



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ELAINE LOPES PEREIRA NUNES**

**DESENVOLVIMENTO DO ANDROCEU E GINECEU EM TRÊS ESPÉCIES DE  
*Potamogeton* L. (POTAMOGETONACEAE, ALISMATALES)**

**CURITIBA**

**2009**

ELAINE LOPES PEREIRA NUNES

DESENVOLVIMENTO DO ANDROCEU E GINECEU EM TRÊS ESPÉCIES DE  
*Potamogeton* L. (POTAMOGETONACEAE, ALISMATALES)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, Área de Concentração em Estrutura e Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Ike Coan

Co-orientadora: Profa. Dra. Cleusa Bona

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Cecília de Chiara Moço

CURITIBA  
2009



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BOTÂNICA



**“DESENVOLVIMENTO DO ANDROCEU E GINECEU EM  
TRÊS ESPÉCIES DE *POTAMOGETON* L.  
(*POTAMOGETONACEAE* – *ALISMATALES*)”**

por

**ELAINE LOPES PEREIRA NUNES**

Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre no Programa de  
Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão  
formada pelos Professores

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Alessandra Ike Coan (UFPR) - PRESIDENTE**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Sajo (UNESP)**

**[Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isabela Galarda Varassin (UFPR)**

Curitiba, 12 de fevereiro de 2009.

Ao Gustavo, meu esposo, companheiro e amigo.  
Aos meus pais, Leila e Licinio.  
Aos meus irmãos, Alexandre, Jéssica e Emmanuel.  
Por todo o amor, apoio, por tudo o sou e pelo que alcancei.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda proteção, força e sorte.

A Alessandra, que apesar de pouco me conhecer e ao projeto, assumiu minha orientação no último semestre do curso. Sob sua orientação, com extrema dedicação, confiança e amizade, dados e idéias foram transformados em dissertação.

A Cleusa, pela co-orientação, amizade e prontidão em resolver os pequenos problemas que surgiram ao longo do curso.

A Cecília, pela co-orientação, amizade, treinamento e suporte no desenvolvimento deste trabalho.

A Mariana Cortes de Lima, pelo auxílio no processamento de parte do material, pela compreensão com a minha inexperiência em orientá-la e amizade.

A professora Edna Scremin-Dias, pelo auxílio na coleta de *P. illinoensis*, hospedagem e conselhos.

Aos professores Armando Cervi e Rodrigo Schütz Rodrigues, pela identificação das espécies.

Ao Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro e Dra. Monika Barth, pelo auxílio nas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão.

A Makeli, pela amizade, companheirismo e cumplicidade, no laboratório e fora dele.

A Jenifer, pela amizade, pelos almoços e conversas na cozinha do anexo e ajuda com a microscopia eletrônica de transmissão.

A todos os amigos, que me apoiaram e acreditaram, às vezes sem compreender bem do que se tratava este trabalho ou a sua importância.

A Elizabeth, secretária do Programa, por todo o seu auxílio e amizade.

Ao Nilson, por compartilhar sua experiência com os iniciantes no laboratório e pelas conversas que amenizaram as atividades diárias.

Aos colegas do curso, pela colaboração e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Viva como se fosse morrer amanhã, aprenda  
como se fosse viver para sempre.

Mahatma Ghandi

## RESUMO

Potamogetonaceae (Alismatales) compreende cerca de três gêneros, dos quais *Potamogeton* se destaca, com 80-100 espécies e distribuição quase cosmopolita. Neste gênero, há controvérsias em relação à natureza da sua unidade floral, interpretada como uma inflorescência reduzida ou como uma flor verdadeira. As informações embriológicas de *Potamogeton*, na circunscrição atual da família, são escassas, necessitando complementação. Dentre elas, sabe-se que o pólen é inaperturado e foi sugerido que neste tipo de pólen, não haveria restrição no formato das tétrades de micrósporos, assim como em outros grupos de Monocotiledôneas. O objetivo deste estudo foi investigar o desenvolvimento do androceu e gineceu em três espécies de *Potamogeton*, procurando: relacionar a microsporogênese à formação do grão de pólen inaperturado; esclarecer a natureza da unidade floral; verificar se há padrões de iniciação dos órgãos florais, e complementar as lacunas de informações embriológicas. Para tanto, foram coletadas inflorescências em diversos estágios de desenvolvimento e as amostras destinadas à microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica varredura (MEV) foram fixadas em glutaraldeído 1% e formaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Para a ML, o material foi incluído em hidroxietilmetacrilato, seccionado e corado segundo técnicas usuais. Para a microscopia eletrônica de transmissão, anteras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 7,2, incluídas em resina epóxi, seccionadas e contrastadas. Amostras também foram processadas para MEV segundo técnicas usuais. Na microsporogênese a citocinese meiótica é sucessiva, com formação de placas celulares centrifugas e deposição de calose adicional nestas, simultaneamente, resultando em tétrades de formatos variados. Durante o desenvolvimento floral, as inflorescências das três espécies apresentaram características semelhantes, diferindo em número de flores e formato dos órgãos. A ordem de iniciação dos verticilos florais foi semelhante: tépalas laterais, tépalas medianas, seguidas dos estames laterais, estames medianos e finalmente, dos carpelos. Em *P. illinoensis*, a formação do carpelo ocorre de maneira distinta das demais espécies. Os caracteres embriológicos mantiveram-se constantes entre as espécies estudadas, ressaltando-se: a parede da antera do tipo monocotiledôneo e os carpelos ascidiados, com apenas um óvulo campilótropo, que origina um saco embrionário do tipo Polygonum. Os dados levantados indicam, como provável motivo para a ausência de aberturas no pólen de *Potamogeton*, a ausência de pontos específicos de término de deposição de calose adicional nas placas celulares. A unidade reprodutiva de *Potamogeton* deve ser interpretada como uma flor verdadeira, e foram levantados dois padrões de iniciação dos órgãos florais no gênero, que não se relacionam a clados específicos. Como caracteres potenciais para a taxonomia de *Potamogeton* foram identificados a forma do estigma e a posição e forma da abertura carpelar. Informações inéditas e complementares acerca da embriologia de *Potamogeton* foram fornecidas, contribuindo para um melhor conhecimento da embriologia de Potamogetonaceae como um todo, podendo auxiliar no esclarecimento de divergências ocasionadas pela utilização de circunscrições antigas da família.

Palavras-chave: Desenvolvimento floral. Microsporogênese. Pólen. *P. illinoensis*. *P. polygonus*. *P. pusillus*.

## ABSTRACT

Potamogetonaceae (Alismatales) comprises about three genera, including *Potamogeton*, a near cosmopolitan genus of about 80-100 species. The understanding of its floral unit is quite controversial, being interpreted as a reduced inflorescence or a true flower. In the current circumscription of Potamogetonaceae there is scarce embryological information of *Potamogeton* and complementation of data is needed. It is known that the pollen in this genus is inaperturate and it has been suggested by some authors that in this type of pollen there is a release of constraint on tetrad shape, as in other Monocotyledons. The aims of the present study were to investigate the development of the androecium and the gynoecium in three *Potamogeton* species in order to: understand the relationship between microsporogenesis features and inaperturate pollen formation; elucidate the nature of the floral unit; verify whether organ initiation patterns occur in the flower or not; and complement the embryological data. Inflorescences at various developmental stages were collected and fixed in 1% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2. for both light (LM) and scanning electron microscopy (SEM). The samples for LM were embedded in hydroxyethyl methacrylate, then sectioned, stained and mounted according to standard procedures. Samples for SEM were also processed according standard procedures. For TEM examination, anthers were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, then embedded in epoxy resin, sectioned and stained. At microsporogenesis, cytokinesis is successive and the callosic cell wall formation was achieved by centrifugal cell plates, with simultaneous deposition of additional callose. The resulting tetrads were of various shapes. The inflorescences of the three species studied were similar, varying only in flower number and shape of the floral organs. The initiation order of floral organs was similar: lateral tepals, median tepals, followed by lateral stamens, median stamens and carpels. The carpels of *P. illinoensis* developed in a different way compared to the other species. The embryological characters were constant among the three species and some of them are as follows: anther wall of the monocotyledonous-type, and ascidiate carpels with a single campylotropous ovule that develop a Polygonum type of embryo sac. The present data indicate that the lack of specific points of additional callose deposition during microsporogenesis is the probable reason to the lack of apertures in the *Potamogeton* pollen. The floral unit of *Potamogeton* should be interpreted as a true flower. Moreover, two patterns of floral organ initiation were pointed out, which are not correlated to specific clades. The stigma shape, and both position and shape of carpel opening were identified as potential characters to taxonomy. This study presented some new and complementary information for the embryology of *Potamogeton*. The data also contribute to a better understanding of the embryology of Potamogetonaceae as a whole and shed light on conflicting information caused by the use of old circumscription of the family.

Key words: Flower development. Microsporogenesis. Pollen. *P. illinoensis*. *P. polygonus*. *P. pusillus*.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. CAPÍTULO I - MICROSPOROGÊNESE EM <i>Potamogeton</i> (POTAMOGETONACEAE, ALISMATALES) E CONSIDERAÇÕES SOBRE A AUSÊNCIA DE ABERTURAS NO PÓLEN</b> .....	13
2.1. INTRODUÇÃO.....	13
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.3. RESULTADOS.....	16
2.4. DISCUSSÃO.....	20
<b>3. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO FLORAL E MORFOLOGIA DO ANDROCEU E GINECEU EM TRÊS ESPÉCIES DE <i>Potamogeton</i> (POTAMOGETONACEAE, ALISMATALES)</b> .....	23
3.1. INTRODUÇÃO.....	23
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.3. RESULTADOS.....	26
3.4. DISCUSSÃO.....	32
<b>4. CAPÍTULO III - CONTRIBUIÇÃO À EMBRIOLOGIA DE <i>Potamogeton</i> (POTAMOGETONACEAE, ALISMATALES)</b> .....	36
4.1. INTRODUÇÃO.....	36
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.3. RESULTADOS.....	38
4.3.1. Organogênese da antera, microsporogênese e microgametogênese .	38
4.3.2. Organogênese do óvulo, megasporogênese e megagametogênese...	43
4.4. DISCUSSÃO.....	46
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51
<b>DOCUMENTOS CONSULTADOS</b> .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

Potamogetonaceae Reichenbach está atualmente incluída em Alismatales, ordem considerada basal dentre as Monocotiledôneas (APG II, 2003; CHASE, 2004). As Alismatales representam o maior grupo monofilético de angiospermas aquáticas (LES; HAYNES, 1995), atualmente com 14 famílias (APG II, 2003; CHASE, 2004): Alismataceae Vent., Aponogetonaceae J. Agardh, Araceae Juss., Butomaceae Mirb., Cymodoceaceae N. Taylor, Hydrocharitaceae Juss., Juncaginaceae Rich., Limnocharitaceae Takht. ex Cronquist, Posidoniaceae Hutch., Potamogetonaceae Rchb., Ruppiaceae Horan., Scheuchzeriaceae F. Rudolphi, Tofieldiaceae Takht. e Zosteraceae Dumort.

Segundo Haynes e Holm-Nielsen (2003), Potamogetonaceae é subcosmopolita, com a maioria das espécies distribuídas em regiões temperadas, especialmente no Hemisfério Norte. Atualmente, compreende os gêneros *Groenlandia* J. Gay, *Stuckenia* Börner e *Potamogeton* L., totalizando cerca de 100 espécies (HAYNES E HOLM-NIELSEN, 2003). Além desses três gêneros, *Zannichellia* L. é também incluída na família segundo alguns autores, com suporte molecular (LES; CLELAND; WAYCOT, 1997; APG II, 2003; LINDQVIST *et al.*, 2006).

*Groenlandia* possui apenas uma espécie e distribuição restrita ao Hemisfério Norte. *Stuckenia*, com distribuição quase cosmopolita e seis espécies, era considerado até recentemente como subgênero *Coleogeton* de *Potamogeton*, mas sua elevação à categoria genérica recebeu suporte morfológico (LES; HAYNES, 1996) e molecular (LES; CLELAND; WAYCOT, 1997; LINDQVIST *et al.*, 2006). *Potamogeton* compreende cerca de 95 espécies, com distribuição quase cosmopolita (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003). Este gênero é considerado um dos mais importantes no ambiente aquático, especialmente como alimento ou habitat para animais aquáticos (HAYNES, 1974; RODRIGUES; IRGANG, 2001), ocorrendo em águas tropicais à temperadas (WIEGLEB; KAPLAN, 1998).

*Potamogeton* é herbáceo, propagado por sementes, *turions* ou rizomas, com caule cilíndrico ou comprimido (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003); pode apresentar folhas homófilas submersas ou heterófilas submersas e flutuantes (RODRIGUES; IRGANG, 2001); suas inflorescências são espigas capitadas ou cilíndricas ou ainda panículas de espigas, com 1-20 verticilos de flores, formados por 1-4 flores em cada (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003); as flores são imersas ou

emersas, com quatro tépalas livres, quatro estames livres, um ou quatro carpelos livres (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003); os frutos são drupas abaxialmente arredondadas ou quilhadas (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003).

No tratamento da família feito por Haynes e Holm-Nielsen (2003) na Flora Neotropica são citadas oito espécies para o Brasil, todas de *Potamogeton*. Rodrigues e Irgang (2001), em seu tratamento sobre Potamogetonaceae no Rio Grande do Sul, encontraram nove espécies de *Potamogeton*: *P. illinoensis* Morong, *P. pectinatus* L., *P. pusillus* L., *P. gayi* A. Benn., *P. polygonus* Cham. e Schldtl, *P. spirilliformis* Hagstr., *P. ulei* K. Schum., *P. montevidensis* A. Benn. e *P. ferrugineus* Hagstr. Dentre estas, *Potamogeton pectinatus* atualmente encontra-se circunscrita em *Stuckenia* (*S. pectinata* Börner) e *P. ulei* foi sinonimizada com *P. polygonus* (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003).

Devido à plasticidade fenotípica (geográfica e sazonal), hibridização, poliploidia e aneuploidia, a delimitação de *Potamogeton s.l.* tem sido discutida (HAYNES, 1974; KAPLAN, 2002; LINDQVIST *et al.*, 2006), o que resultou em uma classificação infragenérica complexa (LINDQVIST *et al.*, 2006). Tradicionalmente, o gênero foi dividido nos subgêneros *Coleogeton* (atualmente gênero *Stuckenia*) e *Potamogeton*, dos quais, o segundo foi separado em dois grupos morfológicos: o das espécies de folhas largas e o das espécies de folhas lineares (RAUNKIÆR, 1896). Diversas hipóteses tentam explicar o surgimento destes dois grupos no subgênero *Potamogeton*, bem como a homofilia e heterofilia apresentada por grande parte das espécies de folhas largas (HAGSTRÖM, 1916; LES, 1983; LES; SHERIDAN, 1990).

Recentemente, análises filogenéticas moleculares têm corroborado, em grande parte, a tradicional divisão do subgênero *Potamogeton* nos dois grupos morfológicos, bem como a hipótese de que o seu ancestral era provavelmente homófilo com folhas lineares (IIDA; KOSUGE; KADONO, 2004; LINDQVIST *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2008). Desta forma, as espécies homófilas de folhas largas teriam surgido uma única vez e a heterofilia diversas vezes por paralelismo (IIDA, 2004; LINDQVIST *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2008). Mas, apesar dos recentes esforços, as relações inter e infragenérica ainda carecem de melhor resolução (LINDQVIST *et al.*, 2006).

Dentre as espécies que ocorrem no Brasil, foram selecionadas três utilizando-se como critérios sua distribuição (endêmica da América do Sul,

cosmopolita e endêmica da América, respectivamente), tipo de inflorescência (emersa ou imersa e apenas emersa), e inclusão em análises filogenéticas moleculares (duas inclusas e outra não). *Potamogeton polygonus*, endêmica na América do Sul, e *P. pusillus*, cosmopolita, apresentam inflorescências emersas ou imersas (RODRIGUES; IRGANG, 2001), enquanto que *P. illinoensis*, encontrada em todo o continente americano, emite suas inflorescências em ambiente aéreo (RODRIGUES; IRGANG, 2001).

Em diversos grupos de angiospermas, inúmeros trabalhos associaram caracteres florais a estudos filogenéticos para inferir a evolução dos mesmos. No caso das monocotiledôneas basais, tais estudos morfológicos com enfoque evolutivo têm se mostrado importantes inclusive na compreensão da evolução das angiospermas em geral (ENDRESS, 2005). Para *Potamogeton*, o único estudo que aborda a evolução desses caracteres foi o de Posluszny e Charlton (1993), baseado apenas em estudos morfológicos clássicos, sem análise filogenética.

Os demais estudos sobre desenvolvimento e morfologia floral em *Potamogeton* ficaram restritos às tentativas em esclarecer a natureza da unidade floral e da inflorescência do gênero (SATTLER, 1965; SINGH, 1965; POSLUSZNY; SATTLER, 1973, 1974; POSLUSZNY, 1981; POSLUSZNY; CHARLTON, 1986). Tais estudos discutiram a hipótese de que a unidade floral seria o resultado da redução de uma inflorescência composta por quatro flores pistiladas circundadas por quatro flores estaminadas (KUNTH, 1841). Porém, enquanto alguns trabalhos sustentaram a hipótese de inflorescência reduzida (MIKI, 1937; UHL, 1947; POSLUSZNY; SATTLER, 1973), outros consideraram a unidade floral como uma flor simples (SINGH, 1965; SATTLER, 1965; POSLUSZNY; SATTLER, 1974; POSLUSZNY; CHARLTON, 1986).

