P.B., Kumar, V.D. & Chopra, V.L. 2005. A unique introgression from *Moricandia arvensis* confers male fertility upon two different cytoplasmic male-sterile lines of *Brassica juncea*. *Plant Breeding* 124: 117-120.
- Bhat, V., Dwivedi, K.K., Khurana, J.P. & Sopory, S.K. 2005. Apomixis: an enigma with potencial applications. *Current Science* 89: 1879-1893.
- Bicknell, R.A. & Koltunow, A.M. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell* 16: S228-S245.

- Bittencourt Junior, N.S. 2003. Auto-Incompatibilidade de Ação Tardia e Outros Sistemas Reprodutivos em Bignoniaceae. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Boavida, L.C., Becker, J.D. & Feijó, J.A. 2005. The making of gametes in higher plants. *International Journal of Developmental Biology* 49: 595-614.
- Borges, H.B.N. 1991. Biologia reprodutiva de quatro espécies de Melastomataceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Bradley, J.E., Carman, J.G., Jamison, M.S. & Naumova, T.N. 2007. Heterochronic features of the female germline among several sexual diploid *Tripsacum* L. (Andropogoneae, Poaceae). *Sexual Plant Reproduction* 20:9-17
- Busch, M.A., Bomblies, K. & Weigel, D. 1999. Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* 285: 585-587.
- Caetano, A.P., Carmo-Oliveira, R. & Oliveira, P.E.A.M. 2005. Apomixia e aspectos embriológicos em *Miconia*. In CD-ROM de Resumos do 56º Congresso Nacional de Botânica, Curitiba-PR.
- Candido, C.P. 2005. A família Melastomataceae na Serra do Cabral-MG: tribos Melastomeae, Merianeae e Miconieae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 51-94.
- Caryl, A.P., Jones, G.H. & Franklin, F.C. 2003. Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants. *Journal of Experimental Botany* 54: 25-38.

- César, O. & Monteiro, R. 1995. Florística e fitossociologia de uma floresta sobre restinga em Picingüaba (Parque Estadual da Serra do Mar), município de Ubatuba, SP. *Naturalia* 20: 21-35.
- Chaudhury, A.M., Koltunow, A., Payne, T., Luo, M., Tucker, M.R., Dennis E.S. & Peacock, W.J. 2001. Control of early seed development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 677-699.
- Clément C. & Pacini, E. 2001. Anther plastids in Angiosperms. *The Botanical Review* 67: 54-73.
- Cocucci, A.E. 1969. El proceso sexual en Angiospermas. *Kurtziana* 5: 407-423.
- Cocucci, A.E. 1980. Precisiones sobre la terminología sexológica aplicada a angiospermas. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica* XIX: 75-81.
- Coen, E.S. 1991. The role of homeotic genes in flower development and evolution. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 241-279.
- Cole, M.M. 1960. Cerrado, Caatinga and Pantanal: the distribution and origin of the savanna vegetation of Brazil. *The Geographical Journal* 126: 168-179.
- CI (Conservation International). 2007. Biodiversity hotspots. Disponível no endereço <[www.biodiversityhotspots.org](http://www.biodiversityhotspots.org)>. Acesso em Junho de 2007.
- Cortez, P.A. & Carmello-Guerreiro, S.M. 2004. Morfologia e anatomia de frutos e sementes e morfologia de plântulas de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) do Cerrado do estado de São Paulo. Relatório científico de projeto de pesquisa, processo FAPESP nº 02/08640-4, nível iniciação científica.
- Cortez, P.A., Teixeira, S.P. & Carmello-Guerreiro, S.M. 2007a. Ontogenia dos estratos parietais da antera e androsporigênese em *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae), espécie agamospérmica. Em preparação.

- Cortez, P.A., Teixeira, S.P. & Carmello-Guerreiro, S.M. 2007b. Ontogenia do óvulo, do ginófito e dos estádios iniciais do embrião agamospérmico e do endosperma autônomo de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae). Em preparação.
- Crane, C.F. 2001. Classification of apomictic mechanisms. *In* The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering. CIMMYT & IRD, Mexico. p. 24-34.
- Crane, P.R., Herendeen, P.S. & Friis, E.M. 2004. Fossils and plant phylogeny. *American Journal of Botany* 91: 1683-1699.
- Dansa, C.V.A. & Rocha, C.F.D. 1992. An ant-membracid-plant interaction in a Cerrado area of Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 8: 339-348.
- Doyle, J.A. & Donoghue, M.J. 1986. Seed plant phylogeny and the origin of angiosperms: an experimental cladistic approach. *Botanical Review* 52: 321-431.
- Drews, G.N., Lee, D. & Christensen, C.A. 1998. Genetic analysis of female gametophyte development and function. *Plant Cell* 10: 5-18.
- Drinnan, A.N, Crane, P.R. & Hoot, S.B. 1994. Patterns of floral evolution in the early diversification of non-magnoliid dicotyledons (eudicots). *Plant Systematics and Evolution* 8: 93-122.
- Dumas, C., Knox, R.B., Mcconchie, C.A. & Russell, S.D. 1984. Emerging physiological concepts in fertilization. *What's New in Plant Physiology* 15: 17-20.
- Dumas, C., Knox, R.B. & Gaude, T. 1985. The spacial association of the sperm cells and vegetative nucleus in the pollen grain of *Brassica oleraceae* var. *aceplala*. *Protoplasma* 124: 168-174.
- Durigan, G. & Ratter, J.A. 2006. Successional changes in Cerrado and Cerrado/Forest ecotonal vegetation in western São Paulo state, Brazil, 1962–2000. *Edinburgh Journal of Botany* 63: 119-130.

- Durigan, G., de Siqueira M.F.D., Franco, G.A.D.C., Bridgewater S. & Ratter, J.A. 2003. The vegetation of priority areas for Cerrado conservation in São Paulo state, Brazil. *Edinburgh Journal of Botany* 60: 217-241.
- Endress, P.K. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Eyde, R.H. 1975. The bases of Angiosperm phylogeny: floral anatomy. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 521-537.
- Furley, P.A. 1999. The nature and diversity of neotropical savanna vegetation with particular reference to the Brazilian cerrados. *Global Ecology and Biogeography* 8: 223-241.
- Genini, J., Bovendorp, R. & Galetti, M. 2005. La Mata Atlántica Brasileira: ¿un paraíso ecológico? *El Indiferente* 17: 48-51.
- Gerlach, G. 1969. *Botanische microtechnik, eine einföhrung*. George Thieme, Stuttgart.
- Gerrits, P.O. & Smid, L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* 95: 150-155.
- Gianotti, E. & Leitão-Filho, H.F. 1992. Composição florística do Cerrado da Estação Experimental de Itirapina. *Anais do 8º Congresso da SBSP* 21-25.
- Gifford, E.M. & Foster, A.S. 1989. *Morphology and evolution of vascular plants*. 3<sup>rd</sup> ed. W.H. Freeman, New York.
- Goldenberg, R. 2000. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae): I. Listagens analíticas, II. Revisão taxonômica da Seção *Hypoxanthus* (Rich. Ex DC.) Hook. F. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in “cerrado” vegetation. *Plant Systematics and Evolution* 211: 13-29.

- González-Sánchez, M., Rosato, M., Chiavarino, M. & Puertas, M.J. 2004. Chromosome instabilities and PCD in tapetal cells of maize with B chromosome and effects on pollen viability. *Genetics* 166: 999-1009.
- Goodland, R. 1971. A physiognomic analysis of the “Cerrado” vegetation of Central Brasil. *The Journal of Ecology* 59: 411-419.
- Grant, V. 1981. *Plant speciation*. 2<sup>nd</sup> ed. Columbia University Press, New York.
- Greyson, R.I. 1994. *The development of flowers*. Oxford University Press, New York.
- Grossniklaus, U., Nogler, G.A. & van Dijk, P.J. 2001a. How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. *Plant Cell* 13: 1491-1498.
- Grossniklaus, U., Spillane, C., Page, D.R. & Köhler, C. 2001b. Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 21-27.
- Grossniklaus, U. & Schneitz, K. 1998. The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9: 227-238.
- Gustafsson, Å. 1946. Apomixis in higher plants. I. The mechanism of apomixis. *Lunds Universitets Arsskrift* 42: 1-67.
- Gustafsson, Å. 1947a. Apomixis in higher plants. II. The causal aspects of apomixis. *Lunds Universitets Arsskrift* 43: 71-179.
- Gustafsson, Å. 1947b. Apomixis in higher plants. III. Biotype and species formation. *Lunds Universitets Arsskrift* 43: 181-370.
- Holliday, R. 1984. The biological significance of meiosis. *In* *Controlling events in meiosis* (Evans, C.W. & Dickinson, H.G., eds). Society for Experimental Biology Symposium 38: 381-394.

- Huang, B.Q. & Russel, S.D. 1992. Female germ unit: organization, isolation, and function. *International Review of Cytology* 140: 233-293.
- Irish, V.F. 1999. Petal and stamen development. *Current Topics in Developmental Biology* 41: 133-61.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 1992. Manual técnico da vegetação brasileira. Série: Manuais Técnicos em Geociências, nº1. DEDIT/CDDI, Rio de Janeiro.
- Jack, T. 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *The Plant Cell* 16: S1-S17.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Joly, A.B. 1970. *Conheça a vegetação brasileira*. EDUSP/Polígono, São Paulo.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. 1999. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Kapoor, S. & Takatsuji, H. 2006. Silencing of an anther-specific zinc-finger gene, *MEZ1*, causes aberrant meiosis and pollen abortion in petunia. *Plant Molecular Biology* 61: 415-430.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biol.* 27: 137A-138A.
- Kawanabe, T., Ariizumi, T., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. & Toriyama, K. 2006. Abolition of the Tapetum Suicide Program ruins microsporogenesis. *Plant Cell Physiology* 47: 784-787.
- Knox, R.B. 1984. The pollen grain. *In Embryology of angiosperms* (Johri, B.M., ed). Springer-Verlag, New York. p. 197-271.
- Köeppen, W. 1948. *Climatologia*. Fondo de Cultura Econômica, México.
- Koltunow, A.M., Bicknell, R.A. & Chaudhury, A.M. 1995. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology* 108: 1345-1352.

- Lazutin, L., Bezerra, P.C., Fagnani, M.A., Pinto, H.S., Martin, I.M., da Silva, E.L.P., Mello, M.G. da S., Turtelli Jr., A., Zhavkov, V. & Zullo Jr., J. 1996. Surface ozone study in Campinas, São Paulo, Brasil. *Atmospheric Environment* 30: 2729-2738.
- Lersten, N.R. 2004. Flowering plant embryology - with emphasis on economic species. Blackwell Publishing, Iowa.
- Magallon, S. & Sanderson, M.J. 2002. Relationships among seed plants inferred from highly conserved genes: sorting conflicting phylogenetic signals among ancient lineages. *American Journal of Botany* 89: 1991-2006.
- Maheshwari, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. McGraw-Hill, New York.
- Mariath, J.E.A., Santos, R.P. & Bittencourt Júnior, N.S. 2006. Flor. *In Anatomia Vegetal* (Apezzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M., eds). 2ª ed. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p. 329-373.
- Martins, A.B., Semir, J., Goldenberg, R. & Martins, E. 1996. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) no estado de São Paulo. *Acta Botanica Brasilica* 10: 267-316.
- Medina, D.M. & Conagin, C.H.T.M. 1964. Técnica citológica. Publicação 2610, Instituto Agrônômico, Campinas-SP.
- Meyerowitz, E.M. 1994. Flower development and evolution: new answers and new questions. *Proceedings National Academy of Sciences* 91: 5735-5737.
- Mogensen, H.L. 1992. The male germ unit: concept, composition and significance. *International Review of Cytology* 149:129-147.
- Mogie, M. 1992. The evolution of asexual reproduction in plants. Chapman & Hall, London.
- Morellato, L.P.C. & Haddad, C.F.B. 2000. Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 786-792.

- Mori, S.A., Boom, B.M. & Prance, G.T. 1981. Distribution patterns and conservation of Eastern Brazilian Coastal Forest tree species. *Brittonia* 33: 233-245.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Naumova, T.N. 1993. Apomixis in angiosperms: nucellar and integumentary embryony. CRC Press, Boca Raton.
- Nogler, G.A. 1984. Gametophytic apomixis. *In* Embryology of angiosperms (Johri, B.M., ed). Springer-Verlag, New York. p. 475-518.
- O'Brien, T.P., Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Okamoto, J.K., den Bôer, B.G.W. & Jofuku, K.D. 1993. Regulation of *Arabidopsis* flower development. *The Plant Cell* 5: 1183-1193.
- Oliveira-Filho, A.T. & Fontes, M.A.L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- Pacini, E., Franchi, G.G. & Hesse, M. 1985. The tapetum: Its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Systematics and Evolution* 149: 155-185.
- Park, J., Ishikawa, Y., Ochiai, T., Kanno, A. & Kameya, T.T. 2004. Two *GLOBOSA*-like genes are expressed in second and third whorls of homochlamydeous flowers in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell Physiology* 45: 325-332.
- Ranta, P., Blom, T. Niemelä, J., Joensuu, E. & Siitonen, M. 1998. The fragmented Atlantic Rain Forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. *Biodiversity and Conservation* 7: 385-403.
- Ratter, J.A., Ribeiro, J.F. & Bridgewater, S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* 80: 223-230.

- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. 1999. Biology of plants. 6<sup>th</sup> ed. Worth Publishers, New York.
- Renner, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 496-518.
- Renner, S.S. 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae. *Nordic Journal of Botany* 13: 519-540.
- Resende, S.B. & Resende, M. 1996. Solos dos mares de morros: ocupação e uso. *In* O solo dos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil (Alvarez, V.H & Fontes, E.F., eds). Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. p. 261-288.
- Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. 1998. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. *In* Cerrado: ambiente e flora (Sano, S.M. & de Almeida, S.P., eds). EMBRAPA-CPAC, Planaltina-DF. p. 89-166.
- Ribeiro, J.F., Sano, S.M. & Silva, J.A. 1983. Os principais tipos fitofisionômicos da região dos Cerrados. *Boletim de Pesquisa* 21, EMBRAPA/CPAC, Brasília-DF.
- Richards, A.J. 1990. Studies in *Garcinia*: tropical dioecious fruit trees: agamospermy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103: 233-250.
- Richards, A.J. 1997. Plant breeding systems. 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall, London.
- Richards, A.J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 358: 1085-1093.
- Rodrigues, R.R. Torres, R.B., Matthes, L.A.F. & Penha, A.S. 2004. Tree species sprouting from root buds in a Semideciduous Forest affected by fires. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47: 127-133.
- Romero, R. & Martins, A.B. 2002. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 19-24.

- SMA (Secretaria do Estado do Meio Ambiente de São Paulo). 2001. APAs, Áreas de Proteção Ambiental estaduais: proteção e desenvolvimento em São Paulo. Governo do estado de São Paulo. SMA, Brasília-DF.
- Sarmiento, G. 1984. The ecology of Neotropical savannas. Harvard University Press, Cambridge.
- Sartor, M.B.L.B. 1994. Fenologia e biologia floral de *Miconia albicans* (Sw.) Triana e *Tibouchina stenocarpa* (DC.) Cogn. (Melastomataceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.
- Sasaki, R.M., Rondon, J.N., Zaidan, L.B.P. & Felipe, G.M. 1999. Number of buried seeds and seedlings emergence in cerradão, cerrado and gallery forest soils at Pedregulho, Itirapina (SP), Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 22: 147-152.
- Savidan, Y., Carman, J.G. & Dresselhaus, T. 2001. The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering. CIMMYT & IRD, Mexico.
- Scudeller, V.V., Martins, F.R. & Shepherd, G.J. 2001. Distribution and abundance of arboreal species in the Atlantic Ombrophilous Dense Forest in Southeastern Brazil. *Plant Ecology* 152: 185-199.
- Scudeller, V.V. 2002. Análise fitogeográfica da Mata Atlântica-Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Silva, D.A. da. 2005. Levantamento do meio físico das estações ecológicas e experimentais de Itirapina, São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Florestal de São Paulo* 17: 113-128.
- Simabukuro, E.A., Begovacz, A., Esteves, L. M. & Felipe, G.M. 1999. Fern spore bank at Pedregulho (Itirapina, São Paulo, Brazil). *Revista Brasileira de Biologia* 59: 131-139.
- Solt, M.L. & Wurdack, J.J. 1980. Chromosome number in Melastomataceae. *Phytologia* 47: 199-220.

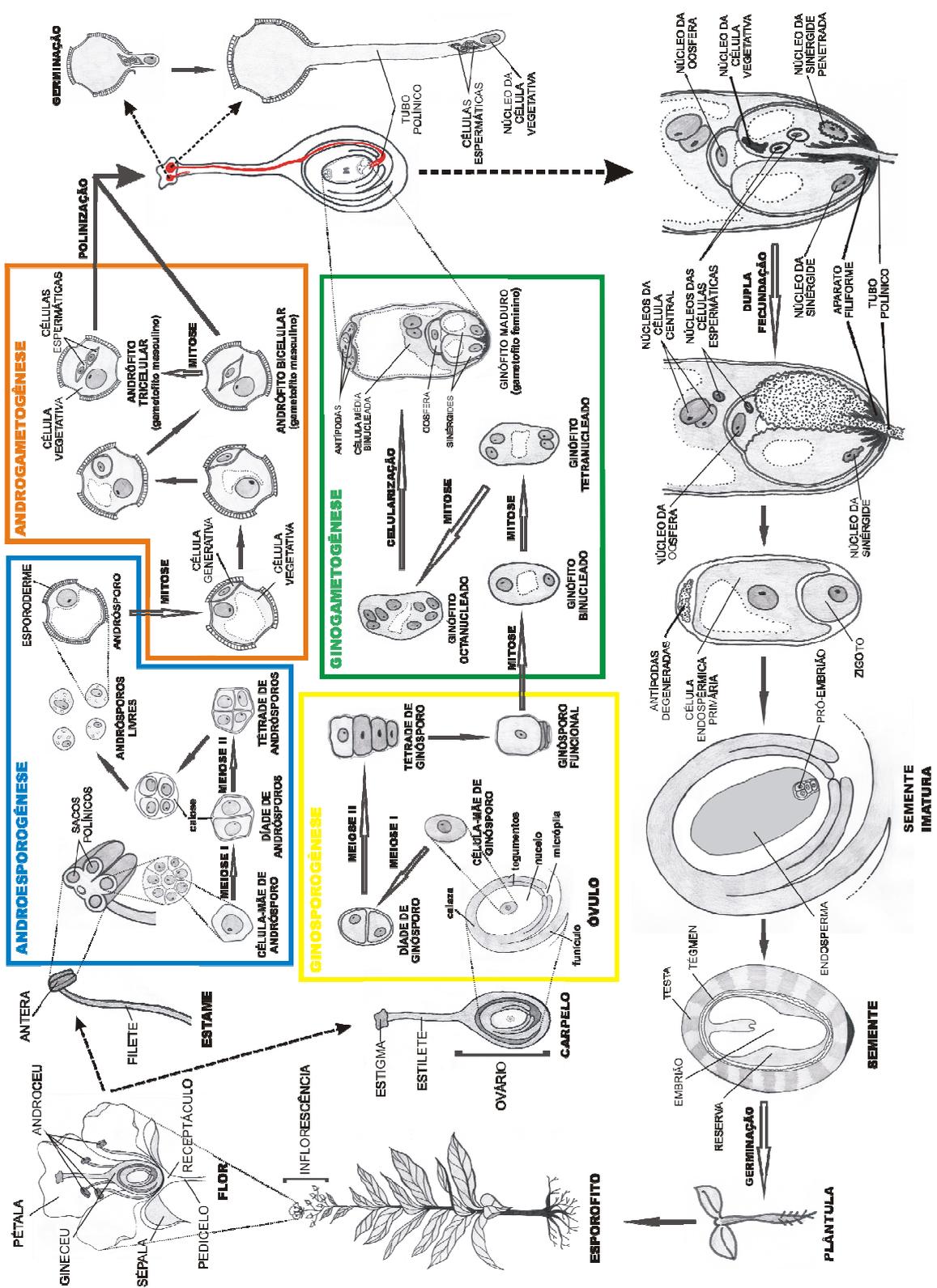
- Soltis, P.S., Soltis, D.E., Chase, M.W., Endress, P.K. & Crane, P.R. 2004. The diversification of flowering plants. *In* *Assembling the tree of life* (Cracraft, J. & Donoghue, M.J., eds.). Oxford University Press, Oxford. p. 154-167.
- Soltis, P.S. & Soltis, D.E. 2004. The origin and diversification of angiosperms. *American Journal of Botany* 91: 1614-1626.
- Spillane, C., Vielle-Calzada, J. & Grossniklaus, U. 2001. A sexy apomixis in *Como*. *The Plant Cell* 13: 1480-1491.
- Tabanez, A.A.J. & Viana, V.M. 2000. Patch structure within Brazilian Atlantic Forest fragments and implications for conservation. *Biotropica* 32: 925-933.
- Tabarelli, M. & Mantovani, W. 1999. A riqueza de espécies arbóreas na Floresta Atlântica de Encosta no estado de São Paulo (Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 22: 217-223.
- Talora, D.C. & Morellato, P.C. 2000. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 23: 13-26.
- Tannus, J.L.S. & Assis, M.A. 2004. Composição de espécies vasculares de campo sujo e campo úmido em área de cerrado, Itirapina-SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 27: 489-506.
- Thomas, W.M.W., de Carvalho, A.M.V., Amorim, A.M.A., Garrison, J. & Arbeláez, A.L. 1998. Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 7: 311-322.
- Toniato, M.T.Z., Leitão-Filho, H.F. & Rodrigues, R.R. 1998. Fitossociologia de um remanescente de floresta higrófila (mata de brejo) em Campinas, SP. *Revista Brasileira de Botânica* 21: 197-210.
- Turner, I.M. 1996. Species loss in fragments of Tropical Rain Forest: a review of the evidence. *The Journal of Applied Ecology* 33: 200-209.

- Vielle-Calzada, J., Crane, C.F. & Stelly, D.M. 1996. Apomixis: the asexual revolution. *Science* 274: 1322-1323.
- Vinkenoog, R., Spielmann, M. & Scott, R.J. 2000. Autonomous endosperm development in flowering plants: how to overcome the imprinting problem? *Sex Plant Reproduction* 14: 189-194.
- Webb, T.J., Woodward, F.I., Hannah, L. & Gaston, K.J. 2005. Forest cover–rainfall relationships in a biodiversity hotspot: the Atlantic Forest of Brazil. *Ecological Applications* 15: 1968-1983.
- Welle B.J.H. ter. & Koek-Noorman, J. 1981. Wood anatomy of the Neotropical Melastomataceae. *Blumea* 27: 335-394.
- Went, J.L. van. & Willemse, M.T.M. 1984. Fertilization. *In* *Embryology of angiosperms* (Johri, B.M., ed). Springer-Verlag, New York. p. 273-317.
- Willemse, M.T.M. & van Went, J.L. 1984. The female gametophyte. *In* *Embryology of angiosperms* (Johri, B.M., ed). Springer-Verlag, New York. p.159-196.
- Winkler, H. 1908. Parthenogenesis und apogamie im Pflanzenreiche. *Progressus Rei Botanicae* 3: 293-454.
- Wurdack, J.J. & Kral, R. 1982. The genera of Melastomataceae in the Southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 63: 429-439.

# ILUSTRAÇÕES

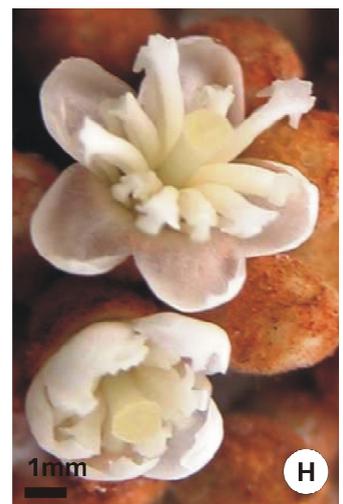
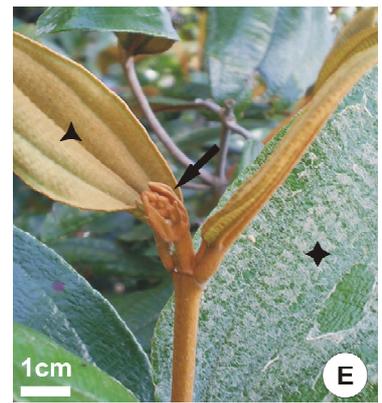
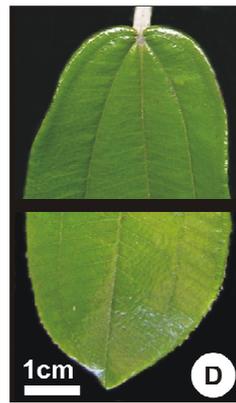
---

**Figura 1.** Ciclo de vida de uma Angiospermae hipotética mostrando a alternância entre os indivíduos produtores de esporos (esporófito - diplóide) e de gametas (gametófito - haplóide).



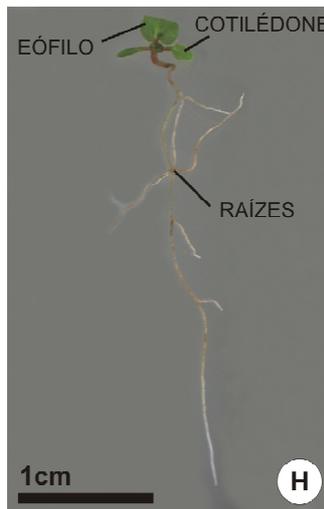
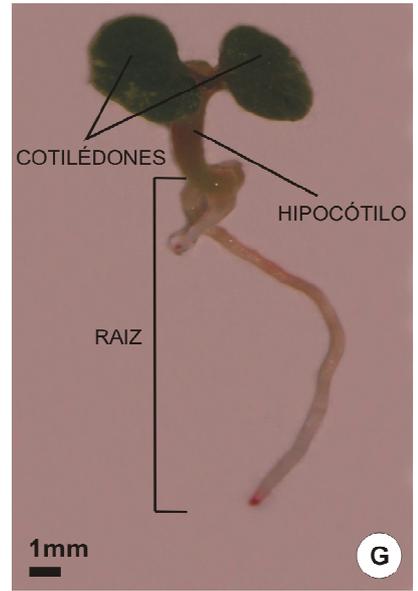
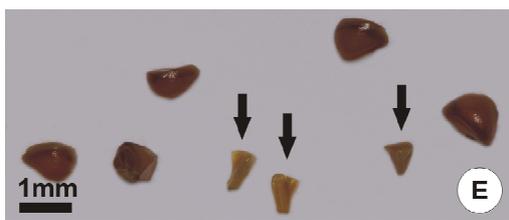
---

**Figura 2.** Aspectos morfológicos de *Miconia albicans*. **A.** Hábito arbustivo. **B.** Filotaxia oposta cruzada. **C.** Limbo foliar discolor (▲=face abaxial; ◆=face adaxial). **D.** Face adaxial do limbo foliar. **E.** Primórdio de inflorescência (seta) e folhas jovens com indumento ferrugíneo (▲) e canescente (◆). **F.** Folha adulta com restos de indumento canescente. **G.** Inflorescência terminal do tipo panícula escorpióide com botões florais (seta). **H.** Botões florais em pré-antese.



---

**Figura 3.** Aspectos morfológicos de *Miconia albicans*. **A.** Botões florais e flor. **B.** Ramo com frutos imaturos. **C.** Ramo com frutos imaturos (►) e frutos maduros (◄). **D.** Desenvolvimento de frutos em botões florais (setas). **E.** Sementes abortadas (setas) e sementes maduras. **F-H.** Plântulas cinco, 15 e 20 dias após a germinação, respectivamente. **I.** Indivíduo jovem. **J.** Indivíduo adulto com inflorescências ensacadas (setas) e inflorescências controle.



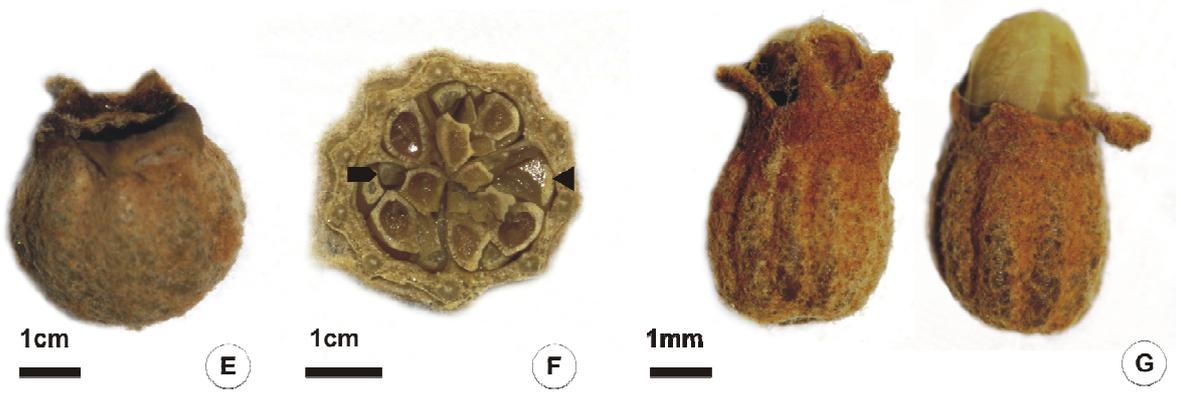
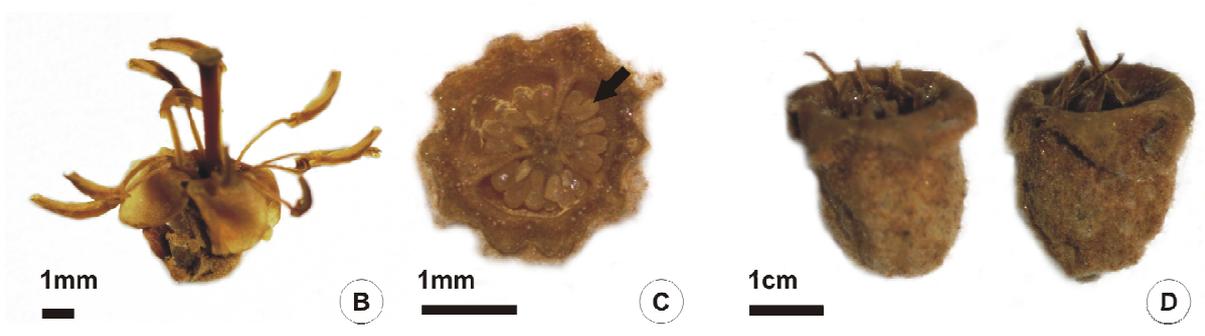
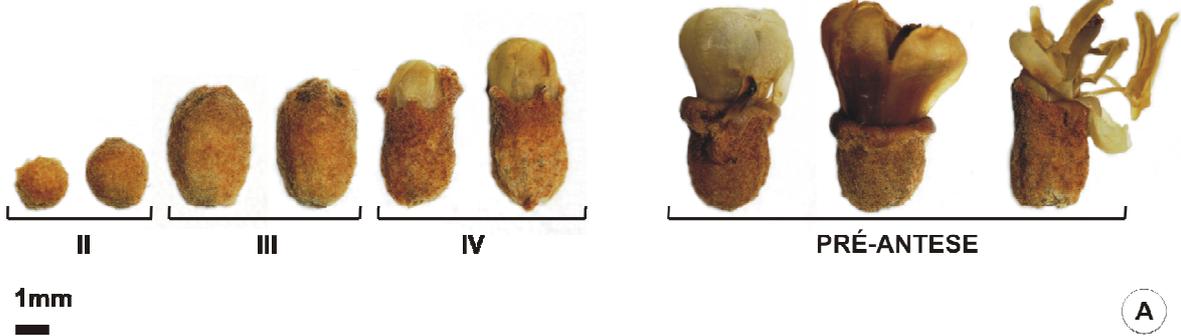
---

**Figura 4.** Aspecto vegetacional das áreas de ocorrência das populações estudadas no Cerrado (**A-D**) e na Floresta Atlântica (**E-H**). **A.** Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (População I). **B.** Valério I (População II). **C.** Pedregulho (População III). **D.** Graúna (População IV). **E.** Praia Vermelha do Centro (População I). **F.** Praia da Fortaleza (População II). **G.** Praia da Picingüaba (População III). **H.** Ilha Anchieta (População IV).



---

**Figura 5.** Diferentes estádios de desenvolvimento dos botões florais, flores e frutos imaturos de *Miconia albicans* (materiais fixados). **A.** Botões florais das categorias II ( $2,58 \pm 0,33$ mm de comprimento), III ( $4,13 \pm 0,52$ mm de comprimento), IV ( $4,78 \pm 0,22$ mm de comprimento) e em pré-antese. **B.** Flor. **C.** Secção transversal do ovário da flor e óvulos (seta). **D, E.** Frutos imaturos ( $2,84 \pm 0,52$ mm de comprimento). **F.** Secção transversal do fruto imaturo e sementes imaturas (►) e maduras (◄). **G.** Desenvolvimento de frutos em botões florais.



