



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**Instituto de Biologia**  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



**ONTOGENIA DO ÓVULO E DA SEMENTE DE ESPÉCIES DE *CUSPIDARIA* E  
*TYNANTHUS* (BIGNONIEAE: BIGNONIACEAE)**

Jessyca Alyne Lozasso

Orientadora: Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

**UBERLÂNDIA- MG**  
**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**Instituto de Biologia**  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



**ONTOGENIA DO ÓVULO E DA SEMENTE DE ESPÉCIES DE *CUSPIDARIA* E  
*TYNANTHUS* (BIGNONIEAE: BIGNONIACEAE)**

Jessyca Alyne Lozasso

Orientadora: Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção  
título de Mestre em Biologia Vegetal.

**UBERLÂNDIA- MG**  
**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L925o      Lozasso, Jessyca Alyne, 1991  
2016      Ontogenia do óvulo e da semente de espécies de *Cuspidaria e*  
*Tynanthus* (Bignoniaceae: Bignoniaceae) / Jessyca Alyne Lozasso. - 2016.  
123 f. : il.

Orientadora: Diana Salles Sampaio.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.  
Inclui bibliografia.

1. Botânica - Teses. 2. Bignoniaceae - Teses. 3. Ontogenia - Teses. I.  
Sampaio, Diana Salles, 1979-. II. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. III. Título.

CDU: 581

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

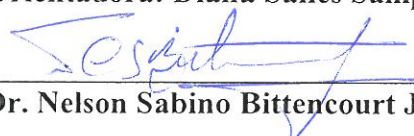


ONTOGENIA DO ÓVULO E DA SEMENTE DE ESPÉCIES DE *CUSPIDARIA* E  
*TYNANTHUS* (BIGNONIEAE: BIGNONIACEAE)

Jessyca Alyne Lozasso

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:   
Orientadora: Diana Salles Sampaio - UFU

Examinadores:   
Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior - UNESP

  
Dra. Juliana Marzinek - UFU

Dissertação aprovada em 25/02/2016

UBERLÂNDIA- MG  
2016

### ***Dedicatória***

*Dedico este trabalho aos meus pais Rita e Elsio, pelo amor e apoio incondicionais que me permitiram caminhar até aqui. A minha avó Iracema (in memoriam) por me transferir o amor pelas plantas.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida, fé, proteção e por nunca me deixar desistir dos meus sonhos.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Diana Salles Sampaio, pela confiança, apoio e dedicação para realização deste trabalho, pelos conselhos profissionais e pessoais e pela amizade.

À FAPEMIG pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFU, pelo apoio financeiro para coletas de material vegetal e oportunidades concedidas.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biologia Vegetal pela formação profissional e conselhos.

À secretária Nívia, por me ajudar sempre que precisei.

Aos funcionários da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Maria Guadalupe Carvalho Fernandes e Marcelo pela permissão de coleta, disponibilidade em ajudar e pelo auxílio durante a coleta na Instituição.

À administração do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, por ter autorizado a coleta na área de reserva.

Aos funcionários de todos os herbários que visitei por concederam as autorizações de coleta e pela atenção para comigo. Agradeço a todos do Herbário da Universidade de Brasília (UB), Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB), Herbário da Universidade de São Paulo (SPF), Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (IBSP), Herbário do Museu Nacional do Rio de Janeiro (R) e Universidade Federal de Uberlândia (HUFU).

A Dra. Lúcia Garcez Lohmann pelas sugestões para elaboração deste trabalho e identificação das espécies coletadas.

Ao professor Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior pelo esclarecimento de dúvidas que surgiram durante as análises.

Agradeço aos membros da banca por aceitarem o convite de contribuir para esse trabalho, Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior, Dra. Juliana Marzinek e Dra. Neuza Maria de Castro.

Ao professor Dr. Orlando Cavallari de Paula e à técnica de laboratório do Departamento de Engenharia Química, Francielle Silva, por me auxiliarem durante as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao professor Dr. Marcelo de Oliveira Gonzaga por disponibilizar o estereomicroscópio do Laboratório de Aracnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Agradeço Marcia, técnica do LAMOVl por sempre estar disposta a ajudar.

Agradeço a todos aqueles que me auxiliaram durante as coletas de material vegetal, a minha orientadora Diana, minha mãe Rita, meu namorado Vagner, meus amigos Pamella, Carmen, Luciano e Fernanda Sant'Anna.

Aos meus amigos da BIOVEG, Fernanda, Márcia, Manuela, Marília e Thais e do LAMOVl Angélica, Lígia, Ludimilla, Nayara, Stéphanie. Em especial agradeço a Pamella, Taynara e Rafael, vocês fizeram meus dias de trabalho mais felizes, obrigada por estarem sempre presentes, pelo apoio, pela amizade, pela ajuda no trabalho.

Aos meus pais, Rita e Elcio e aos meus irmãos, Heverton, Michael e Júnior, que mesmo a quilômetros de distância se fizeram presentes a cada dia, pelo amor, por acreditarem em mim e incentivar meus estudos e os meus sonhos.

Agradeço ao meu namorado Vagner, pelo amor, dedicação, incentivo, apoio e paciência, por estar sempre presente.

Agradeço também a todos os meus amigos que mesmo longe se fizeram presente nesses últimos anos.

## Sumário

Resumo.....	1
Abstract .....	3
Introdução.....	5
Taxonomia de Bignoniaceae .....	5
Taxonomia de Bignoniaceae.....	7
Ontogenia do óvulo .....	10
Ontogenia da semente .....	12
Espécies estudadas .....	14
Objetivos .....	17
Referências Bibliográficas .....	18
CAPÍTULO 1 .....	24
ONTOGENIA DO ÓVULO DE ESPÉCIES DE <i>CUSPIDARIA</i> E <i>TYNANTHUS</i> (BIGNONIEAE: BIGNONIACEAE) .....	24
Resumo: Ontogenia do óvulo de espécies de <i>Cuspidaria</i> e <i>Tynanthus</i> (Bignoniaceae: Bignoniaceae).....	25
<b>Introdução</b> .....	26
<b>Material e Métodos</b> .....	28
<i>Espécies estudadas e locais de estudo</i> .....	28
<i>Processamento do Material</i> .....	30
<i>Análises sob Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	30
<i>Análises Histológicas sob Microscopia Óptica</i> .....	30
<b>Resultados</b> .....	30
<b>Discussão</b> .....	43
<i>Placenta e tecido transmissor</i> .....	43
<i>Ontogenia do óvulo</i> .....	46
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	52
CAPÍTULO 2 .....	57
MEGASPOROGÊNESE E MEGAGAMETOGÊNESE EM ESPÉCIES DE <i>CUSPIDARIA</i> E <i>TYNANTHUS</i> (BIGNONIEAE: BIGNONIACEAE) .....	57

Resumo: Megasporogênese e megagametogênese em espécies de <i>Cuspidaria</i> e <i>Tynanthus</i> (Bignoniaceae: Bignoniaceae) .....	58
<b>Introdução</b> .....	59
<b>Material e Métodos</b> .....	60
<i>Espécies estudadas e locais de estudo</i> .....	60
<i>Análises Histológicas</i> .....	61
<b>Resultados</b> .....	62
<b>Discussão</b> .....	67
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	72
CAPÍTULO 3 .....	75
ONTOGENIA DA SEMENTE DE ESPÉCIES DE <i>CUSPIDARIA</i> E <i>TYNANTHUS</i> (BIGNONIEAE: BIGNONIACEAE) .....	75
Resumo: Ontogenia da semente de <i>Cuspidaria</i> e <i>Tynanthus</i> (Bignoniaceae: Bignoniaceae) .	76
<b>Introdução</b> .....	77
<b>Material e Métodos</b> .....	79
Resultados .....	85
<b>Discussão</b> .....	98
<b>Referências bibliográficas</b> .....	109
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	115

## Resumo

**Lozasso, J. A. 2016. Ontogenia do óvulo e da semente de espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus* (Bignoniaceae: Bignoniaceae). Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 123p.**

Estudos recentes de filogenia molecular alteraram de forma significativa a circunscrição de diversos gêneros de Bignoniaceae-Bignoniaceae. Em um tratamento taxonômico posterior, um de seus maiores gêneros, *Arrabidaea*, considerado polifilético, teve sua circunscrição alterada e suas espécies distribuídas nos gêneros *Cuspidaria*, *Fridericia*, *Tanaecium* e *Xylophragma*. Dado o grande conservadorismo das características embriológicas de angiospermas, o presente trabalho teve como objetivo analisar a ontogenia do óvulo e da semente de *C. sceptrum* (= *Arrabidaea sceptrum*), *C. convoluta* e *Tynanthus micranthus* em busca de caracteres que corroboram os dados moleculares que permitiram a inclusão de espécies de *Arrabidaea* em *Cuspidaria*, bem como que possam distinguir as espécies de *Cuspidaria* de seu grupo irmão, *Tynanthus*. Além de estabelecer comparações com *Fridericia platyphylla* (= *Arrabidaea brachypoda*) adotada como um grupo externo. Os óvulos anátropos, unitegumentados, tenuinucelados com presença de endotélio e hipóstase diferenciada, a meiose regular, com formação de uma tétrade linear e desenvolvimento do megagametófito do tipo *Polygonum*, seguem de acordo com o que foi observado nas espécies de Bignoniaceae anteriormente estudadas. A elevação dos primórdios de óvulos através de divisões celulares nas zonas II e III da placenta difere do já descrito para as demais Bignoniaceae. As espécies estudadas compartilham o fato de o tegumento ter sido originado apenas pela camada epidérmica com a tribo Jacarandae, diferindo das espécies de *Tabebuia alliance*. As espécies de *Cuspidaria* e *Fridericia* possuem apenas uma série de óvulos por placenta, enquanto *T. micranthus* apresenta duas séries por placenta, demonstrando ser uma característica útil para distinguir *Cuspidaria* de *Tynanthus*. A ausência de cristas placentíferas carnosas e presença de um prolongamento na região micropilar do óvulo são compartilhadas pelas espécies de *Cuspidaria* e *F. platyphylla*, indicando que possam ser mais amplamente distribuídas no clado *Arrabidaea and allies*, embora estejam ausentes em *T. micranthus*. O haustório calazal do endosperma das três espécies estudadas possui quatro células e esse caráter é compartilhado com espécies das tribos mais basais da família, Jacarandae e Tecomeae, mas difere do encontrado para os clados *Tabebuia alliance* e *Paleotropical clade*, sendo um caráter importante para diferenciar tribos ou clados superiores. A presença de um envoltório membranáceo composto por endosperma diferenciado tardiamente e endotélio