Recentemente, têm-se demonstrado a relação entre o tipo de citocinese, o tipo de tetrade de micrósporos que se forma ao final da microsporogênese, e a determinação dos padrões de abertura no grão de pólen (FURNESS; RUDALL, 1999a; FURNESS; RUDALL; SAMPSON, 2002; PENET *et al.*, 2005; NADOT *et al.*, 2006; SANNIER *et al.*, 2006). Nadot *et al.* (2006), estudando diversas monocotiledôneas, observaram que em espécies de *Strelitzia* (Strelitziaceae) que também apresentam pólen inaperturado, ocorrem tipos variados de tétrades e estes autores lançaram a hipótese de que para este tipo de pólen não há restrição do tipo de tetrade.

*Potamogeton* possui pólen inaperturado (SORSA, 1988; FURNESS; RUDALL, 1999b), caráter este que surgiu diversas vezes independentemente nas Monocotiledôneas (FURNESS; RUDALL, 1999b), relacionando-se principalmente a táxons hidrófilos (ZAVADA, 1983; FURNESS; RUDALL, 1999b) e a grupos com polinização altamente especializada (ZAVADA, 1983).

A formação da parede do grão de pólen ocorre em três etapas: pré-meiótica, durante o estágio de tétrade e na fase de micrósporos livres (HESLOP-HARRISON, 1971). Esta parede divide-se em intina, a camada interna, formada por polissacarídeos, e exina, a camada externa, formada por esporopolenina (KNOX, 1984). Com base em caracteres morfológicos, a exina pode ser adicionalmente dividida em nexinas 1 e 2, que são camadas mais internas sem ornamentação, e sexinas 1, 2 e 3, que são camadas mais externas correspondentes à camada de columelas, teto e elementos do teto, respectivamente (ERDTMAN, 1952, 1966). Durante o estágio de tétrade, uma parede precursora da sexina é depositada entre o protoplasto do micrósporo e a parede de calose, a primexina (FAHN, 1990). Subsequentemente, precursores da esporopolenina são acumulados em locais específicos da primexina, formando os principais componentes da sexina (HESLOP-HARRISON, 1968).

As informações embriológicas para *Potamogeton* são fragmentadas (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003), muitas vezes levantadas de estudos muito antigos (por exemplo WIEGAND, 1899; WIEGAND, 1900). Tal afirmação pode ser verificada ao se consultar à bibliografia clássica de embriologia (JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992), em que os autores baseiam diversas descrições em gêneros que foram reposicionados em outras famílias (por exemplo *Syringodium* - Cymodoceaceae, *Zostera* - Zosteraceae e *Ruppia* - Ruppiaceae) e fornecem poucas informações sobre *Potamogeton*.

Com base no exposto, este trabalho teve por objetivo esclarecer as seguintes perguntas a partir das três espécies amostradas: 1) Há relação entre o tipo de tétrade formada na microsporogênese e o pólen inaperturado? 2) A unidade floral de *Potamogeton* representa uma inflorescência reduzida? 3) Há padrões na iniciação dos órgãos florais no gênero? 4) Há uniformidade nos caracteres embriológicos no gênero, independente do posicionamento em diferentes clados?

Para uma melhor compreensão dos assuntos abordados e clareza nas discussões, este trabalho foi dividido em três capítulos: o primeiro tratando da

microsporogênese e sua relação com o pólen inaperturado; o segundo tratando do desenvolvimento floral, e o terceiro da embriologia do gênero.

## 2. CAPÍTULO I - MICROSPOROGÊNESE EM *Potamogeton* (POTAMOGETONACEAE, ALISMATALES) E CONSIDERAÇÕES SOBRE A AUSÊNCIA DE ABERTURAS NO PÓLEN

### 2.1. INTRODUÇÃO

A microsporogênese pode ser definida como o processo que resulta na produção de quatro micrósporos haplóides a partir de um microsporócito diplóide, através de meiose e citocinese (FURNESS; RUDALL; SAMPSON, 2002). Dois tipos de citocinese são tradicionalmente caracterizados - sucessiva e simultânea. No primeiro tipo, uma placa celular é formada imediatamente após a meiose I e outra é formada em cada um dos micrósporos após a meiose II. Por outro lado, na citocinese simultânea, as placas celulares que separam os micrósporos são formadas apenas ao final da segunda divisão meiótica (MAHESHWARI, 1950). Nas monocotiledôneas, a citocinese é predominantemente do tipo sucessiva (FURNESS; RUDALL, 1999a; FURNESS; RUDALL; SAMPSON, 2002; RESSAYRE, 2001; FURNESS; RUDALL; SAMPSON, 2002; PENET *et al.*, 2005; NADOT *et al.*, 2006) através de placas celulares centrífugas (PENET *et al.*, 2005; NADOT *et al.*, 2006).

Caracteres como o tipo de citocinese e a formação das placas celulares têm apresentado significado sistemático em alguns grupos de monocotiledôneas, como Dioscoreales, Asparagales e Poales (FURNESS; RUDALL, 1999a). Além disso, sabe-se que o tipo de citocinese influencia o tipo de tétrade que se forma ao final da meiose e que estas características podem determinar os padrões de abertura no grão de pólen (FURNESS; RUDALL, 1999a; FURNESS; RUDALL; SAMPSON, 2002; PENET *et al.*, 2005; NADOT *et al.*, 2006; SANNIER *et al.*, 2006).

As Angiospermas apresentam grande diversidade de padrões de abertura polínica (WALKER; DOYLE, 1975), definidos pela forma, estrutura, número e distribuição das aberturas (RESSAYRE *et al.*, 2002). Nas Monocotiledôneas, o padrão básico é o de uma única abertura distal, enquanto nas Eudicotiledôneas, o padrão mais comum é o de três aberturas equatoriais (RESSAYRE *et al.*, 2002).

Em Monocotiledôneas, não é rara a ocorrência de pólen do tipo inaperturado, tendo surgido diversas vezes, independentemente, na história do grupo (FURNESS; RUDALL, 1999b). A ausência de abertura é geralmente acompanhada pela redução na espessura e complexidade da exina (ZAVADA,

1983), podendo ser apenas uma fina camada sem estruturação e ornamentação ou estar ausente (PETTITT; JERMY, 1975; ZAVADA, 1983; FURNESS; RUDALL, 1999b). São reconhecidos dois tipos de pólen inaperturado nas Monocotiledôneas: omniaperturado (THANIKAIMONI, 1984), em que qualquer local da parede pode funcionar como abertura para a germinação do tubo polínico; e funcionalmente monoaperturado (FURNESS; RUDALL, 1999b), em que há uma região claramente definida para o crescimento do tubo, marcada por um espessamento localizado da intina.

Para explicar a ontogenia do padrão de abertura polínica, Ressayre *et al.* (2002) propuseram que, para espécies de Angiospermas com seis ou menos aberturas, o progresso na citocinese durante a microsporogênese define os locais em que as aberturas irão se localizar nas tétrades de micrósporos. Em muitos casos, a redução ou perda de aberturas no pólen e redução na espessura e complexidade da exina ocorre em táxons hidrófilos (ZAVADA, 1983; FURNESS; RUDALL, 1999b) ou em grupos com polinização altamente especializada (ZAVADA, 1983). Nestes grupos, fatores ambientais que influenciem as relações hídricas do pólen são reduzidos e reduções na exina podem ser esperadas (ZAVADA, 1983).

Nas Alismatales, o pólen inaperturado caracteriza Potamogetonaceae e as demais famílias, particularmente aquáticas, onde está associado à hidrofília (FURNESS; RUDALL, 1999b). Em *Potamogeton*, o pólen é inaperturado (PETTITT; JERMY, 1975; FURNESS; RUDALL, 1999b) e as espécies foram descritas como anemófilas ou hidrófilas (polinização) e hidroautogâmicas (sistema em que a polinização é mediada por uma bolha de ar sob a água) (PROCTOR; YEO, 1973; PHILBRICK, 1988; GUO; COOK, 1989).

Dentre as espécies de *Potamogeton* ocorrentes no Brasil foram selecionadas três: *Potamogeton pusillus* L., que apresenta inflorescências emersas ou imersas (RODRIGUES; IRGANG, 2001) e polinização hidroautogâmica (PHILBRICK; ANDERSON, 1987), *Potamogeton illinoensis* Morong, com inflorescências exclusivamente emersas (RODRIGUES; IRGANG, 2001) e modo de polinização desconhecido, e *Potamogeton polygonus* Cham. *et* Schltdl, com inflorescências emersas ou imersas (RODRIGUES; IRGANG, 2001) e polinização também desconhecida. O objetivo deste estudo foi investigar a microsporogênese, a microgametogênese e a estrutura da parede do grão de pólen nessas três espécies

de *Potamogeton*, para entender a formação do pólen e contribuir para a biologia da família em Alismatales.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de cada espécie foram coletadas nos municípios de Iretama (*Potamogeton. pusillus* L), General Carneiro e Palmas (*P. polygonus* Cham. et Schtdl.), no Estado do Paraná, e Bonito (*P. illinoensis* Morong), no Estado do Mato Grosso do Sul. O material testemunho encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB), aguardando número de registro.

Inflorescências em diversos estágios de desenvolvimento foram fixadas em glutaraldeído 1% e formaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (MCDOWELL; TRUMP, 1976), para processamento e análise em microscopia de luz (ML) e eletrônica de varredura (MEV). O material destinado à microscopia de luz foi incluído em hidroxietilmetacrilato (GERRITS; SMID, 1983) e seccionado com espessura de 2-5 µm. As secções foram coradas com Azul de Toluidina O 0,05% 0,1 M em tampão fosfato de sódio pH 6,8 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1965).

Para a microscopia de epifluorescência, anteras fixadas foram selecionadas e lavadas em tampão fosfato (cinco vezes de 15 minutos). Em seguida, cada antera foi aberta sobre lâmina e coberta com uma gota de azul de anilina 0,05%. Após cinco minutos, o excesso do reagente foi retirado e a antera foi coberta por uma gota de gelatina glicerinada e lamínula. As lâminas foram deixadas em repouso, por uma noite, em refrigerador. As análises foram realizadas no microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot.

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e desidratadas em série etílica até etanol 70%. As inflorescências foram dissecadas, desidratadas em série de propanona e então submetidas a ponto crítico, no aparelho BAL-TEC CPD 030 e metalizadas com ouro no equipamento SCD 030 Balzers Union FL 9496. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6360LV.

O material destinado à microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi fixado sob vácuo em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato

de sódio 0,1M em pH 7,2 por 12-24 horas (KARNOVSKY, 1965, com modificação). Após a fixação, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 0,2%, infiltradas e incluídas em resina epóxi (SPURR, 1969). Foram obtidas secções ultrafinas em ultramicrotomo Leica Ultracut. As análises das amostras e os registros eletromicrográficos foram efetuados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1200EXII.

### 2.3. RESULTADOS

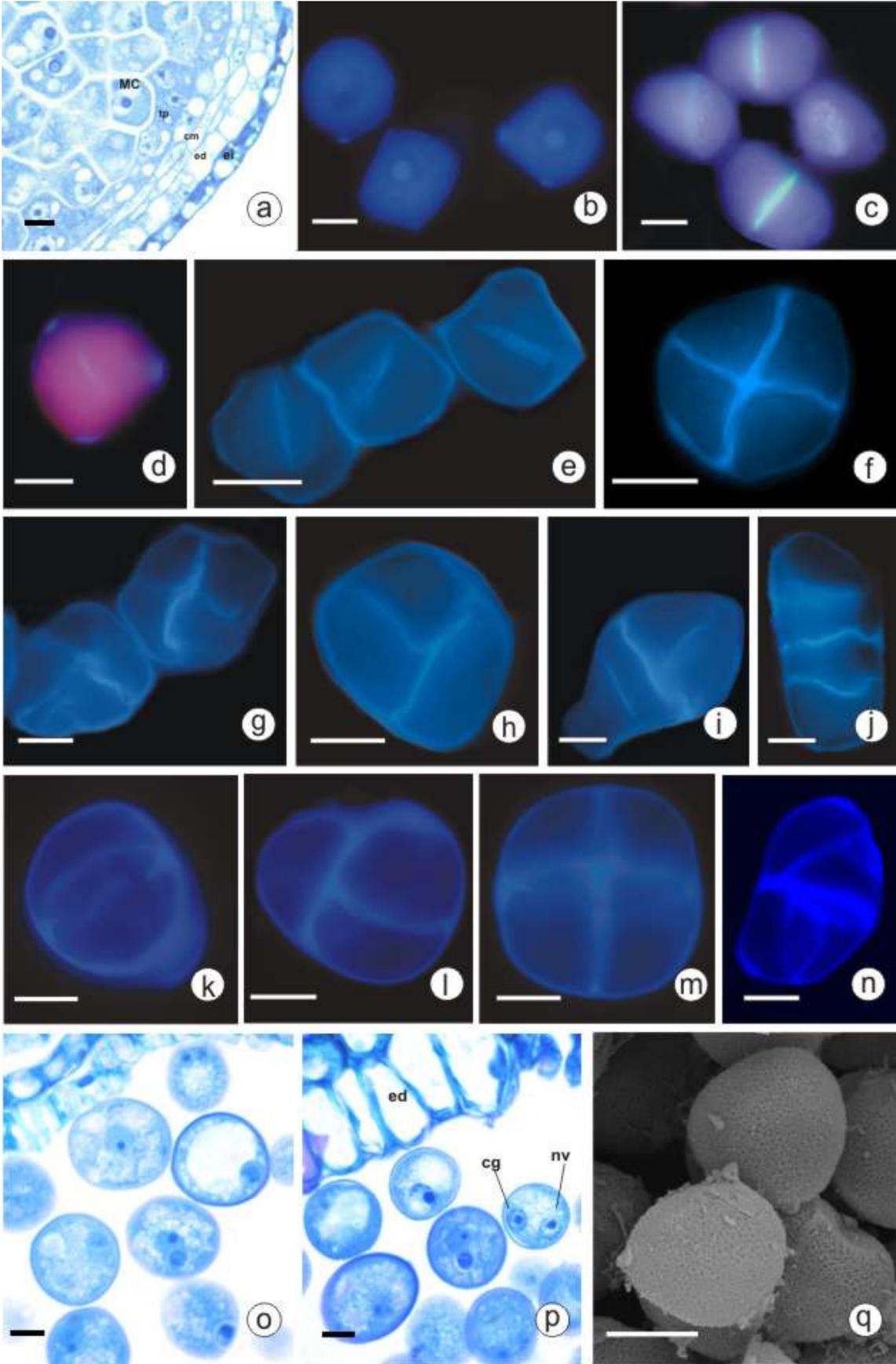
Durante a microsporogênese em *Potamogeton illinoensis*, *P. polygonus* e *P. pusillus*, a epiderme da antera é unisseriada, com células alongadas em corte transversal, apresenta cutícula fina e armazena amido até a fase de micrósporos livres (Fig. 1a). O endotécio apresenta células grandes, poliédricas e também armazena amido na forma de grandes grânulos até a fase de micrósporos livres (Fig. 1a). As camadas médias, em número de dois ou três, são constituídas por células alongadas e justapostas, que são obliteradas ao longo do processo (Fig. 1a). É também durante a microsporogênese que as células do tapete tornam-se binucleadas, perdem sua parede celular, e seus protoplastos migram para o interior do lóculo, unindo-se em um sincício, característico do tapete plasmodial (Fig. 1a).

Em *Potamogeton polygonus*, os microsporócitos apresentam depósito pequeno de calose em seus vértices (Fig. 1b), característica não observada nas demais espécies. A citocinese meiótica é sucessiva (Fig. 1c-m). Após a meiose I, uma parede delgada de calose é formada através de placas celulares centrífugas, originando díades de micrósporos (Fig. 1c-e). Ao final da meiose II, são formadas tétrades predominantemente tetragonais (regulares e irregulares) (Fig. 1f-g) e decussadas (Fig. 1h), ocorrendo em menor proporção tétrades em "T" (Fig. 1i), lineares (Fig. 1j) e em outras formas não definidas. Em *Potamogeton pusillus*, não foi possível caracterizar a formação das paredes entre os micrósporos, nem foram observadas díades de micrósporos, entretanto, os microsporócitos apresentaram um anel de calose conspícuo (Fig. 1k). Nesta mesma espécie, as paredes de calose são mais finas (Fig. 1k-n) e houve predomínio de tétrades decussadas (Fig. 1l) e tetragonais (Fig. 1m), com ocorrência esporádica de tétrades de formas não definidas (Fig. 1n).

A microgametogênese ocorre através de duas divisões mitóticas sucessivas (Fig. 1o-p), resultando em grãos de pólen tricelulares. O grão de pólen é apolar, esférico a oval, inaperturado, com exina reticulada (Figs 1q, 2a-b) e intina pécto-celulósica. O padrão de reticulação da exina é diferente nas três espécies, sendo compacto em *P. illinoensis* (Fig. 1q), aberto em *P. pusillus* (Fig. 2a) e intermediário em *P. polygonus* (Fig. 2b). Em anteras que ainda não tinham sofrido deiscência, eventualmente, foi observada uma estrutura semelhante a tubo polínico na superfície do grão de pólen, com ruptura da exina. Tais estruturas podem ser ramificadas e formar redes complexas que interconectam grãos de pólen (Fig. 2c), não correspondendo a tubos polínicos verdadeiros, mas provavelmente a hifas de fungos aquáticos.