## CAPÍTULO 1

### **Ontogenia dos Estratos Parietais da Antera e Androsporogênese em *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae), Espécie Agamospérmica**

PRISCILA ANDRESSA CORTEZ<sup>1</sup>, SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA<sup>2\*</sup> e SANDRA MARIA  
CARMELLO-GUERREIRO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa  
Postal 6109, Campinas, SP, 13083-970, Brazil and* <sup>2</sup>*Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14040-903, Brazil*

*\*Autor para correspondência: spadua@fcfrp.usp.br*

- *Antecedentes e Objetivos* *Miconia albicans* (Sw.) Triana é uma espécie que se reproduz assexuadamente por meio da agamospermia. Em populações do Cerrado a viabilidade polínica é nula, embora a produção de frutos em experimentos de emasculação das flores seja igual àquela observada em populações-controle. O estudo ontogenético dos estratos parietais da antera e da androsporogênese foram realizados com o objetivo de verificar se há alterações celulares que possam estar relacionadas à inviabilidade dos andrófitos em populações do Cerrado e da Floresta Atlântica.
- *Métodos* Botões florais em vários estádios de desenvolvimento e flores foram coletados a partir de populações naturais de *M. albicans* do Cerrado e da Floresta Atlântica e processados para microscopias de luz e eletrônica de varredura.
- *Resultados-chave* A viabilidade polínica da espécie foi nula em todas as populações estudadas. As anormalidades das células reprodutivas não estiveram restritas a um único estágio da

androsporogênese, sendo a principal dela representada pela deformidade da esporoderme dos andrósporos livres. Foram observadas vacuolização das células do tecido esporogênico e degeneração precoce do tapete devido a alterações citoplasmáticas e nucleares. A produção total de células reprodutivas, inviáveis ou potencialmente viáveis, foi menor nas populações da Floresta Atlântica.

- *Conclusões* Os resultados obtidos corroboram a classificação da espécie como agamospérmica obrigatória e estéril-masculina nas populações estudadas. A vacuolização e a degeneração aparentemente precoces do tapete podem estar relacionadas à inviabilidade dos andrósporos produzidos e a ausência de andrófitos. Não foram observadas diferenças marcantes entre as populações do Cerrado e da Floresta Atlântica, sendo mais evidentes as variações intra e inter-individuais, em ambas as formações vegetacionais.

**Palavras-Chave:** Melastomataceae, *Miconia albicans*, Cerrado, Floresta Atlântica, ontogenia, antera, tapete, androsporogênese, inviabilidade polínica, agamospermia, deiscência.

## INTRODUÇÃO

Melastomataceae é uma das famílias mais ricas e abundantes entre as Angiospermae, com 150-166 gêneros e cerca de 4570 espécies, ocorrentes, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais (Renner 1993, Martins *et al.* 1996, APG 2003). Seus membros apresentam diversidade de estruturas vegetativas e reprodutivas, embora possam ser facilmente reconhecidos, com exceção de poucos gêneros, pela nervura foliar acródroma, pelos estames falciformes, pela deiscência poricida e ausência de endotécio nas anteras maduras (Clausing & Renner, 2001). Entre as espécies mais amplamente distribuídas está *Miconia albicans*, ocorrente em áreas de

Cerrado e em vegetação litorânea, do Sul do México e Antilhas até o Paraguai, e em quase todos os estados brasileiros (Romero & Martins 2002).

De acordo com Renner (1989), Sartor (1994) e Goldenberg e Shepherd (1998), a espécie é agamospérmica obrigatória nas populações estudadas de Cerrado, com base nas observações de produção de frutos em experimentos de emasculação de flores e, principalmente, da viabilidade nula dos andrófitos obtida em testes para estudo da Biologia Reprodutiva. Para a Floresta Atlântica, vegetação litorânea da costa leste brasileira, tais dados são inexistentes.

A agamospermia é, por definição, uma forma de reprodução assexuada derivada dos processos sexuais por alteração coordenada em determinados eventos como a meiose, a embriogênese e, às vezes, também a endospermogênese. Além dessas condições, a viabilidade das sementes obtidas é necessária para que tal fenômeno seja considerado uma forma de reprodução para o indivíduo, para a espécie ou para as populações (Asker & Jerling 1992, Naumova 1993, Koltunow *et al.* 1995, Vielle-Calzada *et al.* 1996, Richards 1997, Grossniklaus *et al.* 2001). Além da inviabilidade polínica, a viabilidade das sementes produzidas por *M. albicans* (Cortez *et al.* 2007) apóia sua classificação como agamospérmica nas populações estudadas.

Nesse estudo foram analisados os estádios ontogenéticos dos estratos parietais da antera e da androsporogênese e a superfície da antera na região de deiscência, em indivíduos de *M. albicans* provenientes de populações do Cerrado e da Floresta Atlântica do estado de São Paulo, Brasil. O estudo visou (1) verificar se as populações da espécie ocorrentes na Floresta Atlântica compartilham as características reprodutivas já descritas para o Cerrado; (2) verificar se as características embriológicas da espécie se assemelham àquelas descritas para outras espécies do gênero; (3) verificar se as características morfológicas das células dos estratos parietais da antera podem estar relacionadas à inviabilidade dos andrófitos e (4) verificar se a inviabilidade polínica está relacionada a um determinado estágio da androsporogênese.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Coleta e Processamento Inicial*

O estudo foi realizado entre os anos de 2004 e 2006 em oito populações de *M. albicans*. No Cerrado foram escolhidas quatro populações, uma no município de Campinas-SP (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) e as demais no município de Itirapina-SP (Valério I, Pedregulho e Graúna); na Floresta Atlântica foram escolhidas quatro populações, todas no município de Ubatuba-SP (Praia Vermelha do Centro, Praia da Fortaleza, Praia da Picingüaba e Ilha Anchieta) (Fig. 4). Foram escolhidos três indivíduos de cada população e, para cada um deles, foram coletados primórdios de inflorescência, botões florais em vários estádios de desenvolvimento e flores. As unidades foram medidas com auxílio de paquímetro digital, fixadas separadamente em FAA (1:1:18, formalina:ácido acético glacial:etanol 50% (v/v)) (Johansen 1940), em solução de Karnovsky (glutaraldeído a 1% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2; paraformaldeído a 4%) (Karnovsky 1965) ou em solução de Carnoy modificada (6:3:1, etanol absoluto:clorofórmio:ácido acético glacial) (Solt & Wurdack 1980), desidratadas em série etanólica e estocadas em etanol 70% (v/v). Ramos vegetativos e/ou reprodutivos foram coletados, herborizados e depositados no herbário da Universidade Estadual de Campinas – UEC (números 146996 a 147006).

### *Microscopia de Luz*

Para os estudos da androsporogênese e da ontogenia dos estratos parietais da antera foram utilizadas cinco unidades de cada estádio de desenvolvimento (Fig. 2E, 5A, B), fixadas em FAA ou em solução de Karnovsky e estocadas em etanol 70% (v/v). As unidades foram desidratadas em série etanólica e incluídas em resina plástica HistoResin Leica (Gerrits & Smid 1983) ou desidratadas em série butílica e incluídas em Paraplast. Secções transversais, longitudinais e

oblíquas, entre seis e 10  $\mu\text{m}$  de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo manual com navalha tipo C, aderidas à lâmina de vidro e coradas com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato 0,1M e pH 4.7 (O'Brien *et al.* 1964) para resina plástica, e com solução aquosa a 1% de safranina e azul de astra (Gerlach 1969) para Paraplast. A análise do laminário foi feita em microscópio de luz Olympus BX 51, e o registro fotográfico, em câmera fotográfica PMC35DX com filme Kodak Pro-Image ISO 100, com escalas projetadas nas mesmas condições ópticas. Os vários estádios de desenvolvimento dos botões florais foram agrupados em botões florais I (Fig. 2E), II, III e IV (Fig. 5A), com base nas medidas de comprimento obtidas e na análise ontogenética.

#### *Microscopia Eletrônica de Varredura*

Para o estudo da superfície da antera na região de deiscência foram utilizadas oito anteras, sendo quatro delas provenientes de botões florais em pré-antese, sendo duas do Cerrado – indivíduo III da população I (PI $\Delta$ III) e indivíduo I da população II (PII $\Delta$ I) – e duas da Floresta Atlântica – indivíduo I da população I (PI $\Delta$ I) e indivíduo IV da população III (PIV $\Delta$ III), e quatro provenientes de flores, sendo duas do Cerrado – indivíduo III da população I (PI $\Delta$ III) e indivíduo I da população II (PII $\Delta$ I) – e duas da Floresta Atlântica – indivíduo I da população I (PI $\Delta$ I) e indivíduo III da população IV (PIV $\Delta$ III). As anteras foram fixadas separadamente em solução de Karnovsky e estocadas em etanol 70% (v/v). As unidades foram desidratadas em série etanólica, submetidas à secagem ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido em um aparelho Balzers CPD 030 e cobertas com ouro sobre suporte metálico em um aparelho Balzers SCD 050. A análise do material feita em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5200 e o registro fotográfico, em câmera fotográfica JEOL MP, com escalas projetadas nas mesmas condições.

### *Viabilidade Polínica*

Para o estudo da viabilidade polínica foram utilizados cinco botões florais em pré-antese (Fig. 5A) provenientes de cinco inflorescências, de cada indivíduo. Estas foram fixadas em FAA, em solução de Karnovsky ou em solução de Carnoy modificada (Solt & Wurdack 1980) e estocadas em etanol 70% (v/v). Todas as anteras de cada botão floral foram contadas e esmagadas em uma lâmina de vidro, coradas com carmim acético, cobertas com lamínula (Medina & Conagin 1964) e observadas em microscópio de luz Olympus BX 51. Cerca de 200 estruturas celulares foram contadas em cada lâmina/botão floral, exceto para aquelas que apresentaram um número inferior a este, e avaliadas quanto à forma e à presença ou não de coloração no citoplasma, totalizando cerca de 1000 estruturas por indivíduo. Além da viabilidade, as estruturas celulares observadas foram analisadas quanto ao seu estágio ontogenético por meio de comparações com os dados obtidos do estudo histológico da androsporogênese, e classificadas como tétrades de andrósporos (T), andrósporos livres (A) e andrófitos (Af). O registro fotográfico foi feito em câmera fotográfica PMC35DX com filme Kodak Pro-Image ISO 100, com escalas projetadas nas mesmas condições ópticas. Dos resultados obtidos foram calculados a média e o desvio-padrão (média±desvio padrão).

## RESULTADOS

### *Ontogenia dos Estratos Parietais da Antera e Androsporogênese*

A ontogenia do androceu teve início em botões florais em estágio I, dispostos de forma congesta nos primórdios de inflorescências (Fig. 2E). Os primórdios estaminais foram observados como projeções arredondadas do meristema fundamental e da protoderme uniestratificada que se formaram a partir do receptáculo floral após o surgimento dos primórdios do cálice e da corola (Fig. 6A, B). Repetidos ciclos de divisões anticlinais das células da

protoderme e de divisões anticliniais, pericliniais e oblíquas das células das camadas subdérmicas resultaram na formação de 10 estames constituídos pelo filete, pelo conectivo dotado de uma expansão e pela antera biteca tetrasporangiada, que se apresentaram flexionados até o estágio de botão floral em pré-antese (Fig. 6C-E). Nesse estágio de desenvolvimento as anteras apresentaram a região do poro apical fechada por um tecido constituído por células de aparência papilosa em relação àquelas observadas na epiderme que recobre o restante da antera (Fig. 7B, D, E). Após a antese floral os estames foram expostos concomitantemente à abertura do poro da antera, constituindo seu estágio de deiscência, sendo que nos estudos de microscopia eletrônica de varredura não foram observados andrófitos ou outras células em seu interior (Fig. 7A, E). Em algumas flores foi observado número variável de estames morfológicamente alterados, com tecidos disformes, anteras sésseis e/ou saco(s) polínico(s) colapsado(s) (Fig. 7F-I).

No estágio II ( $2,58 \pm 0,33$ mm de comprimento) de desenvolvimento do botão floral (Fig. 5A) a antera apresentou tecido meristemático com protoderme bem definida envolvendo as células do meristema fundamental e diferenciação do conectivo parenquimático (Fig. 8A). As células da camada subdérmica, após divisões pericliniais descontínuas, originaram a camada parietal primária, adjacente à protoderme, e um grupo de células esporogênicas com citoplasma denso e núcleo volumoso, no lado interno da antera (Fig. 8B). A partir da protoderme houve vacuolação das células da epiderme concomitantemente a divisões pericliniais descontínuas das células da camada parietal primária, que deram origem às camadas parietais secundárias externa, voltada para a epiderme, e interna; divisões anticliniais foram observadas na epiderme, aumentando o número de células na camada e permitindo a expansão dos sacos polínicos; divisões pericliniais e oblíquas foram observadas nas células esporogênicas aumentando seu número e originando o tecido esporogênico; divisões e diferenciação celular originaram o septo parenquimático entre dois sacos polínicos adjacentes (Fig. 8C-F). Divisões pericliniais

descontínuas das células da camada parietal secundária interna originaram o terceiro estrato parietal, ao mesmo tempo em que foi observado o início da diferenciação do tapete externo, de maneira descontínua, aparentemente a partir da camada mais externa do tecido esporogênico; em algumas anteras foi observada vacuolação intensa e aparentemente anormal das células do tecido esporogênico (Fig. 9A-B). As divisões e diferenciações celulares determinaram já nesse estágio de desenvolvimento a morfologia característica das anteras maduras da espécie, com quatro sacos polínicos separados pelo septo parenquimático e conectivo parenquimático vascularizado por um único feixe vascular (Fig. 9C, D). Foi observada diferenciação do tapete interno, aparentemente a partir das células mais internas do tecido esporogênico; tais células e aquelas do tapete externo possuíam apenas um núcleo e passaram a adquirir características de células secretoras como citoplasma denso e núcleo volumoso; as células da camada parietal secundária externa diferenciaram-se diretamente em endotécio; as camadas resultantes das divisões periclinais nas células da camada parietal secundária interna constituíram, então, as camadas médias externa e interna (Fig. 9E, F). Dessa forma a antera passou a ser constituída pela epiderme, pelo endotécio sem espessamentos parietais, pelas camadas médias externa e interna e pelos tapetes externo e interno, e pelo tecido esporogênico formado por células intensamente vacuoladas (Fig. 10A-C); posteriormente foi observada vacuolação e alterações citoplasmáticas aparentemente anormais nas células do tapete e do tecido esporogênico, e início da degeneração das células das camadas médias externa e interna (Fig. 10D).

Nos estádios III ( $4,13 \pm 0,52$  mm de comprimento) e IV ( $4,78 \pm 0,22$  mm de altura) de desenvolvimento do botão floral (Fig. 5A), foi observada diferenciação de células-mãe de andrósporos a partir das células do tecido esporogênico após diminuição na frequência de divisões celulares, aumento em volume e deposição de parede de calose. Muitas células-mãe de andrósporos apresentaram deformidade em seus limites, em relação às células consideradas

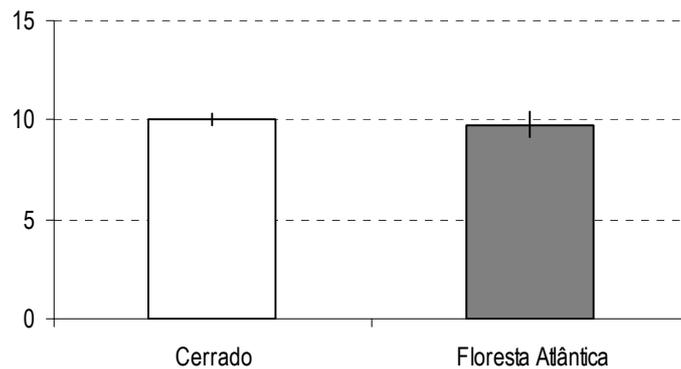
normais, além de degeneração nuclear e/ou citoplasmática; algumas células-mãe de andrósporos apresentaram deposição aparentemente irregular de calose. As células do tapete apresentaram alterações mais pronunciadas em seu citoplasma (Fig. 11A-D), em relação aos estádios ontogenéticos anteriores; células tapetais com alterações menos evidentes iniciaram a síntese de orbículas ou corpúsculos de Ubisch (Fig. 11E). As células-mãe de andrósporos viáveis iniciaram o processo de divisão meiótica originando díades e tétrades consideradas, em sua grande parte, inviáveis devido à delimitação disforme e/ou degeneração citoplasmática e/ou nuclear (Fig. 11F-J). A progressiva degeneração das células do tapete ocorreu concomitantemente à intensa liberação de orbículas para o interior do lóculo da antera e à agregação delas à superfície das células do tapete, formando a membrana tapetal, e das tétrades, formando sua parede; ao mesmo tempo, as tétrades potencialmente viáveis, após dissolução da parede de calose, liberaram os andrósporos, em sua maioria, inviáveis devido à degeneração nuclear e/ou citoplasmática parcial ou total, ou, mais comumente, devido à deformidade das paredes formadas em relação às aquelas formadas nos andrósporos considerados normais (Fig. 12A-G). Apenas um andrófito em estágio bicelular foi observado, constituído pelas células vegetativa e generativa (Fig. 12C).

Nos botões florais em pré-antese (Fig. 5A) e nas flores (Fig. 5B), a parede da antera apresentou dois estratos, a epiderme, formada por células cúbicas a arredondadas de cutícula espessa, e o endotécio, com células cúbicas a retangulares sem espessamentos parietais; foram observados sacos polínicos completamente vazios ou, mais comumente, preenchidos por díades e tétrades de andrósporos e por andrósporos livres, todos eles inviáveis, e membrana tapetal persistente entre o endotécio e o lóculo da antera (Fig. 12H, I). Após a antese floral foi observada a deiscência da antera, que em *M. albicans* é do tipo poricida apical. Foi observada degeneração das células epidérmicas localizadas na região do poro, e conseqüentemente, sua abertura (Fig. 6A, E).

Nos botões florais com ovário desenvolvido em fruto (Fig. 5G) foi observado que tanto os estratos parietais da antera quanto a androsporogênese apresentaram características estruturais e ontogenéticas semelhantes às observadas nas demais unidades, exceto pela presença de díades e tétrades de andrósporos e andrósporos livres com conteúdo fenólico (Fig. 12G).

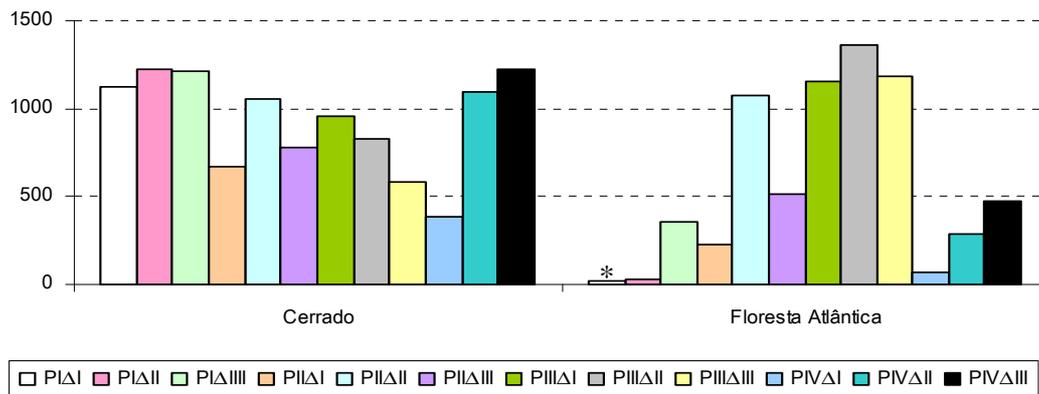
#### *Viabilidade Polínica*

O número médio de estames por botão floral em pré-antese foi igual a  $9,90 \pm 0,49$  (média  $\pm$  desvio-padrão), não sendo observadas diferenças individuais, populacionais ou vegetacionais (Fig. 14).



**Figura 14.** Número de estames por botão floral em pré-antese de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média  $\pm$  desvio-padrão).

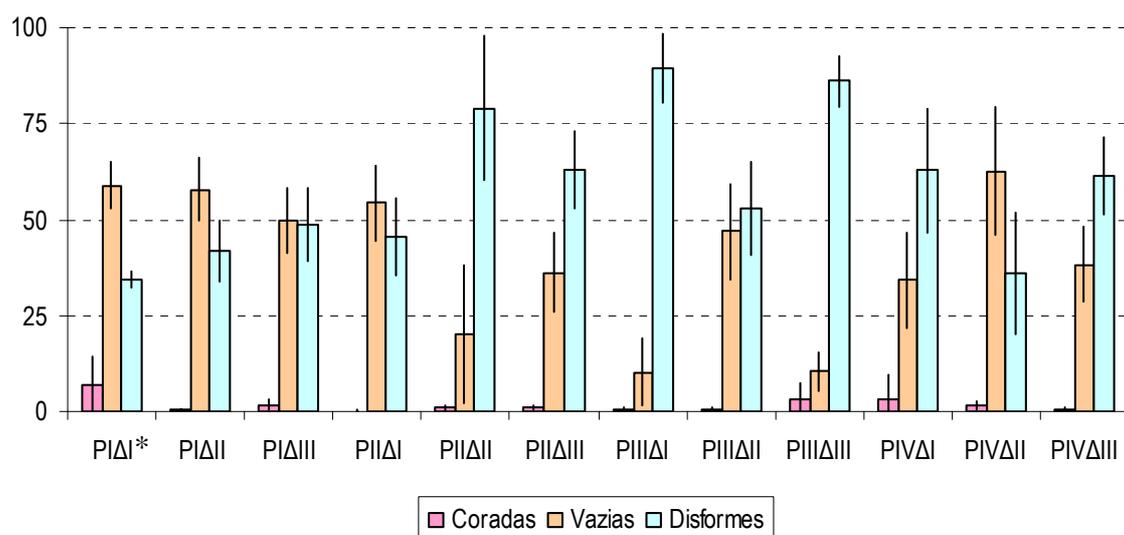
O número mínimo de células analisadas por indivíduo foi menor que 500 em um indivíduo proveniente do Cerrado e em sete indivíduos provenientes da Floresta Atlântica, indicando uma maior quantidade de anteras com baixa produção de células reprodutivas nos indivíduos provenientes da Floresta Atlântica; além disso, dois botões florais em pré-antese provenientes do indivíduo PIAI da Floresta Atlântica apresentaram os sacos polínicos de todas as anteras completamente vazios (Fig. 15).



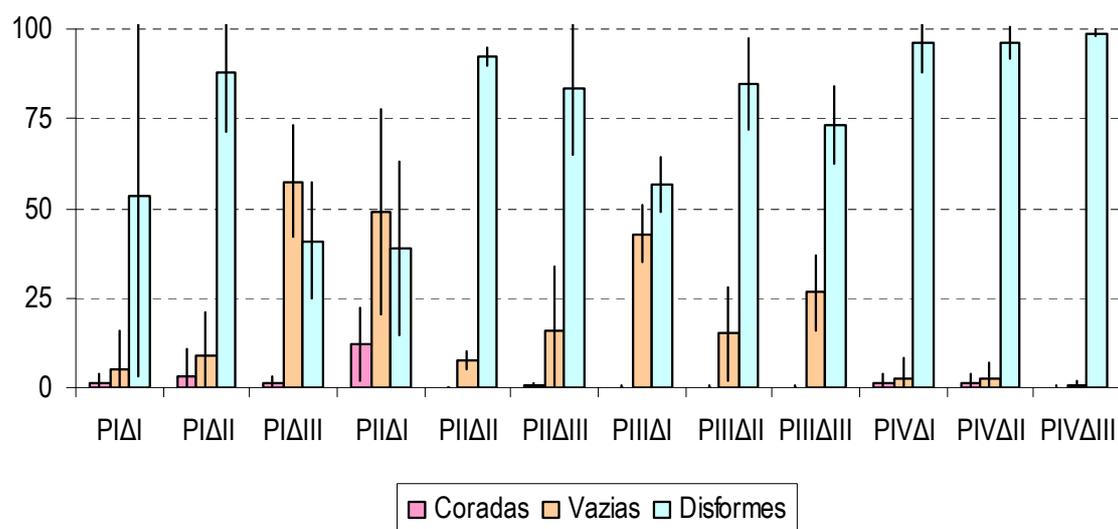
**Figura 15.** Número total de estruturas celulares analisadas no interior dos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão). P=população. Δ=indivíduo. \*Indivíduo que apresentou botões florais em pré-antese com sacos polínicos das anteras completamente vazios.

Algumas estruturas celulares observadas no interior dos lóculos das anteras de botões florais em pré-antese não foram classificadas em nenhuma das categorias (tétrades de andrósporos, andrósporos livres e andrófitos) devido à morfologia e/ou ao tamanho muito diferentes em relação às demais (Fig. 13D, E).

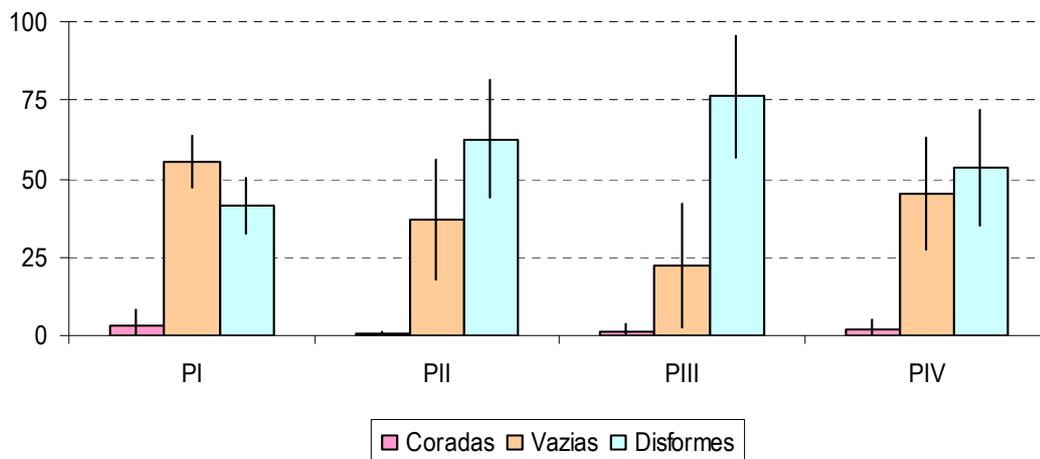
A viabilidade polínica da espécie foi nula em todas as populações estudadas. A porcentagem de estruturas celulares inviáveis, classificadas como vazias e disformes, foi sempre maior que a porcentagem de estruturas celulares potencialmente viáveis, classificadas como coradas (Fig. 13A-C), em todos os indivíduos, populações e formações vegetacionais analisados (Fig. 16-20). Quando analisado apenas o grupo das estruturas celulares inviáveis, quando houve diferença entre as porcentagens daquelas classificadas como vazias e disformes, esta foi, na maior parte dos casos, decorrente da maior porcentagem de estruturas celulares disformes, exceção feita ao indivíduo PIAI proveniente do Cerrado, que apresentou maior porcentagem de estruturas celulares vazias em relação àquelas consideradas disformes (Fig. 16-20). Não foram observadas diferenças entre as duas formações vegetacionais quando estas foram comparadas quanto à porcentagem de estruturas celulares em cada categoria (coradas, vazias e disformes) (Fig. 20).



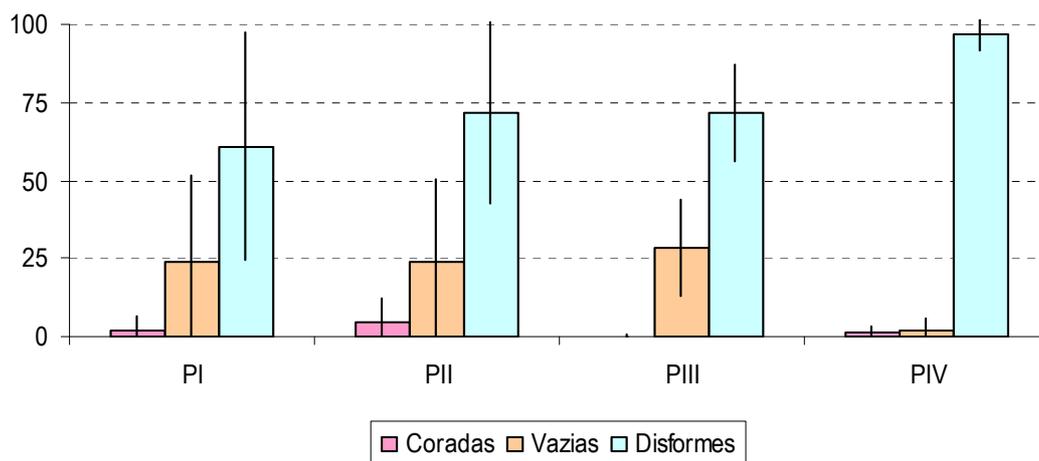
**Figura 16.** Porcentagem de estruturas celulares coradas, vazias e disformes observadas no interior dos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes do Cerrado (média±desvio-padrão). P=população. Δ=indivíduo. \*Indivíduo que apresentou botões florais em pré-antese com porcentagem de estruturas celulares vazias nas anteras maior que a porcentagem de estruturas celulares disformes.



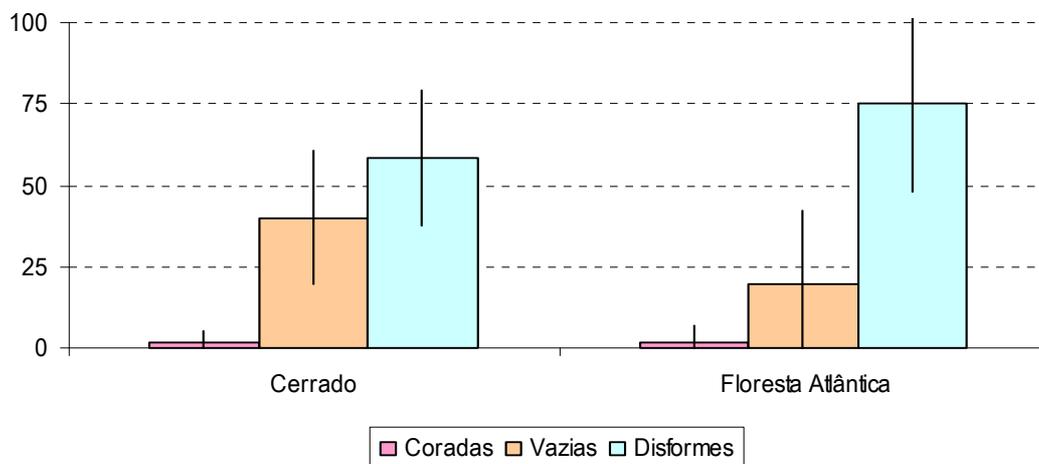
**Figura 17.** Porcentagem de estruturas celulares coradas, vazias e disformes observadas no interior dos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão). P=população. Δ=indivíduo.



**Figura 18.** Porcentagem de estruturas celulares coradas, vazias e disformes observadas no interior dos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes do Cerrado (média±desvio-padrão). P=população.