parece ser uma sinapomorfia para Bignoniaceae e sua ontogenia corresponde ao descrito em trabalhos mais recentes. Embora o endosperma diferenciado tardiamente esteja presente na semente madura, ele é escasso, não sendo a principal fonte de nutrientes durante a germinação, de forma que a semente é caracterizada como exalbuminosa. O prolongamento do tegumento na região micropilar não acompanha a expansão da semente, indicando que sua função deve estar restrita à antese floral podendo favorecer a penetração do óvulo pelo tubo polínico. A análise da morfologia do hilo demonstrou que as espécies de *Cuspidaria* possuem hilos arredondados, enquanto as de *Tynanthus* possuem hilos lineares, com algumas exceções que indicam a necessidade de estudos adicionais para esta característica. Dessa forma, embora os resultados deste estudo sejam úteis para separar espécies *Tynanthus* e *Cuspidaria*, eles não podem ser utilizados para corroborar a nova circunscrição de *Cuspidaria sceptrum* (= *Arrabidaea sceptrum*).

**Palavras chave** megasporogênese; ontogenia do óvulo; ontogenia da semente.

:

## Abstract

**Lozasso, J. A. 2016. Ovule and seed ontogeny in species of *Cuspidaria* and *Tynanthus* (Bignoniaceae: Bignoniaceae). Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 123p.**

Recent studies of molecular phylogeny changed significantly the circumscription of various genera of Bignoniaceae-Bignoniaceae. In a later taxonomic treatment, one of its biggest genera, *Arrabidaea*, considered polyphyletic, was the circumscription changed and had its species distributed in the genera *Cuspidaria*, *Fridericia*, *Tanaecium* and *Xylophragma*. Given the great conservatism of the embryological features of angiosperms, this study aimed to analyze the ovule and seed ontogeny of *C. sceptrum* (= *Arrabidaea sceptrum*), *C. convoluta* and *Tynanthus micranthus* in search of characters that support the molecular data that allowed the inclusion of *Arrabidaea* species in *Cuspidaria*, as well as that can distinguish the *Cuspidaria* species from his sister's group, *Tynanthus*. In addition to establish comparisons with *Fridericia platyphylla* (= *Arrabidaea brachypoda*), adopted as an external group. The anatropous, unitegmic tenuinucellate ovules, with an endothelium and a hypostase, and with a regular meiosis forming a linear tetrad and developing a *Polygonum* megagametophyte, are in accordance to the observed in earlier studies of Bignoniaceae species. The ovule primordia rising in zones II and III of the placenta differ from the previously described for other Bignoniaceae. The studied species share the origin of the integument only in the dermal layer with the tribe Jacarandae, differing from the species of *Tabebuia alliance*. *Cuspidaria* and *Fridericia* species have only a series of ovules per placenta, while *T. micranthus* has two series of ovules per placenta, proving to be a useful feature to distinguish *Cuspidaria* from *Tynanthus*. The absence of fleshy crests placenta and the presence of an integument extension at the micropylar pole of the ovule are shared by *Cuspidaria* species and *F. platyphylla*, indicating that they can be more widely distributed in the clade *Arrabidaea and allies*, although they are absent in *T. micranthus*. The chalazal haustorium of the endosperm of the three studied species has four cells and it is shared with species of the most basal tribes of the family, Jacarandae and Tecomeae, but differs from the finds for the *Tabebuia alliance* and *Paleotropical* clades, being an important character to distinguish tribes or higher clades. The presence of a membranous envelope composed by an endosperm with a late differentiation and by the endothelium seems to be a synapomorphy for Bignoniaceae and its ontogeny corresponds to the described in recent works. Although the late differentiated endosperm is present in the mature seed, it is scarce, not being the main source of nutrients

during germination, so that the seed is characterized as exalbuminous. The integument extension at the micropylar pole of the ovule did not follow the seed expansion, indicating that its function should be restricted to the floral anthesis and could favor the ovule penetration by the pollen tube. The analysis of the morphology of the hilum showed that *Cuspidaria* species have oval hilum, while *Tynanthus* species have linear hilum, with some exceptions, indicating the need for additional studies of this feature. Thus, although the results of this study are useful to distinguish *Tynanthus* and *Cuspidaria* species, they can not be used to support the new circumscription of *Cuspidaria sceptrum* (= *Arrabidaea sceptrum*).

**Keywords:** megasporogenesis, ovule ontogeny, seed ontogeny.

## Introdução

A família Bignoniaceae é composta por 82 gêneros e 827 espécies distribuídas em oito tribos, sendo que algumas ainda não foram formalmente incluídas em tribos, estando contidas nos clados *Tabebuia alliance* e *Paleotropical clade* como pode ser observado na Figura 1 (Olmstead *et al.*, 2009). Possui distribuição pantropical, com seu centro de distribuição nos neotrópicos e é amplamente distribuída pelo território brasileiro, com representantes nos domínios fitogeográficos Mata atlântica, Cerrado, Caatinga, Amazônia e Pantanal (Gentry, 1980).

A família é composta por plantas com hábito arbóreo, arbustivo e lianas, sendo as espécies da tribo Bignonieae representadas principalmente por lianas, mas também por subarbustos (Olmstead *et al.*, 2009; Lohmann & Taylor, 2014). Suas folhas são geralmente compostas e opostas cruzadas (Gentry, 1980), nas lianas o folíolo terminal frequentemente é substituído por uma gavinha que pode variar em forma, podendo ser simples, bífida, trifida ou multífida (Gentry, 1980; Lohmann & Taylor, 2014). As flores são vistosas, se dispõem em inflorescências axilares, terminais ou caulifloras, a corola é tubular e zigomorfa, sendo bilabiada no gênero *Tynanthus* (Gentry, 1974; Lohmann & Taylor, 2014). Possui quatro estames didínamos e um estaminódio, ovário súpero bicarpelar e bilocular (raramente unilocular) (Gentry, 1980; Lohmann & Taylor, 2014). O tipo de placentação é discutido em vários trabalhos e já foi caracterizada como axial, parietal ou intermediária entre axial e parietal, variando de acordo com as espécies estudadas (Gentry, 1980; Bittencourt, 1992; Singer, 2007). Os frutos são capsulares deiscentes, raramente indeiscentes, com sementes aladas (Gentry, 1980; Souza & Lorenzi, 2005; Judd *et al.*, 2009). As sementes maduras são aladas, exalbuminosas, com embrião do tipo transverso-oblongo, cotilédones bilobados, carnosos membranáceos, eixo embrionário reto, cônico, curto, localizado no istmo da base da semente (Barroso *et al.*, 1999).

## Taxonomia de Bignoniaceae

Dois trabalhos importantes de Gentry (1980; 1992) fazem um tratamento taxonômico detalhado da família, exceto para a tribo Bignonieae. Nessa revisão oito tribos foram reconhecidas, sendo duas novidades Oroxyleae, Schlegelieae. As oito tribos são: Bignonieae, Coleae, Crescentieae, Eccremocarpeae, Oroxyleae, Schlegelieae, Tecomeae e Tourretieae. Gentry (1980) não considera a tribo Jacarandae como proposto por Bentham & Hooker (1876) e considerou *Jacaranda* e *Digomphia* pertencentes à Tecomeae seguindo Bureau & K. Schumann (1897 *apud* Gentry, 1980).