A exina é formada pela sexina, de estrutura tectada (sexina 2) e columelada (sexina 1) e com uma camada fina de nexina 1 (Fig. 2d-i). Em *P. illinoensis* a densidade de elementos da sexina 1 é superior às das demais espécies (Fig. 2d-e); *P. pusillus*, por sua vez, apresenta a menor densidade de sexina 1 (Fig. 2f-g) e *P. polygonus* apresenta densidade intermediária (Fig. 2h-i). A intina não foi observada em *P. illinoensis*, mas é relativamente espessa e apresenta estrutura fibrilar nas demais espécies (Fig. 2g-i). A intina eventualmente parece mais espessa em uma porção do grão de pólen (Fig. 2h-i).

FIGURA 1 - Microsporogênese, microgametogênese e morfologia do pólen em *Potamogeton*. (a) Antera em corte transversal com microsporócitos em fase pré-meiótica. (b) Microsporócitos com depósitos de calose em seus vértices. (c) Primeira divisão meiótica, através de placas celulares centrífugas. (d) Placa celular centrífuga em microsporócito com depósitos de calose nos vértices. (e) Microsporócitos com placa celular centrífuga e sem depósitos de calose nos vértices. (f) Tétrade tetragonal regular. (g) Tétrades tetragonais irregulares. (h) Tétrade decussada. (i) Tétrade em "T". (j) Tétrade linear. (k) Microsporócito com anel de calose. (l) Tétrade decussada. (m) Tétrade tetragonal. (n) Tétrade em forma não definida. (o) Início da microgametogênese. (p) Grão de pólen em estágio bicelular. (q) Grãos de pólen com exina reticulada. *P. polygonus* em a-d, f, i, o-p; *P. illinoensis* em e, g, h, j e q; *P. pusillus* em k-n. cm. camadas médias; cg. célula generativa; ei. epiderme; ed. endotécio; MC. microsporócito; nv. núcleo da célula vegetativa; tp. tapete. Barras de escala= 10  $\mu$ m.



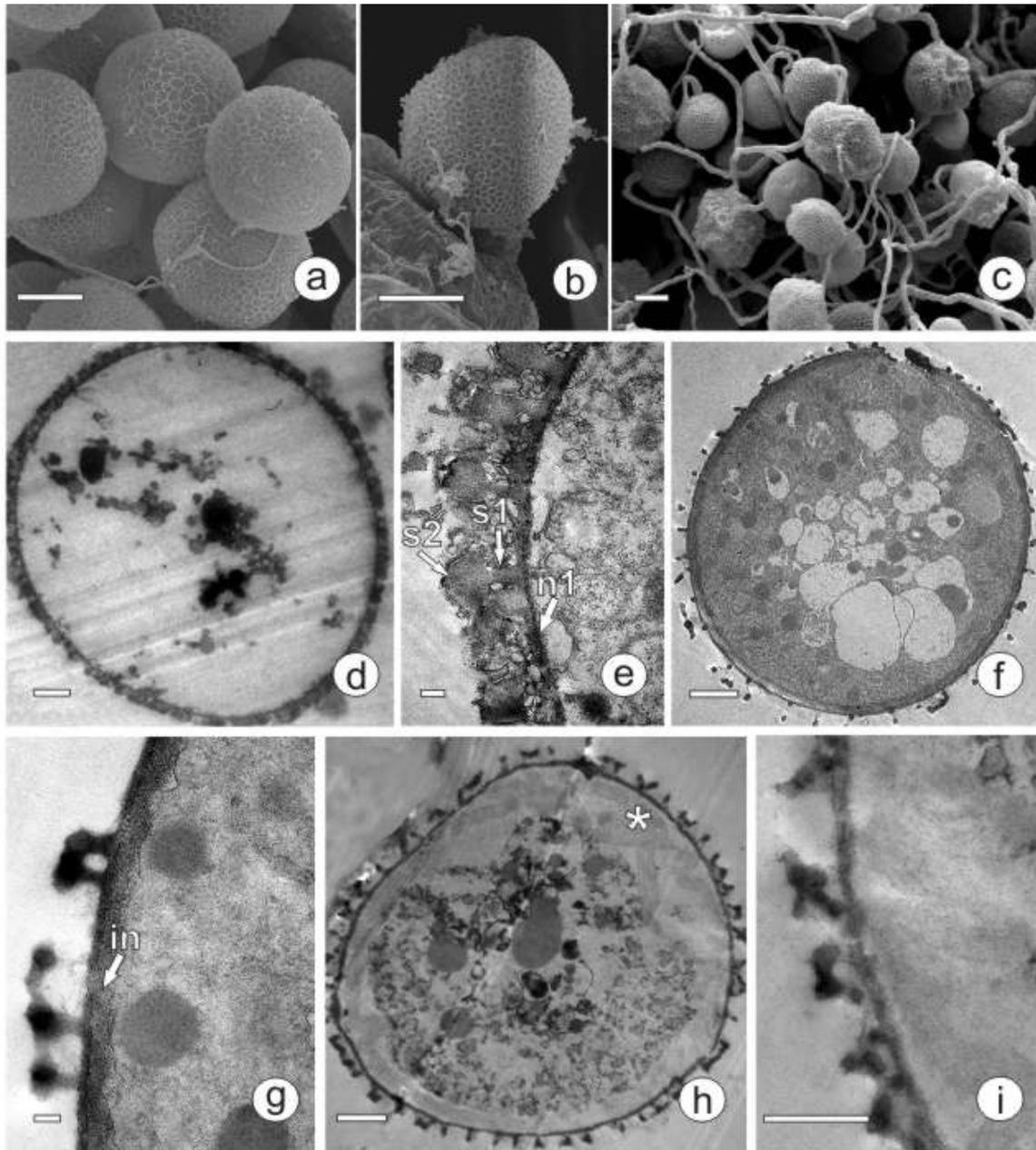


FIGURA 2 - Morfologia e ultraestrutura do pólen de *Potamogeton*. (a-b) Grãos de pólen esféricos, inaperturados e com exina de ornamentação reticulada. (c) Grãos de pólen com estruturas semelhantes a tubos polínicos. (d) Grão de pólen com a maior densidade de elementos de sexina 1. (e) Detalhe da estrutura da parede do grão de pólen, a exina é formada pela nexina 1 e sexinas 1 e 2. (f) Pólen com a menor densidade de elementos de sexina 1. (g) Ultraestrutura da parede de pólen, com intina de estrutura fibrilar. (h) Grão de pólen com densidade intermediária de elementos de sexina 1, intina com região mais espessada em uma das porções do grão (asterisco). (i) Detalhe da porção espessada da intina. *P. pusillus* em a, f, g; *P. illinoensis* em d-e; *P. polygonus* em b-c, h-i. in. intina; n1. nexina 1; s1. sexina 1; s2. sexina 2. Barras de escala= 10μm em a-c; 2 μm em d, f, h; 0,2μm em e, g, i.

## 2.4. DISCUSSÃO

Em *Potamogeton polygonus* e *P. illinoensis* aqui estudadas, a citocinese é sucessiva com placas celulares centrífugas. Esta é a seqüência de desenvolvimento mais difundida nas monocotiledôneas (FURNESS; RUDALL, 1999a; FURNESS; RUDALL; SAMPSON, 2002; PENET *et al.*, 2005; NADOT *et al.*, 2006). Entretanto, variações nesses padrões pré-estabelecidos têm sido observadas, como a ocorrência de citocinese simultânea e sucessiva em microsporócitos de lóculos diferentes de um mesmo estame (SANNIER *et al.*, 2006), ocorrência de citocinese intermediária - em que há formação de uma parede celular efêmera (FURNESS; RUDALL; SAMPSON, 2002), formação da parede interespórica centripetamente (PENET *et al.*, 2005; NADOT *et al.*, 2006), bem como a ocorrência de mais de um tipo de tétrade de micrósporos (PETTITT, 1981; HARDY; STEVENSON, 2000; HARDY; STEVENSON; KISS, 2000; RESSAYRE, 2001; PENET *et al.*, 2005; NADOT *et al.*, 2006; SANNIER *et al.*, 2006).

Em *P. pusillus*, não foram observadas díades de micrósporos, nem foi possível caracterizar a formação das placas celulares, indicando que talvez a citocinese pudesse ser simultânea. Além disso, foi observado um anel de calose no microsporócito, e menor variabilidade no tipo de tétrades (tetragonal, decussado e poucas formas não definidas), característica também observada em algumas Iridaceae (PENET *et al.*, 2005), e relacionadas à citocinese simultânea. Uma das hipóteses para explicar tal fenômeno é que esta seria uma forma de restringir os tipos de tétrades àqueles semelhantes aos da citocinese sucessiva, canalizando, dessa forma, a morfologia do pólen (PENET *et al.*, 2005).

A variação no tipo de tétrades de *Potamogeton* está sendo descrita pela primeira vez neste trabalho, com tétrades: tetragonais, decussadas, lineares, em "T" e em formas não definidas. Variabilidade semelhante relacionada à formação de pólen inaperturado foi relatada em espécies de *Strelitzia* (Strelitziaceae) por Nadot *et al.* (2006), e nossos dados corroboram a hipótese desses autores de que em espécies com pólen inaperturado ocorre a liberação da restrição no tipo de tétrade formada, uma vez que nenhuma abertura será formada.

Em *Potamogeton*, como aqui verificado, a microsporogênese é um processo muito rápido, o que dificulta a visualização de todas as suas etapas. Entretanto, a formação das paredes entre os micrósporos parece ser um processo único, no qual

tanto a formação das placas celulares quanto a deposição de calose adicional nestas ocorre simultaneamente, não sendo, portanto, observados pontos específicos em que a deposição de calose é completada. Se esta observação se confirmar em outras espécies, seria uma possível explicação para a ausência de aberturas no pólen de *Potamogeton*.

A irregularidade na espessura da intina eventualmente observada no pólen de *Potamogeton polygonus* e *P. pusillus* permitiria classificá-lo em funcionalmente monoaperturado, como proposto por Furness e Rudall (1999b), e observado por Wodehouse (1935) e Cranwell (1953) em outras espécies do gênero. Porém, Pettitt e Jermy (1975), ao estudar a ultraestrutura da parede polínica de *P. natans* e *P. pectinatus* não relatam tal espessamento. Nas espécies aqui estudadas, acredita-se que esta característica seja um artefato de processamento, que causa a desestruturação da estrutura fibrilar da intina.

Ainda que tal espessamento seja legítimo, este parece ocorrer em uma grande área da intina e não apenas em um determinado ponto, de modo que talvez o tubo polínico tenha uma ampla área de germinação. Esta observação indica que o pólen de *Potamogeton* não se enquadra em nenhum dos subtipos atuais - funcionalmente monoaperturado e omniaperturado -, e reforça a afirmação de Furness e Rudall (1999b), de que o pólen inaperturado parece representar mais de um caráter. Outra hipótese a ser explorada em relação a esta característica é a possibilidade de que o espessamento ocorra em algumas espécies e em outras não, relacionando-se aos diferentes modos de polinização.

A causa, durante o desenvolvimento, para a ausência de aberturas no grão de pólen permanece desconhecida, e as hipóteses levantadas sugerem que seria devido à redução ou ausência de exina (ZAVADA, 1983; FURNESS; RUDALL, 1999b). Como a formação de aberturas pode relacionar-se a mecanismos que interrompem a deposição da primexina (HESLOP-HARRISON, 1963; WATERKEYN; BIENFAIT, 1970; ROWLEY, 1975), é provável que estes mecanismos estejam ausentes na formação da parede dos grãos de pólen inaperturados. Além disso, o fato de o pólen inaperturado ter surgido várias vezes independentemente nas Monocotiledôneas (FURNESS; RUDALL, 1999b) indica que a maneira como ele é formado pode ser diferente em cada grupo e talvez esta seja a dificuldade em se discutir o caráter inaperturado.

Os dados aqui apresentados para *Potamogeton polygonus*, *P. pusillus* e *P. illinoensis*, sustentam a hipótese de que em grãos de pólen inaperturados há uma liberação na restrição ao tipo de tétrade. Além disso, os dados sugerem que a ausência de aberturas no pólen de *Potamogeton* deve-se à deposição de calose como um processo de apenas um passo nas paredes dos micrósporos durante a microsporogênese, contribuindo para o conhecimento deste processo em Potamogetonaceae e também para as demais Alismatales e monocotiledôneas.

### 3. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO FLORAL E MORFOLOGIA DO ANDROCEU E GINECEU EM TRÊS ESPÉCIES DE *Potamogeton* (POTAMOGETONACEAE, ALISMATALES)

#### 3.1. INTRODUÇÃO

Potamogetonaceae Reichenbach está atualmente incluída em Alismatales, ordem considerada basal dentre as Monocotiledôneas e que agrega a maior parte das angiospermas aquáticas (APG II, 2003). Dentre as sinapomorfias florais que sustentam a ordem, destacam-se: anteras extrorsas, carpelos com canais completamente não fusionados e estiletos separados (STEVENS, 2008). Tradicionalmente, a família compreende dois gêneros: *Groenlandia* J. Gay., monotípico, e *Potamogeton* L., com 80-100 espécies (LINDQVIST *et al.*, 2006). Mais recentemente, a inclusão dos gêneros *Stuckenia* Börner - antes considerado subgênero *Coleogeton* de *Potamogeton* - e *Zannichellia* L. tem recebido suporte morfológico (LES; HAYNES, 1996) e molecular (LES; CLELAND; WAYCOTT, 1997; APG II, 2003; LINDQVIST *et al.*, 2006). Outros gêneros, tradicionalmente inclusos em Zannichelliaceae também são citados como representantes de Potamogetonaceae (por exemplo APG II, 2003; LES; CLELAND; WAYCOTT, 1997).

Segundo Endress (2005), estudos morfológicos nas monocotiledôneas basais têm se mostrado importantes na compreensão da evolução das angiospermas em geral. Para Potamogetonaceae, foram realizados diversos estudos do desenvolvimento floral em espécies de *Potamogeton* na tentativa de esclarecer a natureza da unidade floral e da inflorescência do gênero (SATTLER, 1965; SINGH, 1965; POSLUSZNY; SATTLER, 1973, 1974, 1986; POSLUSZNY, 1981). A discussão foi iniciada por Kunth (1841), que considerou a unidade floral de *Potamogeton* como resultado da redução de uma inflorescência composta por quatro flores pistiladas circundadas por quatro flores estaminadas. Esta interpretação recebeu suporte de alguns autores que consideraram como evidências: a natureza das tépalas (interpretadas como apêndices do conectivo), os estames opostos às tépalas, a grande distância entre as tecas da antera e a origem bi-primordial dos estames laterais em algumas espécies - cada estame é iniciado como dois primórdios separados, que se fundem durante o desenvolvimento

(KUNTH, 1841; MIKI, 1937; UHL, 1947; SINGH, 1965; POSLUSZNY; SATTLER, 1973).

Por outro lado, outros autores interpretaram a unidade floral como uma flor simples (SINGH, 1965; SATTLER, 1965; POSLUSZNY; SATTLER; 1974; POSLUSZNY; CHARLTON, 1986), devido ao surgimento do perianto anterior ao do androceu, ausência de modificações na vascularização floral e origem uni - primordial dos estames nas espécies estudadas - cada estame é iniciado com um único primórdio.

Em *Potamogeton*, o androceu é constituído por quatro estames sésseis, opostos às tépalas e com anteras extrorsas (POSLUSZNY; SATTLER, 1974; POSLUSZNY, 1981; SUN *et al.*, 2000). O gineceu é formado por quatro (um ou dois em algumas espécies) carpelos livres e ascidiados, irrigados por um feixe vascular dorsal e um ventral, e apresentando um único óvulo por carpelo (HEGELMAIER, 1870; POSLUSZNY; SATTLER, 1974; POSLUSZNY, 1981; CHARLTON; POSLUSZNY, 1991; SUN *et al.*, 2000). Os óvulos foram descritos como anátropos (POSLUSZNY; SATTLER, 1974; POSLUSZNY, 1981), ortótropos (IGERSHEIM; BUZGO; ENDRESS, 2001) ou orto-campilótropos (TAKASO; BOUMAN, 1984).

O objetivo deste estudo foi estudar o desenvolvimento floral e a morfologia do androceu e gineceu em três espécies de *Potamogeton*, procurando levantar características que possam auxiliar na definição da unidade floral no gênero e na sua taxonomia. Dentre as espécies que ocorrem no Brasil, foram selecionadas três, utilizando-se como critérios sua distribuição e inclusão ou não em análises filogenéticas moleculares disponíveis: *Potamogeton pusillus* L. é cosmopolita, *P. illinoensis* Morong é endêmica do continente americano e *P. polygonus* Cham. *et* Schtdl. é endêmica da América do Sul. Destas, apenas *P. pusillus* e *P. illinoensis* foram incluídas nas análises filogenéticas de Lindqvist *et al.* (2006).

### 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de cada espécie foram coletadas nos municípios de Iretama (*Potamogeton. pusillus* L), General Carneiro e Palmas (*P. polygonus* Cham. et Schltl.), no Estado do Paraná, e Bonito (*P. illinoensis* Morong), no Estado do Mato Grosso do Sul. O material testemunho encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB), aguardando número de registro.

Inflorescências em diversos estágios de desenvolvimento foram fixadas em glutaraldeído 1% e formaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (MCDOWELL; TRUMP, 1976), para processamento e análise em microscopia de luz e eletrônica de varredura.

O material destinado à microscopia de luz (ML) foi incluído em hidroxietilmetacrilato (GERRITS; SMID, 1983) e seccionado com espessura de 2-5 µm. As secções foram coradas em Azul de Toluidina O 0,05% 0,1 M em tampão fosfato de sódio pH 6,8 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1965).

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e desidratadas em série etílica até etanol 70%. Em seguida, as inflorescências foram dissecadas sob estereomicroscópio e desidratadas em série de propanona e então submetidas a ponto crítico, no aparelho BAL-TEC CPD 030. As amostras foram montadas em suporte metálico e metalizadas com ouro no equipamento SCD 030 Balzers Union FL 9496. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6360LV.