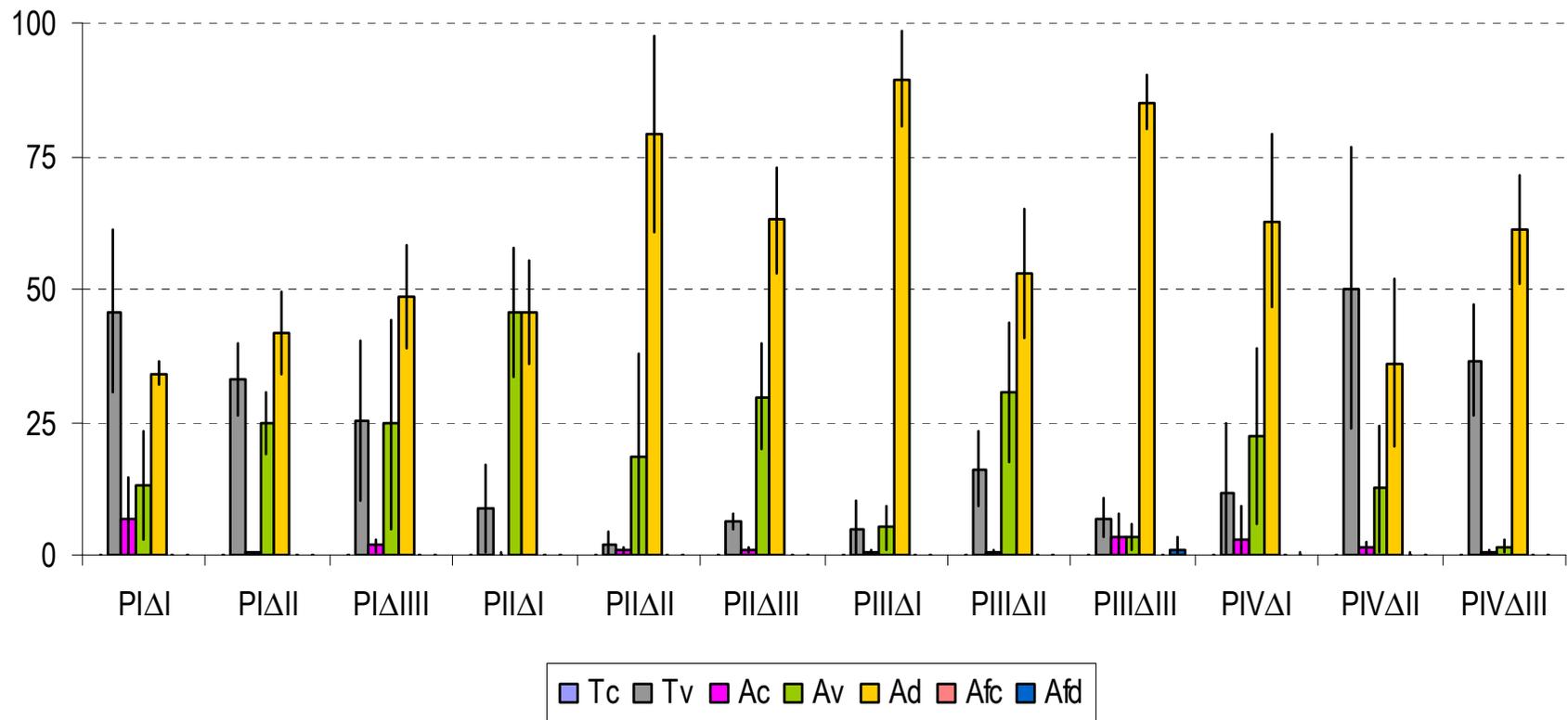


**Figura 19.** Porcentagem de estruturas celulares coradas, vazias e disformes observadas no interior dos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão). P=população.

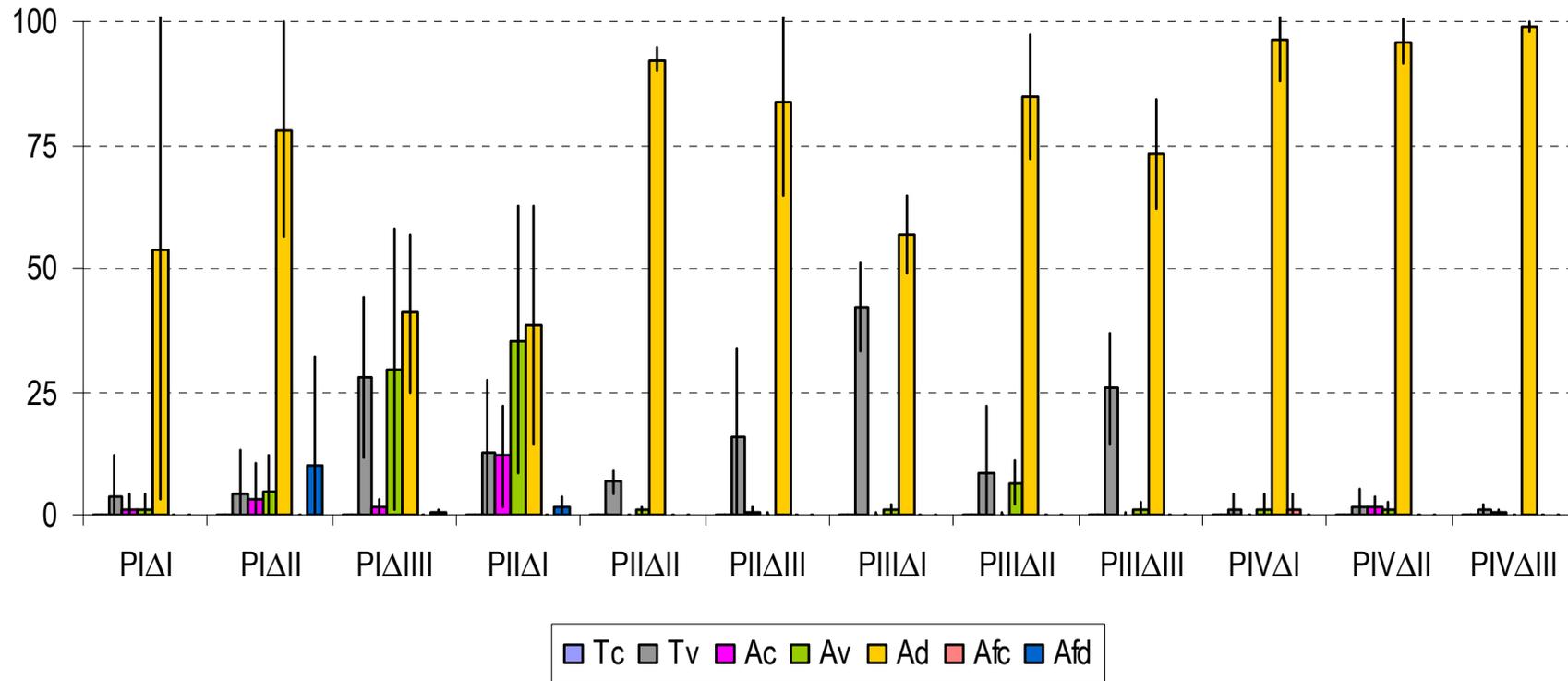


**Figura 20.** Porcentagem de estruturas celulares coradas, vazias e disformes observadas no interior dos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão).

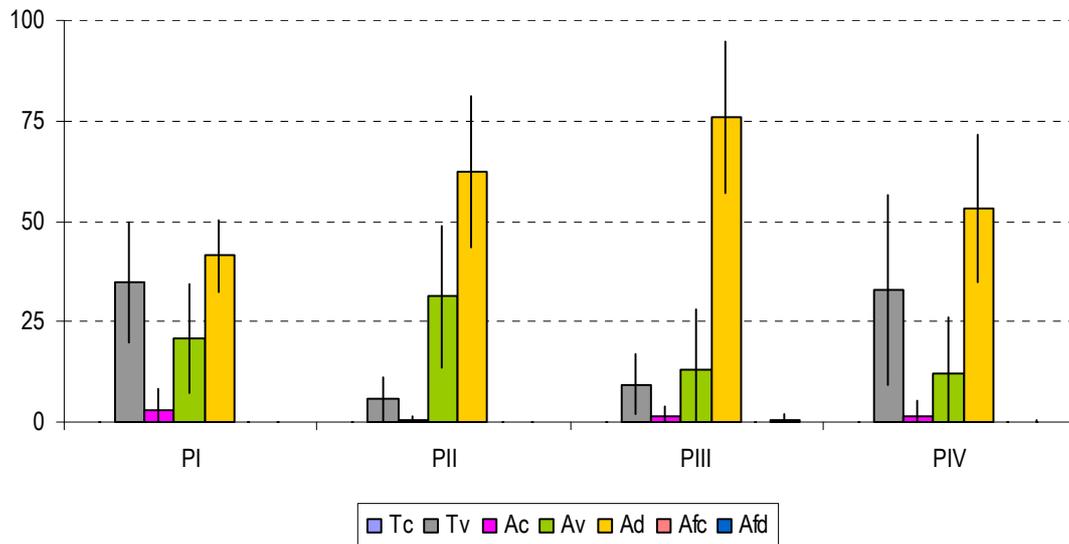
Com relação ao estágio ontogenético das estruturas celulares observadas nos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese (Fig. 13), todos os indivíduos de ambas as formações vegetacionais apresentaram porcentagens muito baixas ou nulas de andrófitos nas duas categorias consideradas (coradas e disformes). Quando houve diferença entre a porcentagem de tétrades de andrósporos (T) e de andrósporos livres (A) observada entre os indivíduos, populações ou formações vegetacionais analisados, esta foi sempre decorrente da maior porcentagem de andrósporos livres (A), sendo que a maioria destes fazia parte da categoria disforme (Fig. 21-24). Não foram observadas diferenças entre as duas formações vegetacionais quando estas foram comparadas quanto à porcentagem de estruturas celulares em cada estágio ontogenético analisado (Fig. 25).



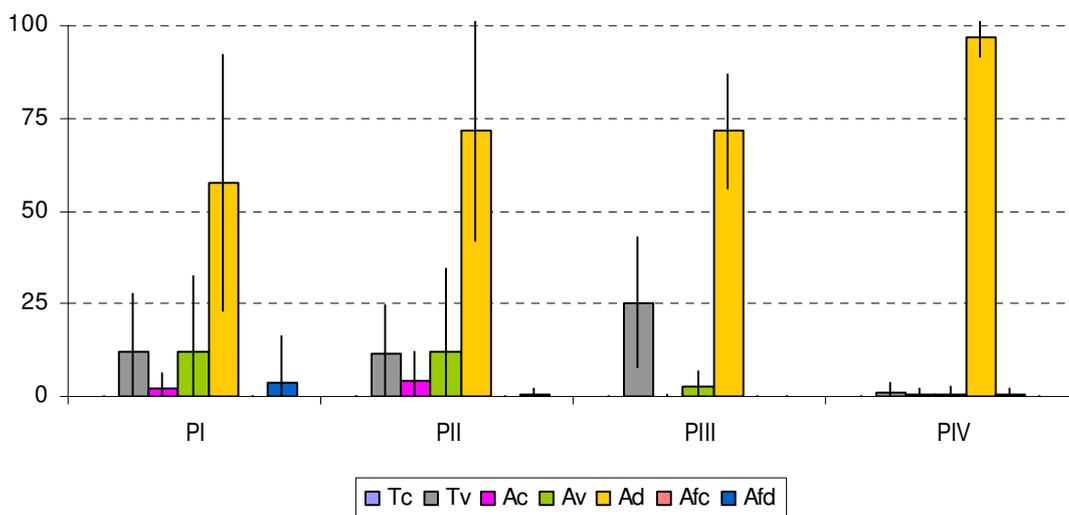
**Figura 21.** Porcentagem de estruturas celulares observadas nos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes do Cerrado, em relação ao estágio ontogenético. Tc=tétrades coradas. Tv=tétrades vazias. Ac=andrósporos corados. Av=andrósporos vazios. Ad=andrósporos disformes. Afc=andrófitos corados. Afd=andrófitos disformes. P=população. Δ=indivíduo.



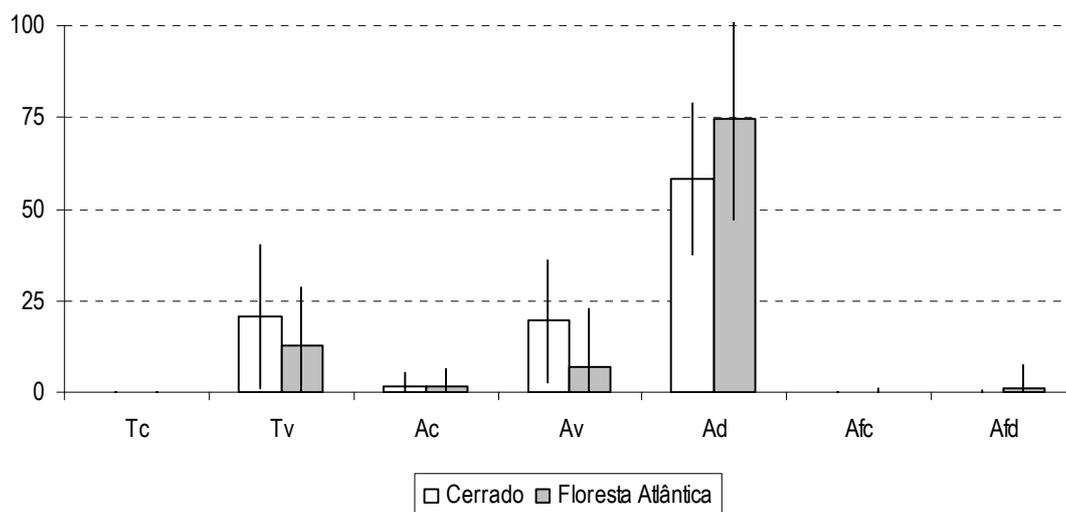
**Figura 22.** Porcentagem de estruturas celulares observadas nos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes da Floresta Atlântica, em relação ao estágio ontogênico. Tc=tétrades coradas. Tv=tétrades vazias. Ac=andrósporos corados. Av=andrósporos vazios. Ad=andrósporos disformes. Afc=andrófitos corados. Afd=andrófitos disformes. P=população. Δ=indivíduo.



**Figura 23.** Porcentagem de estruturas celulares observadas nos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes do Cerrado, em relação ao estágio ontogenético. Tc=tétrades coradas. Tv=tétrades vazias. Ac=andrósporos corados. Av=andrósporos vazios. Ad=andrósporos disformes. Afc=andrófitos corados. Afd=andrófitos disformes. P=população.



**Figura 24.** Porcentagem de estruturas celulares observadas nos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes da Floresta Atlântica, em relação ao estágio ontogenético. Tc=tétrades coradas. Tv=tétrades vazias. Ac=andrósporos corados. Av=andrósporos vazios. Ad=andrósporos disformes. Afc=andrófitos corados. Afd=andrófitos disformes. P=população.



**Figura 25.** Porcentagem de estruturas celulares observadas nos sacos polínicos das anteras de botões florais em pré-antese de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica, em relação ao estágio ontogenético. Tc=tétrades coradas. Tv=tétrades vazias. Ac=andrósporos corados. Av=andrósporos vazios. Ad=andrósporos disformes. Afc=andrófitos corados. Afd=andrófitos disformes.

## DISCUSSÃO

*M. albicans* apresentou viabilidade polínica nula em todas as populações estudadas, apoiando a sua classificação como agamospérmica obrigatória, inclusive na Floresta Atlântica, dado este inédito. As alterações morfológicas que levaram, em última instância, à esterilidade total da espécie, foram primeiramente observadas nas células do tecido esporogênico, com a intensa vacuolação de suas células, e, principalmente, nas células tapetais.

O tapete é considerado um dos mais importantes tecidos responsáveis pela formação de andrófitos funcionais; entre suas funções destacam-se a produção e secreção de substâncias fundamentais a todos os estádios de desenvolvimento do tecido esporogênico: hormônios como a auxina, enzimas como a calase, nutrientes e precursores para a síntese de exina (Heslop-Harrison 1964, Frankel *et al.* 1969, Vithanage & Knox 1980, Bhandari 1984, Bedinger 1992, Mariath *et al.* 2006, Gonzáles-Sánchez *et al.* 2004, Aloni *et al.* 2006). Estudos citológicos ultra-estruturais

realizados em linhagens estéreis revelam uma forte correlação entre a inviabilidade dos andrófitos e as alterações morfológicas e funcionais das células do tapete e, atualmente, vários genes relacionados a esses fenômenos têm sido identificados e caracterizados funcionalmente (Aguirre & Smith 1993, Cigan *et al.* 2001, Fei & Sawhney 2001, Wilson *et al.* 2001, Kapoor *et al.* 2002, Lai *et al.* 2002, Sorensen *et al.* 2003, Albrecht 2005).

Como descrito para grande parte das Angiospermae, o período de maior atividade metabólica das células do tapete coincide com o estágio de célula-mãe de andrósporos, ou seja, durante a meiose (Prakash 1997, Lersten 2004). Já no estágio seguinte, de tetrade de andrósporos, as células do tapete exibem considerável aumento no tamanho de seus vacúolos; posteriormente, há rompimento da parede celular e da membrana plasmática, liberação do conteúdo citoplasmático das células do tapete para o interior do lóculo da antera e deposição de substâncias na superfície dos andrósporos livres, concomitantemente à liberação dos mesmos a partir das tétrades (Vasil 1967, Mascarenhas 1975, Esau 1974 Sawheney & Bhadula 1988, Aguirre & Smith 1993).

Embora os dados obtidos nesse trabalho não permitissem determinar com exatidão sua causa, podemos concluir que a inviabilidade dos andrófitos de *M. albicans*, que é determiando por alterações que se iniciam já nos primeiros estádios da androsporogênese, está relacionada às alterações observadas nas células do tapete, como a precoce e intensa vacuolação e as deformidades nuclear e citoplasmática. Estas alterações determinam características distintas daquelas comumente observadas nas células secretoras presentes, por exemplo, no tapete de *M. cabucu*, espécie com reprodução sexuada (Medeiros e Morretes 1996). Tais anormalidades também estão entre aquelas mencionadas por Bhandari (1984) como um dos fatores determinantes da degeneração prematura do tecido e da dessincronização meiótica das células-mãe de andrósporos, culminando em vários graus de esterilidade masculina.

A observação de díades e tétrades de andrósporos e de andrósporos livres, todos anormais, em anteras de botões florais em pré-antese, mostram que algumas células conseguem se desenvolver normalmente, apesar das anormalidades do tapete. A quase total ausência de andrófitos sugere que a gametogênese seja mais exigente quanto às substâncias necessárias ao seu desenvolvimento satisfatório, ou que haja nessa etapa um controle mais refinado das células com alguma alteração funcional. Estudos ultra-estruturais comparativos das células androsporogênicas de espécies com agamospermia obrigatória, agamospermia facultativa e reprodução sexuada, certamente fornecerão dados mais elucidativos acerca dos mecanismos promotores da inviabilidade dos andrófitos em *M. albicans* e em outras espécies do gênero.

A menor produção de estruturas celulares observadas nos lóculos das anteras dos indivíduos da Floresta Atlântica em relação àqueles do Cerrado foi a diferença mais marcante observada entre as duas formações vegetacionais. Os demais caracteres reprodutivos, como o tipo de desenvolvimento da parede da antera, a androsporogênese e a androgametogênese são de maneira geral constantes entre os indivíduos, o que corrobora o caráter conservativo dessas características dentro de um mesmo grupo. As grandes amplitudes de desvio-padrão obtidos sugerem que as variações existem principalmente dentro de cada indivíduo analisado, em ambas as populações e formações vegetacionais. Embora o fenômeno da agamospermia seja freqüentemente mencionado como decorrente, entre outros fatores, das condições ambientais (Richards 1997), e associado aos diferentes graus de esterilidade masculina (Bhandari 1984), ao menos em *M. albicans*, as alterações observadas ao longo do desenvolvimento dos andrósporos parecem estar mais relacionadas à história de vida da espécie do que às possíveis adaptações dela a ambientes de características tão distintas como o Cerrado e a Floresta Atlântica.

### *Caracteres de Interesse Filogenético em Melastomataceae*

A origem e as características dos tecidos presentes na parede da antera de *M. albicans* assemelham-se ao padrão descrito para as espécies de Melastomataceae estudadas até o momento, como epiderme persistente, camadas médias efêmeras [exceção feita a *M. laticrenata*, que apresenta persistência de uma das camadas médias (Goldenberg *et al.* 2003)] e tapete do tipo glandular (Tobe & Raven 1983, Johri *et al.* 1992, Medeiros & Roos 1996, Medeiros e Morretes 1996, Goldenberg *et al.* 2003), sendo este o tipo de tapete mais comumente observado nas Angiospermae (Bhandari 1984, Lersten 2004).

A origem do tapete externo em *M. albicans*, aparentemente a partir de diferenciação de células periféricas do tecido esporogênico, é semelhante ao observado para a formação do tapete interno; esse tipo de origem do tapete interno já foi observado em outras espécies de Angiospermae, embora o mais comum seja a sua formação a partir de células meristemáticas do conectivo (Bhandari 1984, Mariath *et al.* 2006). Embora a forma mais comum de origem do tapete externo seja a partir da camada parietal secundária interna, o tipo observado em *M. albicans* já foi identificado em outras espécies (Santos 1993). Desse modo, o fato da origem do tapete em *M. albicans* ser distinta daquela observada em *Tibouchina cerastifolia* (Medeiros & Roos 1996) e em *M. cabucu* (Medeiros e Morretes 1996), e dela não se enquadrar nos tipos propostos por Davis (1966), apóia a classificação do tipo de formação do tapete na família Melastomataceae como irregular (Tobe & Raven 1983).

Entretanto, o ponto de discordância mais evidente entre os trabalhos publicados sobre a embriologia do grupo relaciona-se às características do endotécio, quanto a sua presença nos membros da família e a sua relação com os mecanismos de deiscência. O endotécio é uma camada subepidérmica, limitada à porção protuberante do androsporângio, geralmente uniestratificada e com espessamentos fibrosos especializados nas paredes de suas células,

freqüentemente relacionada aos mecanismos de deiscência da antera (Mariath *et al.* 2006). Tobe & Raven (1983) e Schmid (1984) mencionam a presença de endotécio com espessamentos parietais em algumas espécies de Melastomataceae, incluídas em um grupo antes considerado subfamília de Melastomataceae e, recentemente, consolidado, com base em dados morfológicos e moleculares combinados, como família irmã: Memecylaceae (Renner 1993, APG 2003). Do mesmo modo, Clausen & Renner (2001) consideram a ausência de endotécio como característica comum aos membros de Melastomataceae, com exceção da tribo Kibessieae, característica esta também observada em *Miconia cinnamomifolia*, *Miconia pusilliflora* e *Miconia laticrenata* (Goldenberg *et al.* 2003).

Já em *M. albicans*, o endotécio é persistente na antera madura, embora sem espessamentos parietais em suas células. A presença de endotécio, inclusive com espessamentos parietais, foi observada também em *Tococa formicaria* (D.G. Simão, comunicação pessoal), espécie incluída na mesma tribo de *M. albicans*. Embora Clausen & Renner (2001) tenham incluído espécies da tribo Miconieae em suas análises, inclusive do gênero *Tococa*, nenhuma espécie do gênero *Miconia* foi analisada por eles. De acordo com esses autores, a relação entre o endotécio e o tipo de deiscência das anteras é um dos pontos-chave para os estudos filogenéticos da família, já que a perda da capacidade de originar um endotécio poderia ser uma característica ancestral no grupo e, talvez, uma predisposição ao desenvolvimento de anteras com deiscência poricida.

A ausência de espessamentos parietais nas células do endotécio é considerada uma condição derivada e, freqüentemente, associada à deiscência poricida das anteras (Gerenday & French 1988, Mariath *et al.* 2006). Entretanto, tal associação é ainda bastante discutível, já que endotécio com espessamentos parietais está presente em grande parte das famílias de monocotiledôneas com anteras poricidas e considerado ausente em Myrtales, eudicotiledôneas

com representantes tanto de deiscência poricida quanto de deiscência rimosa (Gerenday & French 1988). Dessa forma, a presença concomitante de endotécio e deiscência poricida nas anteras de algumas espécies de Melastomataceae mostra que esses dois caracteres possam coexistir ao menos em alguns membros da família, e que a presença de espessamentos parietais nas células do endotécio de algumas delas pode estar mais relacionada à história evolutiva desses grupos do que com a função desempenhada durante o processo de deiscência.

Ainda quanto aos mecanismos de deiscência, diferentemente do que foi descrito para algumas espécies da família, estudos de microscopia eletrônica de varredura em *M. albicans* mostraram que há epiderme na região do poro apical, em estádios anteriores à sua abertura. De acordo com Ziegler (1925 *apud* Renner 1993), Eyde e Teeri (1967 *apud* Renner 1993) e Clausen & Renner (2001), a aparente ausência de epiderme na região do poro provavelmente esteja relacionada aos mecanismos de deiscência, já que a exposição e dessecação das células do mesofilo permitem a abertura dessa região e a liberação dos andrófitos. Goldenberg e colaboradores (2003) observaram a aparente presença de uma epiderme, embora diferente daquela observada no restante da antera pela ausência de cutícula estriada, na região de deiscência, em *M. cinnamomifolia*, *M. pusilliflora* e *M. laticrenata*.

A presença ou ausência de endotécio nas anteras maduras, a origem do tapete e os tecidos presentes na região do poro apical da antera, associados aos dados já publicados para outras espécies do gênero, deixam claro que determinadas características observadas em alguns membros de Melastomataceae e generalizadas para toda a família, precisam ser urgentemente revistas para auxiliar no reconhecimento de relações filogenéticas consistentes entre os membros desse grupo.

## LITERATURA CITADA

- APG (Angiosperm Phylogeny Group). 2003.** An update of APG classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 399-436.
- Albrecht C, Russinova E, Hecht V, Baaijens E, de Vries S. 2005.** The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *The Plant Cell* **17**: 3337-3349.
- Aguirre PJ, Smith, AG. 1993.** Molecular characterization of a gene encoding a cysteine-rich protein preferentially expressed in anthers of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology* **23**: 477-487.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI. 2006.** Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Planta* **223**: 315-328.
- Asker SE, Jerling L. 1992.** *Apomixis in plants*. Boca Raton: CRC Press.
- Bhandari NN. 1984.** The microsporangium. In: Johri BM, ed. *Embryology of angiosperms*. New York: Springer-Verlag.
- Bedinger P. 1992.** The remarkable biology of pollen. *The Plant Cell* **4**: 879-887.
- Cigan AM, Unger E, Xu R, Kendall T, Fox TW. 2001.** Phenotypic complementation of ms45 maize requires tapetal expression of MS45. *Sexual Plant Reproduction* **14**: 135-142.
- Clausing G, Renner SS. 2001.** Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. *American Journal of Botany* **88**: 486-498.
- Cortez PA, Teixeira SP, Carmello-Guerreiro SM. 2007.** Ontogenia do óvulo, do ginófito e dos estádios iniciais do embrião agamospérmico e do endosperma autônomo de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae). Em preparação.
- Davis GL. 1966.** *Systematic embryology of the angiosperms*. New York: John Wiley.

- Esau K. 1974.** *Anatomia das plantas com sementes*. São Paulo: Edgard Blücher.
- Fei HM, Sawhney VK. 2001.** Ultrastructural characterization of male sterile33 (ms33) mutant in *Arabidopsis* affected in pollen desiccation and maturation. *Canadian Journal of Botany* **79**: 118-129.
- Frankel R, Izhar S, Nitsan J. 1969.** Timing of callase activity and cytoplasmic male sterility in *Petunia*. *Biochemical and Genetics* **3**: 451-455.
- Gerenday A, French JC. 1988.** Endothelial thickenings in anthers of porate monocotyledons. *American Journal of Botany* **75**: 22-25.
- Gerlach D. 1969.** *Botanische mikrotechnik: eine einföhrung*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Gerrits PO, Smid L. 1983.** A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* **95**: 150-155.
- Goldenberg R, Shepherd GJ. 1998.** Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in “cerrado” vegetation. *Plant Systematics and Evolution* **211**: 13-29.
- Goldenberg R, Teixeira SP, Martins AB. 2003.** Anther dehiscence and circumscription of *Miconia* sect. Hypoxanthus (Melastomataceae). *Kew Bulletin* **58**: 195-203.
- González-Sánchez M, Rosato M, Chiavarino M, Puertas MJ. 2004.** Chromosome instabilities and PCD in tapetal cells of maize with B chromosome and effects on pollen viability. *Genetics* **166**: 999-1009.
- Grossniklaus U, Nogler GA, van Dijk PJ. 2001.** How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. *The Plant Cell* **13**: 1491-1498.
- Heslop-Harrison J. 1964.** Cell walls, cell membranes and protoplasmic connections during meiosis and pollen development. In: Linskens HF, ed. *Pollen Physiology and Fertilization*. Amsterdam: North-Holland.

- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS. 1992.** *Comparative embryology of angiosperms*. v.1, 2. New York: Springer-Verlag.
- Kapoor S, Kobayashi A, Takatsuji H. 2002.** Silencing of the tapetum-specific zinc finger gene TAZ1 causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in petunia. *The Plant Cell* **14**: 2353-2367.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of the Cell Biology* **27**: 137A-138A.
- Koltunow AM, Bicknell RA, Chaudhury AM. 1995.** Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology* **108**: 1345-1352.
- Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y. 2002.** An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Molecular Biology* **50**: 29-42.
- Lersten NR. 2004.** *Flowering plant embryology - with emphasis on economic species*. Iowa: Blackwell Publishing.
- Mariath JEA, Santos RP, Bittencourt Júnior NS. 2006.** Flor. In: Appezato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM, eds. *Anatomia Vegetal*. 2ª ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa.
- Martins AB, Semir J, Goldenberg R, Martins E. 1996.** O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) no estado de São Paulo. *Acta Botanica Brasilica* **10**: 267-316.
- Mascarenhas JP. 1975.** The biochemistry of angiosperm pollen development. *Botanical Review* **41**: 259-314.

- Medeiros JD, Morretes BL. 1996.** The embryology of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). *Cytologia* **61**: 83-91.
- Medeiros JD, Roos AL. 1996.** Aspectos do microsporângio, da microsporogênese e do gametófito masculino de *Tibouchina cerastifolia* (Naud.) Cogn. (Melastomataceae). *Biotemas* **9**: 5-14.
- Medina DM, Conagin CHTM. 1964.** *Técnica citológica*. Campinas: Instituto Agronômico.
- Naumova TN. 1993.** *Apomixis in angiosperms: nucellar and integumentary embryony*. Boca Raton: CRC Press.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- Prakash N. 1997.** Sexual reproduction in seed plants - an embryological approach. 2<sup>nd</sup> ed. Department of Botany, University of England.
- Renner SS. 1989.** A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **76**: 496-518.
- Renner SS. 1993.** Phylogeny and classification of the Melastomataceae. *Nordic Journal of Botany* **13**: 519-540.
- Richards AJ. 1997.** *Plant breeding systems*. 2ed. London: Chapman & Hall.
- Romero R, Martins AB. 2002.** Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **25**: 19-24.
- Santos RP. 1993.** Androsporogênese/androgametogênese e desenvolvimento do androsporângio em *Ilex paraguariensis* St. Hill. (Aquifoliaceae). Monografia de bacharelado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-RS.