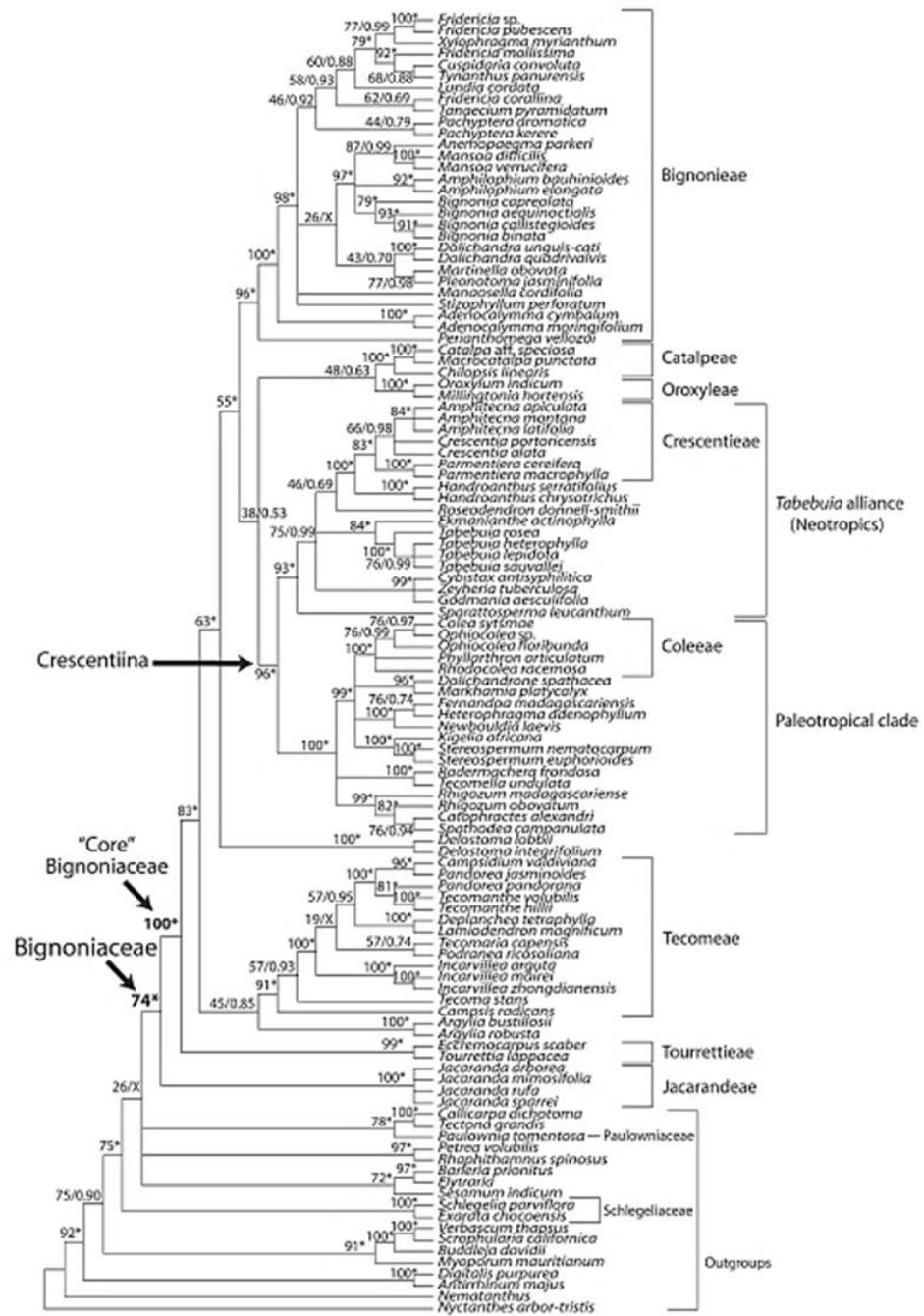


Figura 1: Cladograma da família Bignoniaceae obtido por Olsmsted *et al.*, 2009, combinando dados de *ndhF*, *trnL-F*, e *rbcL*.

Estudos recentes de filogenia molecular sugerem que algumas dessas tribos não sejam monofiléticas o que está acarretando rearranjos na taxonomia do grupo (Spangler & Olmstead, 1999; Lohmann, 2006; Grose & Olmstead, 2007; Olmstead *et al.*, 2009). Atualmente, a família faz parte da ordem Lamiales (APG, 2009). Sendo seus gêneros distribuídos em oito tribos: Bignonieae, Catalpeae, Coleeae, Crescentieae, Jacarandaeae, Oroxyleae, Tecomeae e Tourretieae (Olmstead *et al.*, 2009). A antiga tribo Schlegelieae foi excluída do tratamento de Bignoniaceae (Spangler & Olmstead, 1999; Fischer *et al.*, 2004; Olmstead *et al.*, 2009) e atualmente compõe a família Schlegeliaceae (APG, 2009). Tecomeae (*sensu* Gentry, 1992) aparece como parafilética, sendo reorganizada e passando a ter menor número de espécies (Olmstead *et al.*, 2009). Suas espécies são redistribuídas, fazendo com que ressurgam as tribos Catalpeae e Jacarandaeae (Olmstead *et al.*, 2009 – Figura 1). Nesse novo tratamento, Jacarandaeae ressurgue com uma circunscrição mais restrita do que a proposta por Betham & Hooker (1876) e é considerada como irmã das demais Bignoniaceae (Figura 1), incluindo apenas os gêneros *Jacaranda* e *Digomphia*. Eccremocarpeae (*sensu* Gentry, 1980) é reunida à tribo Tourretieae, reconhecendo as semelhanças das tribos já propostas anteriormente (Olmstead *et al.*, 2009). Outras espécies que eram consideradas parte de Tecomeae e não foram incluídas formalmente em nenhuma tribo, compõe juntamente à tribo Crescentieae, o clado *Tabebuia alliance*, e juntamente com a tribo Coleeae, o *Paleotropical clade*, além dos dois gêneros isolados *Argylia* e *Delostoma* (Olmstead *et al.*, 2009 – Figura 1).

#### *Taxonomia de Bignonieae*

A Tribo Bignonieae é a maior tribo de Bignoniaceae, sendo composta por 393 espécies (Olmstead *et al.*, 2009; Lohmann & Taylor, 2014). Três caracteres morfológicos que distinguem bem seus representantes de outras tribos de Bignoniaceae são a anatomia caular com o floema ramificado de 4 a 32 vezes, gavinha na posição do folíolo terminal e o fruto com deiscência septicida (Lohmann, 2006). A classificação da tribo em nível de gênero era considerada problemática, sendo composta por 47 gêneros, dos quais uma grande quantidade possuía poucas espécies e quatro gêneros principais (*Arrabidaea*, *Adenocalymma*, *Anemopaegma* e *Memora*) concentravam a maioria das espécies da tribo (Lohmann, 2006). Visto isso, foi realizado um estudo de filogenia utilizando DNA do cloroplasto e DNA nuclear de várias espécies de Bignonieae (Lohmann, 2006). Os resultados desse trabalho mostraram que a tribo é um grupo monofilético bem sustentado por caracteres morfológicos e moleculares, além de permitirem uma reorganização da tribo, na qual os 47 gêneros

considerados anteriormente foram reduzidos a 21 gêneros (Lohmann, 2006; Lohmann & Taylor, 2014).

Atualmente, a tribo é composta pelos seguintes gêneros com o número de espécies de cada um entre parênteses: *Adenocalymma* Mart. ex Meisn. (82), *Amphilophium* Kunth (47), *Anemopaegma* Mart. ex Meisn. (45), *Bignonia* L. (28), *Callichlamys* Miq. (1), *Cuspidaria* DC. (19), *Dolichandra* Cham. (8), *Fridericia* Mart. (67), *Lundia* DC. (13), *Manaosella* J. C. Gomes (1), *Mansoa* DC. (12), *Martinella* Baill. (2), *Neojobertia* Baill. (2), *Pachyptera* DC. ex Meisn. (4), *Perianthomega* (1), *Pleonotoma* Miers (17), *Pyrostegia* C. Presl (2), *Stizophyllum* Miers (3), *Tanaecium* Sw. (17), *Tynanthus* Miers (15), e *Xylophragma* Sprague (7) (Lohmann & Taylor, 2014).

O gênero *Arrabidaea*, que anteriormente concentrava grande parte das espécies pertencentes à tribo Bignonieae, foi dividido em quatro grandes clados (*True Arrabidaea clade*, *Bromeliad clade*, *Xylophragma s.l. clade* e *Cuspidaria s.l. clade*), os quais foram agrupados a *Tynanthus* e *Lundia* no clado *Arrabidaeae and allies* (Lohmann, 2006 – Figura 2). No novo tratado taxonômico da tribo este gênero foi extinto e as espécies anteriormente classificadas como *Arrabidaea* foram redistribuídas nos gêneros *Cuspidaria*, *Fridericia*, *Tanaecium* e *Xylophragma* (Lohmann & Taylor, 2014). No estado vegetativo as espécies de *Cuspidaria* são facilmente confundidas com as dos gêneros *Fridericia*, *Lundia*, *Xylophragma* e *Tynanthus*, mas podem ser reconhecidas por seus folíolos de venação pinada e percurrente reta juntamente com glândulas agrupadas nas axilas das nervuras. *Cuspidaria* ainda pode ser distinto de *Fridericia* pelas anteras curvadas para frente e presença de duas séries de óvulos por placenta. As espécies de *Fridericia* também são caracterizadas pela presença de glândulas interpeciolares, gavinhas simples, inflorescência tirsoide, flores cor de rosa e ovário lepidoto (Lohmann & Taylor, 2014). *Tanaecium* possui prófilos foliáceos ou bromelióides nas gemas axilares. *Xylophragma* apresenta múltiplas séries de óvulos por placenta e *Tynanthus* possui como características diagnósticas a presença de gavinhas trifidas e forte cheiro de cravo (Lohmann & Taylor, 2014).

O gênero *Cuspidaria* teve, então, sua circunscrição alterada, sendo composto por 17 espécies e duas variedades, passando a incluir quatro espécies anteriormente pertencentes à *Arrabidaea*, sendo elas *Cuspidaria inaequalis* (DC ex Splitg.) L.G. Lohmann (= *Arrabidaea inaequalis* (DC ex Splitg.) Baill), *Cuspidaria lachnaea* (Bureau) L.G. Lohmann (= *Arrabidaea lachnaea* (Bureau) Sandwith), *Cuspidaria pulchra* (Cham.) L. G. Lohmann (= *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith) e *Cuspidaria sceptrum* (Cham.) L.G. Lohmann (= *Arrabidaea sceptrum* (Cham.) Sandwith) (Lohmann & Taylor, 2014). Além destas espécies,