Para a determinação do número médio de flores por inflorescência de cada espécie foram selecionadas cinco inflorescências de cada, das quais o número de flores foi contado com auxílio de estereomicroscópio.

### 3.3. RESULTADOS

Será apresentada uma única descrição para as três espécies estudadas, uma vez que, em linhas gerais, estas seguiram o mesmo padrão de desenvolvimento floral. As diferenças existentes serão salientadas ao longo do texto.

Cada inflorescência, do tipo espiga, pode apresentar número variável de flores, em média três em *Potamogeton pusillus* (Fig. 1a), sete em *P. polygonus* (Fig. 1b) e mais de 40 em *P. illinoensis* (Fig. 1c). As flores são sésseis e arranjadas compactamente, não precedidas por estruturas similares a brácteas (Fig. 1a-d), com exceção da flor proximal, que eventualmente apresenta um primórdio diminuto, com não mais que três camadas de células (Fig. 1a, e – seta). O eixo da inflorescência e as tépalas são preenchidos por aerênquima (Fig. 1d-e).

No eixo da inflorescência, os primórdios florais surgem de maneira acrópeta e espiralada (Fig. 1f-h). No meristema floral, simultaneamente surgem os dois primórdios de tépalas laterais, seguidos dos dois primórdios de tépalas medianas (Fig. 1i-j). Apesar do atraso na iniciação das tépalas medianas, estas passam a apresentar tamanho semelhante àquele das laterais ao longo do desenvolvimento (Figs. 1k-l, 2a-c). Cada tépala é irrigada por um único feixe vascular (Fig. 2d) e se abre na antese, expondo o androceu e gineceu (Fig. 2e).

A ordem de surgimento dos primórdios de estames segue a mesma ordem das tépalas (Fig. 1i-j). Os estames surgem de primórdios individualizados, opostos aos primórdios de tépalas (Fig. 1j-l), em dois verticilos. O verticilo externo é oposto às tépalas laterais e, o interno oposto às tépalas medianas. Inicialmente, cada estame uni-primordial apresenta formato alongado (Fig. 1j-k) e, posteriormente, adquire formato bilobado (Figs 1k – seta, l, 2a).

No estágio seguinte, inicia-se a diferenciação dos microsporângios (Fig. 2a, c). Cada estame apresenta um único feixe vascular, derivado daquele que irriga a tépala (Fig. 2d – seta). Quando maduros, os estames possuem anteras bitecas e tetrasporangiadas, que atingem seu tamanho final antes da completa formação dos carpelos (Fig. 2f-g). Cada estame é adnato à tépala oposta, suas anteras são extrorsas e as tecas unidas apenas pela região mediano-basal do conectivo (Fig. 2g).

Após a iniciação dos estames, o ápice floral torna-se quadrangular e, em seguida, são iniciados os primórdios carpelares em cada vértice (Figs 1l, 2a). Os

primórdios são individualizados, circulares e alternados aos primórdios estaminais (Fig. 2a-b). Um único óvulo é formado em cada carpelo, na parede ventral, antes da delimitação do lóculo do ovário (Fig. 2b – seta). O carpelo é ascidiado, uma vez que o primórdio surge como uma concavidade no meristema floral e com as margens congenitamente fusionadas; sua parede cresce e forma a cavidade do lóculo, o estilete curto e o estigma, sem fusão pós-genital (Fig. 2b-c, e-f, h). Após o fechamento do carpelo, resta uma abertura em forma de fenda, mais apical em *P. pusillus* e mais voltada para a porção ventral em *P. polygonus* (Fig. 2c, e-f, h-i).

Os carpelos maduros são livres, com estigma papiloso, que começa a formar-se nas margens da fenda e estende-se dorsalmente (Fig. 2i-j). O tecido de transmissão conecta a abertura em fenda do estilete ao lóculo do ovário e é pouco diferenciado (Figs 2j, 3a). Um único feixe irriga o carpelo, bifurcando-se e originando um ventral e outro dorsal (Fig. 2j – seta). O feixe ventral irriga o óvulo, enquanto que o dorsal termina abaixo da região estigmática (Fig. 2 j).

As papilas estigmáticas apresentam conteúdo, mas não foi observada secreção externamente ao estigma. O estigma apresenta formato diferente em cada espécie: em *P. pusillus* apresenta uma superfície ampla, com a maior razão largura/comprimento e abertura carpelar apical e localizada no centro de uma depressão (Fig. 3b); em *P. polygonus* a área superficial tem razão largura/comprimento intermediária, com o maior diâmetro no sentido dorso-ventral e abertura carpelar ventral localizada no centro de uma depressão profunda (Fig. 3c). Em ambas as espécies, os estigmas são fendidos (Fig. 3d). Em *P. illinoensis*, no entanto, o estigma é estreito e alongado do ápice em direção à porção ventral do carpelo, e seu desenvolvimento será detalhado a seguir.

O desenvolvimento carpelar de *P. illinoensis* é similar ao das outras espécies até o momento em que o óvulo é iniciado. O fechamento do carpelo e a formação do estigma ocorrem de maneira distinta. A parede ventral altera-se pouco em forma e dimensão (Fig. 3e). Por outro lado, a parede dorsal, desenvolve-se pronunciadamente, sobrepondo-se à ventral, sendo a responsável pelo formato final do carpelo (Fig. 3e). Como resultado desta sobreposição, a maior parte da porção ventral do carpelo é formada pela parede dorsal (Fig. 3e). Em MEV é possível observar que uma abertura circular é delimitada nesta região (Fig. 3f-g – seta). Em corte longitudinal do carpelo, esta abertura localiza-se logo acima da placenta (Fig. 3e).

A formação do estigma de *P. illinoensis* é iniciada no ápice do carpelo (Fig. 3f), com a diferenciação das células desta região em papilas. Tal diferenciação se estende do ápice até a abertura, resultando em um estigma em forma de crista, posicionado ventralmente e formado exclusivamente pela parede dorsal do carpelo (Fig. 3g-h).

A flor das espécies de *Potamogeton* estudadas apresenta uma organização simples, com filotaxia verticilada, perigônio e androceu dímeros e carpelos tetrâmeros. Os carpelos são alternados aos estames, que por sua vez são opostos e adnatos às tépalas (Fig. 3i). Não foi observada variação de número e posição no perigônio ou androceu. Porém, os carpelos surgiram eventualmente opostos aos estames e apresentaram alguma variação em número, especialmente em flores distais na inflorescência. Em *P. polygonus*, apenas uma flor com cinco carpelos foi observada e em *P. pusillus*, flores com três e cinco carpelos foram observadas com baixa frequência. *Potamogeton illinoensis* apresentou maior frequência de variações na ordem e no número dos carpelos, variando de um a cinco; por vezes uma mesma inflorescência apresentou flores com um a quatro carpelos.

Os carpelos encontram-se próximos uns aos outros (Figs 2e, 3j), de modo que seus estigmas podem tornar-se contíguos. Logo após a antese, os carpelos divergem e tal contato é desfeito (Fig. 3c). Em *P. illinoensis*, devido à proximidade dos carpelos (Fig. 3j) e a forma dos estigmas o contato entre os últimos é maior e se dá na porção mais ventral de cada carpelo.

Foram observados grãos de pólen nos estigmas de flores em antese, com tubos polínicos desenvolvidos, indicando a receptividade do estigma (Fig. 3k). A deiscência das anteras é longitudinal e ocorre concomitante à receptividade dos estigmas (Fig. 3c).

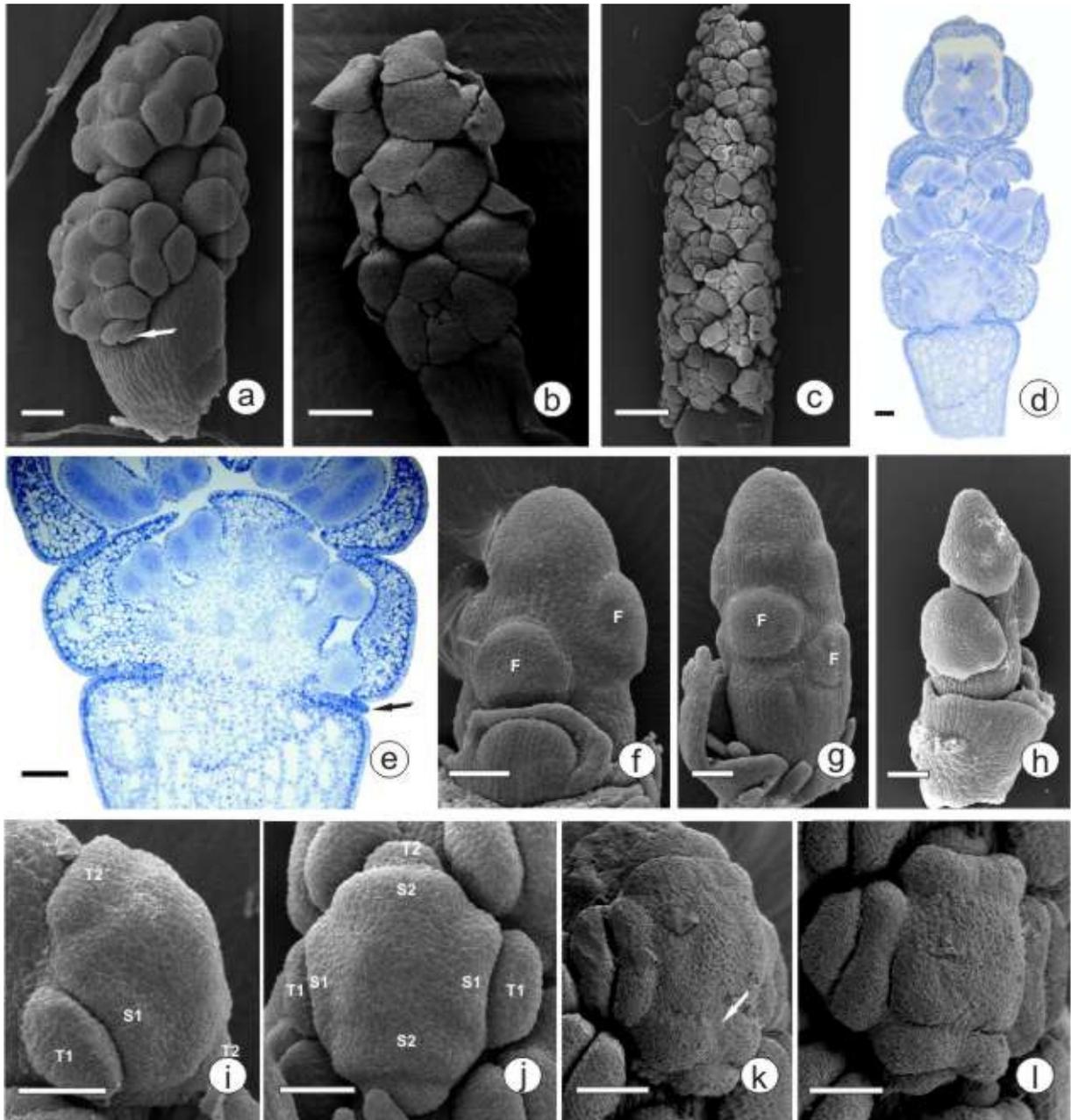


FIGURA 1 - Desenvolvimento floral de *Potamogeton*. *P. pusillus* em a, h; *P. illinoensis* em c; *P. polygonus* nas demais imagens. (a) Inflorescência jovem com três flores iniciadas espiraladamente no eixo floral, notar a presença de um primórdio pequeno junto à flor proximal (seta). (b) Inflorescência antes da antese com oito flores. (c) Inflorescência jovem com várias flores. (d) Corte longitudinal de uma inflorescência jovem, com tépalas e eixo floral compostos por aerênquima. (e) Detalhe da região proximal da inflorescência com um primórdio pequeno iniciado antes da primeira flor (seta). (f-h) Diferenciação dos meristemas florais de maneira acrópeta e espiralada no eixo da inflorescência. (i) Iniciação dos primórdios das tépalas laterais, seguidos dos primórdios medianos e finalmente dos estames laterais. (j) Iniciação dos primórdios estaminais na mesma ordem que as tépalas. (k) Formação de sulco que torna o primórdio estaminal bilobado (seta). (l) Primórdios estaminais bilobados e ápice floral quadrangular, imediatamente antes da iniciação dos primórdios carpelares. As inflorescências e flores estão orientadas com o ápice na posição superior da figura. F. meristema floral; S1. estames laterais; S2. estames medianos; T1. tépalas laterais; T2. tépalas medianas. Barras de escala = 200  $\mu\text{m}$  em b; 500  $\mu\text{m}$  em c; 100  $\mu\text{m}$  em d-e, h; 50  $\mu\text{m}$  nas demais imagens.

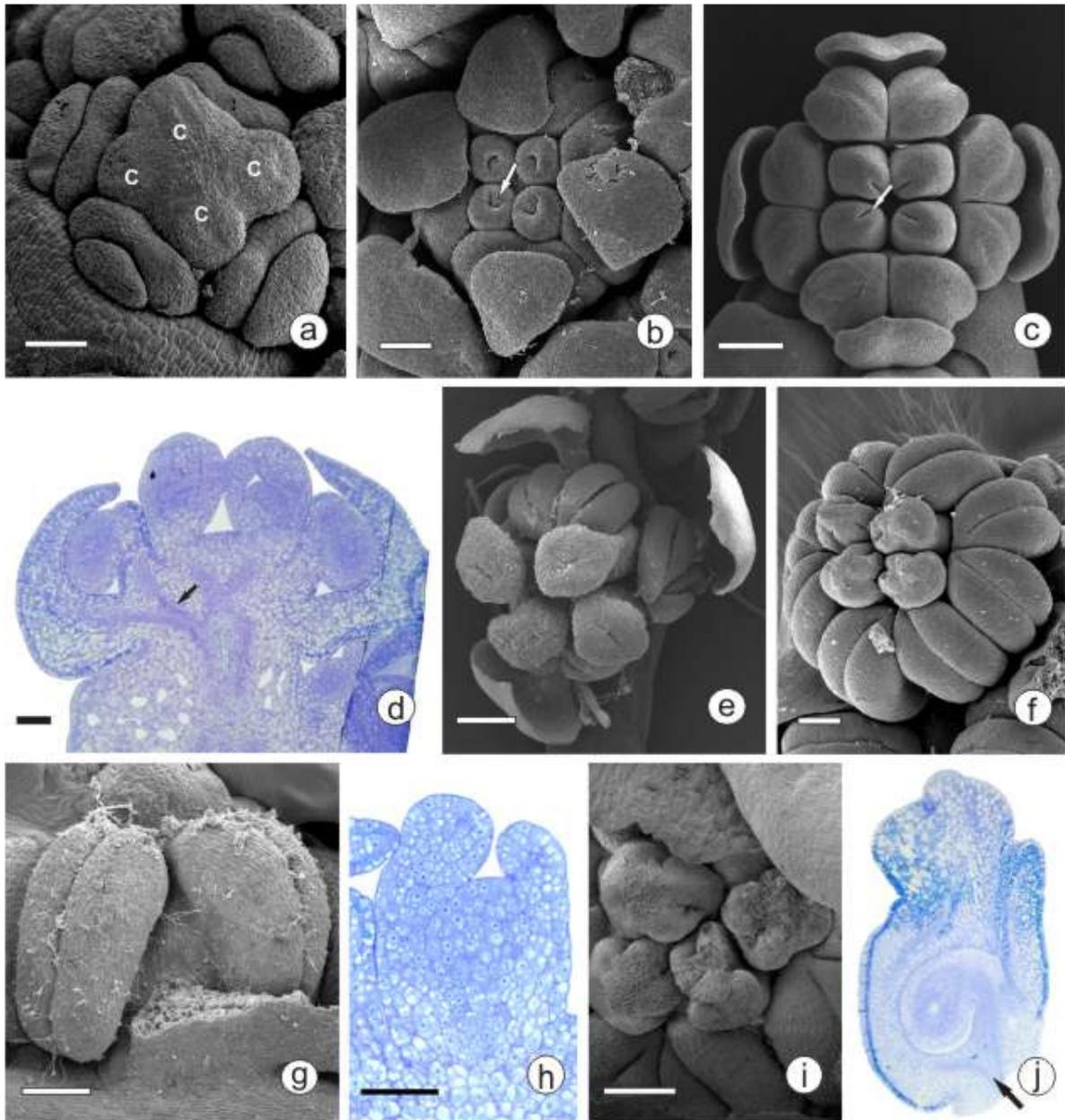


FIGURA 2 - Desenvolvimento floral de *Potamogeton*. *P. polygonus* em a, c-d, f-j; *P. illinoensis* em b; *P. pusillus* em c, e. (a) Iniciação dos primórdios carpelares circulares. (b) Delimitação do lóculo do ovário, com surgimento do óvulo na parede ventral (seta). (c) Flor com estames diferenciados em duas tecas e carpelos com abertura em fenda ventralizada (seta). (d) Flor em corte longitudinal mostrando os feixes vasculares que irrigam tépalas, estames e carpelos. (e) Flor madura com estigmas papilosos e abertura em fenda apical. (f) Flor em desenvolvimento com abertura em fenda ventral e estigma ausente. (g) Estame antes da deiscência, com as tecas da antera separadas pelo tecido conectivo. (h) Carpel logo após o fechamento em corte longitudinal, com óvulo na parede ventral. (i) Flor antes da antese, no início da formação do tecido estigmático ao redor da abertura carpelar. (j) Carpel maduro em corte longitudinal, com canal estilar não fusionado e tecido de transmissão simples e um feixe vascular que se bifurca (seta). As inflorescências e flores estão orientadas com o ápice na posição superior da figura; os carpelos estão com a parede ventral no lado direito da figura. C. carpelo. Barras de escala=50  $\mu$ m em a, d, h, j; 100  $\mu$ m em b-c; 200  $\mu$ m em e-g, i.