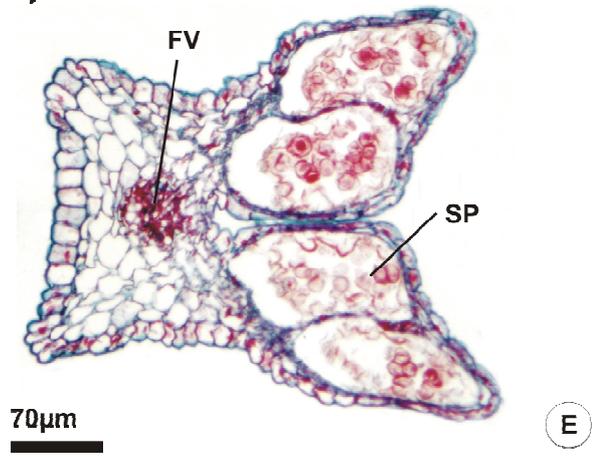
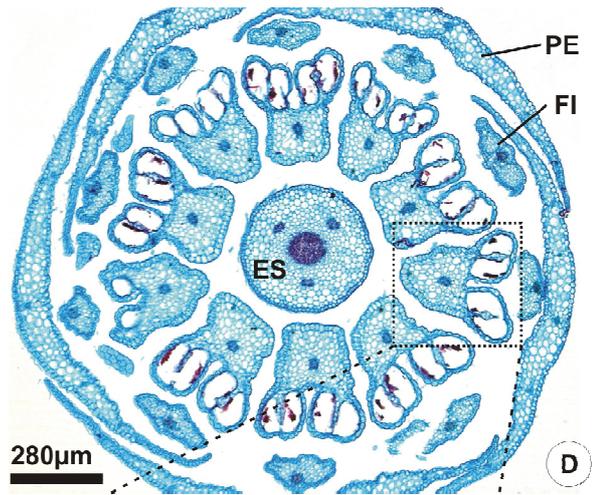
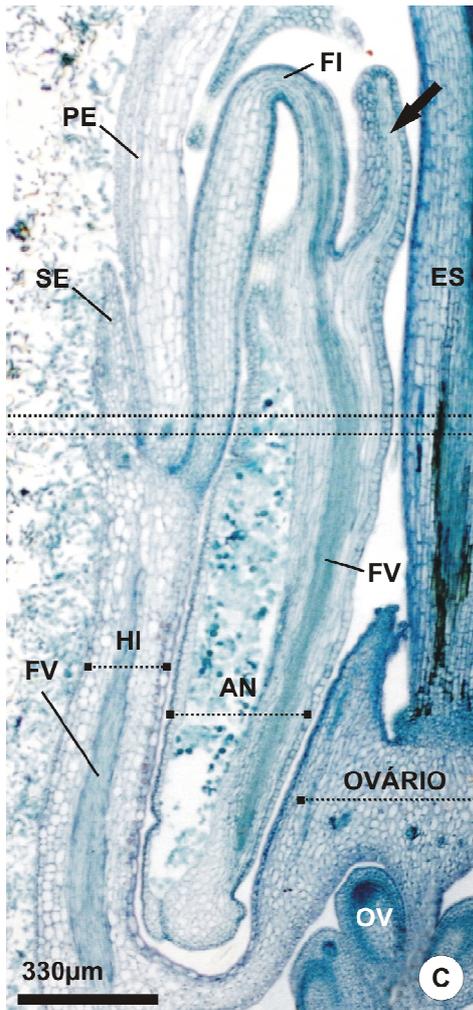
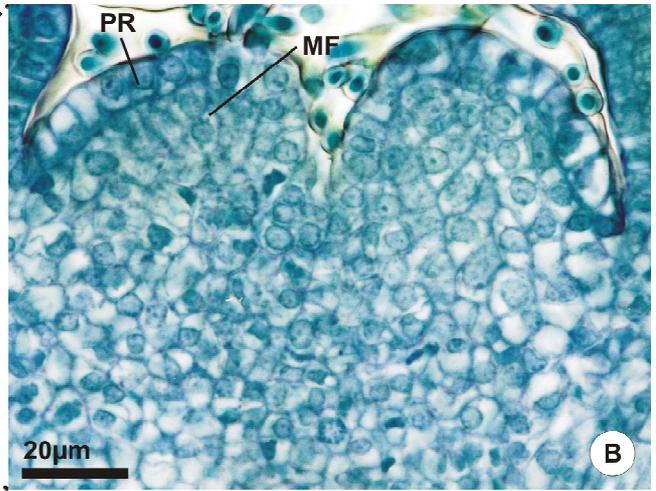
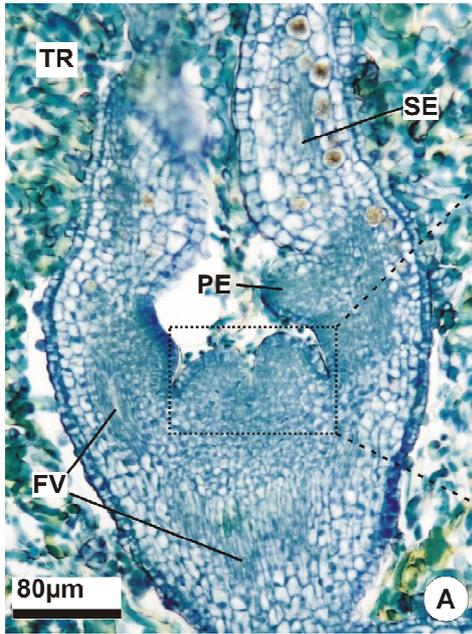
- Sartor MBLB. 1994.** Fenologia e biologia floral de *Miconia albicans* (Sw.) Triana e *Tibouchina stenocarpa* (DC.) Cogn. (Melastomataceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.
- Sawhney VK, Bhadula SK. 1988.** Microsporogenesis in the normal and male-sterile stamenless-2 mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Canadian Journal of Botany* **66**: 2013-2021.
- Schmid R. 1984.** Reproductive anatomy and morphology of Myrtales in relation to systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **71**: 832-835.
- Solt ML, Wurdack JJ. 1980.** Chromosome number in Melastomataceae. *Phytologia* **47**:199-220.
- Sorensen AM, Kröber S, Unte US, Huijser P, Dekker K, Saedler H. 2003.** The *Arabidopsis* aborted microspores (AMS) gene encodes a MYC class transcriptional factor. *The Plant Journal* **33**: 413-423.
- Tobe H, Raven PH. 1983.** An embryological analysis of Myrtales, its definition and characteristics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **70**: 71-94.
- Vasil IK. 1967.** Physiology and cytology of anther-development. *Biological Review* **42**: 327-373.
- Vielle-Calzada J, Crane CF, Stelly DM. 1996.** Apomixis: the asexual revolution. *Science* **274**: 1322-1323.
- Vithanage HIM, Knox RB. 1980.** Periodicity of pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymes in the grasses *Lolium perenne* L. and *Phalaris tuberosa* L. *Annals of Botany* **45**: 131-141.
- Wilson ZA, Morroll SM, Dawson J, Swarup R, Tighe PJ. 2001.** The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (ML1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *Plant Journal* **28**: 27-39.

# ILUSTRAÇÕES

---

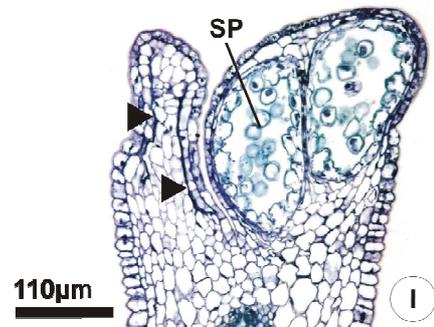
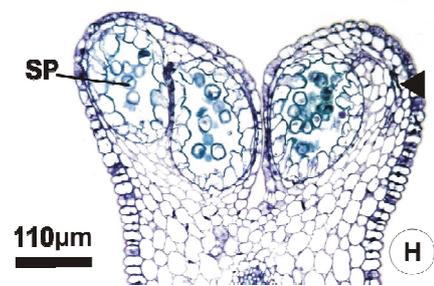
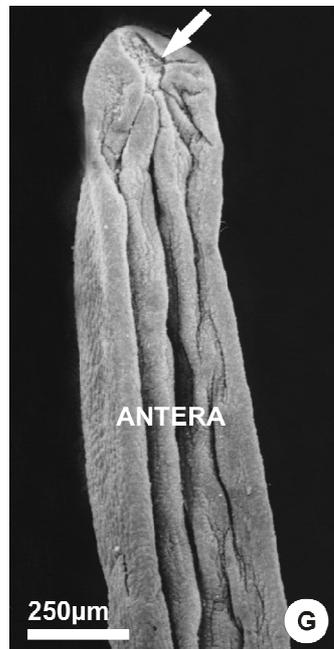
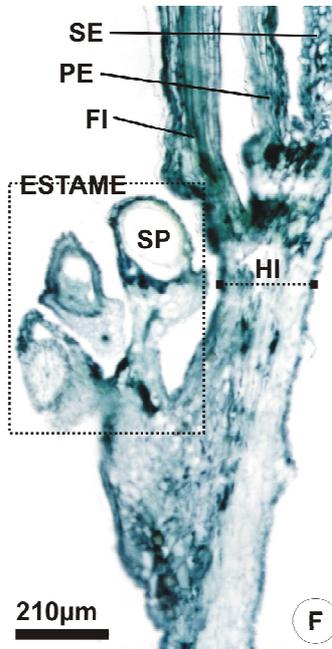
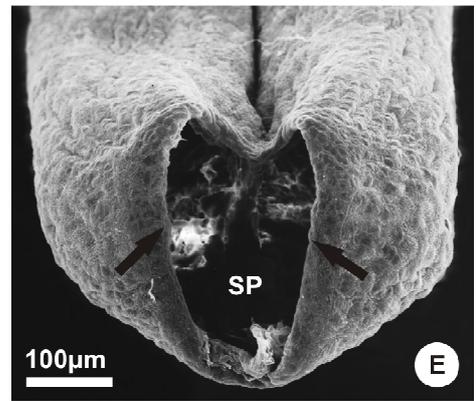
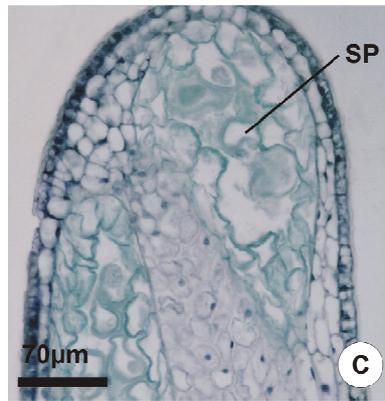
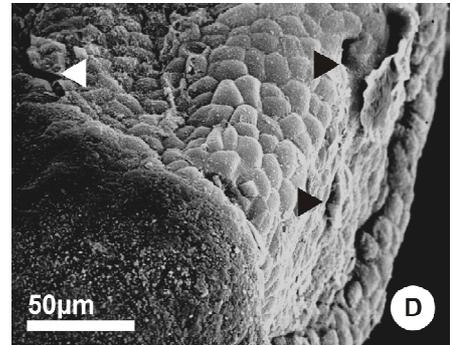
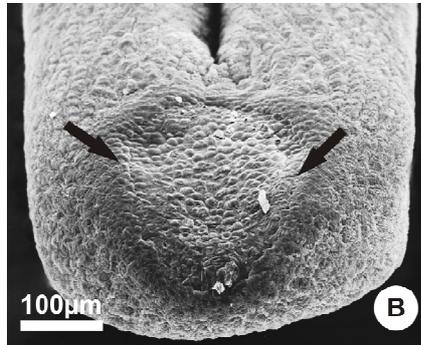
**Figura 6.** Botões florais I (**A, B**) e em pré-antese (**C-E**) de *Miconia albicans*. **A.** Secção longitudinal tangencial. **B.** Androceu em secção longitudinal mediana. **C.** Secção longitudinal mediana mostrando estame flexionado. **D.** Secção transversal da região acima do hipanto. **E.** Secção transversal da antera madura em estágio de pré-deiscência.

[AN=antera. ES=estilete. FI=filete. FV=feixe vascular. HI=hipanto. MF=meristema fundamental. OV=óvulo. PE=pétala. PR=protoderme. SE=sépala. SP=saco polínico. TR=tricomias. Seta=expansão do conectivo.]



---

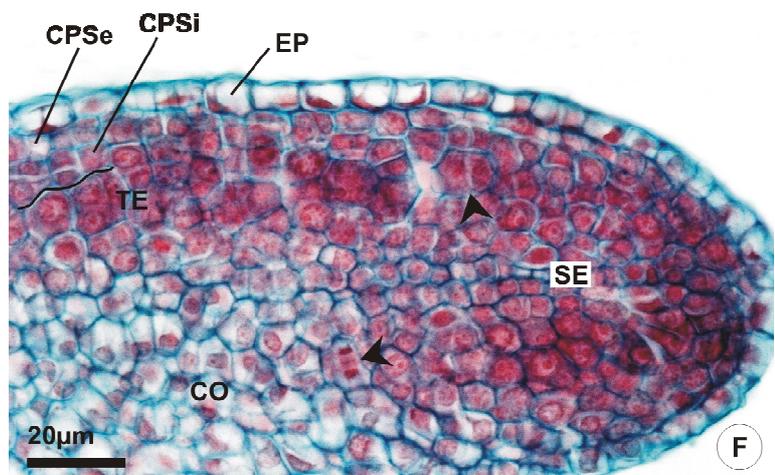
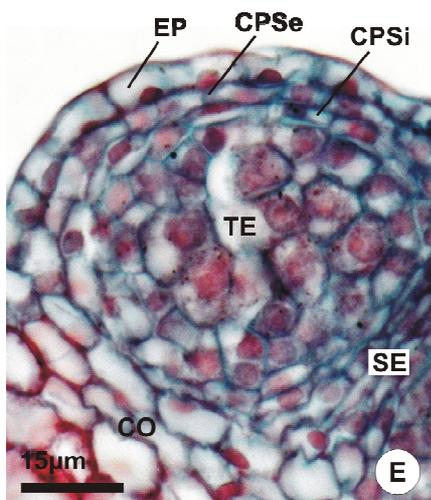
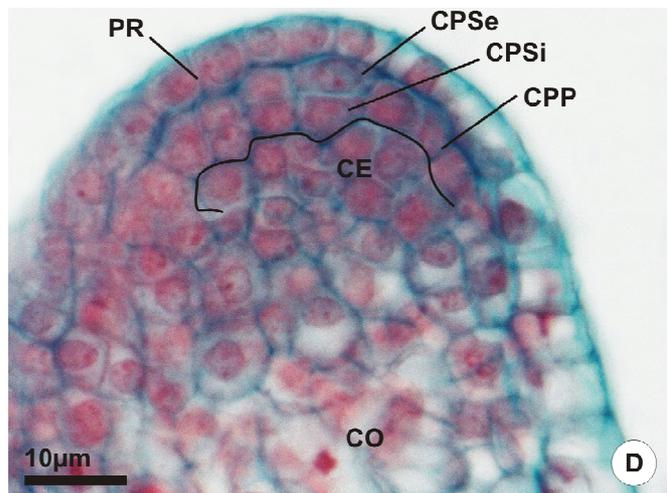
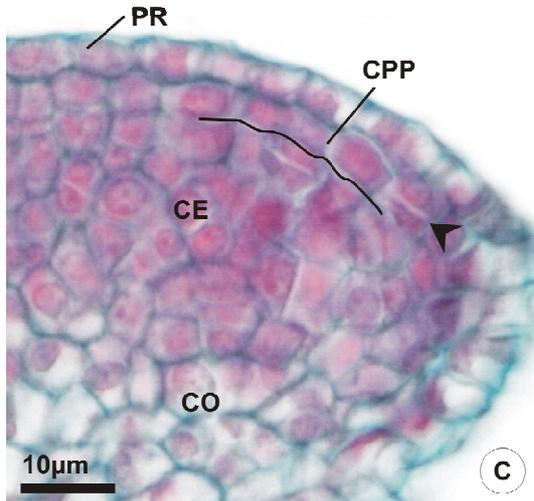
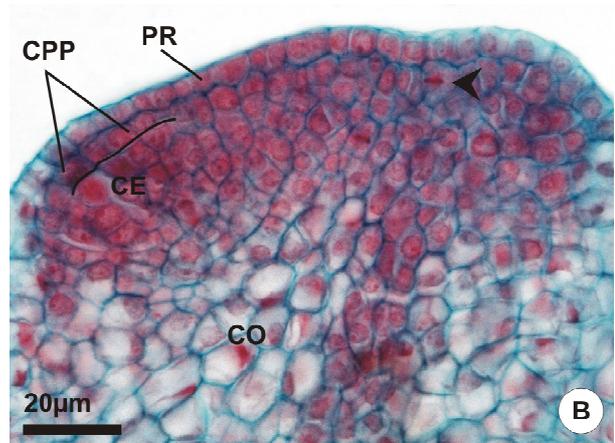
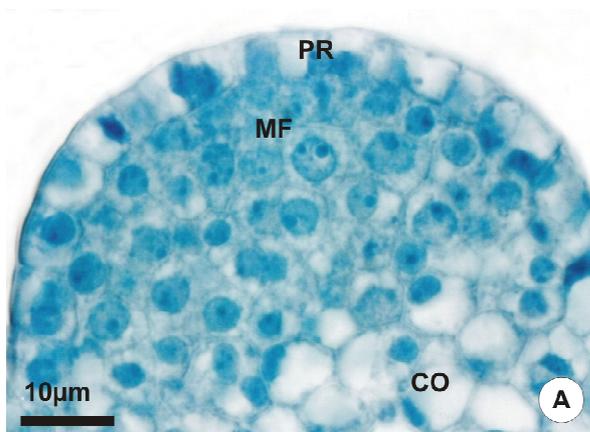
**Figura 7.** Estames de botão floral em pré-antese (**B, C, D**) e de flor (**A, E-I**) de *Miconia albicans*. **A.** Microscopia eletrônica de varredura do estame em estágio de deiscência da antera. **B.** Microscopia eletrônica de varredura do ápice da antera em estágio de pré-deiscência. **C.** Secção longitudinal mediana do ápice da antera em estágio de pré-deiscência. **D.** Microscopia eletrônica de varredura do ápice da antera em início de deiscência (cabeça de seta). **E.** Microscopia eletrônica de varredura do ápice da antera em estágio de deiscência. **F.** Secção longitudinal mediana da flor mostrando estame não-funcional. **G.** Microscopia eletrônica de varredura de antera não-funcional. **H, I.** Secções transversais de anteras mostrando sacos polínicos colapsados (cabeça de seta).  
[EC=expansão do conectivo. FI=filete. HI=hipanto. PE=pétala. SE=sépala. SP=saco polínico. Seta=poro apical.]



---

**Figura 8.** Botão floral II de *Miconia albicans*. **A, D, E.** Secções transversais da antera.  
**B, C, F.** Secções longitudinais da antera.

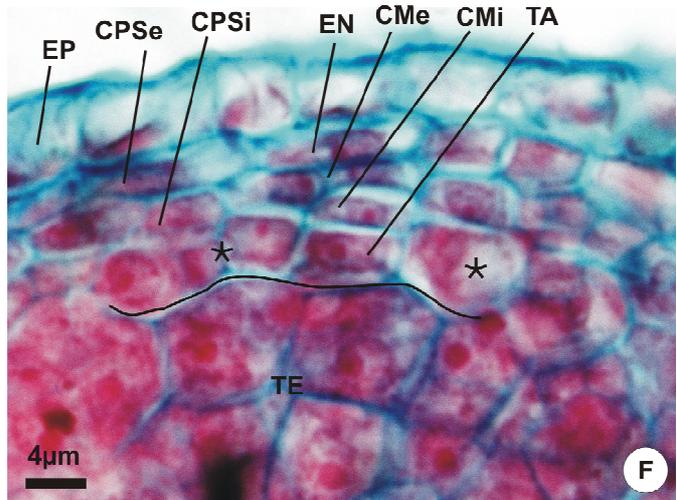
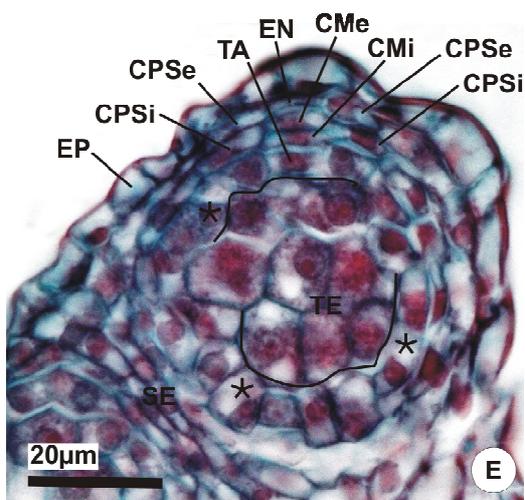
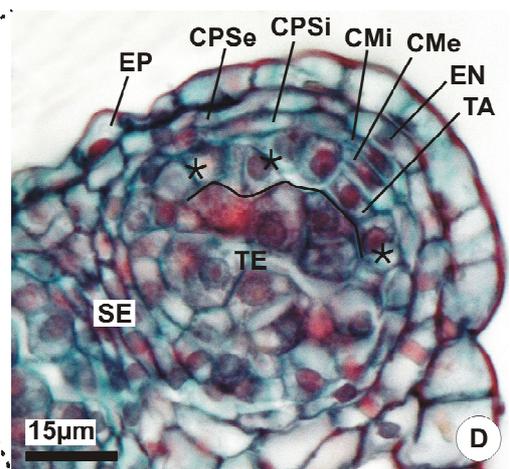
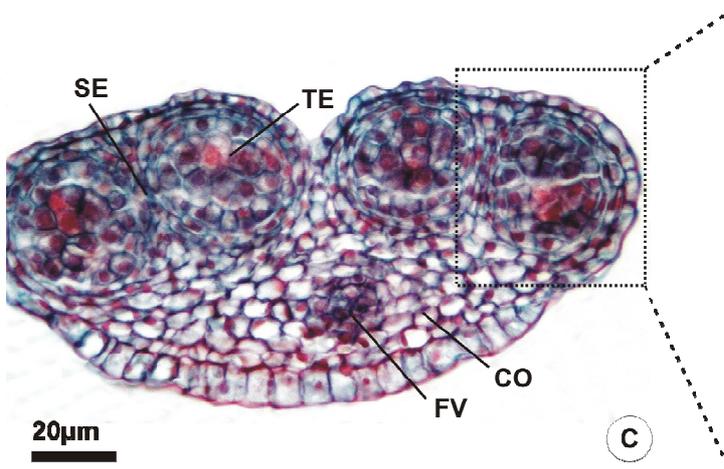
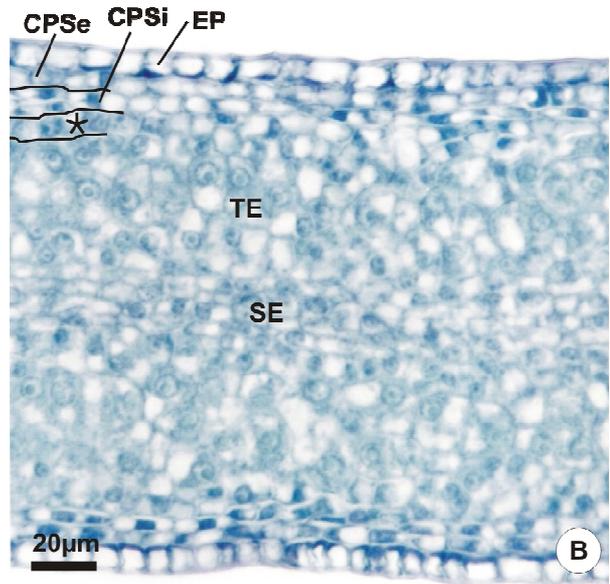
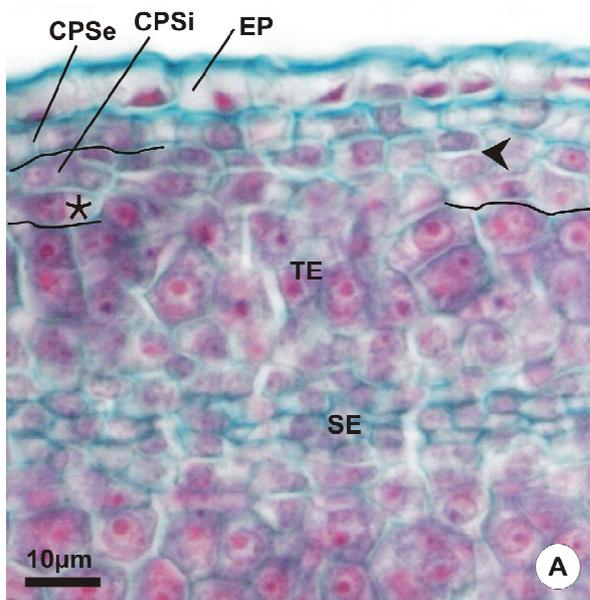
[CE=células esporogênicas. CO=conectivo. CPP=camada parietal primária. CPSe=camada parietal secundária externa. CPSi=camada parietal secundária interna. EP=epiderme. MF=meristema fundamental. PR=protoderme. SE=septo. TE=tecido esporogênico. Setas=células em divisão.]



---

**Figura 9.** Botão floral II de *Miconia albicans*. **A, B, F.** Secções longitudinais da antera. **C-E.** Secções transversais da antera.

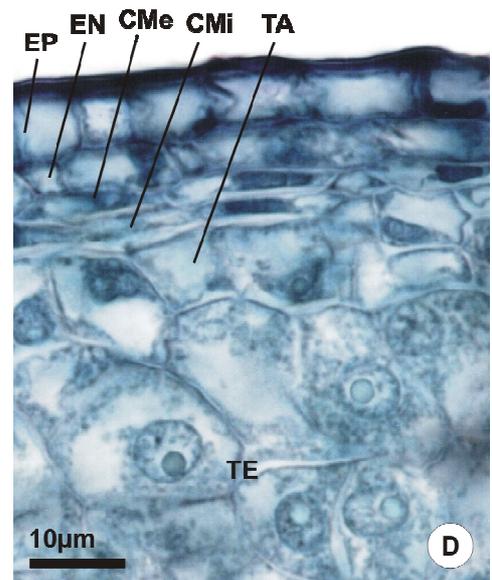
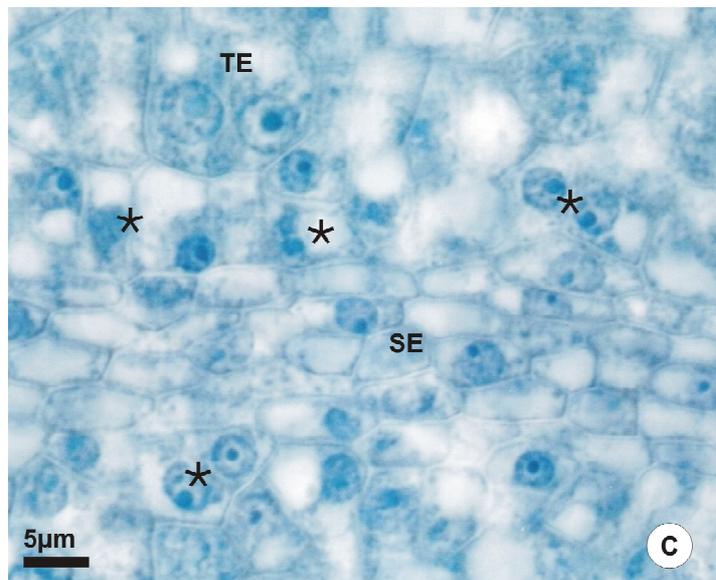
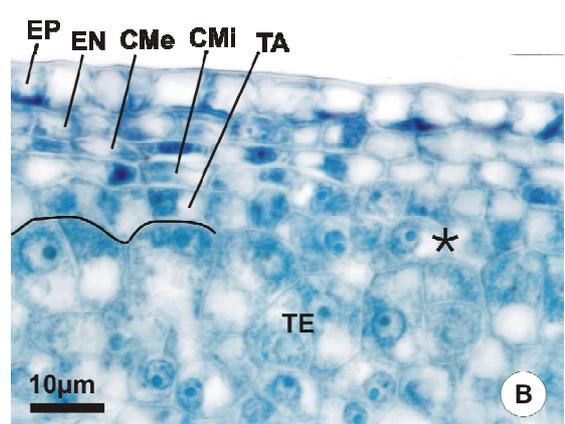
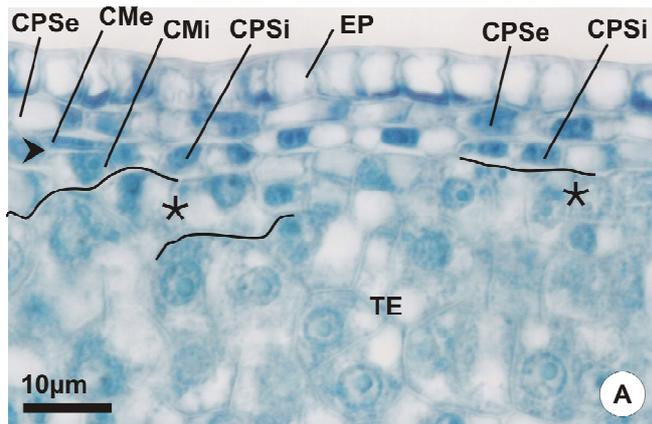
[CMe=camada média externa. CMi=camada média interna. CO=conectivo. CPSe=camada parietal secundária externa. CPSi=camada parietal secundária interna. EN=endotécio. EP=epiderme. FV=feixe vascular. SE=septo. TA=tapete. ◀=célula em divisão. ★=célula esporogênica em diferenciação.]



---

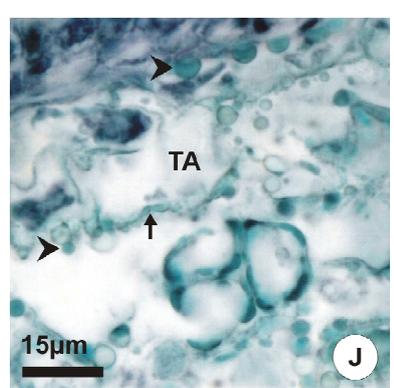
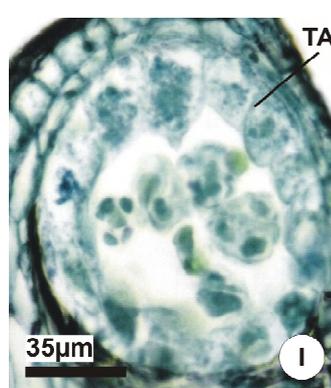
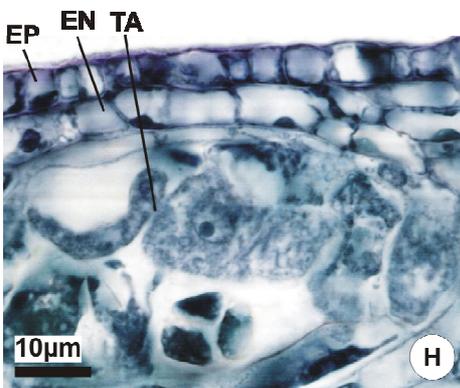
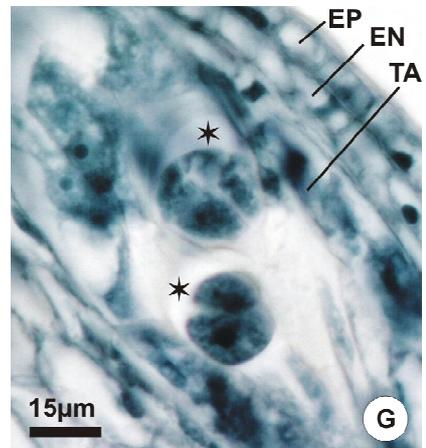
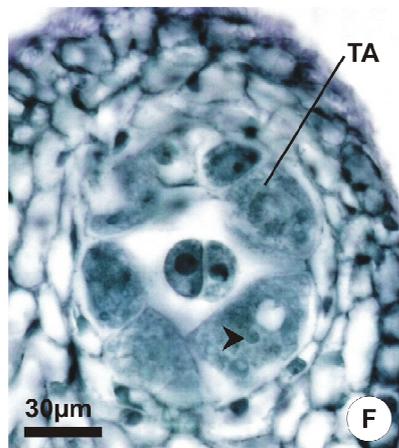
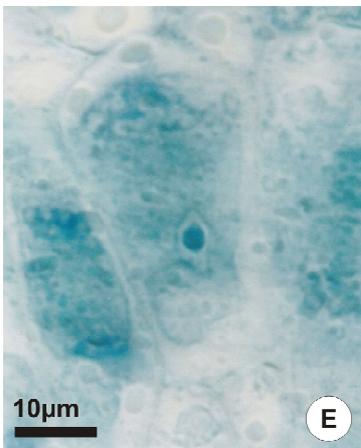
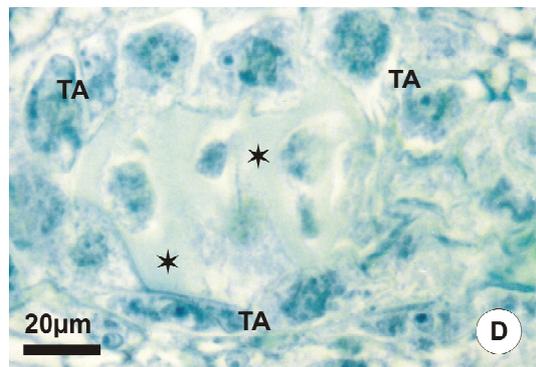
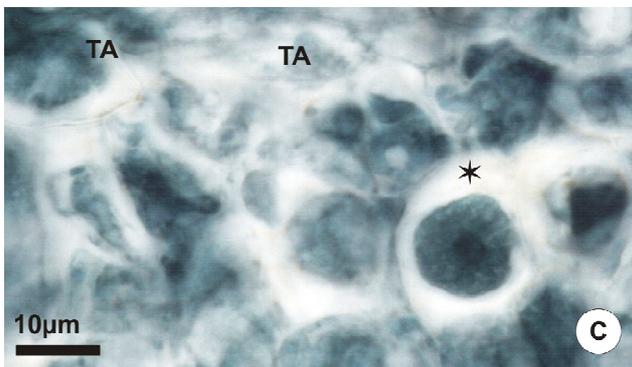
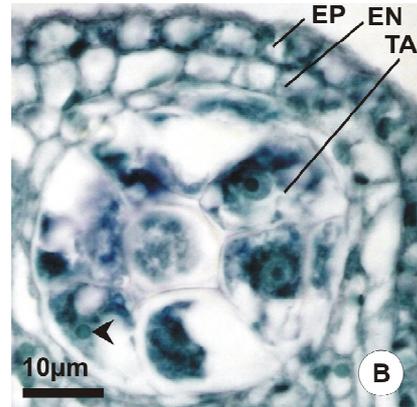
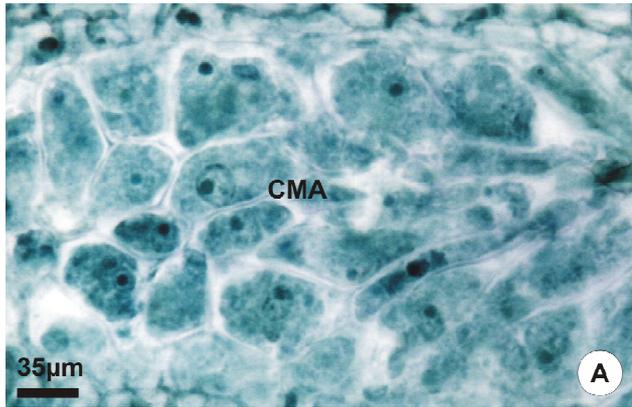
**Figura 10.** Botão floral II de *Miconia albicans*. **A-D.** Secções longitudinais da antera.

[CMe=camada média externa. CMi=camada média interna. CPSe=camada parietal secundária externa. CPSi=camada parietal secundária interna. EN=endotécio. EP=epiderme. SE=septo. TA=tapete. ►=célula em divisão. ★=célula esporogênica em diferenciação.]