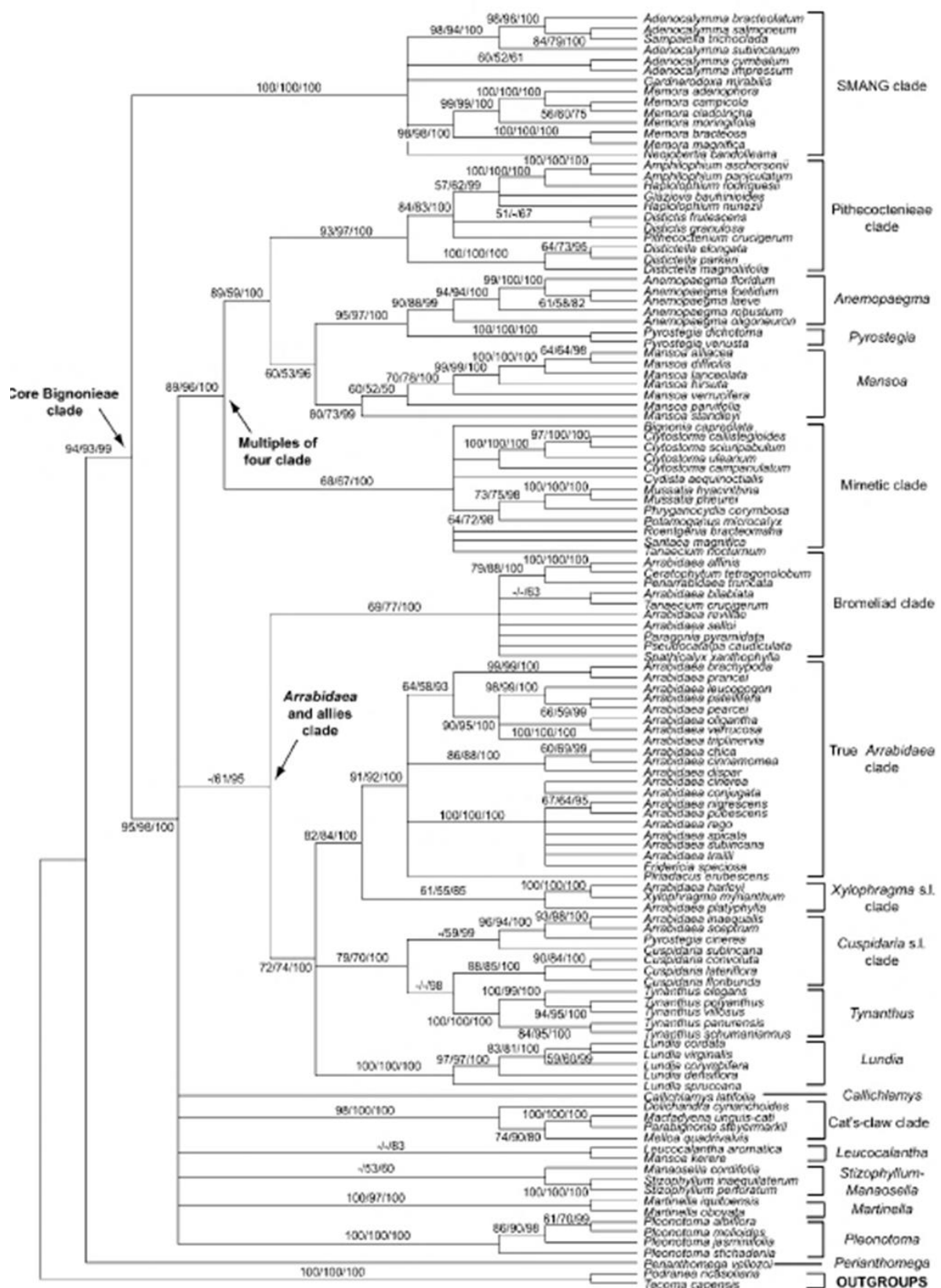


Figura 2: Cladograma da tribo Bignoniaceae obtido por Lohmann, 2006 dados de *ndhF* para 120 espécies de Bignoniaceae.

*Cuspidaria cinerea* (Bureau ex K.Schum.) L.G. Lohmann (= *Pyrostegia cinerea* Bureau & K. Schum) também passou a fazer parte de *Cuspidaria*, apesar desta relação ser inesperada, é apoiada por dados moleculares (Lohmann, 2006) e caracteres morfológicos (Lohmann & Taylor, 2014).

*Tynanthus* inclui 15 espécies de lianas (Lohmann & Taylor, 2014) e pode ser facilmente distinto pelas sinapomorfias do forte cheiro de cravo não encontrado em qualquer outro gênero, pela corola bilabiada com os dois lobos superiores fundidos e pelos frutos com margens elevadas que frequentemente se desenvolvem em alas (Lohmann & Taylor, 2014). Além disso, possui gavinhas trifidas relativamente pequenas, possui ramos cilíndricos e um disco nectarífero pouco desenvolvido (Lohmann & Taylor, 2014). O gênero *Tynanthus* é bem circunscrito e um recente trabalho de filogenia do gênero foi realizado esclarecendo as relações entre as suas espécies (Lohmann & Taylor, 2014; Medeiros & Lohmann, 2015).

#### *Ontogenia do óvulo*

As características reprodutivas são menos susceptíveis às mudanças ambientais, fato que contribui para a utilização desses caracteres em sistemática (Davis, 1966; Johri *et. al.*, 1992), de forma que estudos embriológicos comparativos vêm sendo realizados há muitos anos e fornecem base para estudos evolutivos (Endress, 2005). Segundo Tucker (1997), caracteres expressados mais cedo no desenvolvimento são mais estáveis e podem ser utilizados para caracterizar níveis mais altos da hierarquia (subfamílias, tribos), enquanto estados de caracteres especializados, que são expressos em fases mais avançadas do desenvolvimento, geralmente caracterizam gêneros ou espécies. Os estudos evolutivos tem se tornado possíveis devido às análises filogenéticas, que fornecem uma estrutura cada vez mais sólida para relações das plantas, entretanto, ainda há poucos trabalhos que relatem características embriológicas em angiospermas (Endress, 2005).

No entanto, para que a histologia do óvulo e da semente seja bem compreendida é necessária à realização de estudos ontogenéticos (Fahn, 1990). Estudos da ontogênese do óvulo e da semente são escassos para Bignoniaceae e grande parte dos trabalhos relatam apenas poucas fases do desenvolvimento. Desses trabalhos, apenas três relatam as fases de iniciação do primórdio de óvulo (Galati & Strittmatter, 1999; Bittencourt & Mariath, 2002a e b; Pereira Jr., 2011). Em todas as espécies estudadas até o momento, foram observadas cristas placentíferas salientes nas quais surgem os óvulos (Bittencourt & Mariath, 2002a; Bittencourt & Semir, 2005; Singer, 2007; Renó *et. al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Pereira Jr.,

2011). Variações quanto ao número de séries de óvulos que surgem em cada polo de placenta são observadas e parecem caracterizar gêneros ou grupos hierarquicamente superiores (Bittencourt & Mariath, 2002a; Bittencourt & Semir, 2005; Singer, 2007; Renó *et. al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Pereira Jr., 2011; Lohmann & Taylor, 2014). Em Bignoniaceae, Lohmann & Taylor (2014) definem a presença duas séries de óvulos por placenta uma sinapomorfia de *Cuspidaria* e a presença de apenas uma série de óvulos por placenta uma sinapomorfia de *Fridericia*. Entretanto, parece haver uma divergência nessas interpretações, já que foram descritas duas séries de óvulos por placenta em *F. platyphylla*, demonstrando que tais características merecem ser melhor exploradas (Singer, 2007).

Bittencourt & Mariath (2002a) e Pereira Jr. (2011) enfatizam a necessidade de estudos de fases iniciais da formação do primórdio de óvulo em outras espécies de Bignoniaceae para o esclarecimento das relações evolutivas da característica elevação do primórdio dentro da família. Até o momento foram observados óvulos bizonados em Jacarandaeae, os quais são iniciados a partir de divisões periclinais da camada subepidérmica (Galati & Strittmatter, 1999) e óvulos trizonados em *Tabebuia alliance*, os quais são iniciados a partir de divisões periclinais do corpo (Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011). Características como origem do tegumento do óvulo também divergem entre algumas espécies estudadas, podendo a origem do tegumento ocorrer a partir de divisões apenas na camada epidérmica em Jacarandaeae (Galati & Strittmatter, 1999) ou também haver participação da camada subepidérmica em *Tabebuia alliance* (Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011).

Durante o desenvolvimento do óvulo uma ou duas células camada subepidérmica se diferenciam em células arquesporais. Até o momento já foi observada a diferenciação de uma célula arquesporial em Jacarandaeae (Galati & Strittmatter, 1999), já nas espécies do clado *Tabebuia alliance*, ocasionalmente podem se diferenciar uma ou duas células arquesporais (Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011). A megasporogênese e megagametogênese nas espécies da família são muito características e o desenvolvimento do megagametófito é do tipo *Polygonum* (Bittencourt & Mariath, 2002b), o qual ocorre na maior parte das angiospermas (Batygina, 2002; Lersten, 2004).

Óvulos anátropos ou hemianátropos, unitegmentados e tenuinucelados são característicos de Bignoniaceae (Corner, 1976). No óvulo maduro o nucelo consiste em remanescentes da epiderme nucelar e na hipóstase já diferenciada (Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011), a qual é constituída de células com paredes espessas (Kapil & Tiwari, 1978). A diferenciação da camada interna dos óvulos em endotélio é uma característica comum a todas as espécies de Bignoniaceae já estudadas (Govindu, 1950;

Ghatak, 1956; Galati & Strittmatter, 1999; Mehra & Kulkarni, 1985; Bittencourt & Mariath, 2002a; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2008; Pereira Jr., 2011; Sampaio *et al.*, 2013), tornando-se biestratificado ainda no óvulo de algumas espécies (Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011). O endotélio pode apresentar muitas variações que vão desde a sua morfologia, até características citológicas e funcionais (Bouman, 1984). A hipóstase e o endotélio compartilham diversas características como de nutrição, e de barreira ao crescimento do megagametófito, persistindo até os estádios mais avançados do desenvolvimento da semente (Von Teichman & Van Wyk, 1991). A presença de endotélio e hipóstase simultaneamente é considerada um aspecto raro, já que o endotélio é considerado uma característica derivada e a hipóstase mais basal encontrado em apenas nove famílias de angiospermas (Von Teichman & Van Wyk, 1991).

### *Ontogenia da semente*

O estudo morfológico e anatômico de sementes é de grande importância para a sistemática e taxonomia, permitindo a identificação de espécies segundo Beltrati (1984). Estudos que relatam estádios iniciais de desenvolvimento da semente são encontrados para um número razoável de espécies de Bignoniaceae, devido aos trabalhos que visam elucidar a biologia reprodutiva das plantas (Bittencourt *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010; Gandolphi & Bittencourt, 2010; Sampaio *et al.*, 2013, Alves, 2014). Alguns trabalhos relatam o início do desenvolvimento do endosperma ou aspectos morfológicos em estádios específicos (Govindo, 1950; Ghatak, 1956; Mauritizon, 1935; Mehra & Kulkarni, 1985; Shivaramiah, 1998; Souza *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2008; Costa, 1995; Gabrielle & Castro, 1995). Entretanto, poucos trabalhos relatam a ontogenia da semente de forma detalhada abordando até os estádios finais do desenvolvimento (Renó *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Alves, 2014). Sampaio e colaboradores (2007) sugerem que as características do tegumento da semente nos estádios finais de desenvolvimento podem ser úteis para a sistemática da família e devem ser melhor exploradas.