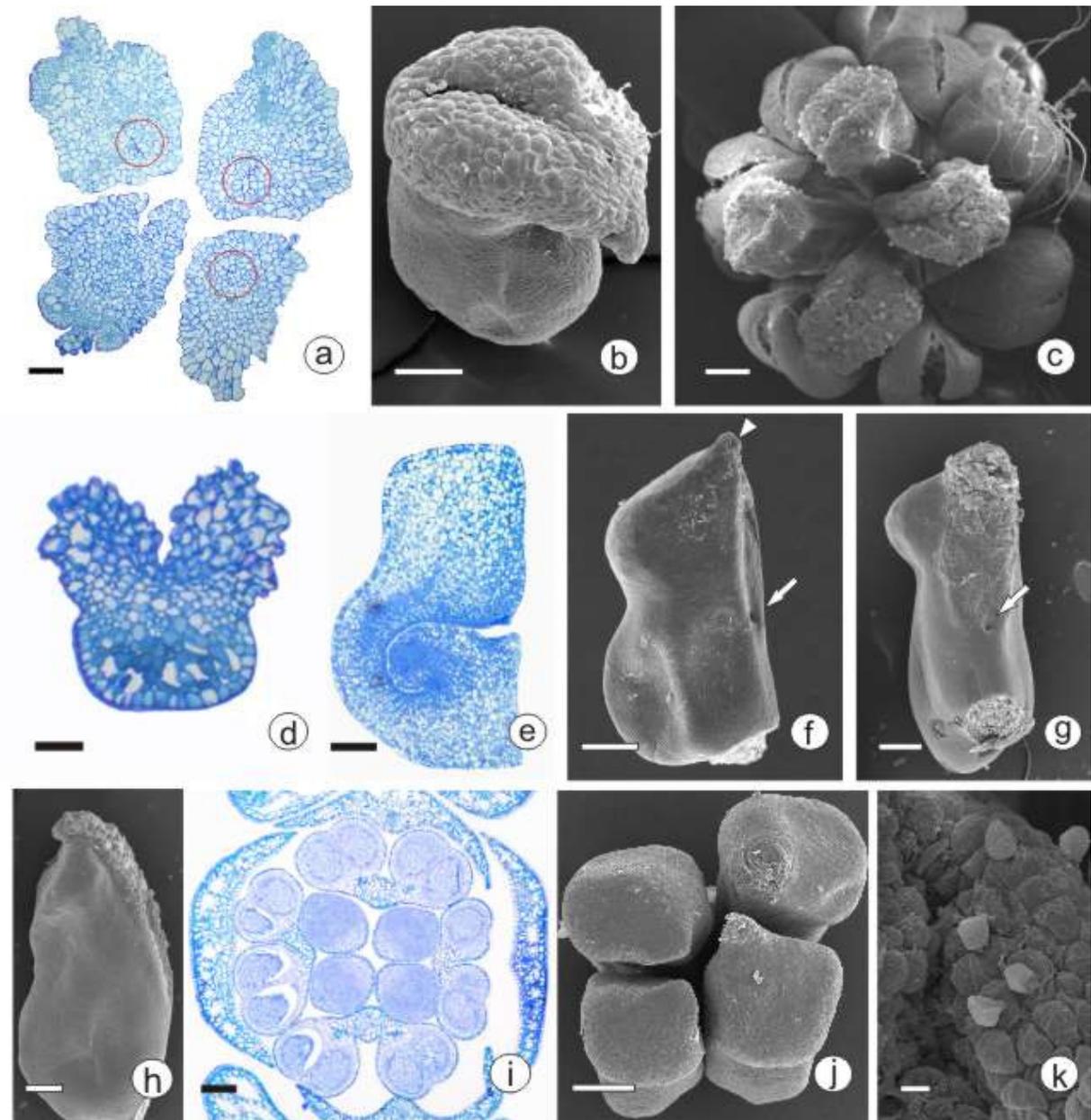


FIGURA 3 - Morfologia do carpelo e formação do estigma de *Potamogeton*. *P. polygonus* em a, c, i, k; *P. pusillus* em b, d; *P. illinoensis* em e-h, j. (a) Corte transversal dos quatro carpelos de uma mesma flor, na região abaixo do estigma, notar os canais estilares não fusionados com tecido de transmissão pouco diferenciado (círculos). (b) Estigma papiloso amplo, com abertura apical. (c) Estigma amplo com abertura ventral. (d) Corte transversal da região do estigma na porção fendida. (e) Carpelo jovem, com abertura acima da placenta. (f) Carpelo em estágio semelhante ao anterior, com abertura circular (seta) e iniciando a formação do estigma no ápice (cabeça-de-seta). (g) Carpelo com abertura circular e estigma em formação (seta). (h) Carpelo maduro, com estigma estreito que estende-se do ápice carpelar à abertura. (i) Flor jovem em corte transversal, com filotaxia verticilada. (j) Carpelos jovens de uma mesma flor arranjados compactamente. (k) Grãos de pólen germinando próximo à abertura carpelar. Barras de escala = 100  $\mu\text{m}$  em a, b, d, e, i; 200  $\mu\text{m}$  em c, f-h, j.

### 3.4. DISCUSSÃO

Nas inflorescências de *Potamogeton illinoensis*, *P. polygonus* e *P. pusillus* aqui estudadas, a ordem de iniciação dos primórdios nas flores foi a mesma: tépalas laterais simultaneamente, seguidas das tépalas medianas, estames laterais, estames medianos e finalmente, quatro primórdios carpelares. Este padrão foi também observado em *Potamogeton richardsonii*, *P. zosteriformis* e *P. distinctus* (POSLUSZNY; SATTLER, 1974; POSLUSZNY, 1981; SUN *et al.*, 2000). Segundo Charlton e Posluszny (1991), em *P. berchtoldi*, *P. compressus*, *P. epiphydrus* e *P. lucens*, após o surgimento simultâneo dos primórdios laterais, a tépala adaxial surge antes da abaxial, bem como o estame adaxial surge antes do abaxial. Esta variação é resultante de atraso na iniciação dos órgãos abaxiais e também pode estar relacionada à organização compacta das flores no eixo da inflorescência.

Em *Potamogeton*, apesar de os dados moleculares (LINDQVIST *et al.*, 2006) mostrarem que o gênero se divide em dois clados maiores, que correspondem em grande parte às espécies de folhas lineares e às de folhas largas de Raunkiær (1896), as relações dentro desses grupos ainda não estão bem resolvidas. Uma vez que ambos os padrões de iniciação dos órgãos florais já descritos em *Potamogeton* encontram-se distribuídos tanto no clado I como no II de Lindqvist *et al.* (2006), não foi possível correlacionar nenhum dos padrões a quaisquer subgrupos dentro do gênero, indicando que ambos são conservados. Porém, o número de espécies de que se têm disponíveis dados de desenvolvimento floral é reduzido se comparado ao número que compõe o gênero. *Potamogeton polygonus* e *P. berchtoldii* (CHARLTON; POSLUSZNY, 1991), de que se têm disponíveis tais dados, não foram incluídas em análises moleculares até o momento, o que dificulta uma comparação mais acurada.

Em *Groenlandia densa* (L.) Fourr. (= *Potamogeton densus*, POSLUSZNY; SATTLER, 1973) também foi observado o surgimento simultâneo dos primórdios de tépalas laterais, bem como dos estames laterais, mas o padrão de iniciação difere dos relatados para os demais representantes de Potamogetonaceae. Em *Groenlandia*, o primeiro órgão a surgir é a tépala abaxial, seguida das duas laterais e, finalmente da adaxial; os estames seguem a mesma ordem. Uma vez que *G. densa* apresenta uma posição ancestral em relação à *Potamogeton* (LINDQVIST *et al.*, 2006), o surgimento simultâneo das tépalas laterais e dos estames laterais nos

dois gêneros é uma característica interessante e aparentemente conservada na família. Isto também foi observado nas espécies do presente estudo e em *P. crispus*, *P. richardsonii*, *P. zosteriformis*, *P. berchtoldi*, *P. compressus*, *P. epihydrus*, *P. lucens* e *P. distinctus* (HEGELMAIER, 1870; POSLUSZNY; SATTLER, 1974; POSLUSZNY, 1981; CHARLTON; POSLUSZNY, 1991; SUN *et al.*, 2000). A ordem diferente de iniciação dos órgãos florais em *Potamogeton* e *Groenlandia* fornece suporte morfológico adicional à separação de ambos em gêneros diferentes.

Dentre os gêneros que podem ser incluídos em Potamogetonaceae, destaca-se *Zannichellia*, que têm sido incluído na família principalmente com base em análises moleculares (LES; CLELAND; WAYCOTT, 1997; APG II, 2003; LINDQVIST *et al.*, 2006), mas sua morfologia floral difere muito da apresentada por *Potamogeton* e *Groenlandia*, de modo que os dados de desenvolvimento floral disponíveis ainda são insuficientes para subsidiar comparações.

A interpretação da filotaxia floral de *Potamogeton* aqui descrita, com perigônio e androceu formado por dois verticilos dímeros e gineceu formado um verticilo tetrâmero implica na possibilidade de *Potamogeton* possuir primariamente uma flor completa, hipótese aparentemente não levantada por autores anteriores para este gênero. Dessa forma, cada verticilo surge alternadamente ao anterior. O primeiro verticilo de tépalas corresponderia ao cálice dímero e alternado a este, o segundo verticilo de tépalas corresponderia à corola dímera. Na seqüência, alternado à corola, surge o verticilo de estames externos, e alternadamente a este, surge o verticilo de estames internos. A adnação entre os estames e tépalas ocorre pós-genitalmente. Interpretação semelhante foi dada por Chen *et al.* (2007) para o merisma de *Tetracentron sinense* (Trochodendraceae), em que a flor apresenta morfologia e ordem de iniciação dos verticilos semelhante à apresentada por *Potamogeton*, entretanto estes autores não especularam a natureza das tépalas naquela espécie.

A filotaxia floral observada no presente estudo favorece a interpretação da unidade floral de *Potamogeton* como uma flor (SATTLER, 1965; POSLUSZNY; SATTLER, 1973, 1974; CHARLTON; POSLUSZNY, 1991). Vale ressaltar como outras características observadas também em favor desta hipótese: a origem uni-primordial de todos os estames, a ausência de apêndices iniciados antes dos carpelos (bractéolas) e a vascularização de tépalas e estames. Estes dados somam-se aos de outros estudos de desenvolvimento floral que também levantaram fortes

evidências de que a unidade floral de *Potamogeton* é realmente uma flor. Por exemplo, Singh (1965), em estudo realizado com oito espécies de *Potamogeton*, observou que a vascularização floral é a de uma flor, com as tépalas recebendo um único e exclusivo feixe, como um membro de perianto.

Em *Groenlandia densa* (POSLUSZNY; SATTLER, 1973) e *P. zosteriformis* Fern. (POSLUSZNY, 1981) os estames laterais surgem como dois primórdios independentes que se fundem rapidamente, originando um primórdio alongado como nas demais espécies. Este fenômeno também foi relatado por Hegelmaier (1870) em *Potamogeton crispus*, porém Posluszny e Sattler (1973) afirmaram que os estames não eram claramente bi-primordiais nas imagens apresentadas por Hegelmaier (1870). Posluszny e Sattler (1973) consideraram que os estames bi-primordiais poderiam ser uma evidência para corroborar a hipótese de que o estame seria uma flor estaminada reduzida. Entretanto, a vascularização de *P. densus* e *P. zosteriformis* é semelhante àquela das demais espécies. E, nas demais espécies já estudadas, todos os estames são iniciados como primórdios individualizados (POSLUSZNY; SATTLER 1974; CHARLTON; POSLUSZNY, 1991; SUN *et al.*, 2000).

*Potamogeton illinoensis* apresenta características que o distinguem das duas outras espécies estudadas, tais como maior número de inflorescências por flor, maior frequência de variação no número e posição dos carpelos, bem como fechamento do carpelo e formação do estigma de maneira distinta. Vale ressaltar que a forma como o carpelo se fecha, a posição da abertura carpelar e formação do estigma não foram relatadas nas demais espécies de *Potamogeton* estudadas até o presente. Estas características assemelham-se às apresentadas por Troll (1932) para *Thalictrum flavum* (Ranunculaceae), mas em *P. illinoensis*, a posição da abertura carpelar é tal que a distância da abertura até o óvulo é muito reduzida.

No presente estudo foi constatada uma contigüidade entre os estigmas de cada carpelo na flor, que pode ocorrer com maior (*P. illinoensis*) ou menor frequência (*P. pusillus* e *P. polygonus*). Esta organização assemelha-se ao *compitum extragynoecial*, definido por Endress (1980) como uma zona externa ao carpelo onde os tubos polínicos podem cruzar de um carpelo ao outro. Esta estrutura é relativamente comum nas Angiospermas basais (Amborellaceae, Austrobaileyaceae, Schisandraceae, Illiciaceae e algumas Nympheaceae; ENDRESS; IGERSEIM, 2000) e se diferencia de maneiras variadas. Ainda que tal

continuidade entre os estigmas ocorra eventualmente em *P. polygonus* e *P. pusillus*, a proximidade entre eles e a maior área estigmática, em comparação à *P. illinoensis*, provavelmente favorecem a captura de um maior número de grãos de pólen, refletindo estratégias diferentes de potencializar a polinização.

A partir dos resultados aqui apresentados para *Potamogeton pusillus*, *P. illinoensis* e *P. polygonus*, foram identificados como caracteres potenciais para a taxonomia de *Potamogeton*: a forma do estigma e a posição e forma da abertura carpelar. Além disso, a posição da abertura carpelar e interação entre os estigmas em *Potamogeton illinoensis* são dados inéditos para a família que podem auxiliar no conhecimento e futuros estudos de biologia reprodutiva da espécie. Os resultados também corroboram e aprofundam a hipótese de que a unidade floral de *Potamogeton* é uma flor.

#### 4. CAPÍTULO III - CONTRIBUIÇÃO À EMBRIOLOGIA DE *Potamogeton* (POTAMOGETONACEAE, ALISMATALES)

##### 4.1. INTRODUÇÃO

Alismatales é uma ordem de Monocotiledôneas que contem a maior parte das angiospermas aquáticas (LES; HAYNES, 1995). É constituída por 14 famílias (APG II, 2003; CHASE, 2004) e como sinapomorfias embriológicas destacam-se: tapete do tipo plasmodial formado por células uninucleadas, endosperma do tipo helobial e embrião grande e clorofilado (JUDD *et al.*, 2008; STEVENS, 2008).

Dentre as Alismatales, destaca-se Potamogetonaceae Reinchenbach, família subcosmopolita, constituída pelos gêneros *Groenlandia* J. Gay, *Stuckenia* Börner e *Potamogeton* L., que juntos somam cerca de 100 espécies distribuídas principalmente em regiões temperadas do Hemisfério Norte (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003). A família é tradicionalmente associada à Ruppiaceae Horan., Zannichelliaceae Dumort., e Zosteraceae Dumort. (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003).

*Potamogeton* L. contém aproximadamente 95 espécies, das quais oito (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003) são citadas para o Brasil. São características florais do gênero: flores emersas ou imersas com quatro tépalas, quatro estames e um ou quatro carpelos (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003).

Segundo a circunscrição de Potamogetonaceae adotada na compilação de Johri, Ambegaokar e Srivastava (1992), foram descritas como características embriológicas da família: parede da antera constituída por epiderme persistente e com taninos, endotécio com ou sem espessamentos fibrosos e tapete periplasmodial; a microsporogênese é sucessiva e resulta em tétrades lineares; os grãos de pólen são inaperturados ou tricolpados, podendo ser filiformes, aparentemente sem exina e dispersos com duas ou três células; o óvulo é anátropo, ortótropo, campilótropo ou ainda orto-campilótropo, bitégmico e crassinucelado, e o saco embrionário é do tipo Polygonum. No entanto, nesta circunscrição estavam incluídos gêneros atualmente posicionados em Cymodoceaceae e Zosteraceae. Haynes e Holm-Nielsen (2003) acrescentaram ainda que o tipo de formação da parede da antera é aparentemente desconhecido.

Como caracteres embriológicos de *Potamogeton*, são citados: endotécio com espessamentos fibrosos (JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992); células do tapete predominantemente uninucleadas (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003); microsporogênese sucessiva, com tétrades geralmente isobilaterais (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003); pólen tricelular (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003); primórdio ovular trizonado (TAKASO; BOUMAN, 1984); óvulo ortocampilótopo (TAKASO; BOUMAN, 1984), ortótopo (DAVIS, 1966; IGERSEIM; BUZGO, 2001) ou anátropo (POSLUSZNY; SATTLER, 1974; POSLUZNY, 1981), bitegmentados e crassinucelados (TAKASO; BOUMAN, 1984; JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992); megásporos arranjados em tétrades lineares ou em “T” (JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992); saco embrionário Polygonum (TAKASO; BOUMAN, 1984); e endosperma do tipo helobial (JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992).

O presente estudo teve por objetivo acompanhar a organogênese da antera e do óvulo, com ênfase na microsporogênese e microgametogênese e na megasporogênese e megagametogênese de três espécies de *Potamogeton* ocorrentes no Brasil: *Potamogeton illinoensis*, *P. polygonus* e *P. pusillus*. Espera-se, com isso, contribuir para o conhecimento da embriologia do gênero e da família como um todo.