---

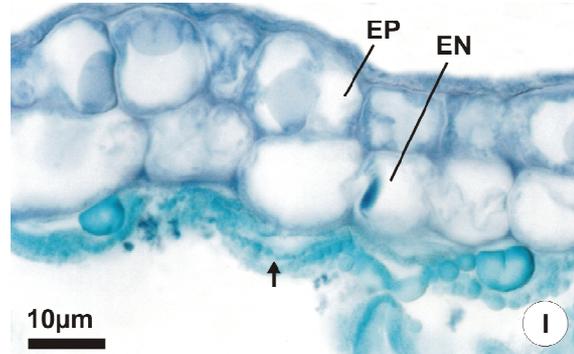
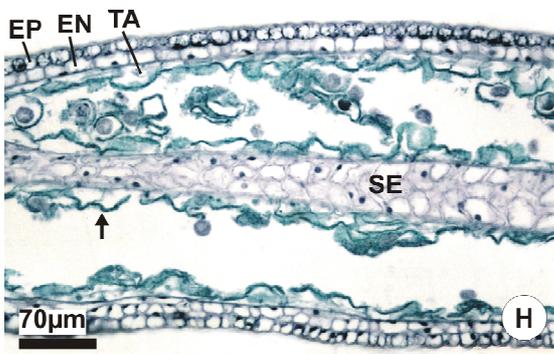
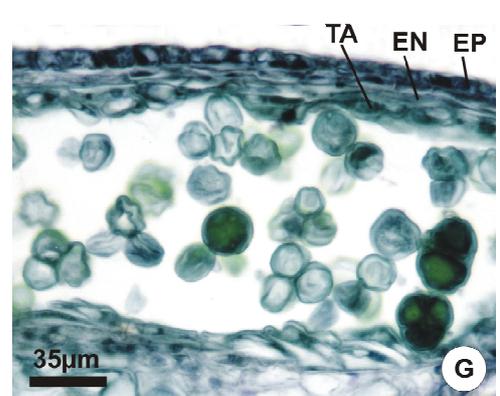
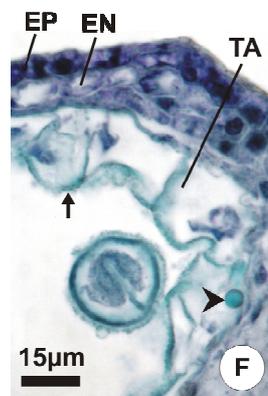
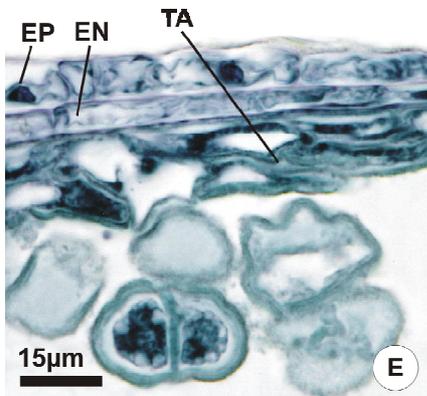
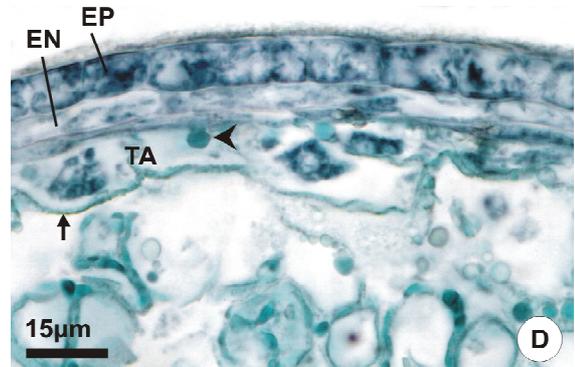
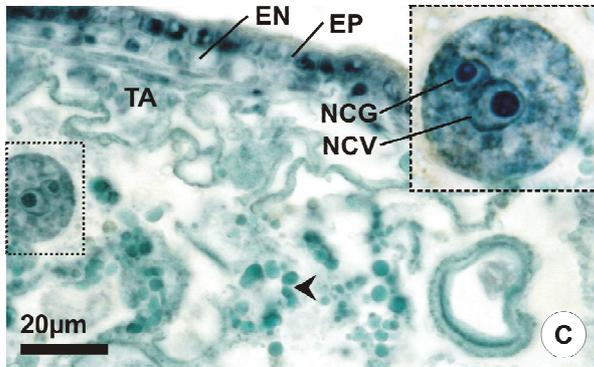
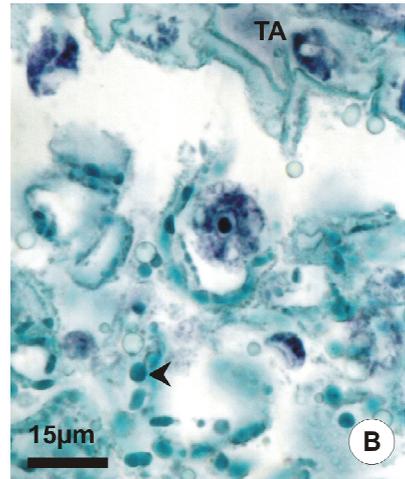
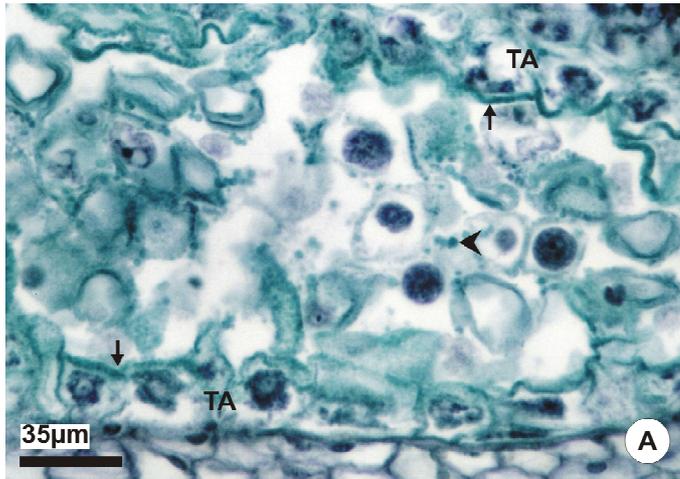
**Figura 11.** Botões florais III e IV de *Miconia albicans*. **A, D, G, H, J.** Secções longitudinais da antera. **B, C, E, F, I.** Secções transversais da antera. **A-D.** Células-mãe de andrósporos no interior do saco polínico. **E.** Detalhe do tapete secretor uninucleado. **F-J.** Díades, tétrades e políades de andrósporos no interior do saco polínico.  
[CMA=célula-mãe de andrósporo. EN=endotécio. EP=epiderme. Seta=membrana tapetal. TA=tapete. \*=parede de calose. ►=orbícula.]



---

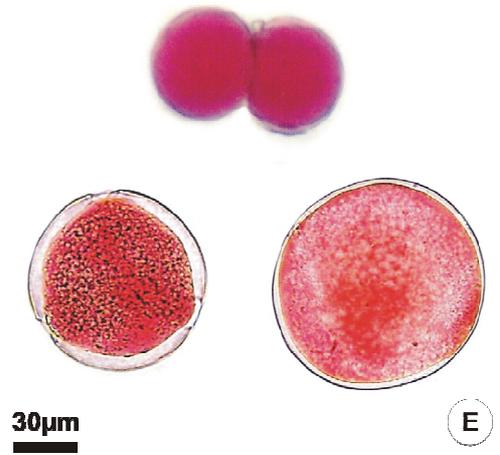
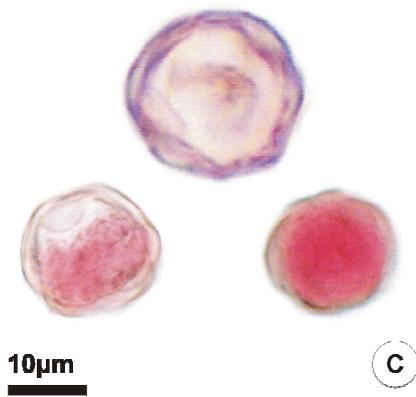
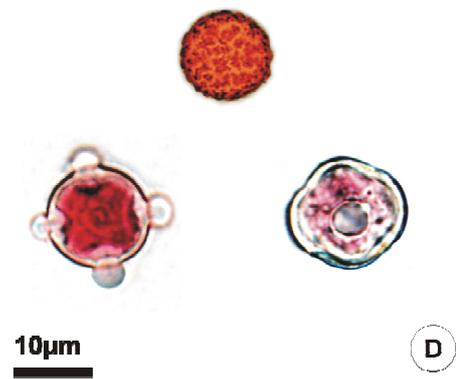
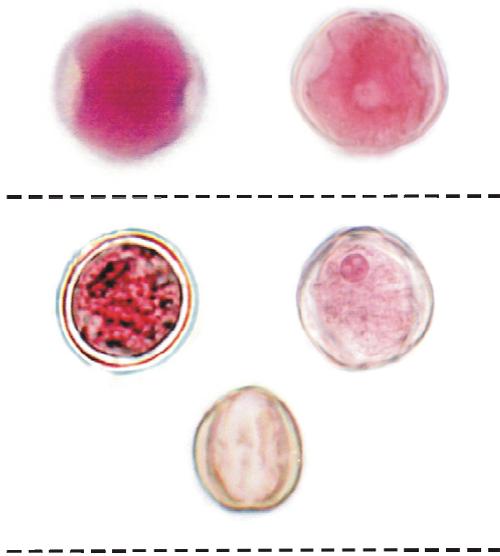
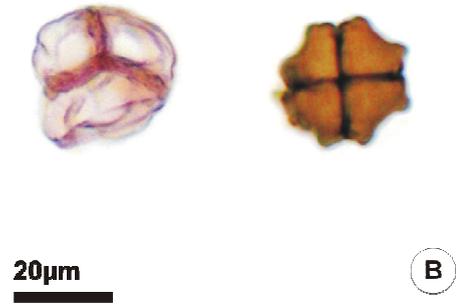
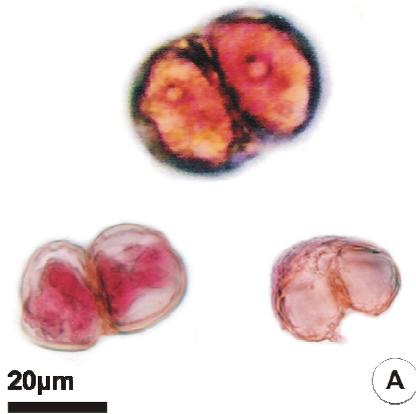
**Figura 12.** Secções longitudinais de anteras de botões florais III e IV de *Miconia albicans*. **A, B, H.** Andrósporos livres inviáveis no interior do lóculo. **C.** Andrófito bicelular (detalhe). **D-F.** Díades, tétrades e andrósporos livres inviáveis no interior do lóculo. **G.** Díades, tétrades e andrósporos livres inviáveis com conteúdo fenólico no interior do lóculo. **I.** Detalhe da parede da antera.

[EN=endotécio. EP=epiderme. NCG=núcleo da célula generativa. NCV=núcleo da célula vegetativa. SE=septo. TA=tapete. Seta=membrana tapetal. ►=orbículas].



---

**Figura 13.** Esmagamento de anteras de botões florais em pré-antese. **A.** Díades de andrósporos coradas (acima) e disformes (abaixo). **B.** Tétrades de andrósporos disformes. **C.** Andrósposos livres corados (acima), vazios (intermediário) e disformes (abaixo). **D, E.** Unidades não-classificadas.



## CAPÍTULO 2

### **Ontogenia do Óvulo, do Ginófito e dos Estádios Iniciais do Embrião Agamospérmico e do Endosperma Autônomo de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae).**

PRISCILA ANDRESSA CORTEZ<sup>1</sup>, SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA<sup>2\*</sup> e SANDRA MARIA CARMELLO-GUERREIRO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, Campinas, SP, 13083-970, Brazil and* <sup>2</sup>*Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14040-903, Brazil*

*\*Autor para correspondência: spadua@fcfrp.usp.br*

- *Antecedentes e Objetivos* *Miconia albicans* é uma espécie agamospérmica obrigatória por apresentar viabilidade polínica nula associada à produção de frutos contendo sementes tanto sob condições naturais (controle) quanto em experimentos de emasculação e ensaque das flores. A ontogenia do óvulo e do ginófito foi estudada em populações de *M. albicans* ocorrentes no Cerrado e na Floresta Atlântica para verificar a presença e origem do embrião agamospérmico. Estudos de germinação foram feitos para verificar a viabilidade das sementes e a possibilidade de ocorrência de poliembrionia na espécie.
- *Métodos* Botões florais em vários estádios de desenvolvimento, flores e frutos em início de desenvolvimento de *M. albicans* foram coletados a partir de populações ocorrentes no Cerrado e na Floresta Atlântica e processados para microscopias de luz e eletrônica de varredura e para testes de germinação das sementes.

- **Resultados-chave** A espécie apresentou ginófito do tipo *Polygonum* originado diretamente a partir da célula-mãe de ginósporo, caracterizando a agamospermia como do tipo diplospórica. A porcentagem de aborto dos óvulos produzidos foi de cerca de 50%. O embrião único foi formado no interior do ginófito, na região micropilar. As sementes são viáveis, apesar da alta incidência de fungos observada nos experimentos.
- **Conclusões** *M. albicans* apresenta agamospermia obrigatória do tipo diplospórica nas populações estudadas e ausência de poliembrião. Não foram observadas diferenças ontogenéticas significativas entre as populações do Cerrado e as da Floresta Atlântica, sendo mais marcantes as variações intra e inter-individuais, em ambas as formações vegetacionais.

**Key words:** Melastomataceae, *Miconia albicans*, Cerrado, Floresta Atlântica, ontogenia, óvulo, ginospogênese, ginogametogênese, ginófito, embrião, agamospermia, germinação.

## INTRODUÇÃO

Melastomataceae é uma das famílias mais ricas e abundantes entre as Angiospermae, com 150-166 gêneros e cerca de 4570 espécies, ocorrentes, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais (Renner, 1993; Martins *et al.* 1996; APG 2003). Seus membros apresentam diversidade de estruturas vegetativas e reprodutivas, embora possam ser facilmente reconhecidos, com exceção de poucos gêneros, pela nervura foliar acródroma e pelos estames falciformes (Clausing e Renner, 2001). Entre as espécies mais amplamente distribuídas está *Miconia albicans*, ocorrente em áreas de Cerrado e em vegetação litorânea, do Sul do México e Antilhas até o Paraguai, e em quase todos os estados brasileiros (Romero & Martins 2002, Candido 2005).

De acordo com Renner (1989), Sartor (1994) e Goldenberg e Shepherd (1998), a espécie é agamospérmica obrigatória nas populações de Cerrado estudadas com base nas observações de

produção de frutos em experimentos de emasculação e ensaque de flores e na viabilidade polínica nula. Estudos recentes mostraram que populações de *M. albicans* ocorrentes em Floresta Atlântica, vegetação litorânea da costa leste brasileira, também exibem tais características (Cortez *et al.* 2007).

A agamospermia é, por definição, um tipo de reprodução assexuada, derivada dos processos sexuais por alteração coordenada em determinados eventos-chave, como a meiose, a embriogênese e, às vezes também, a endospermogênese. Além dessas condições, a viabilidade das sementes obtidas é necessária para que tal fenômeno seja considerado um tipo de reprodução para o indivíduo, para as populações ou para a espécie (Asker & Jerling 1992, Naumova 1993, Koltunow *et al.* 1995, Vielle-Calzada *et al.* 1996, Richards 1997, Grossniklaus *et al.* 2001).

Nesse estudo foram analisados os estádios ontogenéticos do óvulo, a androgametogênese, os estádios ontogenéticos iniciais do embrião e do endosperma e a viabilidade das sementes produzidas assexuadamente, em indivíduos de *M. albicans* ocorrentes no Cerrado e na Floresta Atlântica do estado de São Paulo, Brasil. O estudo visou (1) verificar o tipo de agamospermia da espécie e o local de desenvolvimento do embrião agamospérmico; (2) obter a porcentagem de aborto de óvulos; (2) verificar a porcentagem de sementes maduras viáveis; e (3) verificar a ocorrência de poliembrião.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Coleta e Processamento Inicial*

O estudo foi realizado entre os anos de 2004 e 2006 em oito populações de *M. albicans* (Tabela 1). No Cerrado foram escolhidas quatro populações, uma no município de Campinas-SP (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), e as demais no município de Itirapina-SP (Valério I, Pedregulho e Graúna). Na Floresta Atlântica foram escolhidas quatro populações, todas no

município de Ubatuba-SP (Praia Vermelha do Centro, Praia da Fortaleza, Praia da Picingüaba e Ilha Anchieta) (Fig. 4). Em cada população foram escolhidos três indivíduos. Foram coletados primórdios de inflorescências (Fig. 2E), botões florais em vários estádios de desenvolvimento (Fig. 5A), além de flores (Fig. 6B) e frutos imaturos (Fig. 5D-F) provenientes de inflorescências controle e ensacada (Fig. 3J). As unidades coletadas foram medidas com auxílio de paquímetro digital, fixadas separadamente em FAA (1:1:18, formalina:ácido acético glacial:etanol 50% (v/v)) (Johansen 1940), em solução de Karnovsky (glutaraldeído a 1% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2; paraformaldeído a 4%) (Karnovsky 1965), desidratadas em série etanólica crescente e estocadas em etanol 70% (v/v). Das medidas obtidas foram calculados a média e o desvio-padrão.

Frutos maduros coletados a partir de ramos controle e ensacado foram mantidos em sacos plásticos sob refrigeração, dissecados e as suas sementes, retiradas, separadas da polpa, contadas e secas em temperatura ambiente. Ramos vegetativos ou reprodutivos foram coletados, herborizados e depositados no herbário da Universidade Estadual de Campinas-UEC (números 146996 a 147006).

#### *Porcentagem de Óvulos que se Desenvolvem em Sementes*

Para a obtenção da porcentagem de óvulos que se desenvolvem em sementes, que indica a porcentagem de aborto dos óvulos produzidos, o número médio de óvulos por botão floral em pré-antese ou por flor, e o número médio de sementes maduras por fruto maduro foram calculados, para cada indivíduo e população, em ambas as formações vegetacionais. Para o cálculo do número médio de óvulos, botões florais em pré-antese ou flores foram dissecados e os óvulos, contados com ajuda de estereomicroscópio. Como não foram obtidos frutos maduros a partir de ramos ensacados em parte dos indivíduos escolhidos e como não foram observadas diferenças quanto ao número de sementes maduras produzidas pelos frutos coletados a partir dos

ramos controle e ensacados, para o cálculo do número médio de sementes maduras foram utilizados preferencialmente frutos maduros provenientes dos ramos controle, exceto para o indivíduo PIVΔII do Cerrado, para o qual apenas foram obtidos frutos dos ramos ensacados (Tabela 2); os frutos foram dissecados, e as sementes maduras, separadas da polpa e contadas.

#### *Viabilidade das Sementes e Poliembrionia*

A viabilidade das sementes foi obtida a partir do cálculo da porcentagem de germinação de uma amostra de 100 sementes maduras e secas de *M. albicans* para cada indivíduo e tratamento possíveis, já que não foram obtidos frutos maduros de ramos ensacados em parte dos indivíduos escolhidos (ver item anterior). Dois procedimentos foram realizados para as sementes provenientes dos indivíduos do Cerrado. No primeiro, as sementes foram deixadas durante 10 min em solução de hipoclorito de sódio a 10%, lavadas sucessivamente em água destilada e colocadas em caixas plásticas do tipo gerbox sobre papel-filtro simples umedecido com água destilada; no segundo, as sementes foram deixadas durante 10 min em solução de hipoclorito de sódio a 10%, lavadas sucessivamente em água destilada e colocadas em placas de petri autoclavadas sobre papel-filtro duplo umedecido com água destilada. As sementes provenientes dos indivíduos da Floresta Atlântica foram submetidas apenas ao segundo procedimento. Os experimentos foram feitos em câmara de germinação com iluminação fluorescente branca contínua e temperatura constante de 28°C. As sementes foram observadas por um período de cerca de 30 dias após o início da germinação, e especial atenção foi dada ao número de embriões contidos em cada semente.

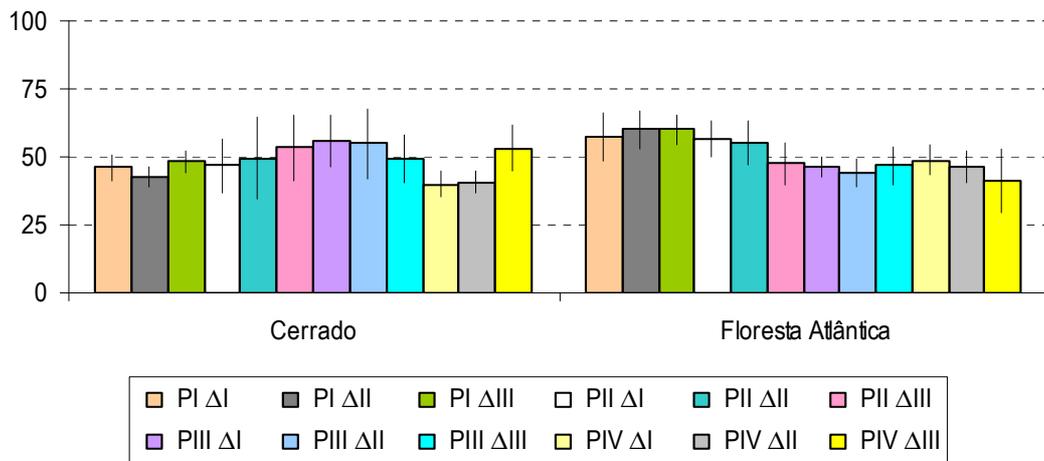
*Ontogenia do Óvulo e do Ginófito e Desenvolvimento Inicial do Embrião Agamospérmico e do Endosperma Autônomo*

Para o estudo ontogenético do óvulo e do ginófito, e dos estádios iniciais de desenvolvimento do embrião agamospérmico, foram utilizadas cinco unidades de cada estágio de desenvolvimento fixadas em FAA ou em solução de Karnovsky e estocadas em etanol 70% (v/v). As unidades foram desidratadas em série etanólica e incluídas em resina plástica HistoResin Leica (Gerrits & Smid 1983) ou desidratadas em série butílica e incluídas em Paraplast. Secções transversais e longitudinais, entre seis e 10 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo manual com navalha tipo C, aderidas à lâmina de vidro e coradas, conforme o meio de inclusão, com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato 0,1M e pH 4.7 (O'Brien *et al.* 1964) para resina plástica e com solução aquosa a 1% de safranina e azul de astra (Gerlach 1969) para Paraplast. A análise do laminário foi feita em microscópio de luz Olympus BX 51, e o registro fotográfico, em câmera fotográfica PMC35DX com filme Kodak Pro-Image ISO 100, com escalas projetadas nas mesmas condições ópticas. Os vários estádios de desenvolvimento dos botões florais foram agrupados em botões florais I (Fig. 2E), II, III e IV (Fig. 5A), com base nas medidas de comprimento obtidas e na análise ontogenética.

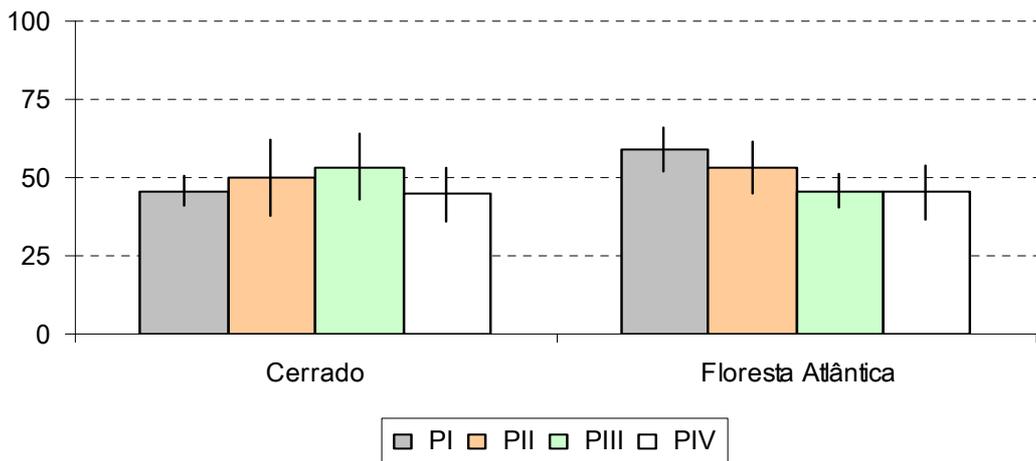
## RESULTADOS

### *Porcentagem de Óvulos que se Desenvolvem em Sementes*

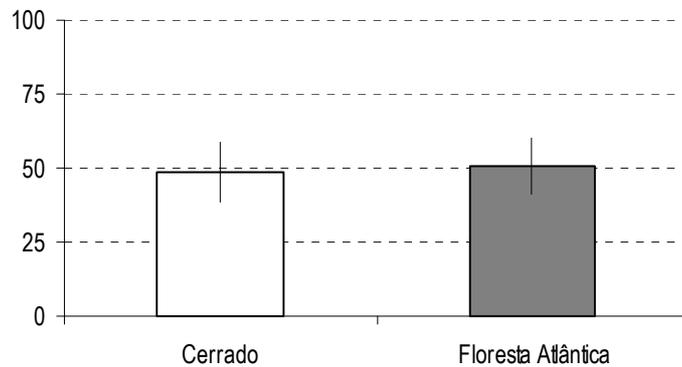
O número médio de óvulos por botão floral em pré-antese ou flor foi igual a  $49,64 \pm 9,74$  (média $\pm$ desvio-padrão), não sendo observadas diferenças entre os indivíduos, populações e formações vegetacionais analisados (Fig. 26-28).



**Figura 26.** Número médio de óvulos por botão floral em pré-antese ou flor de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média $\pm$ desvio-padrão). P=população.  $\Delta$ =indivíduo.

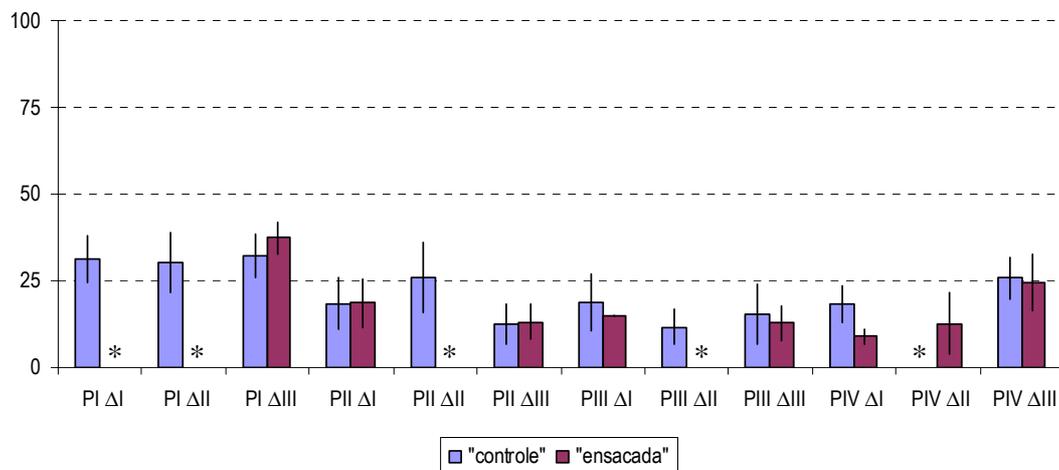


**Figura 27.** Número médio de óvulos por botão floral em pré-antese ou flor de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média $\pm$ desvio-padrão). P=população.

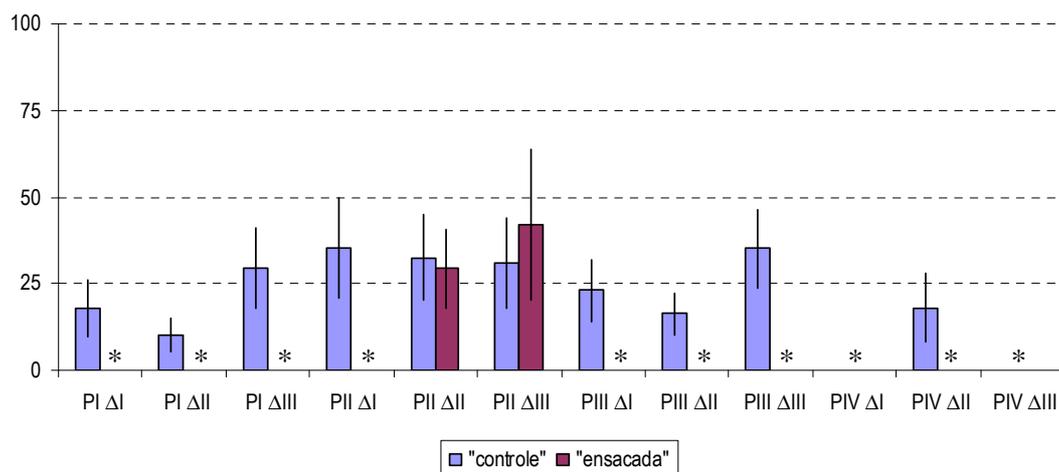


**Figura 28.** Número médio de óvulos por botão floral em pré-antese ou flor de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão).

Dos 12 indivíduos escolhidos em cada formação vegetacional, frutos maduros não foram obtidos em um indivíduo do Cerrado e em dois indivíduos da Floresta Atlântica para os ramos controle, e em três indivíduos do Cerrado e em 10 indivíduos da Floresta Atlântica para os ramos ensacados. A maior parte das inflorescências ensacadas murchou ainda na fase de botão floral, o que impediu que estas chegassem ao estágio de maturação dos frutos. Para os indivíduos possíveis, o número médio de sementes maduras por fruto maduro foi comparado entre os dois tratamentos, sendo que não foram observadas diferenças para a maior parte dos indivíduos (Fig. 29, 30).

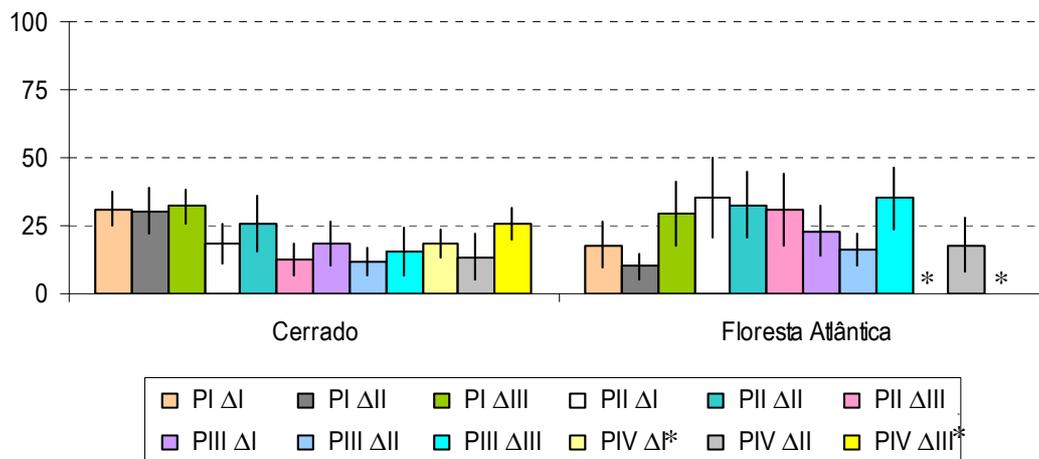


**Figura 29.** Número médio de sementes maduras por fruto maduro de *M. albicans* provenientes do Cerrado (média±desvio-padrão). P=população. Δ=indivíduo. \*Indivíduos para os quais não foram obtidos frutos maduros.

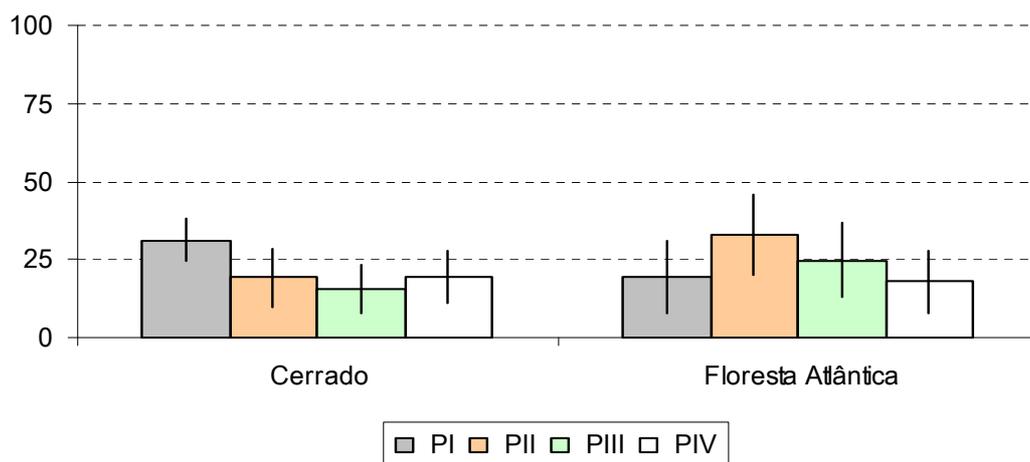


**Figura 30.** Número médio de sementes maduras por fruto maduro de *M. albicans* provenientes da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão). P=população. Δ=indivíduo. \*Indivíduos para os quais não foram obtidos frutos maduros.