O tegumento da semente madura é composto por várias camadas de células na região do corpo da semente diminuindo gradativamente até tornar-se uniestratificado nos bordos, nos quais apenas a ala está presente (Renó *et al.*, 2007). A partir de um alongamento das células da epiderme nas regiões apical e lateral óvulo origina-se a ala, que é membranácea, formada por células longas contendo celulose na região distal e celulose mais lignina na região próxima ao embrião em *Tecoma stans* (L.) Kunth (Renó *et al.*, 2007). As paredes das células

da ala apresentam diferentes graus de lignificação para as espécies já estudadas (Govindu, 1950; Ghatak, 1956; Costa, 1995; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007). As células da exotesta em sementes jovens são constituídas de paredes finas, e as células da mesotesta são parenquimáticas vacuoladas e com poucos espaços intercelulares (Sampaio *et al.*, 2007). Em estádios subsequentes do desenvolvimento ocorre um espessamento das paredes da exotesta e na mesotesta há um aumento dos espaços intercelulares (Sampaio *et al.*, 2007). Durante o desenvolvimento da semente é observada uma proliferação das células do endotélio a partir da porção calazal, envolvendo a porção mediana da cavidade da semente (Kapil & Tiwari, 1978; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014). No estágio médio de desenvolvimento da semente, as células da mesotesta se rompem e se forma um espaço de ar entre a mesotesta e o endotélio (Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010).

A morfologia do hilo possui formato variável, sendo relatado o formato ovóide a obovóide ou orbicular (Ferreira & Cunha, 2000) e como uma cicatriz estreita alongada transversalmente (Sampaio *et al.*, 2007) em estudos com espécies pertencentes ao clado *Tabebuia alliance*. O hilo como uma cicatriz estreita alongada transversalmente também foi descrito por Beltrati & Piccolo (1979) para uma espécie da tribo Bignonieae, enquanto para uma espécie da tribo Jacarandae foi relatado hilo punctiforme e em depressão (Gurgel *et al.*, 2006). Sendo assim, são necessários outros estudos para definir se este caractere possui alguma importância sistemática.

O endosperma é do tipo celular (Davis, 1966). Em Bignoniaceae pode ser classificado quanto ao número de células do haustório calazal (Mauritzon, 1935). O endosperma do tipo *Catalpa* possui haustório calazal de duas a quatro células e o do tipo *Incarvillea* possui haustório calazal de apenas uma célula (Mauritzon, 1935). Na semente em estágio médio de desenvolvimento e madura ainda foi identificada a diferenciação de um endosperma periférico diferenciado tardiamente (Renó *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013).

A maior parte dos trabalhos com sementes maduras de Bignoniaceae descreve o endosperma como ausente ou limitado (Hyakutake & Grotta, 1965; Panizza, 1967; Corner, 1976; Beltrati & Piccolo, 1979; Mehra & Kulkarni, 1985; Gabrielli & Castro, 1995; Costa, 1995; Ferreira & Cunha, 2000; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Renó *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2013). Sampaio e colaboradores (2007) relatam que a presença do endosperma limitado leva a utilização dos termos semente albuminosa e exalbuminosa de forma indistinta. Com isso, os autores sugerem a padronização para a descrição do endosperma nas sementes

maduras em Bignoniaceae como exalbuminosas, visto que os termos albuminosa e exalbuminosa dão ideia, respectivamente, do endosperma como sendo ou não a principal fonte de energia utilizada pelo embrião durante a germinação da semente. Mesmo sendo um tecido restrito nas sementes maduras, foram descritas a presença reservas lipoprotéicas, amido e outros carboidratos em suas células (Beltrati & Piccolo, 1979; Gabrielle & Castro, 1995; Renó *et al.*, 2007).

Uma estrutura membranácea que envolve todo o embrião na semente madura foi descrita e denominada de envoltório membranáceo (Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007). Existem divergências quanto à constituição desta estrutura, já tendo sido descrita como um conjunto de endosperma, remanescentes do nucelo e do tegumento interno (Beltrati & Piccolo, 1979), ou de endotélio e nucelo (Gabrielli & Castro, 1995), ou de endosperma e endotélio (Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014), ou ainda de apenas poucas camadas do endosperma (Mehra & Kalkarni, 1985; Costa, 1995). Estudos mais detalhados realizados por Sampaio e colaboradores (2007) e Bittencourt e Moraes (2010) demonstraram que o envoltório membranáceo é formado pelo endotélio, uma camada de cutícula e internamente pelas células do endosperma diferenciado tardiamente. Sampaio e colaboradores (2007) sugerem que, possivelmente, todas as espécies que apresentam o envoltório membranáceo tenham sua ontogenia e constituição semelhantes, pois os eventos para a formação deste tecido são de grande importância, tais como a morte programada das células da mesotesta e a diferenciação de células periféricas do endosperma. Sendo assim, são necessários estudos de sua composição em outras espécies.

#### *Espécies estudadas*

As espécies foram selecionadas para o presente trabalho com base no estudo de filogenia molecular realizado por Lohmann (2006) e seu posterior tratamento taxonômico (Lohmann & Taylor 2014). Optamos por trabalhar com uma espécie de *Cuspidaria sensu strictu* (*C. convoluta*), uma *sensu lato* (*C. sceptrum*; = *Arrabidaea sceptrum*), uma espécie de *Tynanthus* (*T. micranthus*), e uma de *Fridericia sensu lato* (*F. platyphylla* = *Arrabidaea brachypoda*). O representante do gênero *Tynanthus* foi escolhido por ser grupo irmão de *Cuspidaria*, a fim de buscar características que possam separar ou agrupar os gêneros. E o representante de *Fridericia* por anteriormente estar circunscrito junto com *C. sceptrum*, no gênero *Arrabidaea*, permitindo detectar características que corroborem ou não a separação destas espécies. Além disso, foi realizada a análise da morfologia do hilo em 14 espécies de

*Cuspidaria* e oito espécies de *Tynanthus* a fim de distinguir estes gêneros, as quais serão apresentadas no Capítulo 3.

*Cuspidaria convoluta* (Figura 3A, B) possui hábito lianescente e suas folhas são compostas por três folíolos elípticos com ápices afilados e com tricomas na face abaxial, sendo que frequentemente gavinhas simples se desenvolvem no local do folíolo central. As flores são dispostas em inflorescências apicais com corola lisa, apresentando coloração rosa clara e branca e cálice campanulado com cinco lobos agudos a acuminados. Os frutos são cápsulas septicidas, lisos, com margens elevadas, dando aspecto de um fruto alado. Ocorre no Paraguai, Bolívia, Argentina e no Brasil, neste já foi documentada para os estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, além de poder ser encontrada cultivada em outros locais (Lohmann & Taylor, 2014).

*Cuspidaria sceptrum* (Figura 3C-D) possui hábito arbustivo. Suas folhas são compostas por três folíolos lanceolados com tricomas na face abaxial e adaxial. As flores são dispostas em inflorescências apicais. A corola e cálice petaloides possuem coloração rosada, ambos com tricomas. O cálice é urceolado e se rasga após a protrusão da corola, o que dá um aspecto danificado às suas margens, mas permanece seco envolvendo o fruto durante o desenvolvimento (Sampaio, 2010). O fruto é uma cápsula septicida, de margens lisas e textura pegajosa devido à grande quantidade de tricomas glandulares. Ocorre na Bolívia e no Brasil, e neste é encontrada nos estados Bahia, Distrito Federal, Rondônia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Lohmann & Taylor, 2014).

*Fridericia platyphylla* (Figura 3E-F) é um subarbusto, possui folhas simples, obovadas e coriáceas. As inflorescências são apicais, o cálice é cupuliforme, inconspicuamente 5-partido, violáceo, de consistência coriácea e cobre apenas uma pequena porção da base da corola (Sampaio, 2010). A corola é lisa, apresenta coloração rosa com a face interna branca. O fruto é uma cápsula septicida com margens lisas. Sua distribuição no Brasil é bastante ampla, ocorrendo em quase todos os estados brasileiros (Lohmann & Taylor, 2014).

*Tynanthus micranthus* (Figura 3G-H) possui hábito lianescente, suas folhas são compostas por dois ou três folíolos e frequentemente gavinhas trifidas se desenvolvem no local do folíolo central. Os folíolos são elípticos e possuem região apical afilada. Suas flores são pequenas e dispostas em inflorescências axilares, a corola é bilabiada, de coloração branca. A presença de flores com tamanho entre 0,5 e 0,9 cm é uma característica diagnóstica da espécie (Medeiros & Lohmann, 2014) e a corola fortemente bilabiada constitui uma sinapomorfia do gênero (Lohmann & Taylor, 2014). Os frutos possuem margens elevadas,

sendo considerados alados. É encontrada no Paraguai, Argentina e Brasil. No Brasil ocorre nos estados Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (Lohmann & Taylor, 2014).

## **Objetivos**

O presente trabalho tem como objetivo elucidar a evolução das estruturas do óvulo e da semente em espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus* em comparação aos dados já existentes para a família Bignoniaceae. Além de buscar caracteres da ontogenia do óvulo e da semente que suportam os dados moleculares que agruparam *C. sceptrum* e *Cuspidaria convoluta* (Vell.) A.H. Gentry, bem como que possam distingui-las de *Tynanthus micranthus* Corr. Méllö ex K. Schum, representando seu grupo irmão.

O trabalho está dividido em três capítulos. O primeiro capítulo descreve aspectos da ontogenia do óvulo e discute sua evolução na família. O segundo capítulo descreve a megasporogênese e megagametogênese das três espécies. E o terceiro capítulo tem como objetivo elucidar aspectos importantes a respeito da ontogenia e morfologia da semente, como a presença endosperma na semente madura, o número de células do haustório calazal em comparação com outras espécies da família, o desenvolvimento do prolongamento da micrópila em *Cuspidaria*, a ontogenia e constituição do envoltório membranáceo, bem como a morfologia do hilo de 14 espécies de *Cuspidaria* e oito espécies de *Tynanthus*.