#### 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de cada espécie foram coletadas nos municípios de Iretama (*Potamogeton. pusillus* L), General Carneiro e Palmas (*P. polygonus* Cham. et Schtdl.), no Estado do Paraná, e Bonito (*P. illinoensis* Morong), no Estado do Mato Grosso do Sul. O material testemunho encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB), aguardando número de registro.

Inflorescências em diversos estágios de desenvolvimento foram fixadas em glutaraldeído 1% e formaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (MCDOWELL; TRUMP, 1976), para processamento e análise em microscopia de luz e eletrônica de varredura.

O material destinado à microscopia de luz (ML) foi incluído em hidroxietilmetacrilato (GERRITS; SMID, 1983) e seccionado com espessura de 2-5

µm. As secções foram coradas em Azul de Toluidina O 0,05% 0,1 M em tampão fosfato de sódio pH 6,8 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1965).

Foram realizados os seguintes testes histoquímicos em secções de anteras maduras: reação com IKI, para amido (JOHANSEN, 1940); Coomassie Brilliant Blue 0,25% em ácido acético 7%, para detecção de proteínas totais (SOUTHWORTH, 1973); Vermelho de Rutênio, para detecção de ácidos pécicos (JENSEN, 1962); *Calcofluor White*, sob fluorescência, para identificação de celulose (RUZIN, 1999); Azul de Anilina, sob fluorescência, para identificação de calose. As observações em microscópio de epifluorescência foram realizadas no equipamento Zeiss Axiophot, com filtro Dapi (excitação em 365 nm, emissão em 420 nm).

Para os testes com Sudan III, para a identificação de lipídeos totais (O'BRIEN; MCCULLY, 1981), e com Floroglucinol acidificado, para identificação de lignina (JOHANSEN, 1940), as anteras fixadas foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 e maceradas entre lâmina e lamínula com o reagente.

#### 4.3. RESULTADOS

##### 4.3.1. Organogênese da antera, microsporogênese e microgametogênese

Em corte longitudinal da flor das espécies de *Potamogeton* estudadas, observa-se que o primórdio de estame surge como uma pequena expansão de células indiferenciadas, logo acima da tépala (Fig. 1a-b). A protoderme sofre divisões anticlinais acompanhando o crescimento do órgão e suas células se diferenciam, diretamente, na epiderme (Fig. 1b-e). O meristema fundamental origina o tecido parenquimático do conectivo da antera e a células arquesporais (Fig. 1b-d), enquanto o procâmbio fica limitado a um grupo de células de citoplasma mais denso na região central do primórdio e dará origem a um feixe vascular no conectivo (Fig. 1c).

A diferenciação do tecido do conectivo inicia nas células centrais, mais próximas ao procâmbio, com a formação de vacúolos e o aumento em seu volume (Fig. 1c). Neste mesmo estágio, ocorre a vacuolação das células medianas para a formação dos septos que separam os microsporângios de cada teca (Fig. 1c-e). A formação das camadas da parede de cada microsporângio inicia-se com a diferenciação das células arquesporais em camada esporogênica e camada parietal

primária (Fig. 1d-e). As células da camada parietal primária dividem-se periclinamente, originando duas camadas parietais secundárias (Fig. 1f-g); a externa diferencia-se em endotécio, e a interna divide-se periclinamente, originando duas camadas (Fig. 1g), das quais a interna diferencia-se em tapete (Figs 1h, 2a) e a externa divide-se novamente para formar duas a três camadas médias (Figs 1h, 2a). As células do tecido esporogênico, após alguns ciclos de divisões mitóticas, diferenciam-se nos microsporócitos (Figs 1e-h, 2a).

Durante a meiose dos microsporócitos, as camadas médias, que inicialmente, possuíam células alongadas e justapostas, são obliteradas (Fig. 2a-b). O tapete é predominantemente uniestratificado, com células de formato irregular e uninucleadas (Fig. 2a), podendo apresentar dois núcleos (*P. polygonus*). As células do tapete desprendem-se umas das outras, adquirem forma amebóide e migram para o interior do lóculo, caracterizando o tapete do tipo plasmodial (Fig. 2a-d). Em *P. illinoensis*, algumas células do tapete sofrem divisões mitóticas adicionais, formando até quatro camadas celulares em algumas regiões do tecido. Notou-se, durante a meiose e também na fase de micrósporos livres, a presença de uma matriz na periferia de cada microsporângio, derivada das células do tapete - o periplasmódio - que desaparece antes da primeira divisão mitótica do micrósporo (Fig. 2e).

No início da meiose, os microsporócitos assumem formato arredondado (Fig. 2a). Dentre as fases da meiose dos microsporócitos, foram observadas prófase I, anáfase I, telófase I e telófase II (Fig. 2b-d). A citocinese meiótica é sucessiva, formando, inicialmente, díades com uma parede delgada de calose e após a meiose II, tétrades predominantemente tetragonais e decussadas e, com menor frequência tétrades em "T", lineares em formatos irregulares (Fig. 2c-e).

Durante a microgametogênese, o endotécio apresenta células grandes, poliédricas, com espessamentos celulósicos em bandas nas paredes celulares (Fig. 2f). O início da microgametogênese é marcado pela formação de um grande vacúolo no micrósporo, empurrando o núcleo em direção à parede (Fig. 2f-g). A primeira divisão mitótica é desigual, originando uma célula generativa lenticular, periférica e menor que a célula vegetativa, ambas separadas por suas paredes celulares (Fig. 2h). Em um estágio posterior, observa-se que a célula vegetativa engloba a generativa e, finalmente, a célula generativa sofre divisão mitótica, resultando em duas células espermáticas (Fig. 2i). O grão de pólen é apolar, esférico a oval,

inaperturado (Fig. 2i-j), com exina reticulada e intina pécto-celulósica. Antes da deiscência, os microsporângios de cada teca coalescem, após a degeneração do septo (Fig. 2j).

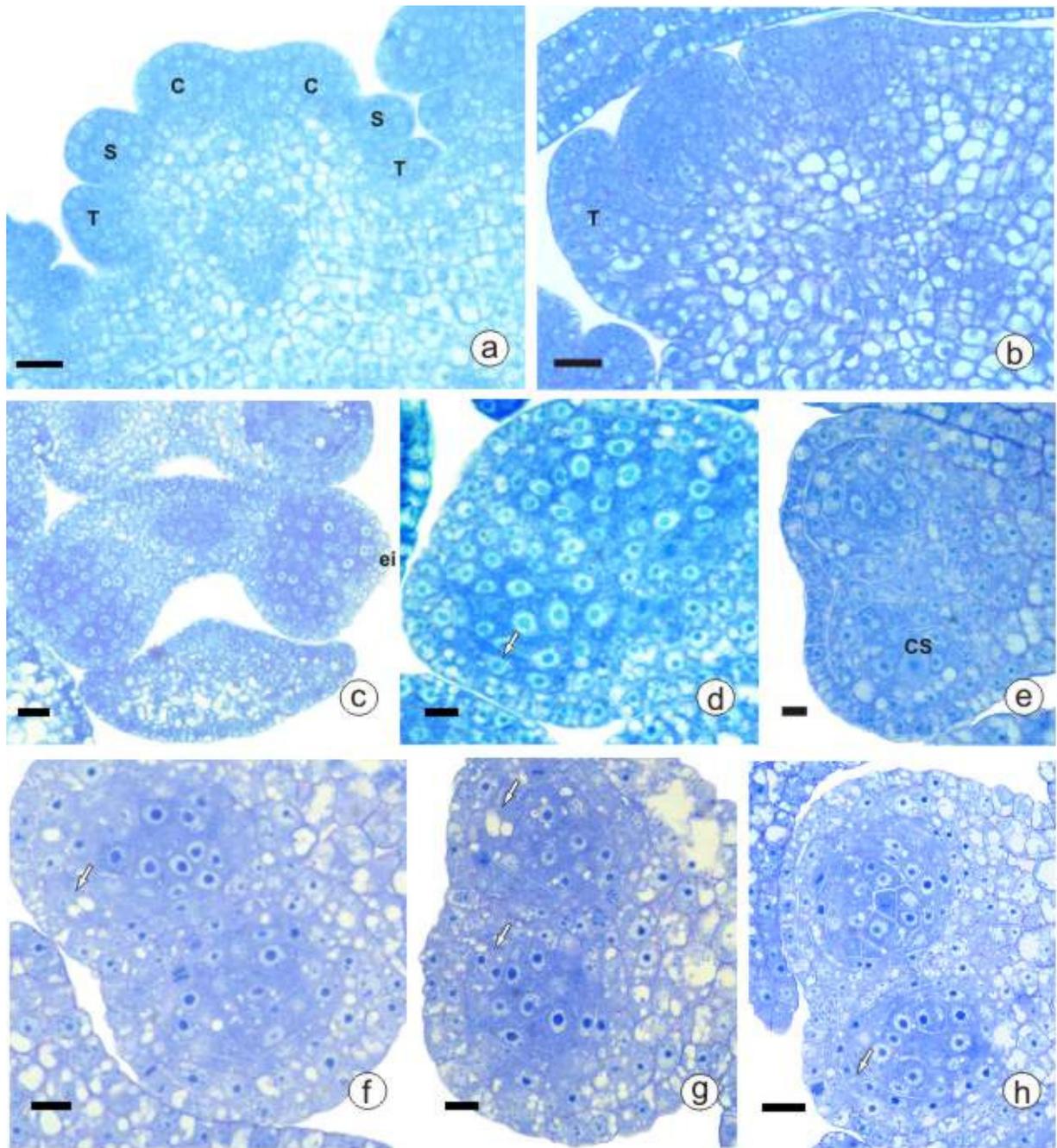
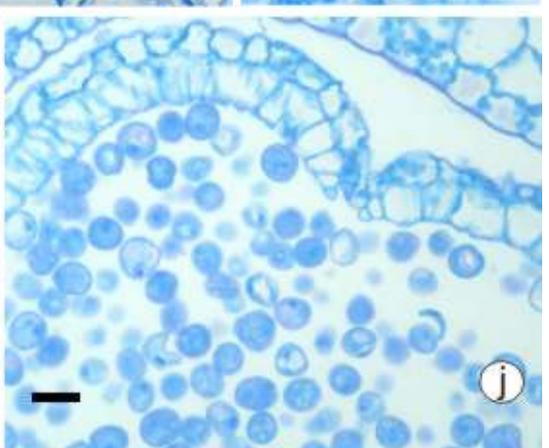
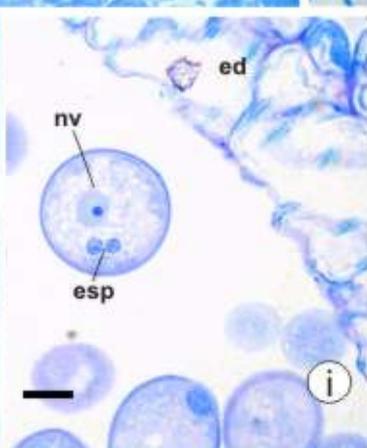
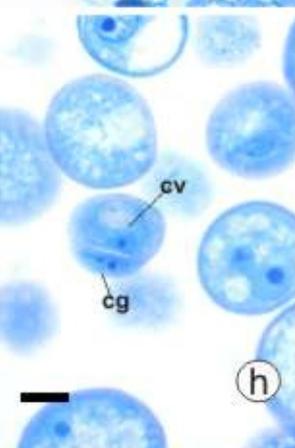
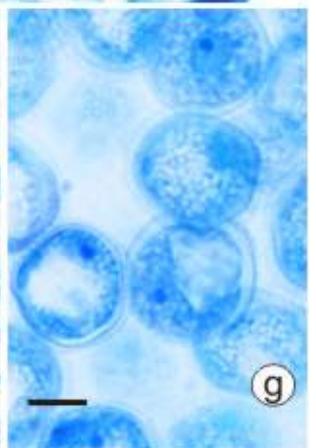
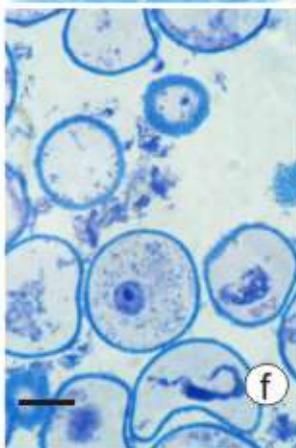
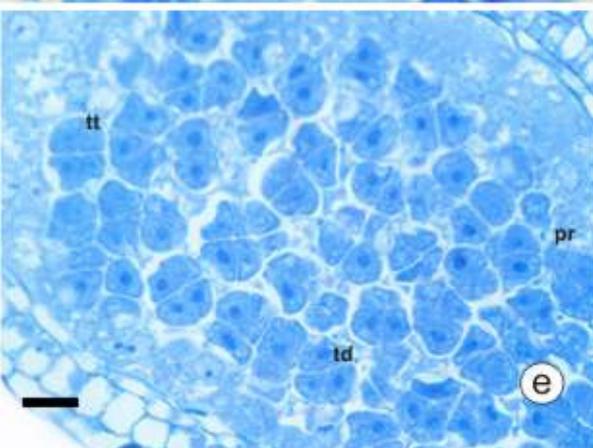
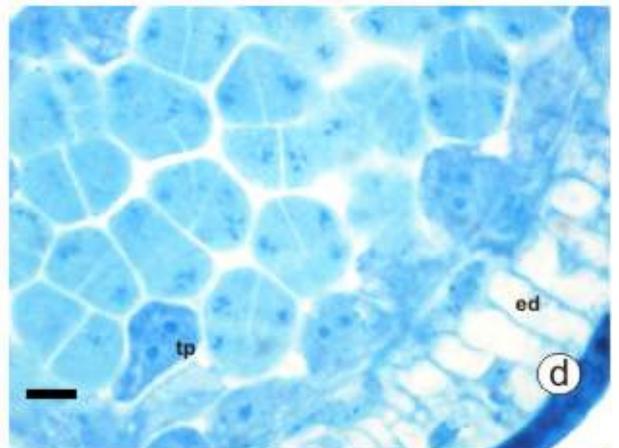
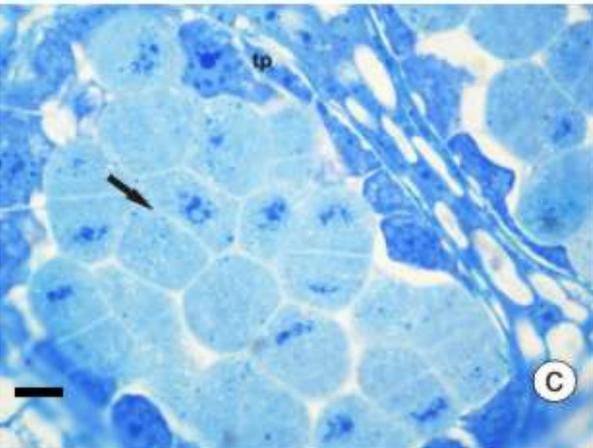
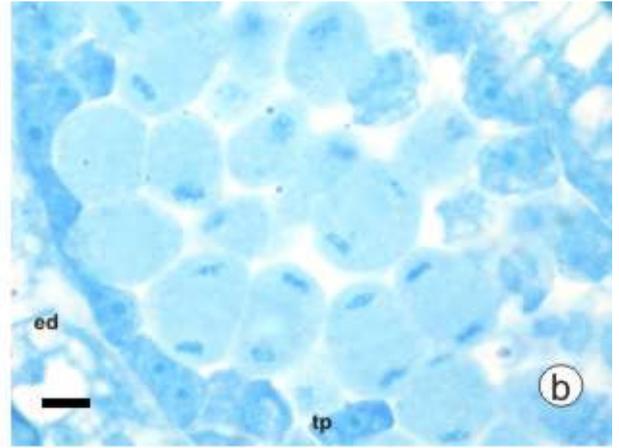
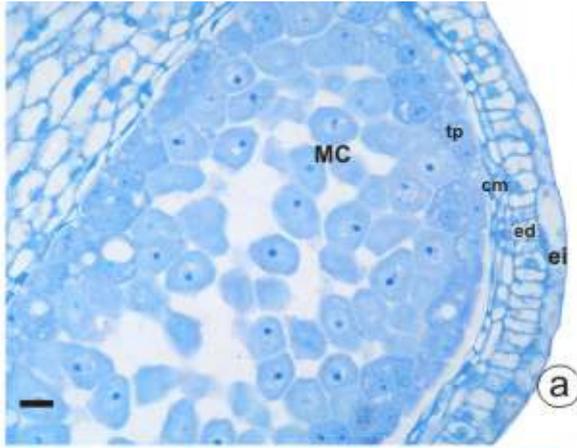


FIGURA 1 - Organogênese do estame em *Potamogeton P. polygonus* em a-h. (a) Corte longitudinal do botão floral com todos os verticilos iniciados. (b) Botão floral em corte longitudinal, antera com células arquesporais diferenciadas. (c) Antera bilobada, com epiderme, septos que dividem cada teca, feixe vascular da antera e conectivo em diferenciação. (d) Teca com camada parietal primária visível (seta). (e) Teca com camada parietal primária e camada esporogênica diferenciadas. (f) Divisão periclinal das células da camada parietal primária (seta), para originar duas camadas parietais secundárias. (g) Divisão periclinal de células da camada parietal secundária interna (setas). (h) Antera com três camadas parietais, a externa corresponde ao endotécio, a interna ao tapete e, a intermediária, após suas células sofrerem nova divisão periclinal (seta), originará as camadas médias. C. carpelo; CS. camada esporogênica; ei. epiderme; S. estame; T. tépala. Barras de escala = 10  $\mu\text{m}$  em a, d; 20  $\mu\text{m}$  nas demais imagens.