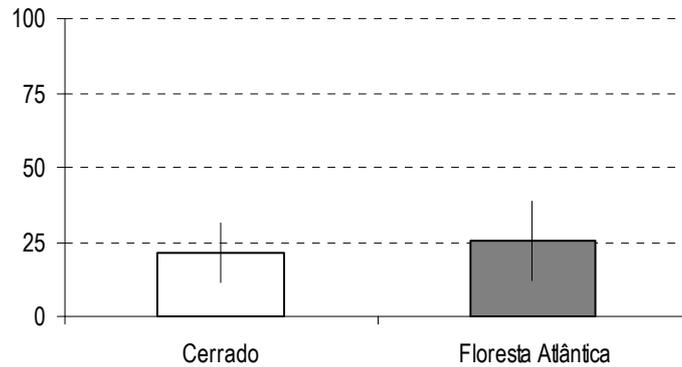
Dessa forma, o número médio de sementes maduras por fruto maduro foi obtido a partir de frutos provenientes dos ramos controle ou ensacados, preferencialmente do tratamento controle (Tabela 2), sendo igual a  $23,04 \pm 9,74$  (média±desvio-padrão). Não foram observadas diferenças individuais, populacionais ou vegetacionais quanto ao número médio de sementes maduras por fruto maduro (Fig. 31-33).



**Figura 31.** Número médio de sementes maduras por fruto maduro de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão). P=população. Δ=indivíduo. \*Indivíduos para os quais não foram obtidos frutos maduros.

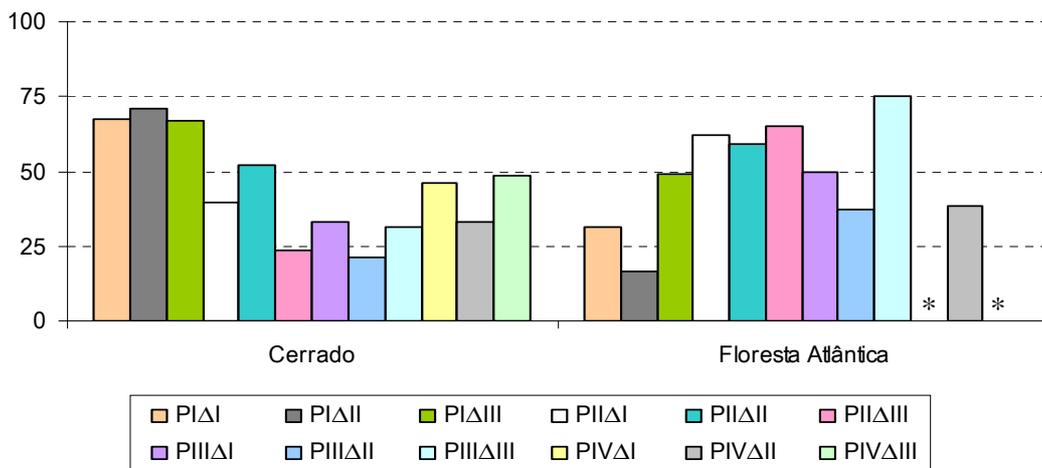


**Figura 32.** Número médio de sementes maduras por fruto maduro de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão). P=população.



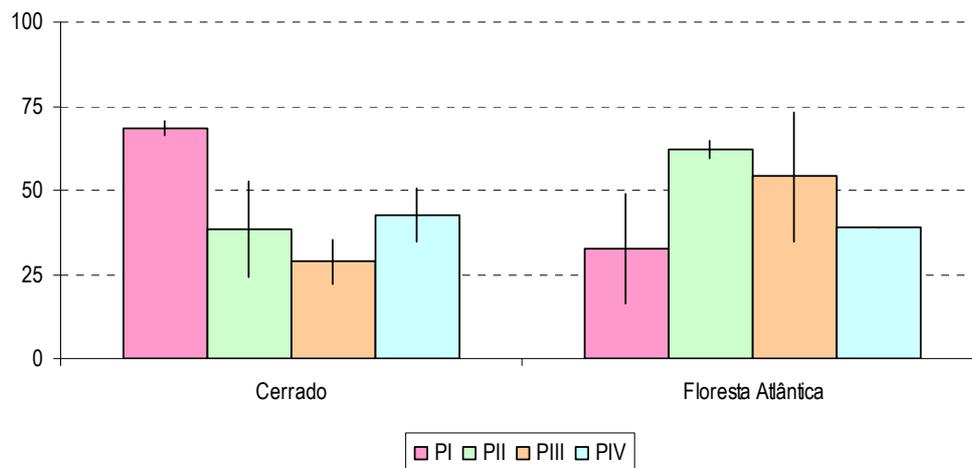
**Figura 33.** Número médio de sementes maduras por fruto maduro de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão).

A porcentagem de óvulos que se desenvolveram em sementes variou entre os indivíduos de uma mesma população, em ambas as formações vegetacionais (Fig. 34).



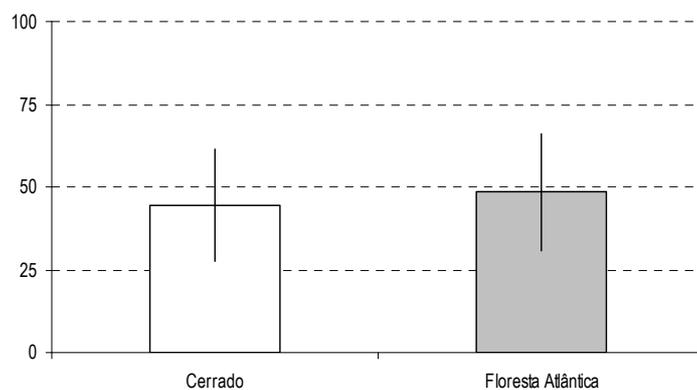
**Figura 34.** Porcentagem de óvulos que se desenvolveram em sementes maduras em *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão). P=população. Δ=indivíduo. \*Indivíduos para os quais não foram obtidos frutos maduros.

Quando foram comparadas as populações do Cerrado, maior porcentagem de óvulos que se desenvolvem em sementes foi observada na população PI; variações individuais foram observadas nas duas formações vegetacionais (Fig. 35).



**Figura 35.** Porcentagem de óvulos que se desenvolveram em sementes maduras em *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão). P=população.

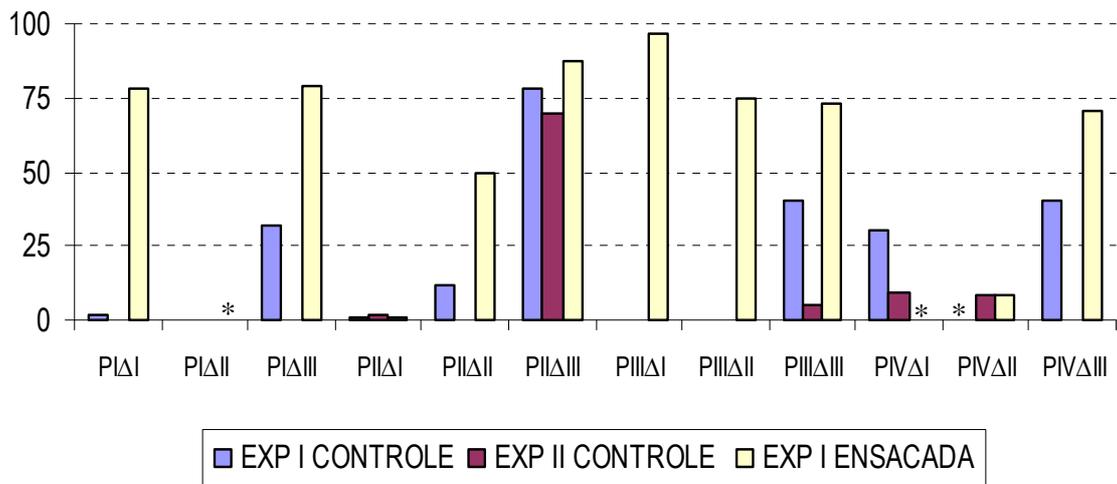
Entretanto, diferenças de porcentagem de desenvolvimento de óvulos em sementes não foram observadas quando comparadas as duas formações vegetacionais (Fig. 36), sendo igual a  $46,34 \pm 17,05$  (média±desvio-padrão).



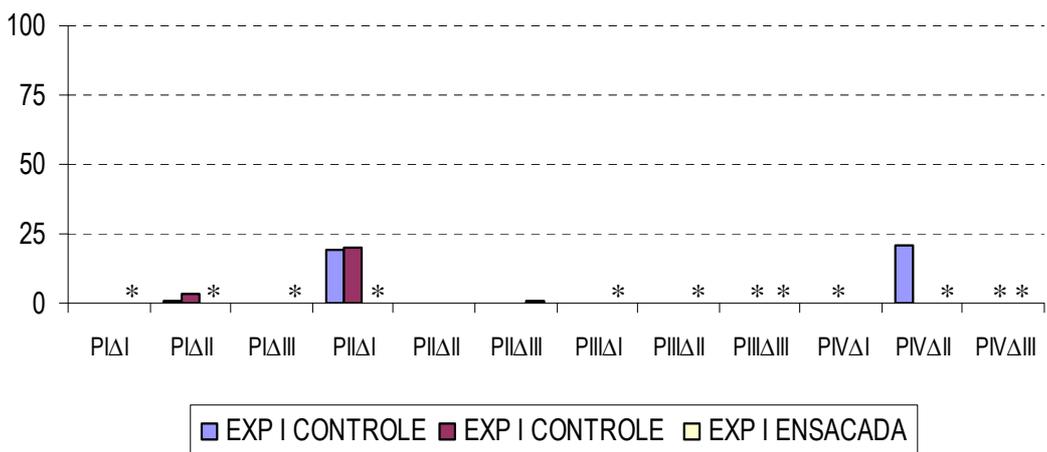
**Figura 36.** Porcentagem de óvulos que se desenvolveram em sementes maduras em *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão).

*Viabilidade das Sementes e Poliembrionia*

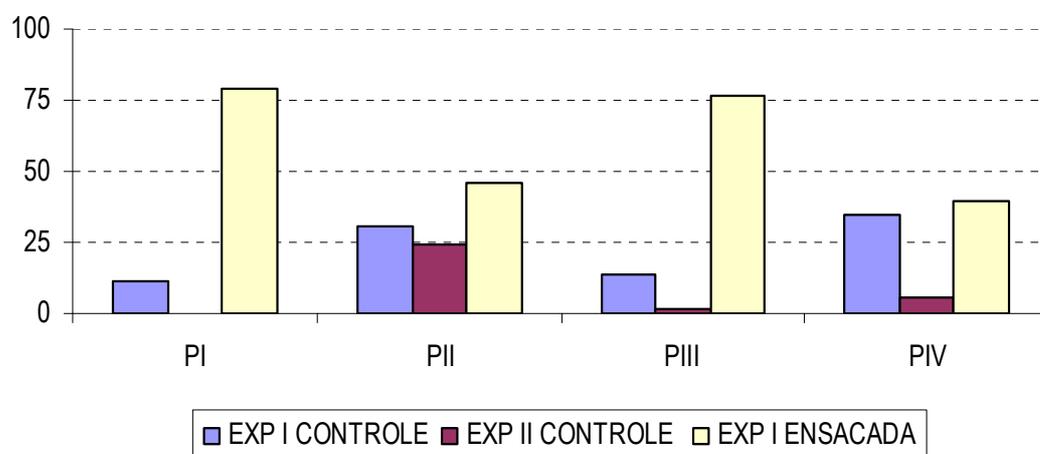
Infestação por fungos e porcentagens baixas ou nulas de germinação foram observada nas sementes provenientes de frutos dos ramos controle e ensacados, e submetidas a ambos os experimentos de germinação, na maioria dos indivíduos analisados. Diferenças de viabilidade das sementes foram observadas nos indivíduos e nas populações estudados (Fig. 37-40).



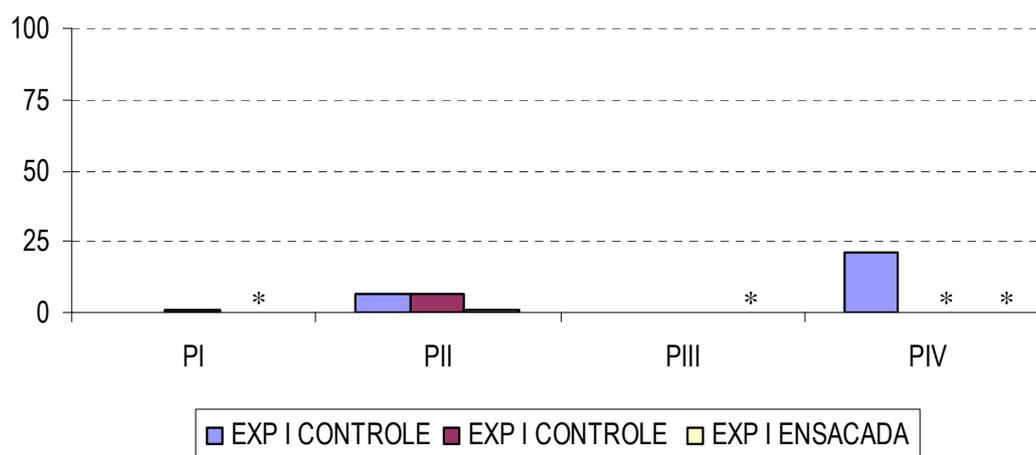
**Figura 37.** Porcentagem de germinação de sementes de *M. albicans* provenientes do Cerrado. P=população. Δ=indivíduo. EXP=experimento. \*Indivíduos e tratamentos para o quais não foram obtidas sementes maduras.



**Figura 38.** Porcentagem de germinação de sementes de *M. albicans* provenientes da Floresta Atlântica. P=população. Δ=indivíduo. EXP=experimento. \*Indivíduos e tratamentos para o quais não foram obtidas sementes maduras.



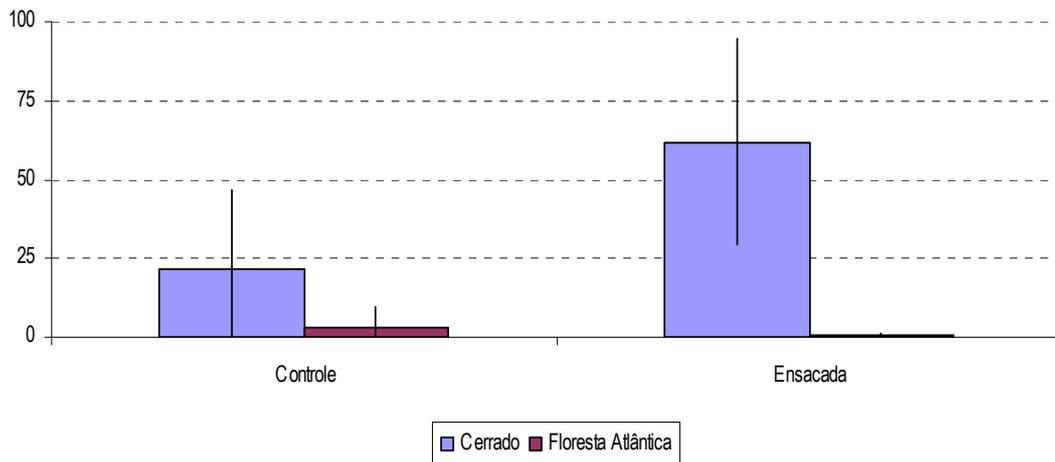
**Figura 39.** Porcentagem de germinação de sementes de *M. albicans* provenientes do Cerrado. P=população. EXP=experimento.



**Figura 40.** Porcentagem de germinação de sementes de *M. albicans* provenientes da Floresta Atlântica. P=população. EXP=experimento. \*Indivíduos e tratamentos para o quais não foram obtidas sementes maduras.

Comparações entre as formações vegetacionais foram possíveis apenas para o experimento I, já que o experimento II foi aplicado apenas às sementes provenientes do Cerrado, devido a quantidade de sementes disponíveis. Nas sementes provenientes de ramos controle não foram observadas diferenças quanto a porcentagem média de germinação das sementes; naquelas

provenientes dos ramos ensacados a porcentagem média de germinação de sementes foi maior no Cerrado (Fig. 41).



**Figura 41.** Porcentagem média de germinação de sementes de *M. albicans* provenientes do Cerrado e da Floresta Atlântica (média±desvio-padrão).

*Ontogenia do Óvulo e do Ginófito e Desenvolvimento Inicial do Embrião Agamospérmico e do Endosperma Autônomo*

A ontogenia do gineceu se inicia em botões florais (estádio I) dispostos de forma congesta nos primórdios de inflorescência (Fig. 2E). Os primórdios carpelares podem ser observados como uma protuberância do meristema fundamental e da protoderme uniestratificada na porção central do receptáculo floral, após o surgimento dos primórdios do cálice, da corola e do androceu. Repetidos ciclos de alongamento e divisões anticlinais das células da protoderme, e de alongamento e divisões anticlinais, periclinais e oblíquas das células subdérmicas determinam a formação de um gineceu tricarpelar, sincárpico, diferenciado em estigma, estilete e ovário. A superfície estigmática possui uma depressão central e é formada por células de aparência papilosa, sendo que nenhum andrófito foi observado nos estiletos provenientes de flor (Fig. 51C-F). Alguns estiletos apresentaram a região apical com características morfológicas distintas

daquelas observadas na maioria das unidades analisadas, como a aparência amassada da epiderme (Fig. 51F).

No estágio II ( $2,58 \pm 0,33$ mm de comprimento) de desenvolvimento do botão floral (Fig. 5A), o gineceu já pôde ser diferenciado em estigma, estilete e ovário; no ovário foram observados três lóculos, no interior dos quais se projetou a placenta axilar, a partir da qual surgiram inúmeras protuberâncias (Fig. 42A); cada protuberância caracterizou-se como um primórdio do óvulo, constituído por tecido meristemático com protoderme envolvendo uma massa de células do meristema fundamental; divisões mitóticas periclinais, anticlinais e oblíquas nas células do meristema fundamental foram acompanhadas por divisões anticlinais nas células da protoderme. Todas essas divisões resultam no crescimento do óvulo em direção ao lóculo (Fig. 42B, C). As células da placenta apresentaram-se bastante vacuoladas em relação às células do meristema fundamental e as divisões mitóticas tornaram-se mais freqüentes em uma das laterais do óvulo, iniciando seu processo de curvatura (Fig. 42C). Divisões mitóticas ocorreram também com maior freqüência em dois pontos da protoderme e das camadas subdérmicas do óvulo, que nessa fase já apresentava curvatura mais evidente, determinando o início da formação do tegumento externo, seguida por divisões da protoderme, resultando na diferenciação do tegumento interno (Fig. 42D, E). Foram observados crescimento e curvatura mais acentuados, resultando na formação de um óvulo do tipo anátropo, sustentado e ligado à placenta pelo funículo (Fig. 42E). Os tegumentos e o funículo se expandiram em consequência de mitoses sucessivas e suas células apresentaram-se bastante vacuoladas em relação às células nucelares; ocorreu diferenciação da epiderme uniestratificada a partir da protoderme; na região apical do nucelo foi observada diferenciação de uma única célula arqueosporial subdérmica (Fig. 42F); esta célula se dividiu periclinamente originando uma célula parietal primária, logo abaixo da epiderme, e uma célula esporogênica, de posição mais interna (Fig. 43A, B).

No estágio III ( $4,13 \pm 0,52$  mm de comprimento) de desenvolvimento do botão floral (Fig. 5A), a célula esporogênica ocupa posição mais profunda no nucelo, caracterizando o óvulo como do tipo crassinucelado (Fig. 43C). Ginófitos maduros foram observados em alguns botões florais nesse estágio de desenvolvimento.

No estágio IV ( $4,78 \pm 0,22$  mm de comprimento) de desenvolvimento do botão floral e no botão floral em pré-antese foram observados aumento em volume e alongamento da célula esporogênica, provocados pelo surgimento de dois vacúolos citoplasmáticos de posição polar, juntamente com o surgimento de regiões mais claras na cariolinfa, determinando a diferenciação da célula esporogênica em célula-mãe de ginósporo; ao redor da célula-mãe de ginósporo foi observada uma camada de células nucelares diferenciadas das demais pela forma alongada e pela presença de núcleo denso e volumoso (Fig. 43D-F). Em alguns materiais foram observados início da ginogametogênese, ginófitos maduros e início da endospermogênese.

No estágio de flor foi observado o final da diferenciação da célula-mãe de ginósporo (Fig. 43A-F); os tegumentos envolveram totalmente o nucelo, exceto por uma região, denominada micrópila; a região oposta à micrópila é a calaza, na qual pôde ser observada a hipóstase “lato sensu”, constituída por um conjunto de células de formato diferenciado, conteúdo denso e núcleo volumoso; as células dessa região apresentaram continuidade com as células nucelares diferenciadas localizadas ao redor da célula-mãe de ginósporo; a porção funicular do óvulo é vascularizada por um único feixe vascular e denominada rafe, enquanto a porção oposta a ela é denominada anti-rafe (Fig. 43F-H). A meiose foi aparentemente suprimida e a célula-mãe de ginósporo se diferenciou diretamente em ginósporo, originando, após um primeiro ciclo mitótico e acitocinético, um ginófito cenocítico binucleado; tão logo se dividiram os núcleos resultantes foram direcionados cada um para um dos pólos do ginófito devido à formação de um vacúolo central (Fig. 45A-C). A continuidade entre as células da região da calaza e as nucelares

diferenciadas tornou-se mais evidente; foi então observada uma segunda divisão mitótica acitocinética simultaneamente em ambos os núcleos, originando um ginófito tetranucleado também cenocítico, e um aumento considerável no tamanho do vacúolo central (Fig. 45D, E). Em indivíduos da população de Cerrado localizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron foi observada a formação de um ginófito constituído por sete células e oito núcleos, do tipo *Polygonum*: uma célula central binucleada, antípodas e um aparelho oosférico constituído por duas sinérgides com núcleos de posição micropilar e vacúolos de posição calazal e por uma oosfera com núcleo de posição calazal e vacúolo de posição micropilar; foi possível também observar o aparelho filiforme na porção micropilar das duas sinérgides (Fig. 46, 47). Em algumas flores foi observado início da endospermogênese e da embriogênese.

Os estádios iniciais de desenvolvimento do embrião agamospérmico foram observados em frutos em início de desenvolvimento ( $2,84 \pm 0,52$  mm de comprimento) (Fig. 5D-F), concomitantemente ao início da formação do endosperma. O zigoto assexuado foi formado na posição micropilar (Fig. 48A-C), mas não foi possível determinar se a partir do desenvolvimento autônomo da oosfera ou de uma das sinérgides. Seguiram-se divisões sucessivas do zigoto (Fig. 48D-F), originando o proembrião, constituído por várias células (Fig. 48G, H, 49B). Concomitantemente ao desenvolvimento do embrião foi observada a endospermogênese, que assim como a embriogênese, se deu de modo autônomo; os dados obtidos sugerem que cada um dos núcleos da célula central se diferenciou em um núcleo primário do endosperma por meio da formação de ramificações citoplasmáticas (Fig. 48A, B); tais núcleos se dividiram originando um endosperma com vários núcleos e posição periférica no interior do ginófito (Fig. 48F, H, I, 49A). Foram observadas algumas sementes em adiantado estágio de desenvolvimento, sem endosperma, com embrião ocupando quase a totalidade da cavidade seminal e tegumentos desenvolvidos (Fig. 49C, D). Foram também observadas sementes visivelmente menores e

morfologicamente alteradas (Fig. 3E) em relação às sementes viáveis em testes de germinação, correspondendo aos óvulos abortados; essas sementes apresentavam células do tegumento e do nucelo plasmolisadas e com formatos alterados, além de zigotos e embriões em vários estádios de degeneração; entretanto, em algumas delas, foi observado um endosperma aparentemente normal (Fig. 50).

Alguns botões florais com ovário desenvolvido em fruto (Fig. 5G) apresentaram características distintas daquelas observadas nos frutos considerados normais, como placenta hipertrofiada constituída por células parenquimáticas e grandes quantidades de esclereides e cristais do tipo drusa, embora tenham sido observados óvulos aparentemente normais e sementes viáveis em testes de germinação (Fig. 51).

## DISCUSSÃO

Embora as características ambientais sejam frequentemente associadas ao fenômeno da agamospermia (Richards 1997), não foram observadas diferenças restritas a um dos ambientes estudados que pudessem ser relacionadas ao favorecimento ou não desse modo de reprodução ao menos nas populações de *M. albicans* estudadas.

### *Porcentagem de Óvulos que se Desenvolvem em Sementes*

Embora estudos embriológicos detalhados não tenham sido realizados com o objetivo de entender os mecanismos que levam ao aborto de cerca de metade dos óvulos e/ou sementes produzido por essa espécie, alterações bastante pronunciadas puderam ser observadas em algumas sementes em estádios iniciais de desenvolvimento. Essas alterações foram observadas principalmente na morfologia da semente, do embrião e das células do nucelo e da testa. Na maioria das Angiospermae, certo número de flores e óvulos originam frutos e sementes (Lloyd

1980, Stephenson 1981, Bawa & Webb 1984), sendo a sua produção regulada por mecanismos de aborto de flores, óvulos e sementes. Tais mecanismos permitem o direcionamento na nutrição materna para os descendentes, maximizando o sucesso reprodutivo da espécie (Teixeira *et al.* 2001).

Estudos embriológicos em óvulos e/ou sementes abortados são raros, talvez devido ao fato de que o aborto é considerado por muitos pesquisadores mais uma anormalidade do que um processo adaptativo de uma determinada espécie (Briggs *et al.* 1987). Algumas espécies sexuadas apresentam altas porcentagens de aborto de frutos e sementes em decorrência da ausência de secreção na região micropilar no momento da fecundação (Herrero & Arbeloa 1989). Nesse sentido, estudos em espécies agamospérmicas obrigatórias, como é o caso de *M. albicans*, forneceriam resultados interessantes, já que nela alterações que dificultariam ou mesmo impediriam a fecundação não necessariamente resultariam em aborto devido às características peculiares desse tipo de reprodução, como a não necessidade da fecundação para a formação do embrião e do endosperma.

#### *Viabilidade das Sementes (VS) e Poliembrionia*

As diferenças individuais, populacionais e vegetacionais nas porcentagens de germinação das sementes de *M. albicans* nos dois experimentos realizados provavelmente foram conseqüências da alta incidência de fungos sobre a maior parte das sementes, já que em trabalhos anteriores, em que os mesmos procedimentos foram realizados (Cortez & Carmello-Guerreiro 2004), a porcentagem de germinação foi visivelmente maior. Apesar disso, os resultados obtidos mostraram que uma parte considerável das sementes produzidas assexuadamente por *M. albicans* é potencialmente viável, apoiando a classificação da espécie como agamospérmica.

A emergência de apenas uma plântula a partir de cada semente em 100% das sementes que germinaram, associada aos estudos de microscopia de luz, mostrou que a poliembrionia, embora geralmente associada ao fenômeno da agamospermia (Asker & Jerling 1992), não é um evento ocorrente em *M. albicans*. Entretanto, Caetano e colaboradores (2005) sugerem a formação de embriões adventícios nas populações de *M. albicans* por eles estudadas a partir de células do nucelo que são comprimidas pelo desenvolvimento do ginófito, o que não foi observado nas populações aqui estudadas.

#### *Ontogenia do Óvulo e do Ginófito*

Os dados obtidos neste trabalho, referentes ao estudo de várias populações localizadas em formações vegetacionais distintas, permitiram importantes inferências a respeito da estrutura anatômica do mecanismo de reprodução de *M. albicans*. De modo geral, as características estruturais observadas ao longo dos estádios ontogenéticos do óvulo e do ginófito de *M. albicans*, como a curvatura anátropa, o ginófito do tipo *Polygonum*, se assemelham às aquelas observadas nas espécies sexuadas *M. cabucu* (Medeiros e Morretes 1996) e *M. elegans* (Borges 1991), e nas espécies agamospérmicas *M. discolor* e *Leandra australis* (Borges 1991). Isso nos permite considerar tais características, até certo nível, como conservadas filogeneticamente, sustentando a consideração de alguns desses caracteres como padrão na família.

Entre esses caracteres estão os óvulos anátropos bitegmentados e crassinucelados com tegumentos não-vascularizados e endotélio ausente, e o ginófito do tipo *Polygonum* com antípodas efêmeras e endosperma inicialmente nuclear (Schmid 1984, Johri 1992, Tobe & Raven, Johri 1984). Entretanto, os passos que levam ao estabelecimento final dessas características podem ser distintos para as espécies, já que, embora ambos resultem em óvulos crassinucelados, diferentemente de *M. cabucu* em que a célula arquesporrial funciona diretamente como célula-mãe

de ginósporo (Medeiros e Morretes 1996), em *M. albicans* ela se divide, e apenas a derivada mais interna se diferencia em célula-mãe de ginósporo. Embora não tenham sido observados os estádios ontogenéticos entre a divisão da célula arqueosporial e a posição mais profunda da célula esporogênica, acredita-se que tal fato tenha sido decorrente de divisões periclinais da célula parietal primária e de suas derivadas, como descrito para grande parte das Angiospermae com óvulos do tipo crassinucelados (Lersten 2004, Mariath *et al.* 2006).

A aparente supressão da meiose e, conseqüentemente, da esporogênese em *M. albicans*, associada aos resultados de viabilidade das sementes e de inviabilidade polínica (Sartor 1994, Goldenberg & Shepherd 1998, Caetano *et al.* 2005, Cortez *et al.* 2007), apóiam sua classificação como agamospérmica obrigatória nas populações estudadas. A supressão ou alteração do processo meiótico é um fenômeno geralmente observado em espécies agamospérmicas (Asker & Jerling 1992), e pode resultar na formação de ginófitos não-reduzidos. Esse fenômeno é importante para a manutenção do nível de ploidia bem como para a origem de poliplóides em espécies agamospérmicas com produção de andrófitos viáveis. Embora os dados obtidos no presente trabalho não tenham permitido conclusões acerca de sua ploidia, Caetano e colaboradores (2005) e Borges (1991) sugerem a presença de ginófitos não reduzidos em *M. albicans* e em *Leandra australis*, respectivamente, ambas consideradas agamospérmicas obrigatórias. Já em *M. cabucu* (Medeiros e Morretes 1996) e em *M. elegans* (Borges 1991), a presença de tétrades lineares de ginósporos indica a ocorrência de meiose.

A diferenciação de células nucelares ao redor da célula-mãe de ginósporo, também observada por Caetano e colaboradores (2005) em *M. albicans*, e sua perceptível continuidade com as células calazais, particularmente aquelas da hipóstase, sugerem que tais células possam estar relacionadas aos mecanismos de nutrição do ginófito em desenvolvimento, talvez funcionando como células de transferência de nutrientes a curtas distâncias. Células de

transferência foram descritas em óvulos de várias espécies, ocupando regiões distintas, mas frequentemente associadas aos feixes vasculares (Johri & Ambegaokar 1984). Entretanto, apesar das características morfológicas semelhantes entre as células da hipóstase e essas possíveis células de transferência, estudos ontogenéticos do tegumento da semente de *M. albicans* (Cortez & Carmello-Guerreiro, submetido) relataram a presença de compostos fenólicos como conteúdo restrito às células da hipóstase, e ausente nas demais, sugerindo funções distintas para ambas. Estudos ultra-estruturais poderiam fornecer evidências mais sólidas sobre a possível função de tais células.

A migração dos núcleos originados após a primeira divisão mitótica para pólos opostos do ginófito no início da ginogametogênese é conseqüência da formação de um vacúolo central, e acredita-se que esse evento desempenhe importante função no posicionamento dos núcleos antes da próxima divisão mitótica (Cass *et al.* 1985). Provavelmente a posição do vacúolo tem importante função na polarização do ginófito.

#### *Desenvolvimento Inicial do Embrião Agamospérmico e do Endosperma Autônomo*

A análise dos estádios iniciais de desenvolvimento do embrião de *M. albicans* corrobora os resultados obtidos nos estudos de germinação, ou seja, a ausência de poliembrionia, fenômeno frequentemente associado à agamospermia (Asker & Jerling 1992). A localização dos embriões na porção micropilar do ginófito em todos os materiais analisados sugere a sua origem a partir de uma das três células no aparelho oosférico.