## Referências Bibliográficas

- ALVES, M. F. **Populações haploides e apomíticas de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae) com diferentes sistemas reprodutivos.** 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- APG (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP). An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à Sistemática de dicotiledôneas.** Viçosa: Imprensa Universitária. 1999.
- BATYGINA, T. B. **Embryology of flowering plants-Terminology and concepts. - Generative organs of flower.** v.1, Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd ed. New Dheli. 2002.
- BELTRATI, C. M. Morfologia e anatomia das sementes de *Trichilia elegans* A. Juss. (Meliaceae). **Naturalia**, v. 9, p. 35-42, 1984.
- BELTRATI, C. M.; PICCOLO, A. L. G. Consideraciones sobre la semilla, la germinación y la plántula de *Distictella mansoana* (Bur.) Urb. **Phytton**, v. 37, p. 85-96, 1979.
- BENTHAN, G.; HOOKER, J. D. **Genera Plantarum** 2: 1026-1053. 1876.
- BITTENCOURT JR., N. S. **Anatomia floral de *Tabebuia ochraceae* (Cham.) Standley (Bignoniaceae): Histologia, vascularização e ontogenia com especial referência ao desenvolvimento do óvulo e da antera.** 1992. Monografia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.
- BITTENCOURT JR, N. S; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): megasporogenesis and integument development. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 103-115, 2002a.
- BITTENCOURT JR, N. S.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): embryo sac development. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 117-127, 2002b.

- BITTENCOURT JR, N. S., GIBBS, P.E.; SEMIR, J. Histological study of post-pollination events in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), a species with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany**, v. 91, p. 827-834, 2003.
- BITTENCOURT JR., N. S.; SEMIR, J. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 166, p. 493-506, 2005.
- BITTENCOURT JR. N. S.; MORAES, C. I. G. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae) a histological study of post-pollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, p. 59-76, 2010.
- BOUMAN, F. The ovule. In **Embryology of Angiosperms** (B.M. Johri, ed.). Springer-Verlag, Berlin, 1984, p. 123-157.
- CORNER, E. J. H. **The seed of dicotyledons**. Cambridge University Press, London. 1976.
- COSTA, M. E. **Morfo-anatomia da semente e da plântula de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Bignoniaceae)**. 1995. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- COSTA, M. E.; SAMPAIO, D. S.; PAOLI, A. A. S.; LEITE, S. C. A. L. Poliembrião e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 395-406, 2004.
- DAVIS, O. L. **Systematic embryology of the Angiosperms**. John Wiley & Sons, Inc., New York. 1966.
- ENDRESS, P. K. Links between embryology and evolutionary floral morphology. **Current Science, Bangalore**, v. 89, n. 5, p.749-754, 2005.
- FAHN, A. **Plant anatomy**. 4th ed. Pergamon Press, New York. 1990.
- FERREIRA, R. A.; CUNHA, M. C. L. Aspectos morfológicos de sementes, plântulas e desenvolvimento da muda de craibeira (*Tabebuia caraiba* (Mart.) Bur.) – Bignoniaceae e pereiro (*Aspidosperma pyrifolium* Mart.) – Apocynaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 2, p. 134-143, 2000.

- FISCHER, E.; THEISEN, I.; LOHMANN, L. G. 2004. Bignoniaceae. *In*: The families and genera of vascular plants, vol VII. Kadereit (ed.) Springer-Verlag Heidelberg. Germany.
- GABRIELLI, A. C.; CASTRO, M. M. Anatomia da semente madura de *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers – Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 18, p. 227-234, 1995.
- GALATI, B. G.; STRITTMATTER, L. I. Ovule ontogeny and megasporogenesis in *Jacaranda mimosifolia* D. Don. (Bignoniaceae). **Phytomorphology**, v. 49, p. 67-74, 1999.
- GANDOLPHI G.; BITTENCOURT JR, N. S. Sistema reprodutivo do Ipê-Branco-*Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 24, p. 840-851, 2010.
- GENTRY, A. H. Coevolutionary Patterns in Central American Bignoniaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 61, n. 3, p. 728-759, 1974.
- GENTRY, A. H. Bignoniaceae: Part I (Crescentieae and Tourrettieae). **Flora Neotropica**, v. 25, p. 1-130, 1980.
- GENTRY, A. H. Bignoniaceae: Part II (Tribe Tecomeae) **Flora Neotropica**, v. 25, p. 1-1-370, 1992.
- GHATAK, J. A contribution to the life-history of *Oroxylum indicum* Vent. **Proceedings of the Indian Academical Science**, v. 43, p. 72-87, 1956.
- GOVINDU, H. C. Studies in the embryology of some members of the Bignoniaceae. **Proceedings of the Indian Academical Science**, v. 32, p 164-178, 1950.
- GROSE, S. O.; OLMSTEAD. Evolution of a Charismatic Neotropical Clade: Molecular Phylogeny of *Tabebuia* s. l., Crescentieae, and Allied Genera (Bignoniaceae), **Systematic Botany**, v. 32, n. 3, p. 650-659, 2007.
- GURGEL, E. S. C; SANTOS, J. U. M.; CARVALHO, A. C. M.; BASTOS, M. de N. do C. *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don. subsp. *spectabilis* (Mart. ex A. DC) Gentry (Bignoniaceae): aspectos morfológicos do fruto, semente, germinação e plântula. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 1, n. 2, p. 113-120, 2006.

- HYAKUTAKE, S.; GROTTA, A. S. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld. var. *petiolata* Bur. Bignoniaceae. **Ver. Fac. Farmácia. Bioquímica**, v. 3, p. 51-78, 1965.
- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B; SRIVASTAVA, P. S. Comparative Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin. 1992.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHU, M. J. **Sistemática vegetal um enfoque filogenético**. 3°. ed. Artmed. 2009.
- KAPIL, R.N.; TIWARI, S.C. The integumentary tapetum. **The Botanical Review**, v. 44, p. 457-490, 1978.
- LERSTEN, N. R. **Flowering plant embryology**. Blackwell Publishing, Austrália. 2004.
- LOHMANN, L. G. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae: Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, p. 304-318, 2006.
- LOHMANN, L. G.; TAYLOR, C. M. A new generic classification of tribe Bignoniaceae (Bignoniaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 99, p 348–489, 2014.
- MAURITZON, J. Etwas über die embryologie der Bignoniaceen. **Botaniska Notiser**, p. 60-77, 1935.
- MEHRA, K. R.; KULKARNI, A. R. Embryological studies in Bignoniaceae. **Phytomorphology**, v. 35, p. 239-251, 1985.
- MEDEIROS, M. C. M. P. de; LOHMANN, L. G. Two new species of *Tynanthus* Miers (Bignoniaceae, Bignoniaceae) from Brazil. **PhytoKeys**, v. 42, p. 77-85, 2014.
- MEDEIROS, M. C. M. P. de; LOHMANN, L. G. Phylogeny and biogeography of *Tynanthus* Miers (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 85, p. 32-40 (2015).
- OLMSTEAD, R. G.; ZHANG, M. L.; LOHMANN, L. G.; GROSE, S. O. ; ECKERT, A. J. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 1731–1743, 2009.

- PANIZZA, S. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Jacaranda caroba* (Velloso) DC. Bignoniaceae. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica de São Paulo**, v. 5, p. 93-106, 1967.
- PEREIRA JR, E. J. Ontogenia do Óvulo e da Antera de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae). (Dissertação de mestrado), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2011.
- RENÓ, L. R.; MOSCHETA, I. S.; BRACCINI A. de L. Morfo-anatomia do fruto e semente de amarelinho (*Tecoma stans* (L.) Kunth - Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 18-30, 2007.
- SAMPAIO D. S.; COSTA M. E.; PAOLI A. A. S. Ontogenia da semente de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 289-302, 2007.
- SAMPAIO, D. S. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações nos sistema de autoincompatibilidade**. Tese. (Doutorado em Ecologia) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil. 2010.
- SAMPAIO, D. S.; BITTENCOURT JR, N. S.; OLIVEIRA, P. E. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma species* (Bignoniaceae) from central Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 173, p. 77-91, 2013.
- SHIVARAMIAH, G. Endosperm development in Bignoniaceae. **Phytomorphology**, v. 48, p. 45-50, 1998.
- SINGER, R. F. **Estudos ontogenéticos de flor e fruto de espécies de Bignoniaceae com ênfase na taxonomia** Tese. (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2005

- SOUZA, L. A, IWAZAKI, M. C.; MOSCHETA, I. Morphology of the pericarp and seed of *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. (Bignoniaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 407-418, 2005.
- SOUZA, L. A de; OLIVEIRA OYAMA, S. de; MUNERATTO J.C. Morphology and anatomy of the developing fruit of *Macfadyena unguis-cati* (L.) A.H. Gentry, Bignoniaceae. **Acta Botánica Venezuelica**, v. 31, p. 1-13, 2008.
- SPANGLER, R. E.; OLMSTEAD, R. G. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences *rbcL* and *ndhF*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 86, p. 33-46, 1999.
- TUCKER S. C. Floral evolution, development and convergence: the hierarchical significance hypothesis. **International Journal of Plant Science**, v. 158, p. 143-161, 1997.
- VON TEICHMAN, I.; VAN WYK, A. E. Trends in evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachychalazy and recalcitrance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 105, p. 211-237, 1991

## **CAPÍTULO 1**

### **ONTOGENIA DO ÓVULO DE ESPÉCIES DE *CUSPIDARIA* E *TYNANTHUS* (BIGNONIEAE: BIGNONIACEAE)**

**Resumo: Ontogenia do óvulo de espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus* (Bignoniaceae: Bignoniaceae)**