FIGURA 2 - Microsporogênese e microgametogênese em *Potamogeton*. *P. illinoensis* em a, f; *P. pusillus* em e, g, j; *P. polygonus* nas demais imagens. (a) Antera antes da meiose apresentando as camadas parietais já diferenciadas. (b) Microsporócitos em anáfase I, células do tapete uninucleadas. (c) Telófase 1, díades de micrósporos separados por parede de calose fina (seta). (d) Tétrades de micrósporos em telófase II, tapete com células binucleadas migrando para interior do lóculo. (e) Tétrades de micrósporos em intérfase, com perisplamódio derivado das células do tapete ao seu redor. (f) Micrósporos livres. (g) Início da microgametogênese, núcleo do micrósporo foi deslocado para junto da parede por um vacúolo grande. (h) Grão de pólen imaturo bicelular. (i) Grão de pólen tricelular, com células espermáticas próximas ao núcleo da célula vegetativa. (j) Antera antes da deiscência, septo entre os esporângios ausente e endotécio com espessamentos em banda. cg. célula generativa; cm. camada média; cv. célula vegetativa; ed. endotécio; ei. epiderme; esp. células espermáticas; MC. microsporócito; nv. núcleo da célula vegetativa; pr. periplasmódio; td. tétrade decussada; tp. tapete; tt. tétrade tetragonal. Barras de escala = 20  $\mu\text{m}$  em a; 30  $\mu\text{m}$  em j; 10  $\mu\text{m}$  nas demais imagens.



#### 4.3.2. Organogênese do óvulo, megasporogênese e megagametogênese

O gineceu é tetracarpelar, apocárpico e um único óvulo é iniciado na parede ventral de cada carpelo (Fig. 3a). O óvulo se inicia como um primórdio trizonado, que cresce inicialmente no sentido horizontal, preenchendo todo o lóculo (Fig. 3a-c). São formados dois tegumentos, constituídos por duas camadas de células, eventualmente três, especialmente na região próxima à calaza (Fig. 3b-d).

À medida que o óvulo se desenvolve, observa-se uma acentuação em sua curvatura (Fig. 3c-f). Esta curvatura ocorre devido a um maior desenvolvimento da porção superior do óvulo, bem como devido ao desenvolvimento do carpelo, que, à medida que cresce, libera espaço na porção superior do lóculo, o que permite que o óvulo se acomode (Fig. 3c-f). A micrópila é delimitada apenas pelo tegumento interno, que sofre um espessamento nessa região (Fig. 3g). Em estágios posteriores observou-se a proliferação do tecido na região mediana da parede ventral do carpelo, na interface entre a parede e o funículo (Fig. 3h). Esta proliferação pressiona a região funicular, acentuando a curvatura do óvulo. O óvulo maduro é campilótopo, crassinucelado e bitegmentado (Fig. 3f-h).

O megasporócito diferencia-se após o início da divisão dos tegumentos e apresenta um núcleo grande e conspícuo (Fig. 3c). A meiose I resulta em uma díade de células. A meiose II ocorre normalmente na célula calazal, produzindo dois megásporos (Fig. 4a). Na díade micropilar, a meiose II é interrompida antes de a divisão ser completada (Fig. 4a), esta célula degenera-se rapidamente, seguida do megásporo adjacente (Fig. 4b). O megásporo funcional é o calazal (Fig. 4b).

A megagametogênese constitui-se de três ciclos de divisões mitóticas sucessivas, que resultam na formação de um saco embrionário do tipo Polygonum (Fig. 4c-f), com sete células: duas sinérgides (Fig. 4f) e uma oosfera (Fig. 4g) no pólo micropilar, três antípodas efêmeras no pólo calazal (Fig. 4g) e a célula central, com dois núcleos polares, que se fundem antes da fertilização (Fig. 4f-g). Devido à curvatura do óvulo, os núcleos e conseqüentemente as células do megagametófito ficam em níveis diferentes, dificultando sua visualização.

Foram observados grãos de pólen germinando na região periférica do estigma, mas não foi acompanhada a fertilização (Fig. 4i).

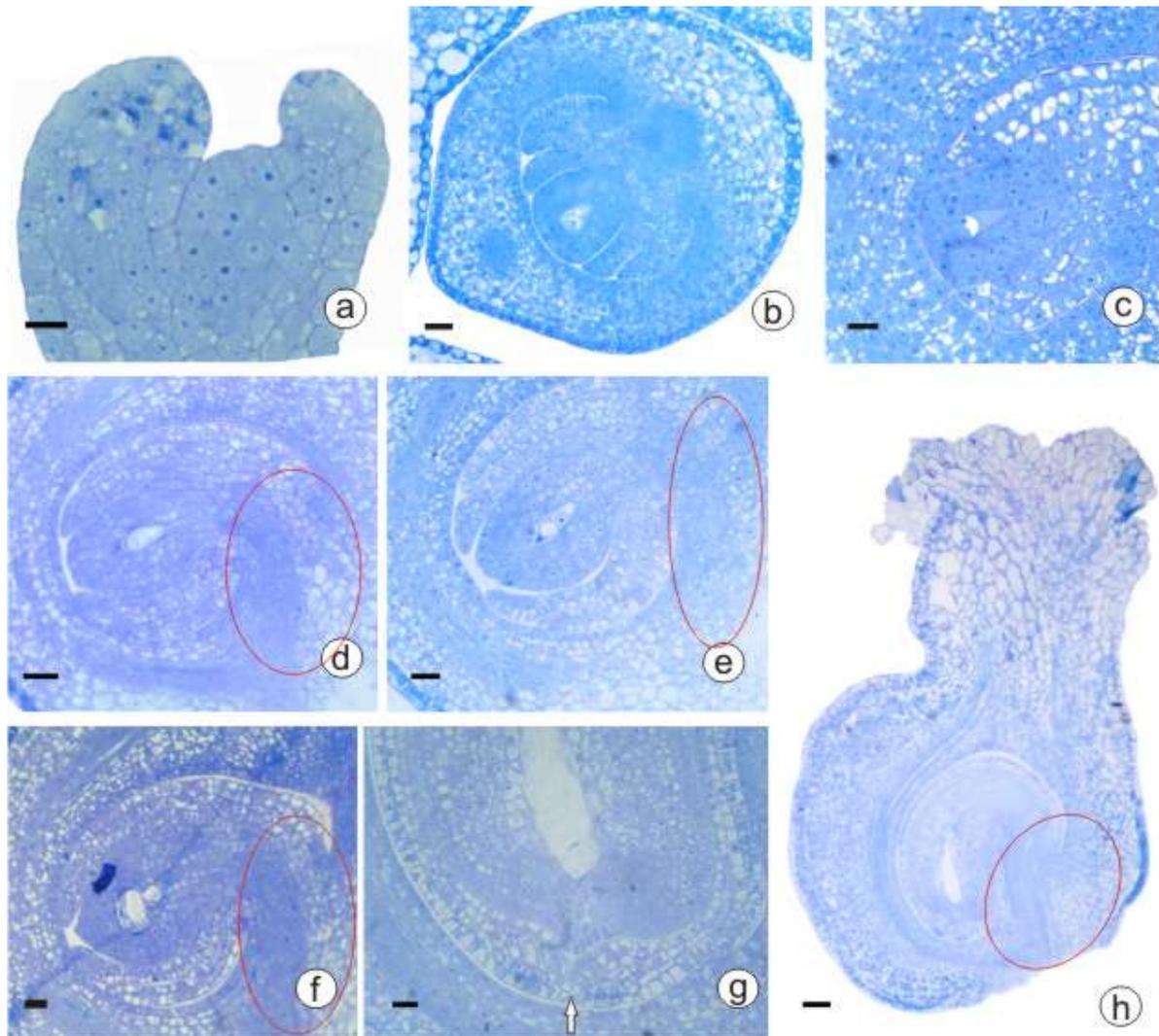


FIGURA 3 - Organogênese do óvulo em *Potamogeton*. *P. illinoensis* em c; *P. polygonus* nas demais imagens. (a) Primórdio carpelar em corte longitudinal com primórdio de óvulo trizonado. (b) Carpelo em corte transversal, óvulo com tegumentos interno e externo iniciados. (c) Óvulo antes da megasporogênese, iniciando sua curvatura; notar o maior desenvolvimento da porção superior na interface entre os tegumentos e a calaza. (d-f) Estágios sucessivos de acentuação da curvatura do óvulo, devido a um maior desenvolvimento da porção basal do carpelo, na interface entre a parede ventral do carpelo e funículo (verificar região delimitada pela elipse). (g) Detalhe da região micropilar do óvulo maduro, a micrópila (seta) é delimitada apenas pelo tegumento interno, que tem aumento no número de células. (h) Carpelo maduro com rudimento seminal fortemente curvado devido à proliferação de células da interface entre a parede ventral do carpelo e o funículo (elipse). Barras de escala = 50  $\mu\text{m}$  em f, h; 20  $\mu\text{m}$  nas demais imagens.

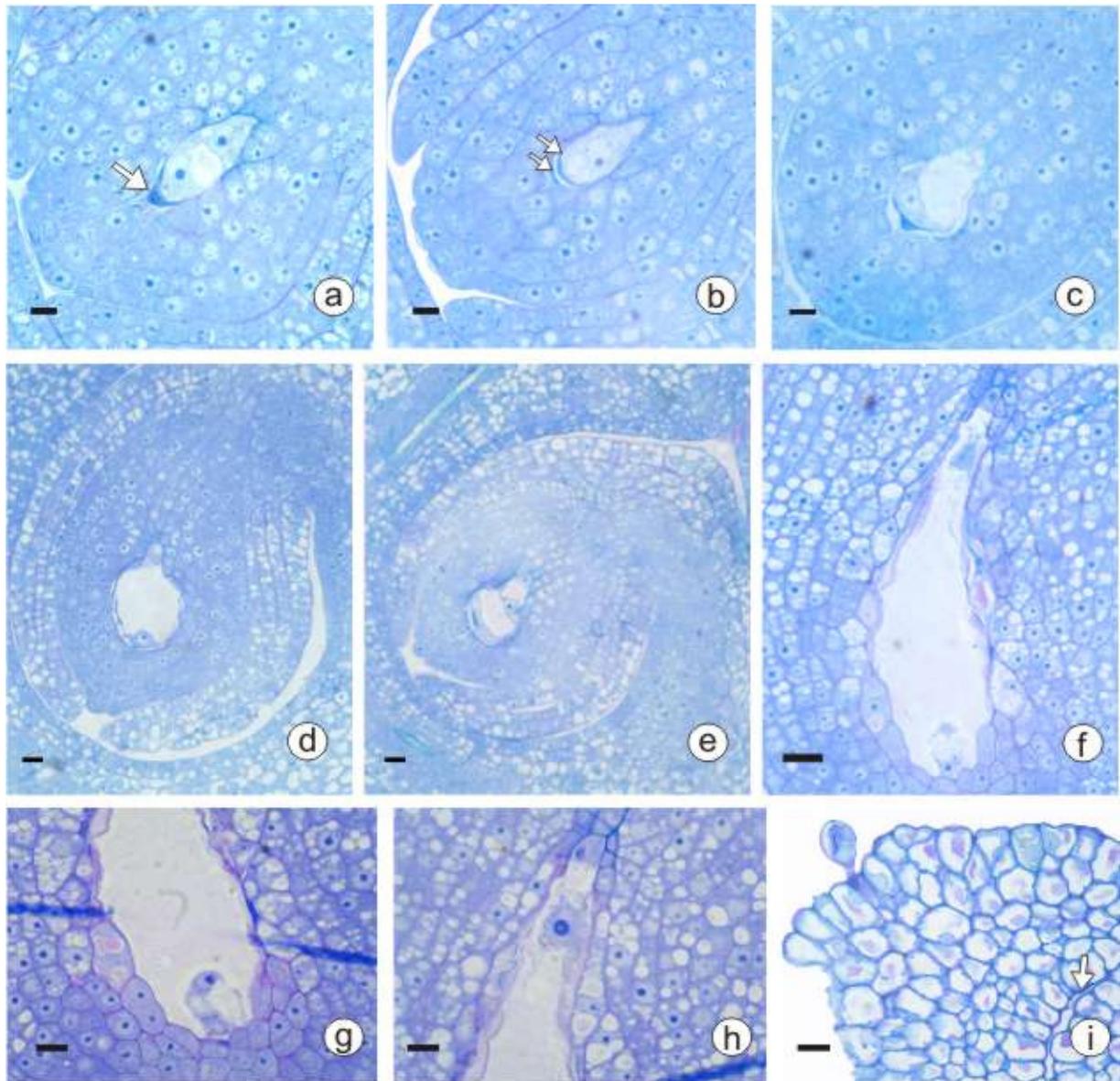


FIGURA 4 - Megasporogênese e megagametogênese em *Potamogeton. P. polygonus* em a-i. (a) Díade calazal de megásporos, díade micropilar degenerada na base (seta). (b) Megásporo funcional, com díade calazal e megásporo adjacente degenerados (setas). (c) Megásporo funcional com vácuolo grande deslocando o conteúdo celular para a região basal. (d) Megagametófito imaturo binucleado (apenas um núcleo é visível). (e) Megagametófito imaturo, com quatro núcleos (apenas os dois superiores são visíveis). (f) Saco embrionário Polygonum. (g) Detalhe do saco embrionário, com sinérgides e núcleo polar. (h) Detalhe do saco embrionário com oosfera e parte de uma sinérgide visíveis. (i) Grão de pólen germinando na porção periférica do estigma, notar a abertura carpelar (seta). Barras de escala = 50  $\mu\text{m}$  em d-e; 10  $\mu\text{m}$  em g-i; 20  $\mu\text{m}$  nas demais imagens.

#### 4.4. DISCUSSÃO

As características da formação da parede da antera nas espécies de *Potamogeton* aqui estudadas permitem classificá-la como tipo monocotiledôneo, ou seja, modelo em que a camada parietal secundária interna divide-se e origina a(s) camada(s) média(s) e o tapete (DAVIS, 1966). Apesar de Haynes e Holm-Nielsen (2003) afirmarem que o tipo de parede da antera é desconhecido em *Potamogeton*, em 1899, Wiegand descreveu o desenvolvimento desta em *P. foliosus*, de maneira distinta da apresentadas aqui: a partir de dois ciclos de divisão em apenas uma célula hipodermal em cada microsporângio, a partir das quais se originariam, através de divisões periclinais, três camadas: endotécio, uma camada média e tapete.

No presente estudo foi constatada a formação de espessamentos em bandas, de origem pécto-celulósica, nas células do endotécio na fase de micrósporos livres. Apesar da presença e forma dos espessamentos corroborarem os dados disponíveis para *Potamogeton* (JOHRI; AMBEGAOKAR; SRIVASTAVA, 1992; HAYNES; HOLM-NIELSEN, 2003), sua natureza não havia sido esclarecida até o momento.

Devido à perda das paredes celulares e à fusão dos protoplastos, o tapete nas espécies de *Potamogeton* aqui estudadas foi classificado como plasmodial, em concordância com Furness e Rudall (2001). Esse dado corrobora a afirmação de que todas as Alismatales estudadas apresentam esse tipo de tapete, com exceção de *Tofieldia* (Toelfidiaceae Takht.) (FURNESS; RUDALL, 1999a).

As células do tapete de *P. polygonus* aqui estudadas são binucleadas, característica também relatada para *P. natans* por Haynes e Holm-Nielsen (2003). Estes mesmos autores também afirmam que tapete com células uninucleadas é o predominante em *Potamogeton*. Vale ressaltar que Stevens (2008) considera a presença de células uninucleadas no tapete uma sinapomorfia de Alismatales.

A muito discutida curvatura do óvulo em *Potamogeton*, aqui foi interpretada no presente estudo como campilótropa, tendo em vista que o saco embrionário é curvado no óvulo maduro (CORNER, 1976) e que o tegumento externo desenvolve-se de maneira semelhante nas regiões da rafe e da anti-rafe. Davis (1966) e Igersheim, Buzgo e Endress (2001) interpretaram o óvulo de *Potamogeton* como ortótropo, mas uma vez que neste tipo de óvulo o funículo, a calaza, o nucelo e a micrópila encontram-se alinhados em uma reta, esta classificação não é adequada

(BOUMAN, 1984). Da mesma forma, a classificação do óvulo de *Potamogeton* em anátropo (POSLUSZNY; SATTLER, 1974; POSLUZNY, 1981) não é consistente, considerando que neste tipo de óvulo, a inversão de 180° do nucelo e conseqüente curvatura do óvulo é ocasionada apenas pelo crescimento intercalar do funículo, não afetando o saco embrionário e que o tegumento externo é menos desenvolvido na região da rafe. Takaso e Bouman (1984) propuseram, para *P. natans*, classificar o óvulo como orto-campilótropo, por considerá-lo inicialmente ortótropo e orientado quase horizontalmente e somente após a megasporogênese curvar-se em direção à base do carpelo, apesar de recomendar o uso facultativo do prefixo orto-. Nas três espécies aqui estudadas, a curvatura inicia-se antes da meiose do megasporócito, com um maior desenvolvimento da porção funicular e calazal.

Na megasporogênese das três espécies de *Potamogeton* aqui estudadas foi constatada uma falha da célula micropilar da díade em se dividir, resultando em uma tríade de megásporos, de modo que a observação de tétrades em “T” relatada por Johri, Ambegaokar e Srivastava (1992) parece pouco provável. Fenômeno semelhante também foi relatado em *P. natans* por Takaso e Bouman (1984) e em *Tofieldia glutinosa* (Tofieldiaceae) (HOLLOWAY E FRIEDMAN, 2008), recentemente posicionada próxima às Alismatales por análises filogenéticas moleculares (APG II, 2003; SOLTIS; GITZENDANNER; SOLTIS, 2007).