O desenvolvimento do endosperma de *M. albicans* é do tipo nuclear, o mesmo descrito para *M. cabucu* (Medeiros e Morretes 1996) e *Leandra australis* (Borges 1991), embora Lersten (2004) considere todos os endospermas como celulares por serem constituídos por ao menos uma célula, mesmo que com vários núcleos. A sugestão de que em *M. albicans* o endosperma possa

ser formado a partir dos núcleos polares isoladamente, ou seja, sem haver fusão entre eles, pode ser uma característica relacionada à agamospermia, em que, com a supressão da meiose, são originados núcleos polares diplóides e não haplóides como normalmente observado em espécies sexuadas. Dessa forma, o endosperma originado pelas espécies agamospérmicas seria também diplóide, mesmo nível de ploidia observado no zigoto.

#### LITERATURA CITADA

- APG (Angiosperm Phylogeny Group). 2003.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 399-436.
- Asker SE, Jerling L. 1992.** Apomixis in plants. Boca Raton: CRC Press.
- Bawa KS, Webb CJ. 1984.** Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees implications goes the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *American Journal of Botany* **71**: 736-751.
- Borges HBN. 1991.** Biologia reprodutiva de quatro espécies de Melastomataceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Briggs CL, Westoby M, Selkirk PM, Oldfield, RJ. 1987.** Embryology of early abortion due to limited maternal resources in *Pisum sativum* L. *Annals of Botany* **59**: 611-619.
- Caetano AP, Carmo-Oliveira R, Oliveira PEAM. 2005.** Apomixia e aspectos embriológicos em *Miconia*. In CD-ROM de Resumos do 56º Congresso Nacional de Botânica, Curitiba-PR.
- Candido CP. 2005.** A família Melastomataceae na Serra do Cabral-MG: tribos Melastomeae, Merianeae e Miconieae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

- Clausing G, Renner SS. 2001.** Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. *American Journal of Botany* **88**: 486-498.
- Cortez PA, Carmello-Guerreiro SM.** Ontogeny and structure of the pericarp and the seed coat of *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) from Cerrado, Brazil. Submetido.
- Cortez PA, Teixeira SP, Carmello-Guerreiro SM. 2007.** Ontogenia dos Estratos Parietais da Antera e Androsporogênese em *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae), Espécie Agamospérmica. Em preparação.
- Gerlach D. 1969.** *Botanische mikrotechnik: eine einföhrung*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Gerrits PO, Smid L. 1983.** A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* **95**: 150-155.
- Goldenberg R, Shepherd GJ. 1998.** Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in “cerrado” vegetation. *Plant Systematics and Evolution* **211**: 13-29.
- Grossniklaus U, Nogler GA, van Dijk PJ. 2001.** How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. *The Plant Cell* **13**: 1491-1498.
- Herrero M, Arbeloa A. 1989.** Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *American Journal of Botany* **76**: 1441-1447.
- Johansen DA. 1940.** *Plant mycrotechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Johri BM, Ambegaokar KB. 1984.** Embryology: then and now. In: Johri BM, ed. *Embryology of angiosperms*. New York: Springer-Verlag.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of the Cell Biology* **27**: 137A-138A.

- Koltunow AM, Bicknell RA, Chaudhury AM. 1995.** Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology* **108**: 1345-1352.
- Lersten NR. 2004.** *Flowering plant embryology with emphasis on economic species*. Iowa: Blackwell Publishing.
- Lloyd DG. 1980.** Sexual strategies in plant: an hypothesis of sexual adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytologist* **86**: 69-79.
- Mariath JEA, Santos RP, Bittencourt Júnior NS. 2006.** Flor. In: Apezato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM, eds. *Anatomia Vegetal*. 2ª ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa.
- Martins AB, Semir J, Goldenberg R, Martins E. 1996.** O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) no estado de São Paulo. *Acta Botanica Brasilica* **10**: 267-316.
- Medeiros JD, Morretes BL. 1996.** The embryology of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). *Cytologia* **61**: 83-91.
- Naumova TN. 1993.** *Apomixis in angiosperms: nucellar and integumentary embryony*. Boca Raton: CRC Press.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- Renner SS. 1989.** A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **76**: 496-518.
- Renner SS. 1993.** Phylogeny and classification of the Melastomataceae. *Nordic Journal of Botany* **13**: 519-540.
- Richards AJ. 1997.** *Plant breeding systems*. 2ed. London: Chapman & Hall.

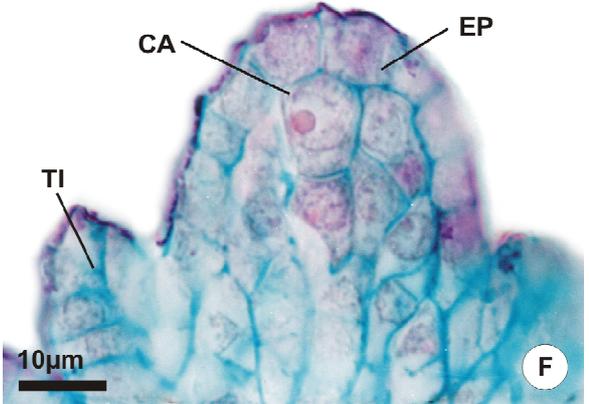
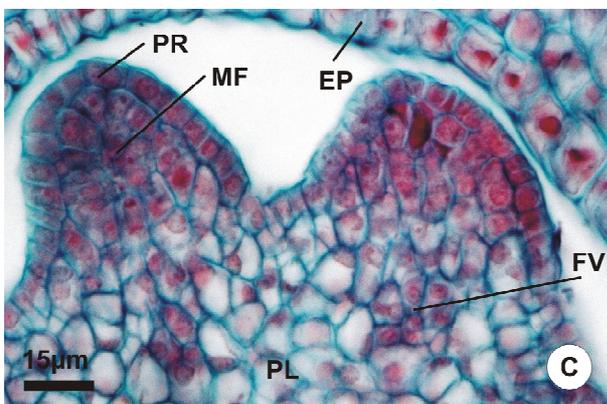
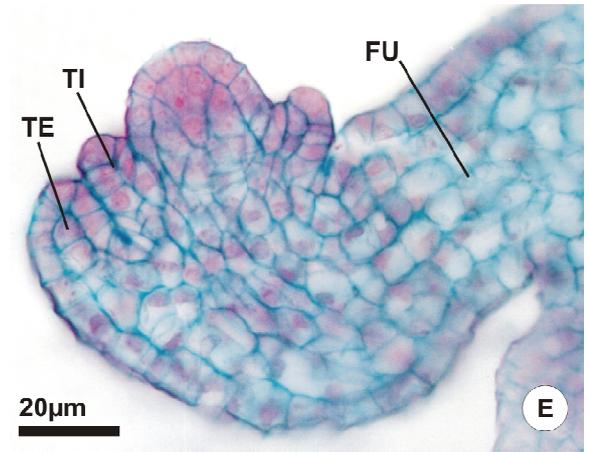
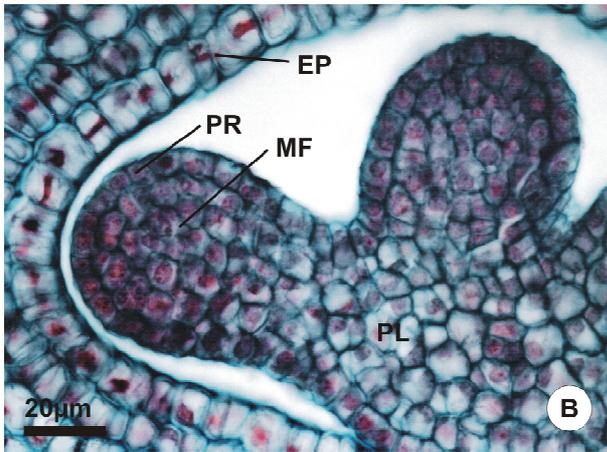
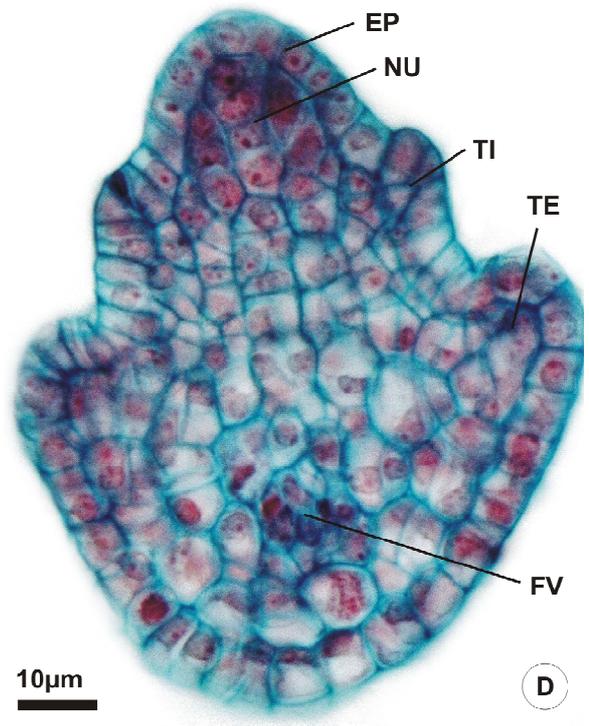
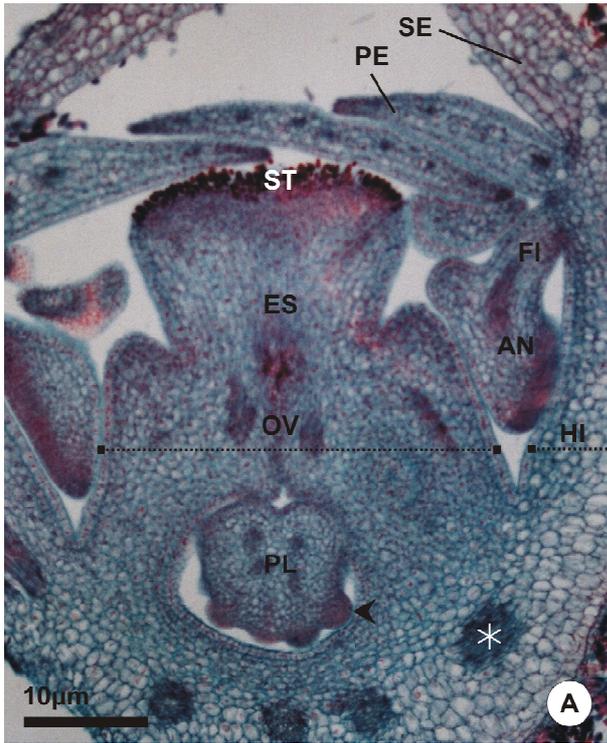
- Romero R, Martins AB. 2002.** Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **25**: 19-24.
- Sartor MBLB. 1994.** Fenologia e biologia floral de *Miconia albicans* (Sw.) Triana e *Tibouchina stenocarpa* (DC.) Cogn. (Melastomataceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.
- Schmid R. 1984.** Reproductive anatomy and morphology of Myrtales in relation to systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **71**: 832-835.
- Stephenson AG. 1981.** Flower and fruit abortion proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology Systematics* **12**: 253-279.
- Teixeira SP, Prakash N, Ranga NT. 2001.** Ovule and early seed development related to seed abortion in *Dahlstedtia pinnata* and *D. pentaphylla* (Leguminosae, Papilonoideae). *Phytomorphology* **51**: 41-50.
- Vielle-Calzada J, Crane CF, Stelly DM. 1996.** Apomixis: the asexual revolution. *Science* **274**: 1322-1323.

# ILUSTRAÇÕES

---

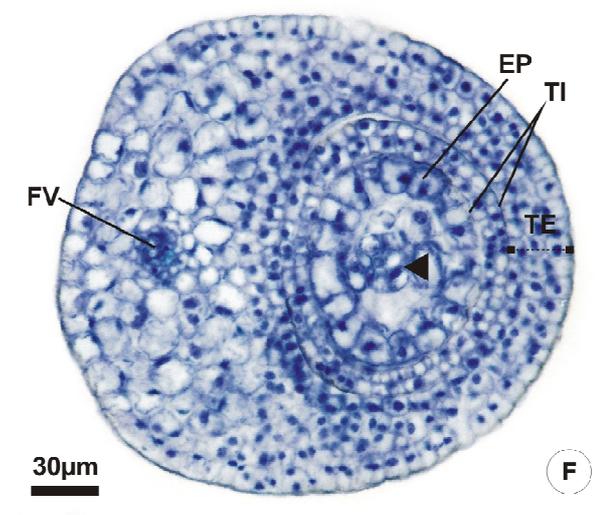
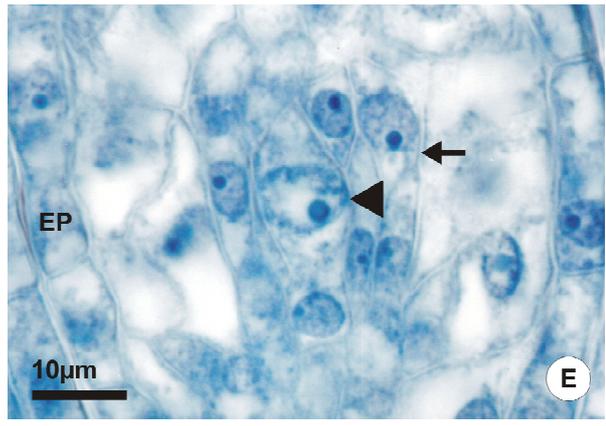
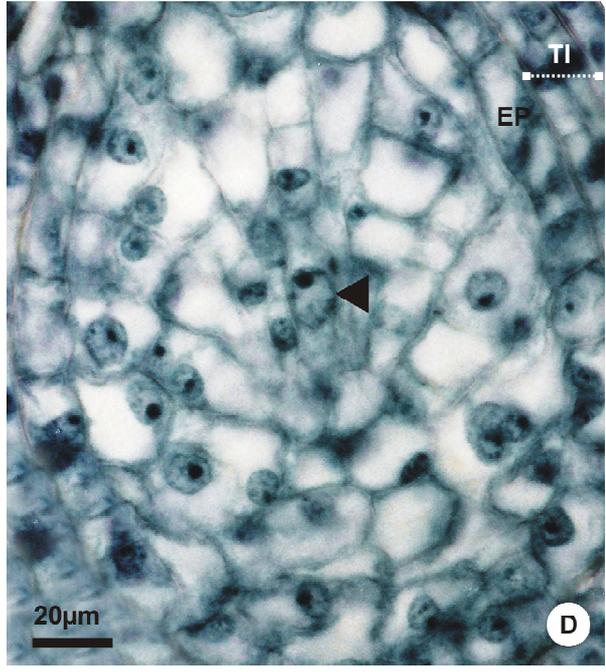
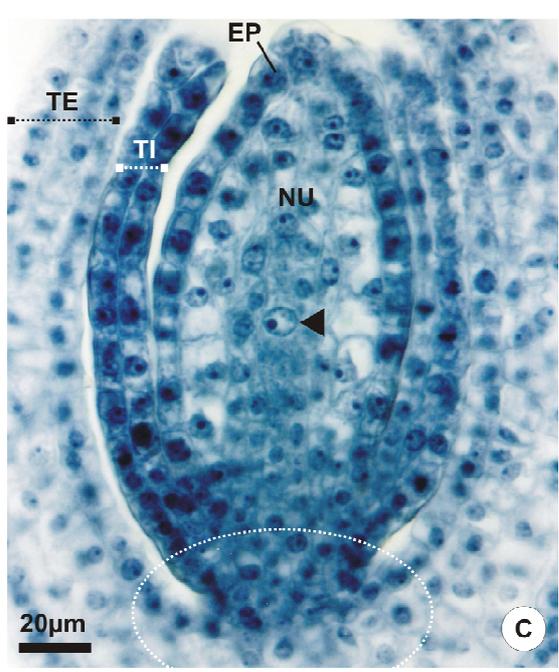
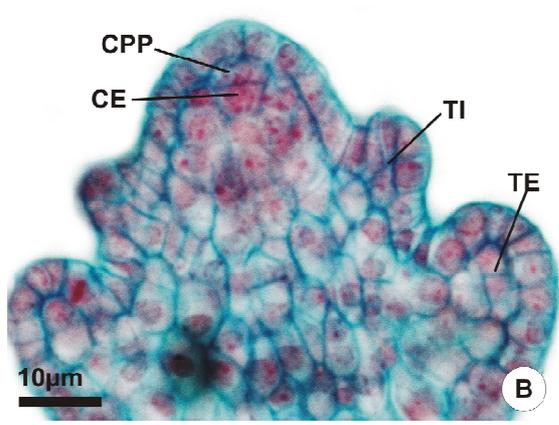
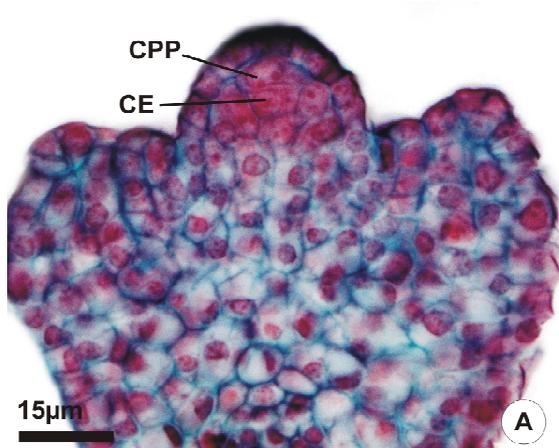
**Figura 42.** Botão floral II de *Miconia albicans* mostrando ontogenia do óvulo (**A-E**) e diferenciação da célula arquesporial (**F**). **A.** Secção longitudinal do botão floral. **B-F.** Secções longitudinais do óvulo.

[AN=antera. CA=célula arquesporial. EP=epiderme. ES=estilete. FI=filete. FU=funículo. FV=feixe vascular. HI=hipanto. MF=meristema fundamental. NU=nucelo. OV=ovário. PE=pétala. PL=placenta. PR=protoderme. SE=sépala. ST=superfície estigmática. TE=tegumento externo. TI=tegumento interno. \*=feixe vascular. ◀=óvulo.]



---

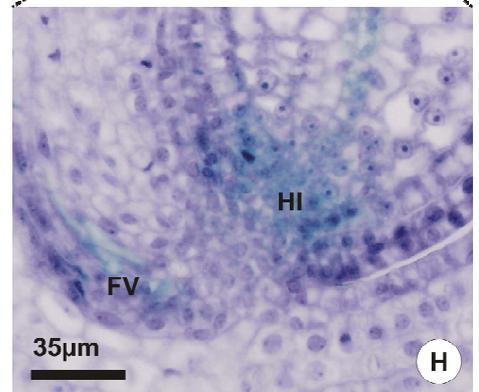
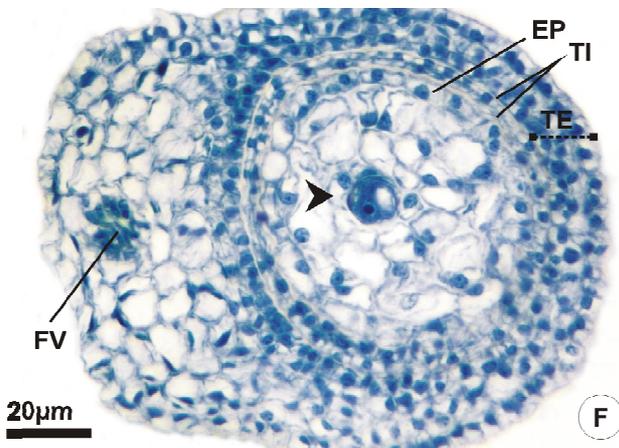
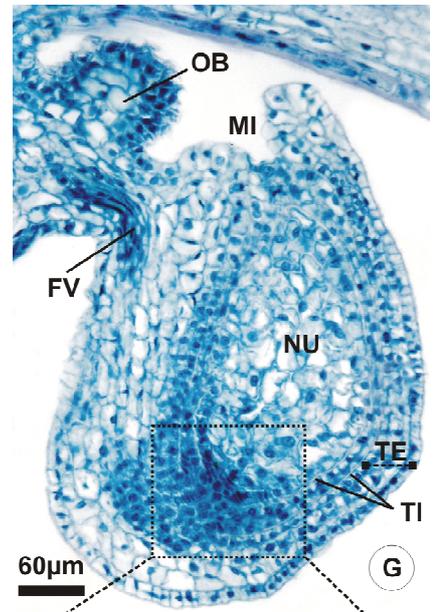
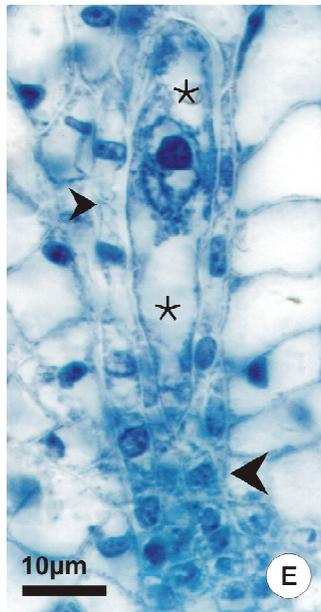
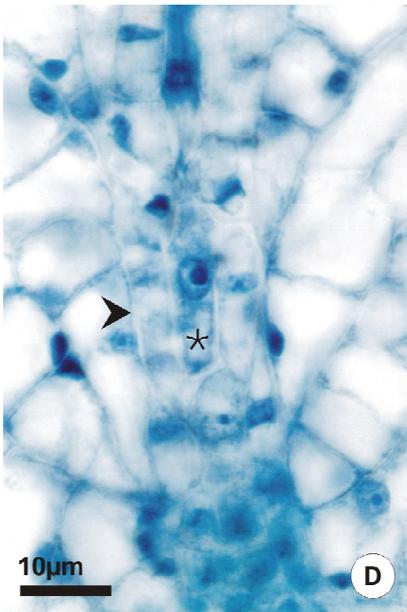
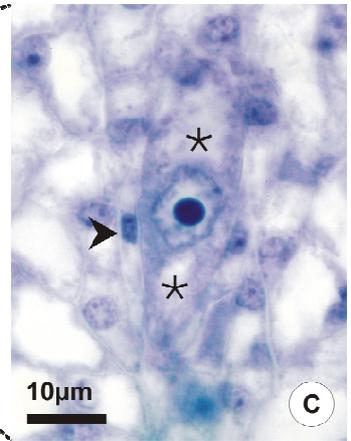
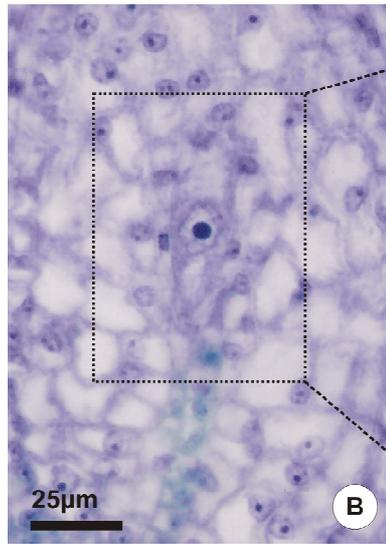
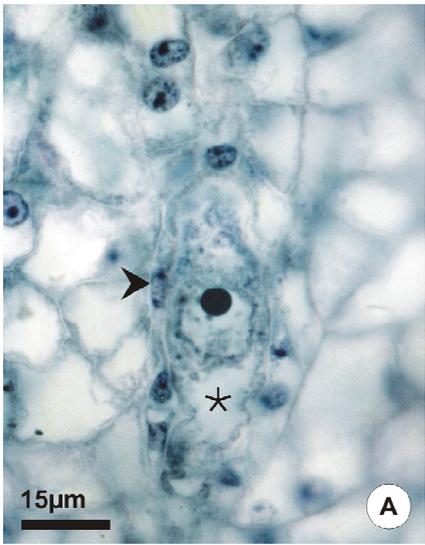
**Figura 43.** Botões florais II (**A, B**), III (**C**), IV e em pré-antese (**D-F**) de *Miconia albicans* mostrando divisão da célula arquesporial (**A, B**) e diferenciação da célula-mãe de ginósporos (seta) e das células nucelares ao redor da célula-mãe de ginósporos (**C-F**). **A-E.** Secções longitudinais do óvulo. **F.** Secção transversal do óvulo.  
[CE=célula esporogênica. CPP=célula parietal primária. EP=epiderme nucelar. FV=feixe vascular. NU=nucelo. TE=tegumento externo. TI=tegumento interno. Curva pontilhada=calaza. Seta: células nucelares diferenciadas. ►=célula-mãe de ginósporo.]



---

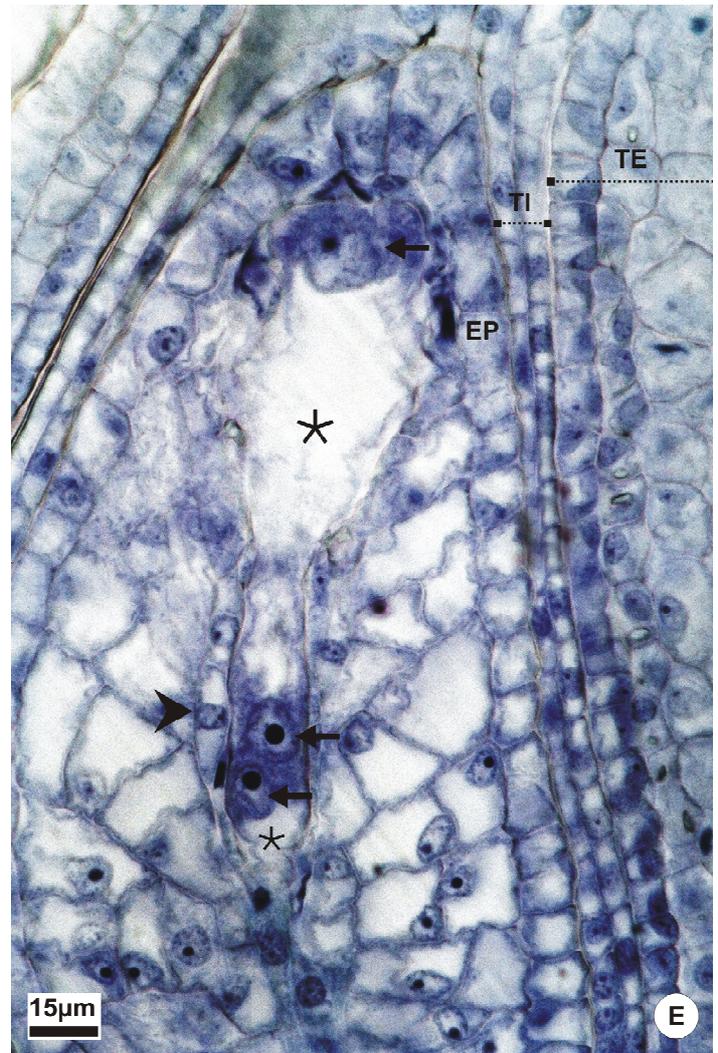
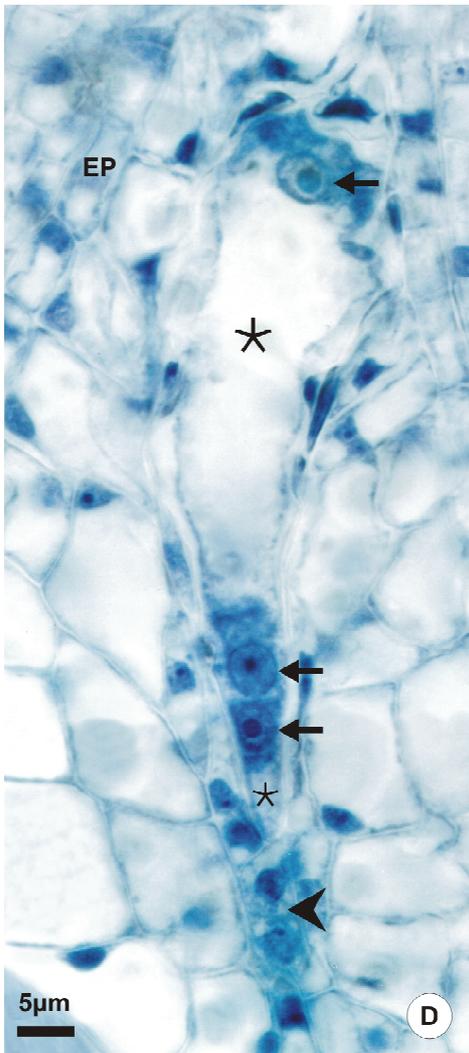
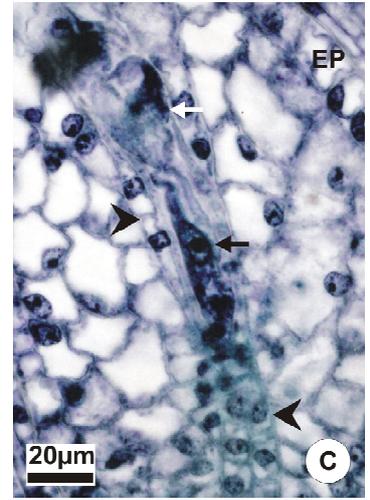
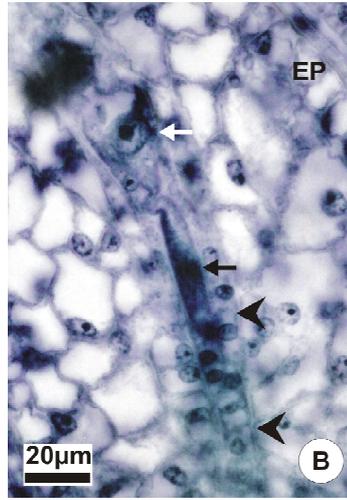
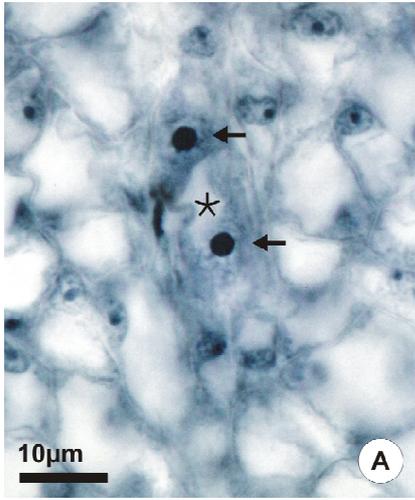
**Figura 44.** Flor de *Miconia albicans* mostrando estádios ontogenéticos finais da célula-mãe de andrósporos (**A-E**) e do óvulo (**F-H**). **A-E, G, H.** Secções longitudinais do óvulo. **F.** Secção transversal do óvulo.

[EP=epiderme nucelar. FV=feixe vascular. HI=hipóstase. MI=micrópila. NU=nucelo. OB=obturador. TE=tegumento externo. TI=tegumento interno. ★=vacúolo. ►=células nucleares diferenciadas.]



---

**Figura 45.** Flor de *Miconia albicans* mostrando estádios sucessivos da gametogênese. **A-E.** Secções longitudinais do óvulo. **A-C.** Ginófito binucleado. **D, E.** Ginófito tetranucleado. [EP=epiderme nucelar. TE=tegumento externo. TI=tegumento interno. Seta=núcleo. ★=vacúolo. ►=células nucleares diferenciadas.]