Recentemente o gênero *Arrabidaea* (Bignoniaceae-Bignoniaceae) foi extinto e suas espécies foram distribuídas em outros gêneros, como *Cuspidaria* e *Fridericia*. Como caracteres embriológicos possuem grande valor sistemático, objetivou-se verificar características na ontogenia do óvulo de *Cuspidaria convoluta* e *Cuspidaria sceptrum* (= *Arrabidaea sceptrum*) que corroborassem os dados moleculares, e que as distinguissem de *Tynanthus micranthus*, membro de seu grupo irmão, através de análises histológicas e de Microscopia Eletrônica de Varredura. Os dados ainda foram comparados a *Fridericia platyphylla* (= *Arrabidaea brachypoda*) para que fossem observadas possíveis sinapomorfias do clado *Arrabidaea and allies*. As quatro espécies possuem óvulos anátropos, unitegumentados e tenuinucelados, com hipóstase e endotélio diferenciados como as demais espécies de Bignoniaceae. A origem dos primórdios de óvulos nas zonas II e III da placenta difere do já descrito para *Jacarandae* e *Tabebuia alliance*. A presença de apenas uma fileira de óvulos por placenta é uma característica compartilhada pelos gêneros *Cuspidaria* e *Fridericia*, enquanto as duas fileiras encontradas em *T. micranthus* são compartilhadas por outros gêneros de *Arrabidaeae and allies*. *Cuspidaria convoluta*, *C. sceptrum* e *T. micranthus* possuem um tecido transmissor pouco proeminente, diferindo das espécies já estudadas de *Tabebuia alliance*. O tegumento do óvulo foi originado pela camada epidérmica e subepidérmica como observado em espécies de *Tabebuia alliance*, levando a crer que esta é uma característica derivada na família. A presença de cristas placentíferas pouco salientes e a presença de um prolongamento característico do tegumento na região micropilar dos óvulos são características compartilhadas pelas espécies estudadas de *Cuspidaria*, bem como por *F. platyphylla*, indicando que estas características possam ser compartilhadas pelas espécies do clado *Arrabidaeae and allies*, mas que foram perdidas em *Tynanthus*. Os dados sobre a morfologia da placenta e ontogenia do óvulo são semelhantes entre *Cuspidaria sceptrum* e *C. convoluta*, entretanto, não podem ser reportados como características do gênero, uma vez que são compartilhadas com *F. platyphylla*. Dessa forma, os resultados deste estudo são úteis para separar espécies dos gêneros *Tynanthus* e *Cuspidaria*.

## Introdução

As características embriológicas das plantas são bem conservadas, sendo menos susceptíveis às mudanças ambientais, o que favorece sua utilização para a compreensão de relações filogenéticas entre diferentes grupos (Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992). O tipo de placentação, locais e arranjos das regiões da placenta são importantes ferramentas na taxonomia, auxiliando na identificação das famílias de angiospermas (Gasser & Beers, 1993). Em Bignoniaceae existem descrições de placentação axial, parietal e intermediária, bem como de diferentes números de séries de óvulos por placenta, evidenciando a necessidade de estudos focados nestes aspectos. Além disso, os óvulos, também demonstram características importantes como ser de origem bizonada ou trizonada, o número de tegumentos, tipo de nucelo, presença de hipóstase e endotélio (Endress, 2010).

Duas cristas placentíferas salientes foram observados em cada face do septo em espécies de *Handroathus*, *Tabebuia* e *Cyristax* (clado *Tabebuia alliance*, *sensu* Olmstead *et al.*, 2009) (Bittencourt & Mariath, 2002a; Bittencourt & Semir, 2005; Bittencourt & Moraes, 2010; Pereira Jr., 2011). E em *Jacaranda racemosa* Cham. (Bittencourt & Semir, 2006) pertencente à tribo Jacarandae (*sensu* Olmstead *et al.*, 2009). Embora Singer (2007), não descreva a histologia das placentas, mostra a secção transversal do ovário evidenciando a presença de cristas placentíferas salientes em *Parmentiera cereifera* Seem., que é parte da tribo Crescentieae, também inserida no clado *Tabebuia alliance*, e em *Jacaranda mimosifolia* D. Don., *Jacaranda simplicifolia* K. Schum. e *Digomphia laurifolia* Benth., pertencentes à tribo Jacarandae, o clado mais basal da família. Diferente do que foi observado para estas espécies, *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann (= *Arrabidaea brachypoda* Bureau), da tribo Bignonieae (*sensu* Olmstead *et al.*, 2009), não apresenta cristas placentíferas salientes (Singer, 2007), o que nunca foi discutido na literatura.

Variações quanto ao número de séries de óvulos que surgem nas superfícies das placentas são observadas e parecem caracterizar gêneros ou grupos hierarquicamente superiores (Bittencourt & Mariath, 2002a; Bittencourt & Semir, 2005; Singer, 2007; Renó *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Pereira Jr., 2011; Lohmann & Taylor, 2014). Em Bignonieae, Lohmann & Taylor (2014) definem a presença duas séries de óvulos por placenta como uma sinapomorfia de *Cuspidaria* e a presença de apenas uma série de óvulos por placenta como uma sinapomorfia de *Fridericia*. Entretanto, parece haver uma divergência nessas interpretações, já que foram descritas duas séries de óvulos por placenta em *F. platyphylla*, demonstrando que tais características merecem ser melhor exploradas (Singer, 2007).

Bouman (1984) considera que os primórdios ovulares possuem uma organização do tipo túnica e corpo. Na qual os primórdios bizonados tem origem na túnica, sendo esta formada pela camada epidérmica e a subepidérmica, e se elevam a partir de divisões periclinais na camada subdérmica. Primórdios trizonados tem origem na túnica, formada pela camada epidérmica e a subepidérmica, e um corpo, constituído por várias células, e elevam-se a partir de divisões periclinais na última. Por outro lado, Warming (1878 *apud* Batygina, 2002) reconhece três modos de iniciação do primórdio ovular e considera que as plantas podem apresentar várias combinações destes padrões, sendo eles (1) divisões na camada subepidérmica, (2) divisões no corpo, e (3) divisões simultâneas na camada subepidérmica e no corpo. Em Bignoniaceae foram observados óvulos bizonados em *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter, 1999), e óvulos trizonados iniciados a partir de divisões periclinais no corpo em *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath, 2002a) e *C. antisiphilitica* (Pereira Jr., 2011). Bittencourt & Mariath (2002a) e Pereira Jr. (2011) enfatizam a necessidade de estudos com outras espécies de Bignoniaceae para o esclarecimento das relações evolutivas deste caráter na família.

Óvulos anátropos ou hemianátropos, unitegumentados e tenuinucelados foram descritos para Bignoniaceae (Corner, 1976). A presença de hipóstase diferenciada e endotélio também são relatados para a família (Mauritzon, 1935; Govindu, 1950; Ghatak, 1956; Davis, 1966; Mehra & Kulkarni, 1985; Johri *et al.*, 1992; Galati & Strittmatter, 1999; Bittencourt & Mariath, 2002a; Gandolphi & Bittencourt, 2010; Pereira Jr., 2011; Sampaio, *et al.*, 2013). A presença de endotélio e hipóstase simultaneamente é considerada um aspecto raro, já que o endotélio é considerado uma característica derivada e a hipóstase mais basal, sendo encontrado em apenas nove famílias de angiospermas (Von Teichman & Van Wyk, 1991). A formação do endotélio é associada à desorganização de células do nucelo, ou epiderme nucelar em plantas tenuinuceladas (Johri *et al.*, 1992). O endotélio possui funções que variam com o estágio de desenvolvimento, podendo ser relacionado à coordenação do desenvolvimento do megagametófito (Kapil & Tiwari, 1978), além de servir como intermediário no transporte de nutrientes entre o tegumento e o megagametófito (Johri *et al.*, 1992). Há variações quanto à forma de suas células, podendo ser isodiamétricas, tangencialmente ou radialmente alongadas (Bittencourt & Mariath, 2002a; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007, Souza *et al.*, 2008; Bittencourt & Moraes, 2010; Pereira Jr., 2011).

Um recente trabalho de filogenia, utilizando dados morfológicos e moleculares alterou a delimitação taxonômica de Bignoniaceae (Lohmann, 2006; Lohmann & Taylor, 2014). Um dos maiores gêneros da tribo, *Arrabidaea*, foi desmembrado e teve suas espécies

redistribuídas nos gêneros *Cuspidaria*, *Fridericia*, *Tanaecicum* e *Xylophragma* (Lohmann & Taylor, 2014). A maior parte das espécies anteriormente pertencentes a *Arrabidaea* foram inseridas em *Fridericia*, como foi o caso de *F. platyphylla* (Lohmann & Taylor, 2014). No gênero *Cuspidaria* foram inseridas quatro espécies anteriormente pertencentes à *Arrabidaea*, entre elas *Cuspidaria sceptrum* (Cham.) L.G. Lohmann (= *Arrabidaea sceptrum* (Cham.) Sandwith) (Lohmann & Taylor, 2014). *Cuspidaria*, por sua vez, é grupo irmão de *Tynanthus*, sendo suas espécies facilmente confundidas no estado vegetativo (Lohmann & Taylor, 2014).

Neste trabalho, foram selecionadas quatro espécies para as análises de morfologia da placenta e ontogenia do óvulo, sendo uma *Cuspidaria sensu strictu* (*Cuspidaria convoluta* (Vell.) A.H. Gentry), uma *sensu lato*, *C. sceptrum*, uma espécie de *Tynanthus*, *Tynanthus micranthus* Corr. Méllö ex K. Schum., e uma de *Fridericia sensu lato*, *F. platyphylla*. Dessa forma, pretende-se verificar se *C. sceptrum* possui ontogenia do óvulo semelhante a *C. convoluta*, suportando os dados moleculares que as agruparam, bem como que possam distingui-las de *T. micranthus*, representando seu grupo irmão. Ainda foi realizada uma análise pontual do tegumento do óvulo de *F. platyphylla*, a fim de confirmar se sua morfologia difere do encontrado em *C. sceptrum*, já que estavam anteriormente agrupadas em *Arrabidaeae*. Além disso, pretende-se contribuir para o conhecimento da evolução da morfologia de placentas e óvulos na família Bignoniaceae, um campo ainda pouco explorado.