Dentre os dados aqui apresentados, os seguintes diferem das informações fornecidas por Johri, Ambegaokar e Srivastava (1992) para Potamogetonaceae: endotécio com espessamentos pécto-celulósicos; presença de tétrades predominantemente tetragonais e decussadas ao final da microsporogênese; grãos de pólen inaperturados, esféricos a ovais, com exina reticulada e dispersos com três células; óvulo campilótropo. Tais diferenças se devem à utilização de uma circunscrição antiga naquele trabalho e a informações embriológicas fragmentadas para a família após as modificações na circunscrição desta propiciadas por análises filogenéticas moleculares. Mas ainda não se tem informações sobre aspectos embriológicos para os demais gêneros de Potamogetonaceae.

Os dados aqui apresentados foram uniformes para as três espécies de *Potamogeton* estudadas, podendo-se concluir que os caracteres estudados são conservados nestas espécies, independente de sua segregação em diferentes clados nas análises filogenéticas moleculares de Lindqvist *et al.* (2006). Além disso,

uma descrição detalhada da formação da parede antera de *Potamogeton* é fornecida pela primeira vez.

## 5. CONCLUSÃO

No capítulo I foi possível verificar que, em *Potamogeton*, a ocorrência de tétrades de micrósporos em formatos variados após a microsporogênese, indicando uma liberação na restrição do formato possivelmente relacionada à ausência de aberturas no grão de pólen. Além disso, a formação das placas celulares e deposição de calose adicional nestas ocorre simultaneamente, não deixando pontos específicos de término de deposição de calose adicional, um provável motivo para a ausência de aberturas no pólen de nos representantes deste gênero.

Eventualmente, foram observados pontos de espessamento na intina do pólen das espécies de *Potamogeton* aqui estudadas, mas este fenômeno foi interpretado como artefato de processamento, devido a sua baixa ocorrência. Para verificar os possíveis locais em que o tubo polínico pode germinar em *Potamogeton*, análises em MET de grãos de pólen germinados seriam muito úteis. Uma vez que outras características também apresentam um papel importante no desenvolvimento de aberturas e ainda se sabe pouco sobre a ausência de aberturas, e este caráter surgiu diversas vezes na história das Angiospermas, estudos de desenvolvimento e MET no grupo poderiam fornecer evidências importantes sobre este processo.

No capítulo II, verificou-se que a unidade floral de *Potamogeton* corresponde mais provavelmente a uma flor, com filotaxia verticilada: perigônio dímero, androceu dímero e gineceu tetrâmero. Ao se comparar a ordem de iniciação dos órgãos florais das três espécies aqui estudadas, com os dados disponíveis na bibliografia, foi possível distinguir dois padrões e concluir que o surgimento simultâneo das tépalas laterais é conservado no gênero e em *Groenlandia*, porém nenhum dos padrões pôde ser correlacionado a clados específicos dentro de *Potamogeton*. Seria interessante estudar a ordem de iniciação dos órgãos florais em espécies de *Stuckenia* (anteriormente subgênero *Coleogeton* de *Potamogeton*), para verificar se existem diferenças que possam oferecer suporte morfológico à elevação deste grupo à categoria de gênero, conforme proposto por alguns autores. Além disso, a forma do estigma e a posição e forma da abertura carpelar foram identificados como caracteres potenciais para a taxonomia do gênero.

No capítulo III, foram fornecidas informações inéditas sobre a embriologia de *Potamogeton*, como parede da antera do tipo monocotiledôneo; espessamentos do endotécio de natureza pécto-celulósica; presença de tétrades

predominantemente tetragonais e decussadas ao final da microsporogênese; óvulo campilótropo; falha da célula micropilar da díade de megásporos em se dividir, resultando em uma tríade. Estas informações foram uniformes para as três espécies e contribuem para um melhor conhecimento da embriologia de Potamogetonaceae como um todo e auxiliam no esclarecimento de divergências ocasionadas pela utilização de circunscrições antigas da família. Contudo, dados sobre a embriologia dos demais gêneros desta família permanecem incompletos ou desconhecidos.

## REFERÊNCIAS

- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 141, p. 399-436, 2003.
- BOUMAN, F. The ovule. In: JOHRI, B. M (Ed.). **Embriology of Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 123-153.
- CHARLTON, W. A.; POSLUSZNY, U. Meristic variation in *Potamogeton* flowers. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 106, p. 265-293, 1991.
- CHASE, M. W. Monocot relationships: an overview. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 91, p. 1645–1655, 2004.
- CHEN, L. *et al.* Floral organogenesis in *Tetracentron sinense* (Trochodendraceae) and its systematic significance. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 264, p. 183-193, 2007.
- CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons**. London: Cambridge University Press, 1976.
- CRANWELL, L. M. New Zealand pollen studies: The monocotyledons. **Bulletin of the Auckland Institute and Museum**, Auckland, v. 3, p. 1-91, 1953.
- DAVIS, G. L. **Systematic Embryology of the Angiosperms**. New York: John Wiley and Sons Inc., 1966.
- ENDRESS, P. K. Ontogeny, function and evolution of extreme floral construction in Monimiaceae. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 134, p. 79-120, 1980.
- ENDRESS, P. K.; IGERSEIM, A. Gynoecium structure and evolution in basal angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 161, p. 211-223, 2000.
- ENDRESS, P. K. Links between embryology and evolutionary floral morphology. **Current Science**, Bangalore, v. 89, p. 749-754, 2005.
- ERDTMAN, G. **Pollen Morphology and Plant Taxonomy**. Angiosperms. Stockholm: Almqvist and Wiksell, 1952.
- ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy**. Angiosperms. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Hafner Publishing Company, 1966.
- FAHN, A. **Plant Anatomy**. New York: Pergamon Press, 1990.
- FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Microsporogenesis in Monocotyledons. **Annals of Botany**, Oxford, v. 84, p. 475-499, 1999a.

- FURNESS, C.A.; RUDALL, P. J. Inaperturate pollen in Monocotyledons. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 160, p. 395-414, 1999b.
- FURNESS, C. A; RUDALL, P. J. Pollen and anther characters in monocot systematics. **Grana**, Stockholm, v. 40, p. 17-25, 2001.
- FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J.; SAMPSON, F. B. Evolution of microsporogenesis in Angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 163, p. 235-260, 2002.
- GERRITS, P. O.; SMID, L. A new, less toxic polymerization system form the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 132, p. 81-85, 1983.
- GUO, Y. H.; COOK, C. D. K. Pollination efficiency of *Potamogeton-pectinatus* L. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 34, p. 381-384, 1989.
- HAGSTRÖM, J.O. Critical researches on the Potamogetons. **Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar**, Stockholm, v. 55, p.1–281, 1916.
- HARDY, C. R.; STEVENSON, D. W. Development of gametophytes, flower, and floral vasculature in *Cochliostema odoratissimum* (Commelinaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 134, p. 131-157, 2000.
- HARDY, C. R.; STEVENSON, D. W.; KISS, H. G. Development of gametophytes, flower, and floral vasculature in *Dichorisandra thyrsiflora* (Commelinaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 87, p. 1228-1239, 2000.
- HAYNES, R. R. A revision of North American *Potamogeton* subsection *pusilli* (Potamogetonaceae). **Rhodora**, Cambridge, v. 76, p. 564-649, 1974.
- HAYNES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. Potamogetonaceae. **Flora Neotropica**, New York, n. 85, p. 1-52, 2003.
- HEGELMAIER, F. Über die Entwicklung der Blüthentheile von Potamogeton. **Botanische Zeitung**, Berlin, v. 28, p. 283-320, 1870.
- HESLOP-HARRISON, J. An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in *Silene pendula*. **Grana Palynologica**, Stockholm, v. 4, p. 7-24, 1963.
- HESLOP-HARRISON, J. The pollen grain wall. **Science**, Washington, v. 161, p. 230-237, 1968.
- HESLOP-HARRISON, J. The pollen wall: structure and development. In: HESLOP-HARRISON, J (Ed.). **Pollen: development and physiology**. London: Butterworths, 1971.
- HOLLOWAY, S. J.; FRIEDMAN, W. E. Embryological features of *Tofieldia glutinosa* and their bearing on the early diversification of monocotyledonous plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 102, p. 167-182, 2008.

IGERSHEIM, A.; BUZGO, M.; ENDRESS, P. K. Gynoecium diversity and systematics in basal monocots. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 136, p.1-65, 2001.

IIDA, S.; KOSUGE, K.; KADONO, Y. Molecular phylogeny of Japanese *Potamogeton* species in light of noncoding chloroplast sequences. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 80, p. 115-127, 2004.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1962.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd edn. New York: McGraw-Hill, 1940.

JOHRI, B. M. AMBEGAOKAR, K. B.; SRIVASTAVA, P. S. **Comparative embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

JUDD, W. S. *et al.* **Plant Systematics**. A phylogenetic approach. 3<sup>rd</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2008.

KAPLAN, Z. Phenotypic plasticity in *Potamogeton* (Potamogetonaceae). **Folia Geobotanica**, Praha, v.37, p.141-170, 2002.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137A-138A, 1965.

KNOX, R. B. The pollen grain. In: JOHRI, B. M. **Embriology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 197-261.

KUNTH, C. S. **Enumeratio plantarum**. Stuttgart: J. G. Cotta, 1841. v. 3.

LES, D. H.. Taxonomic implications of aneuploidy and polyploidy in *Potamogeton* (Potamogetonaceae). **Rhodora**, Cambridge, v. 85, p. 301-323, 1983.

LES, D. H.; SHERIDAN, D. J. Hagström's concept of phylogenetic relationships in *Potamogeton* L. (Potamogetonaceae). **Taxon**, Utrecht, v. 39, p. 41-58, 1990.

LES, D. H.; HAYNES, R. R. Systematics of subclass Alismatidae. A synthesis of approaches. In: *Monocotyledons: Systematics and Evolution*, 1993, Kew. **Proceedings of the Monocotyledons: Systematics and Evolution**, Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p. 353-377.

LES, D. H.; HAYNES, R. R. *Coleogeton* (Potamogetonaceae), a new genus of pondweeds. **Novon**, Saint Louis, v. 6, p. 389-391, 1996.

LES, D. H.; CLELAND, M. A; WAYCOTT, M. Phylogentic studies in Alismatidae, II: evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. **Systematic Botany**, Kent, v. 22, p. 443-463, 1997.

- LINDQVIST, C. *et al.* Molecular phylogenetics of an aquatic plant lineage, Potamogetonaceae. **Cladistics**, Westport, v. 22, p. 568-588, 2006.
- MAHESHWARI, P. **An Introduction to the Embryology of Angiosperms**. New York: McGraw-Hill, 1950.
- MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology e Laboratory Medicine**, Chicago, v. 100, p.405-414, 1976.
- MIKI, S. The origin of *Najas* and *Potamogeton*. **Botanical Magazine**, London, v. 51, p. 472-480, 1937.
- NADOT, S. *et al.* Links between early pollen development and aperture pattern in monocots. **Protoplasma**, New York, v. 228, p. 55-64, 2006.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, New York, v. 59, p. 368-373, 1965.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Thermacarphi Pty, 1981.
- PENET, L. *et al.* Multiple developmental pathways leading to a single morph: monosulcate pollen (examples from the Asparagales). **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, p. 331-343, 2005.
- PETTITT, J. M.; JERMY, A. C.. Pollen in hydrophilous angiosperms. **Micron**, New York, v. 5, p. 377-405, 1975.
- PETTITT, J. M. Reproduction in seagrasses: pollen development in *Thalassia hemprichii*, *Halophila stipulaceae* and *Thalassodendron ciliatum*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 48, p. 609-622, 1981.
- PHILBRICK, C. T.; ANDERSON, G. J. Implications of pollen/ovule ratios and pollen size for the reproductive biology of *Potamogeton* and autogamy in aquatic angiosperms. **Systematic Botany**, Kent, v. 12, p. 98-105, 1987.
- PHILBRICK, C. T. Evolution of underwater outcrossing from aerial pollination systems: a hypothesis. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 75, p. 836-841, 1988.
- POSLUSZNY, U.; SATTLER, R. Floral development of *Potamogeton densus*. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 51, p. 647-656, 1973.
- POSLUSZNY, U.; SATTLER, R. Floral development of *Potamogeton richardsonii*. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 61, p. 209-216, 1974.
- POSLUSZNY, U. Unicarpellate floral development in *Potamogeton zosteriformis*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, p. 495-504, 1981.

- POSLUSZNY, U.; CHARLTON, W. A. Inflorescence in the Helobiae (Alismatidae) - convergences and divergences. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 73, p. 617, 1986.
- POSLUSZNY, U.; CHARLTON, W. A. Evolution of the helobial flower. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 44, p. 303-324, 1993.
- PROCTOR, M.; YEO, P. **The pollination of flowers**. London: Collins, 1973.
- RAUNKIÆR, C. **De Danske Blomsterplanters Naturhistorie I. Helobieae**. København: Gyldendalske Boghandels Forlag, 1896.
- RESSAYRE, A. Equatorial aperture pattern in monocots: same definition rules as in eudicots? The example of two species of Pontederiaceae. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 162, p. 1219–1224, 2001.
- RESSAYRE, A. *et al.*. Aperture pattern ontogeny in angiosperms. **Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)**, New York, v. 294, p.122-135, 2002.
- RODRIGUES, R. S.; IRGANG, B. E. Potamogetonaceae Dumort., no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia série Botânica**, Porto Alegre, v. 56, p. 3-49, 2001.
- ROWLEY, J.R. Germinal aperture formation in pollen. **Taxon**, Utrecht, v. 24, p. 17-25, 1975.
- RUZIN, S. E. **Plant microtechnique and microscopy**. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- SANNIER, J. *et al.* Variations in the microsporogenesis of monosulcate palm pollen. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 151, p. 93-102, 2006.
- SATTLER, R. Perianth development of *Potamogeton richardsonii*. **American Journal of Botany**. Saint Louis, v. 52, p. 35-41, 1965.
- SINGH, V. Morphological and anatomical studies in Helobiae II: vascular anatomy of the flower of Potamogetonaceae. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 126, p. 137-144, 1965.
- SOLTIS, D. E.; GITZENDANNER, M. A.; SOLTIS, P. S. A 567-taxon data set for angiosperms: the challenges posed by Bayesian analyses of large data sets. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 168, p. 137-157, 2007.
- SORSA, P. Pollen Morphology of *Potamogeton* and *Groenlandia* (Potamogetonaceae) and its taxonomic significance. **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v. 25, p. 179-199, 1988.
- SOUTHWORTH, D. Cytochemical reactivity of pollen walls. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 21, p. 73-80, 1973.

SPURR, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructural Research**, New York, v. 26, p. 31-43, 1969.

STEVENS, P. F. **Angiosperm phylogeny website**. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>>. Acesso em:15/10/2008.

SUN, K. *et al.*, Floral organogenesis of *Potamogeton distinctus* A. Benn. (Potamogetonaceae). **Acta Phytotaxonomica Sinica**, Peiping, v. 38, p. 528-531, 2000.

TAKASO, T.; BOUMAN, F. Ovule ontogeny and seed development in *Potamogeton natans* L. (Potamogetonaceae) with a note on the campylotropous ovule. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam v. 33, p. 519-533, 1984.

THANIKAIMONI, G. Omniaperturate Euphorbiaceae pollen with striate spines. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique**, Meise, v. 54, p. 305-325, 1984.

TROLL, W. Morphologie der schildformigen Blätter. **Planta**, [S. l.]v. 17, p. 153-314, 1932.

UHL, N. W. **Studies in the floral morphology and anatomy of certain members of the Helobiae**. Não paginado. Tese (Doutorado em Botânica), - Cornell University, Ithaca, 1947.

WALKER, J. W.; DOYLE, J. A. The bases of Angiosperm phylogeny, palinology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 62, p. 664-723, 1975.

WATERKEYN, L.; BIENFAIT, A. On the possible function of the callosic special wall in *Ipomea purpurea* (L.) Roth. *Grana*, Stockholm, v. 10, p. 13-20, 1970.

WIEGAND, K. M. The development of the microsporangium and microspores in *Convallaria* and *Potamogeton*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 28, p. 328-368, 1899.

WIEGAND K. M. The development of the embryo-sac in some monocotyledonous plants. **Botanical Gazzete**, Chicago, v. 30, p. 25-47, 1900.

WIEGLEB, G.; KAPLAN, Z. An account of the species of *Potamogeton* L. (Potamogetonaceae). **Folia Geobotanica**, Praha, v. 33,p. 241-316, 1998.

WODEHOUSE, R. P. **Pollen grains**. Their structure, identification and significance in science and medicine. New York: McGraw-Hill, 1935.

ZAVADA, M. Comparative morphology of monocot pollen and evolutionary trends of apertures and wall structure. **The Botanical Review**, New York, v. 49, p. 331-379,1983.

ZHANG, T. *et al.* Analysis of phylogenetic relationships of *Potamogeton* species in China based on chloroplast trnT-trnF sequences. **Aquatic Botany**, Amsterdam. v. 89, p. 34-42, 2008.

## **DOCUMENTOS CONSULTADOS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR). Sistema de Bibliotecas. Citações e notas de rodapé. In: **Normas para apresentação de documentos científicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR). Sistema de Bibliotecas. Redação e editoração. In: **Normas para apresentação de documentos científicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR). Sistema de Bibliotecas. Referências. In: **Normas para apresentação de documentos científicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR) Sistema de Bibliotecas. Teses, dissertações, monografias e trabalhos acadêmicos. In: **Normas para apresentação de documentos científicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007.