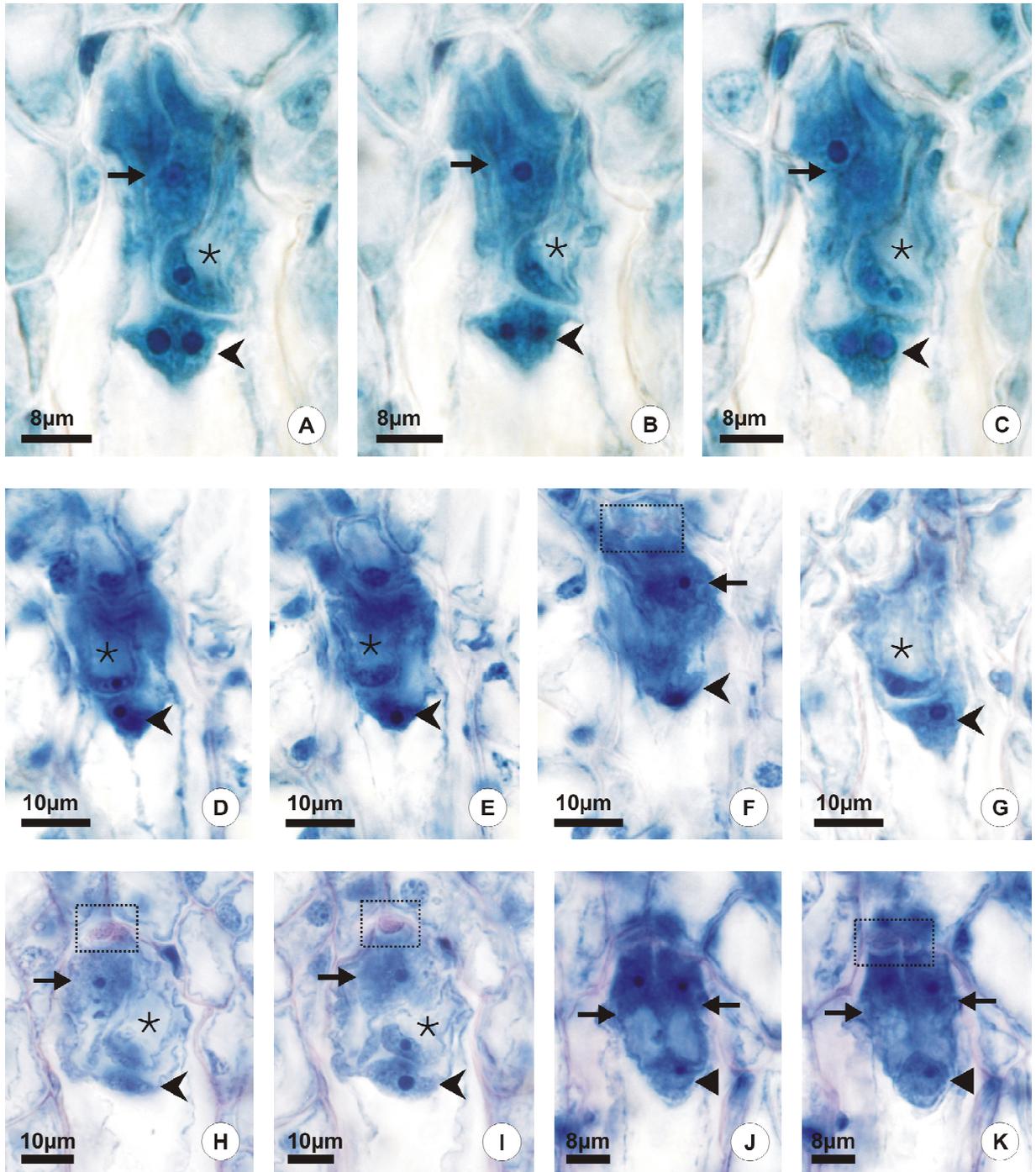


---

**Figura 46.** Flor de *Miconia albicans*. **A-K.** Secções longitudinais do óvulo. **A-I.** Unidade germinativa feminina. **J, K.** Aparelho oosférico.

[Linha pontilhada=aparelho filiforme. Seta=sinérgides. ★=vacúolo da oosfera. ►=núcleos polares.

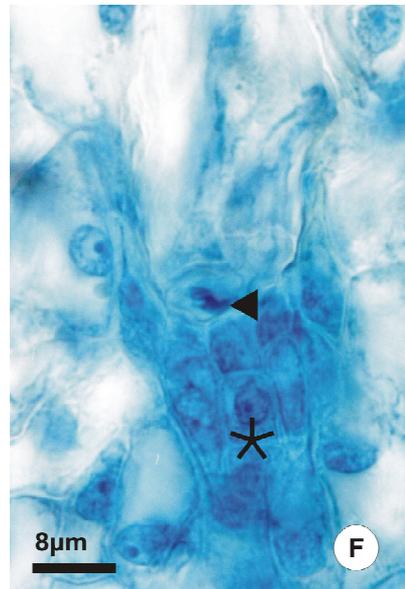
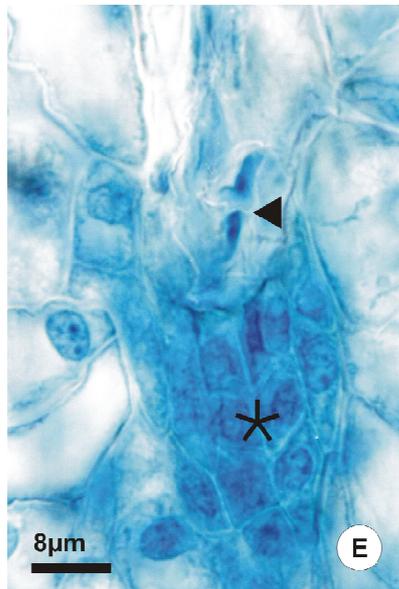
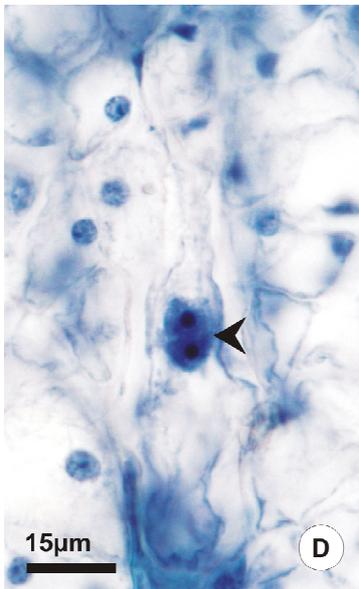
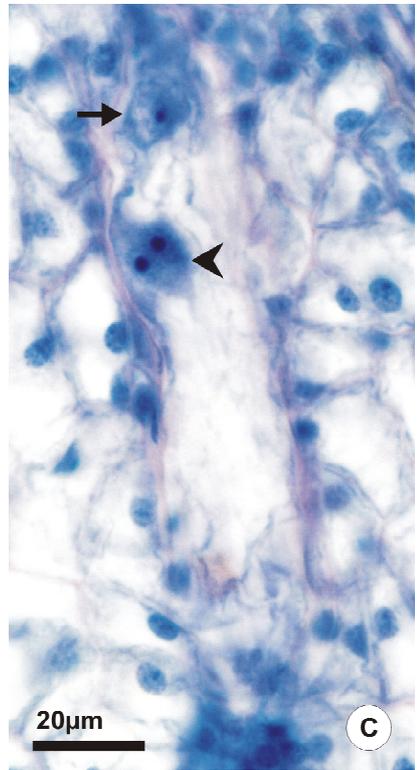
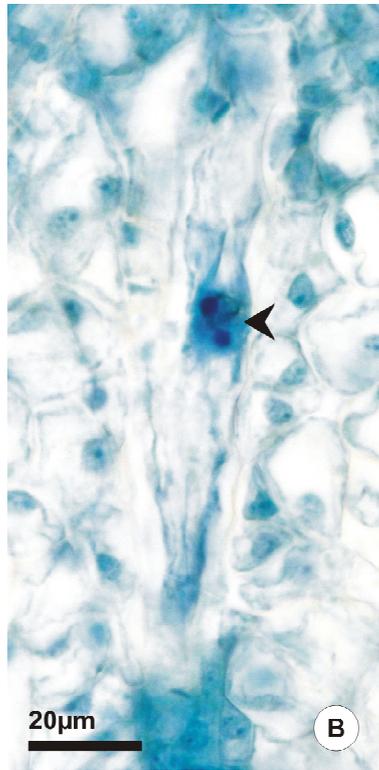
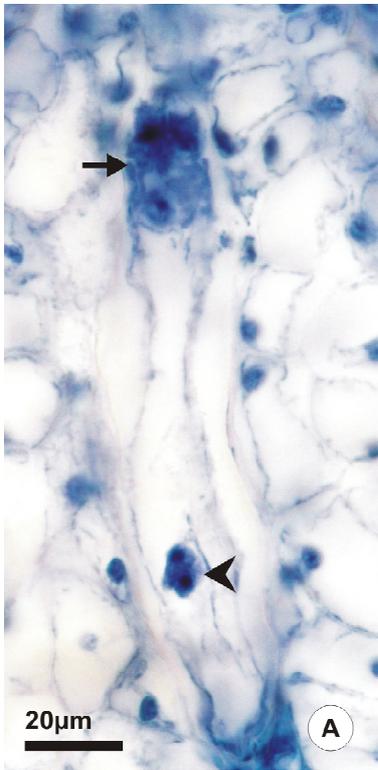
▶=oosfera.]



---

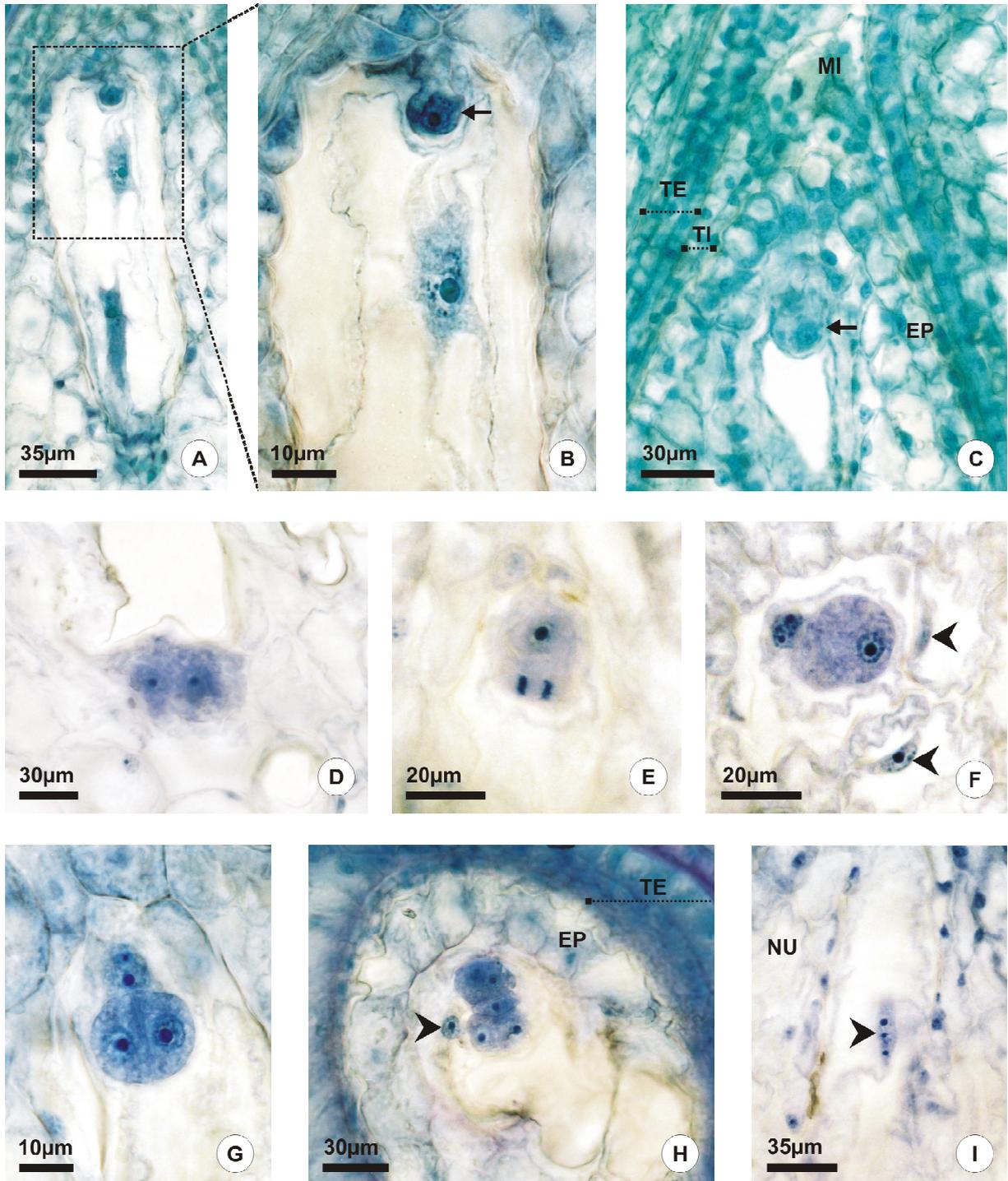
**Figura 47.** Flor de *Miconia albicans*. Secções longitudinais do óvulo. **A-F.** Ginófito octanucleado do tipo *Polygonum*.

[Seta=aparelho oosférico. ►=núcleos polares. ▶=antípodas. \*=células nucelares diferenciadas.]



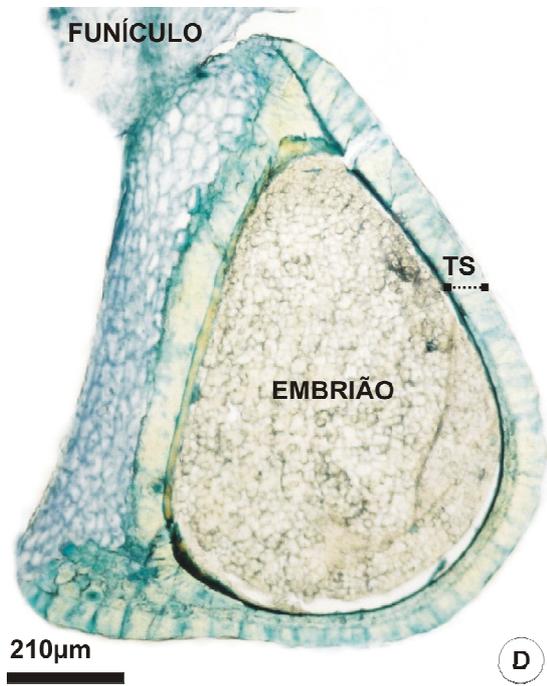
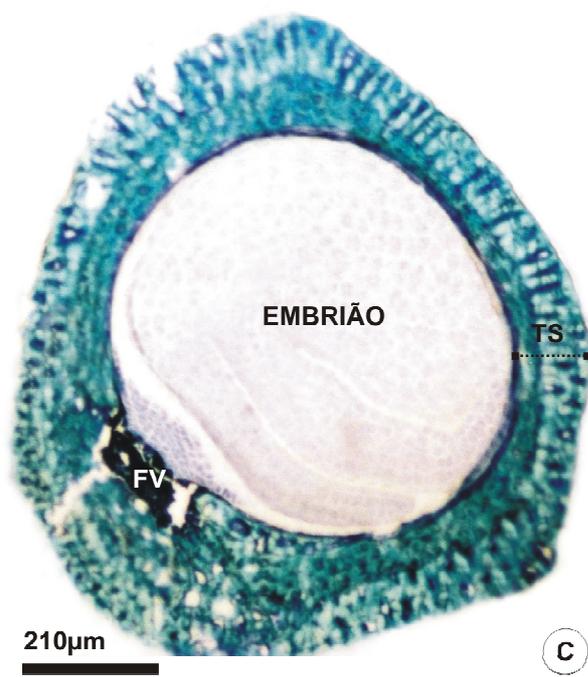
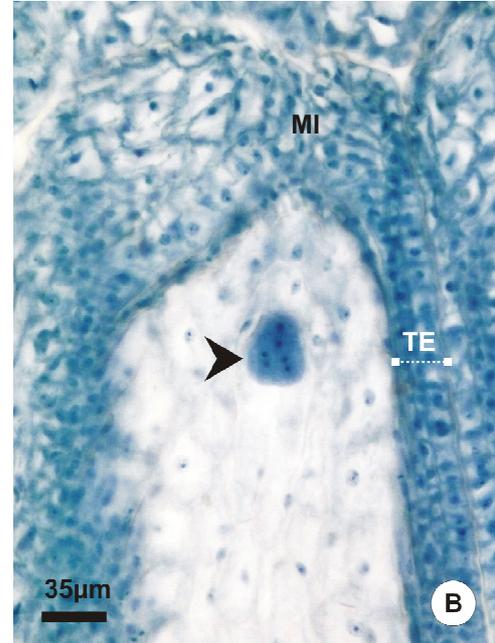
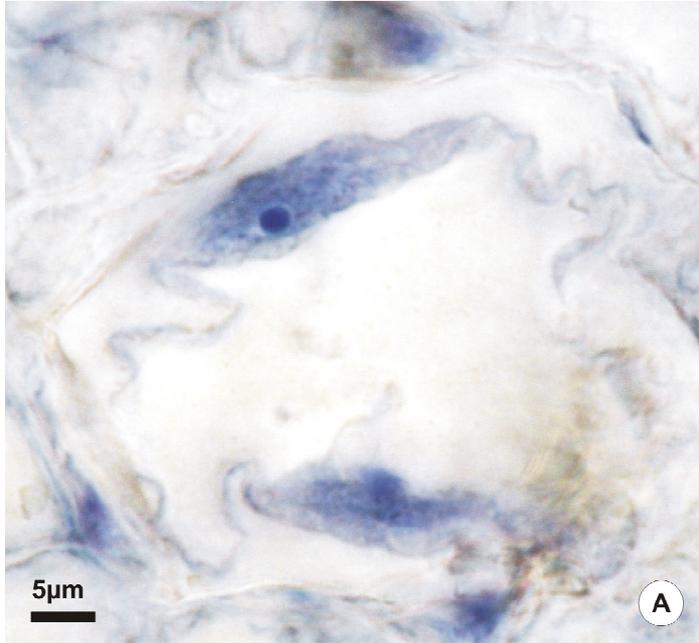
---

**Figura 48.** Frutos imaturos de *Miconia albicans* mostrando embriogênese e endospermogênese autônomas. **A-E, G-I.** Secções longitudinais da semente imatura. **F.** Secção transversal da semente imatura. **A-B.** Expansões dos núcleos polares. **D, E.** Primeiras divisões do zigoto. **F-H.** Pró-embrião. **I.** Endosperma.  
[EP=epiderme nucelar. MI=micrópila. NU=nucelo. TE= tegumento externo. TI=tegumento interno. Seta=zigoto. ►=núcleo do endosperma.]



---

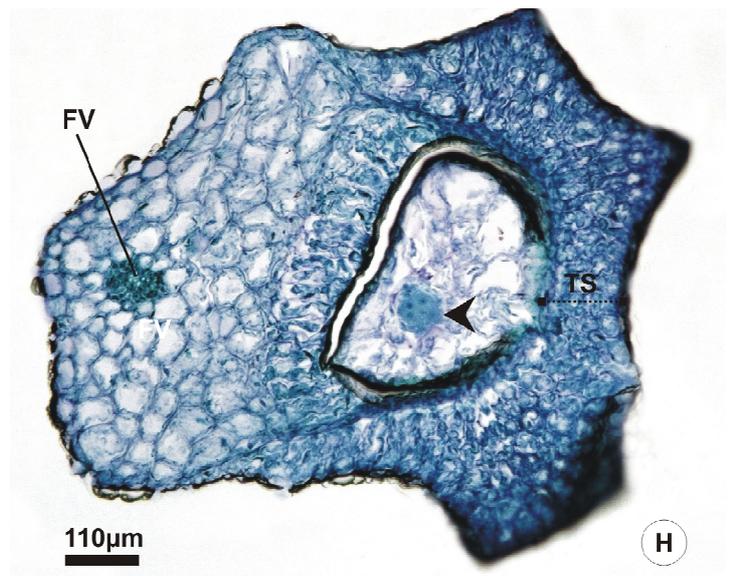
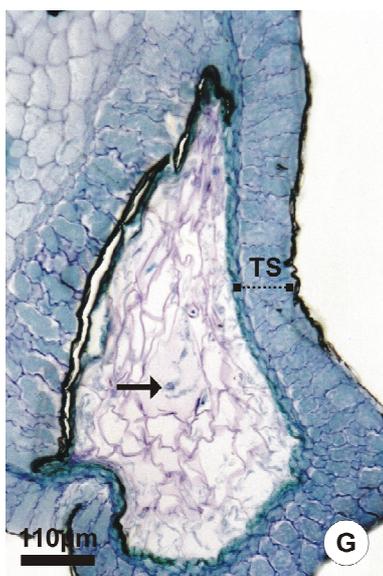
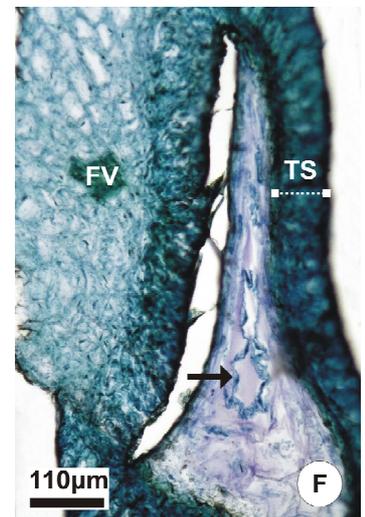
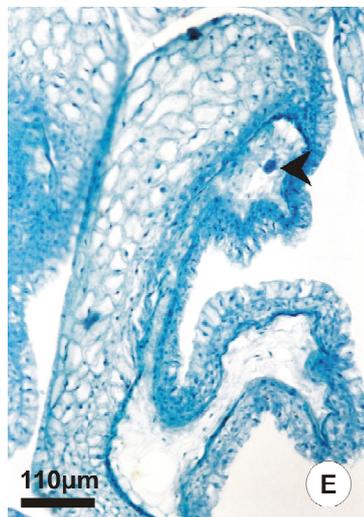
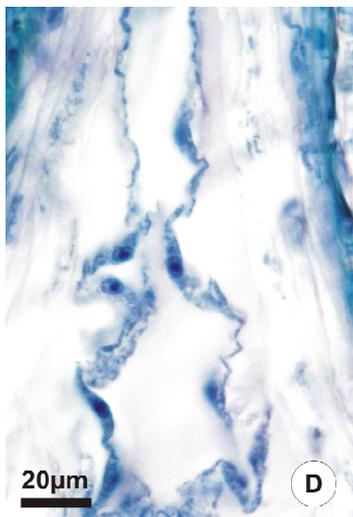
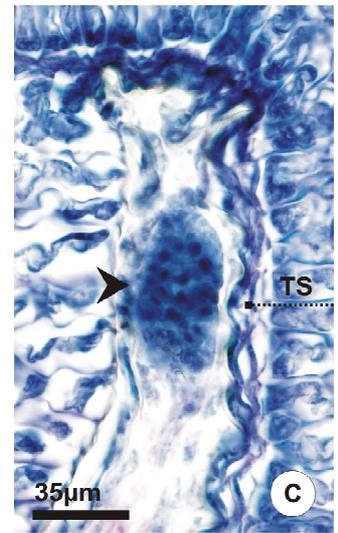
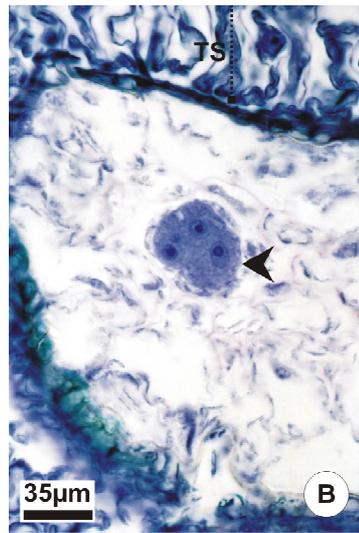
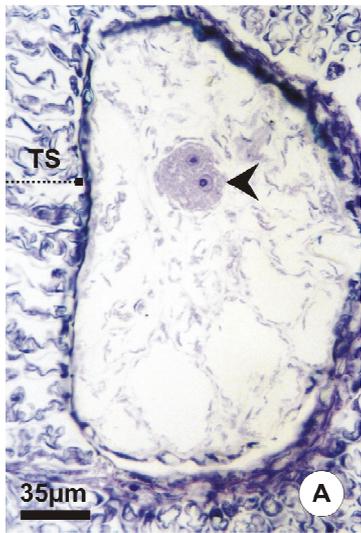
**Figura 49.** Frutos imaturos de *Miconia albicans* mostrando embriogênese e endospermogênese autônomas. **A, B.** Secções longitudinais da semente imatura. **C.** Secção transversal da semente madura. **D.** Secção longitudinal da semente madura.  
[FV=feixe vascular. MI=micrópila. TE=tegumento externo. TS=testa. ►=pró-embrião.]



---

**Figura 50.** Frutos imaturos de *Miconia albicans*. **A-G.** Secções longitudinais das sementes abortadas. **H.** Secção transversal das sementes abortadas.

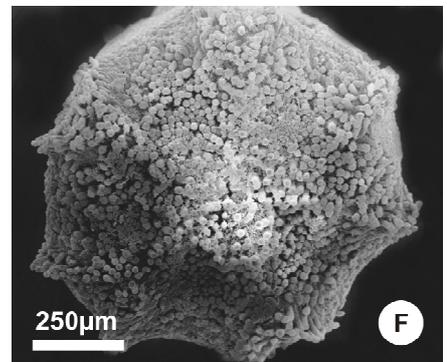
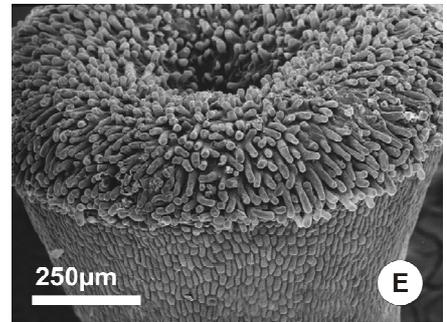
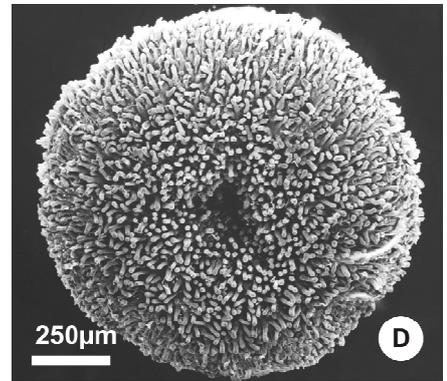
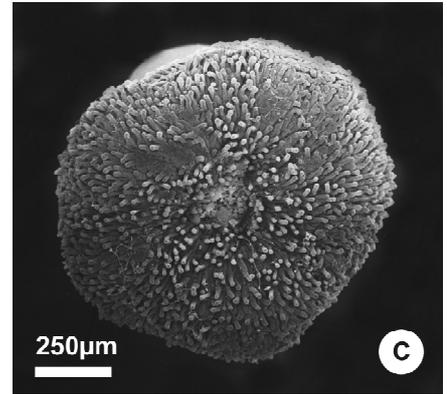
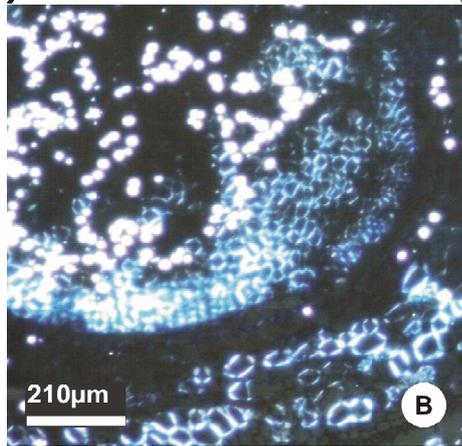
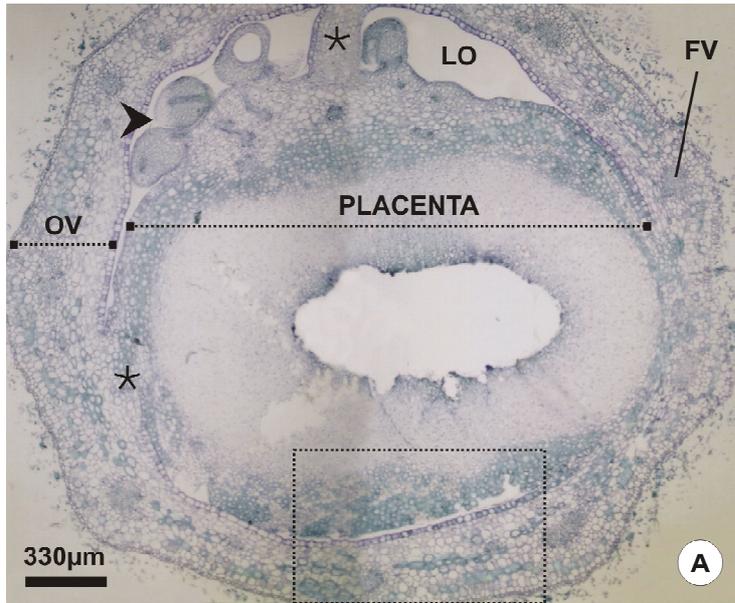
[FV=feixe vascular. TS=testa. Seta=núcleo do endosperma. ►=embrião.]



---

**Figura 51.** Botões florais e flores de *Miconia albicans*. **A, B.** Secções transversais do botão floral com desenvolvimento de fruto. **B.** Luz polarizada mostrando cristais do tipo drusa (branco) e esclereídes (verde). **C-F.** Microscopia eletrônica de varredura mostrando superfície estigmática.

[FV=feixe vascular. LO=lóculo. OV=parede do ovário. ★=septo carpelar. ►=óvulo.]



## CONCLUSÕES

O conhecimento dos mecanismos envolvidos com o fenômeno da agamospermia, além de fornecer importantes informações para o entendimento deste tipo peculiar de reprodução, contribui também para o entendimento do próprio desenvolvimento das estruturas envolvidas com a reprodução sexuada, já que os mecanismos regulatórios são similares em ambos os modos de reprodução (Reiser & Fisher 1993).

A análise conjunta de determinados parâmetros relacionados com a produção de gametas masculinos e femininos forneceu importantes dados para o entendimento desse tipo de reprodução em *M. albicans*, bem como para outras espécies de Melastomataceae. Dentre os principais resultados obtidos com este trabalho, destacam-se:

1) a classificação da espécie como agamospérmica obrigatória é apoiada pelos resultados semelhantes obtidos em ambos os experimentos controle e ensacada, pela total esterilidade masculina associada à viabilidade das sementes produzidas, e pela aparente supressão da meiose para a formação do ginófito;

2) a agamospermia como forma de reprodução da espécie nas populações estudadas é uma característica compartilhada tanto por indivíduos do Cerrado quanto da Floresta Atlântica, e do tipo diplospórica, ou seja, o ginófito teve origem diretamente a partir de uma célula-mãe de ginósporo;

3) o único parâmetro analisado cujas diferenças observadas podem estar relacionadas às diferentes condições ambientais do Cerrado e da Floresta Atlântica foi a porcentagem relativamente menor de células nas anteras de flores em pré-antese da Floresta Atlântica, já que a menor porcentagem de frutos obtidos nos experimentos ensacada e de viabilidade das sementes provavelmente foram decorrentes de fatores extrínsecos, como a interferência dos sacos

colocados nas inflorescências, principalmente na Floresta Atlântica, e a infestação de fungos, o que também foi observado em indivíduos do Cerrado, porém em menor grau;

4) a inviabilidade dos andrófitos está relacionada a alterações observada ao longo de toda a androsporogênese, indicando que, em cada estágio, determinado número de células viáveis são produzidas e alcançam o estágio de desenvolvimento seguinte;

5) o maior número de andrósporos disformes produzido na maior parte dos indivíduos analisados indica que a inviabilidade pode ser decorrente, entre outros fatores, de alterações nos limites das células e/ou na formação da esporoderme, embora tenha sido observada a agregação de orbículas ao redor de tétrades e andrósporos, indicando uma possível eficiência dos mecanismos formadores da esporoderme;

6) as alterações precoces observadas nas células do tapete podem estar entre os fatores responsáveis pelas anormalidades das células ao longo da androsporogênese, embora a liberação dos andrósporos das tétrades indique haver produção e liberação de calase, enzima responsável pela dissolução da parede de calose que envolve as tétrades, indicando pelo menos parte de sua funcionalidade;

7) a análise detalhada dos diferentes estádios ontogenéticos apóia o uso de determinados caracteres na delimitação da família, entre eles o tipo de óvulo e de ginófito (Schmid 1984), e mostra a necessidade de estudos mais amplos e detalhados em relação a outros, como aqueles relacionados à origem da célula-mãe de ginósporo e a morfologia e presença ou não de endotécio na antera madura. Dessa forma, as variações existentes entre espécies filogeneticamente bastante próximas, como as observadas, por exemplo, entre *M. albicans* e *M. cabucu*, devem ser consideradas com cautela no estabelecimento de tais padrões.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho mostrou a necessidade de estudos mais detalhados e comparativos sobre a embriologia de *M. albicans*, espécie agamospérmica obrigatória, bem como de espécies com agamospermia facultativa e sexuada, já que as diferenças observadas parecem estar mais relacionadas com a história evolutiva das espécies e os mecanismos reprodutivos adotados por elas do que com as variações do ambiente em que elas se desenvolvem. Além disso, estudos mais aprofundados são necessários para que possam ser conhecidos os prováveis fatores determinantes da esterilidade ou do desenvolvimento normal dos andrófitos, bem como dos tecidos relacionados ao fenômeno da inviabilidade polínica. Estudos ultra-estruturais aplicados a determinadas espécies forneceram informações importantes com relação aos vários estádios ontogenéticos (Bhandari 1984) e, certamente, contribuirão em muito para o entendimento dos fenômenos que determinam, em última instância, a inviabilidade dos andrófitos em *M. albicans*.

## LITERATURA CITADA

- Bhandari, N.N. 1984. The microsporangium. *In* Embryology of angiosperms (Johri, B.M., ed). Springer-Verlag, New York. p. 53-121.
- Reiser, L. & Fisher, R.L. 1993. The ovule and the embryo sac. *The Plant Cell* 5: 1291-1301.
- Schmid, R. 1984. Reproductive anatomy and morphology of Myrtales in relation to systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: 832-835.