## Material e Métodos

### *Espécies estudadas e locais de estudo*

*Cuspidaria convoluta* possui hábito lianescente e suas folhas são compostas por três folíolos elípticos com ápices afilados e com tricomas na face abaxial, sendo que frequentemente gavinhas simples se desenvolvem no local do folíolo central. As flores são dispostas em inflorescências apicais com corola lisa, apresentando coloração rosa clara e branca e cálice campanulado com cinco lobos agudos a acuminados. Os frutos são cápsulas septicidas, lisos, com margens elevadas, dando aspecto de um fruto alado. Ocorre no Paraguai, Bolívia, Argentina e no Brasil, neste já foi documentada para os estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, além de poder ser encontrada cultivada em outros locais (Lohmann & Taylor, 2014).

*Cuspidaria sceptrum* possui hábito arbustivo. Suas folhas são compostas por três folíolos lanceolados com tricomas na face abaxial e adaxial. As flores são dispostas em inflorescências apicais. A corola e cálice petaloides possuem coloração rosada, ambos com

tricomas. O cálice é urceolado e se rasga após a protrusão da corola, o que dá um aspecto danificado às suas margens, mas permanece seco envolvendo o fruto durante o desenvolvimento (Sampaio, 2010). O fruto é uma cápsula septicida, de margens lisas e textura pegajosa devido à grande quantidade de tricomas glandulares. Ocorre na Bolívia e no Brasil, e neste é encontrada nos estados Bahia, Distrito Federal, Rondônia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Lohmann & Taylor, 2014).

*Fridericia platyphylla* é um subarbusto, possui folhas simples, obovadas e coriáceas. As inflorescências são apicais, o cálice é cupuliforme, inconspicuamente 5-partido, violáceo, de consistência coriácea e cobre apenas uma pequena porção da base da corola (Sampaio, 2010). A corola é lisa, apresenta coloração rosa com a face interna branca. O fruto é uma cápsula septicida com margens lisas. Sua distribuição no Brasil é bastante ampla, ocorrendo em quase todos os estados brasileiros (Lohmann & Taylor, 2014).

*Tynanthus micranthus* possui hábito lianescente, suas folhas são compostas por dois ou três folíolos e frequentemente gavinhas trifidas se desenvolvem no local do folíolo central. Os folíolos são elípticos e possuem região apical afilada. Suas flores são pequenas e dispostas em inflorescências axilares, a corola é bilabiada, de coloração branca. A presença de flores com tamanho entre 0,5 e 0,9 cm é uma característica diagnóstica da espécie (Medeiros & Lohmann, 2014) e a corola fortemente bilabiada constitui uma sinapomorfia do gênero (Lohmann & Taylor, 2014). Os frutos possuem margens elevadas, sendo considerados alados. É encontrada no Paraguai, Argentina e Brasil. No Brasil ocorre nos estados Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (Lohmann & Taylor, 2014).

*Cuspidaria convoluta* e *T. micranthus* foram coletadas de setembro de 2014 a setembro de 2015, na Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, MG (19°51'30.7" S, 44°0'29.4" W). As coletas de *C. sceptrum* foram realizadas entre os meses de abril e maio de 2014 e *F. platyphylla* em agosto de 2015, ambas em populações naturais do Município de Uberlândia, nas bordas da área de reserva legal do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (18°58'43.8" S, 48°17'40,3" W). *Fridericia platyphylla* foi analisada somente quanto à morfologia do tegumento do óvulo durante a antese. O material testemunho foi depositado no *Herbarium Uberlandense* da Universidade Federal de Uberlândia, sob os números: *C. convoluta*: HUFU 71.549, *C. sceptrum*: HUFU 71.548, *F. platyphylla*: HUFU 55490 e *T. micranthus*: HUFU 71.547.

### *Processamento do Material*

Foram coletados botões florais e flores em diferentes estádios de desenvolvimento. O material foi fixado em solução de gluteraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Mc Dowell & Trump, 1976).

### *Análises sob Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia da Faculdade de Engenharia Química, da Universidade Federal de Uberlândia. Para exposição dos óvulos, os pistilos foram dissecados com auxílio de pinças e bisturi. Logo em seguida o material foi desidratado em série etílica e série etanol:acetona (1:0, 1:1, 0:1), ficando 15 minutos em cada solução. Posteriormente, o material foi seco em aparelho de ponto crítico (Leica CPD 300) e fixado nos “stubs” com auxílio de fita dupla face. A metalização do material foi feita com ouro em equipamento Leica SCD 050. A análise e digitalização das imagens foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura, Zeiss (EVO|MA10).

### *Análises Histológicas sob Microscopia Óptica*

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Morfologia Vegetal e Imagem da Universidade Federal de Uberlândia. O material foi desidratado em série etílica e, posteriormente, passou por uma série etanol:clorofórmio (3:1, 1:1, 3:1) para retirada das ceras epicuticulares, retornando, em seguida, ao etanol 100%. A inclusão foi realizada em hidroxietilmetacrilato (Leica Historesin Embedding Kit) (Gerrits & Smid, 1983). Os ovários foram seccionados transversalmente obtendo-se cortes longitudinais dos óvulos. Cortes seriados de 0,2 a 0,3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo de rotação (RM2135, Leica) equipado com navalha descartável Leica, (Leica 818 High Profile Microtome Blades). O material foi corado com Azul de Toluidina O 0,05%, em tampão benzoato de sódio, pH 4,4 (Feder & O'brien, 1968) e as lâminas montadas com Permount. A análise das lâminas e as fotomicrografias foram realizadas em microscópio óptico (Olympus BX 51) com câmera digital acoplada (Olympus DP70).

## **Resultados**

Nas espécies de *Cuspidaria*, as placentas emergem como duas saliências longitudinais em cada lado do septo, sendo que as células da placenta se diferenciam das demais células por passarem a apresentar conteúdo citoplasmático denso (Figuras 1A-D). Já em *T. micranthus*, a placenta é formada por duas cristas carnosas de cada lado do septo

(Figuras 1E, F). Em *Cuspidaria*, apenas uma fileira de primórdios de óvulo emerge em cada um destes quatro polos de placenta (Figuras 2A, B), sendo visto apenas um primórdio por placenta quando o pistilo é analisado em secção transversal do ovário. Deve-se atentar para que em estádios mais avançados do desenvolvimento, com o aumento dos óvulos em volume, eles podem perder a sua disposição linear em *C. convoluta*, dando a impressão haver mais de uma fileira de óvulos por polo de placenta. Em *T. micranthus*, duas fileiras de primórdios de óvulo emergem em cada uma das cristas placentíferas (Figuras 2C, D), sendo vistos dois primórdios por crista quando o pistilo é analisado em um corte transversal. No entanto, na base do septo desta espécie há apenas um óvulo por crista placentífera (Figuras 2C, D). Ainda pode-se observar que o desenvolvimento dos óvulos no pistilo ocorre sequencialmente da base para o ápice em *C. sceptrum* (Figura 2B) e do ápice para a base em *T. micranthus* (Figura 2C), sendo encontradas diferentes fases do desenvolvimento do óvulo em um mesmo pistilo (Figuras 2B, C).

A emergência dos primórdios seminais em *C. convoluta* e *C. sceptrum* segue rapidamente com a protusão inicial da placenta, de modo que a formação das duas entidades se sobrepõe. As células meristemáticas da placenta possuem citoplasma denso, vacúolos reduzidos ou ausentes e núcleos evidentes (Figuras 3A-F). Cada polo de placenta é constituído de três zonas celulares, sendo denominadas do exterior para o interior de zona I, zona II (ambas com uma camada de células) e zona III (com mais de uma camada de células). As zonas correspondem às camadas epidérmica e subepidérmica da túnica, e às células do corpo (*sensu* Bouman, 1984). A iniciação dos primórdios de óvulos tem origem em um alongamento nas paredes anticlinais das células da zona II, seguido por uma divisão periclinal nestas células, bem como por divisões em diferentes planos na zona III da placenta (Figuras 3A-F). Portanto, o primórdio de óvulo é composto pelas três zonas da placenta. As camadas de células originadas da divisão periclinal da zona II foram denominadas derivada externa da zona II (De II) e derivada interna da zona II (Di II) (Figuras 3A-C, F).

Em *T. micranthus*, observam-se células de conteúdo citoplasmático denso regiões da crista placentífera, sendo observadas inicialmente divisões periclinais na zona II, também originando as De II e Di II (Figuras 3G, H). Assim como observado nas espécies de *Cuspidaria*, em *T. micranthus* a elevação do primórdio se dá por esta primeira divisão periclinal das células da zona II, bem como por divisões em células da zona III, as quais ocorrem em diferentes planos (Figuras 3G-H). Dessa forma, nas três espécies a zona I passa por uma sequência de divisões anticlinais, a zona II por divisões anticlinais e periclinais

e na zona III não há um padrão regular das divisões, sendo observadas divisões periclinais, anticlinais e oblíquas (Figuras 3A-H).

Com a protrusão do primórdio, torna-se difícil estabelecer os limites das células oriundas das zonas II e III, com isso, consideramos um conjunto de células derivadas de ambas as zonas (Figuras 4A-F). Observa-se que as células das zonas I e II tornam-se alongadas anticlinalmente, adjacentes à célula arquesporial na região onde surgirá a micrópila, enquanto as células que se localizam na região onde será formado o funículo, são mais ou menos isodiamétricas (Figuras 4 A-C, E). Tal diferença de formato está relacionada com o início da curvatura do primórdio que dará origem a um óvulo anátropo, devido à proliferação de células da face funicular. Ocorre uma maior extensão do primórdio no lado funicular, sendo que este se curva em direção ao lado das células alongadas anticlinalmente, futura região micropilar (Figuras 4 A-C, E).

Na camada subepidérmica do primórdio, uma ou duas células se diferenciam em células arquesporais, possuindo maior volume, citoplasma denso e núcleo proeminente, sendo o núcleo da célula arquesporial maior do que o núcleo das demais células (Figuras 4B, E-F). Neste estágio, observam-se, esporadicamente, células da camada epidérmica em divisão periclinal (Figuras 4C, E). Algumas células da camada subepidérmica também passaram por divisões periclinais (Figuras 4A, C, F). Em um estágio imediatamente posterior, são observadas divisões em diferentes planos nas células da camada epidérmica, lateralmente à célula arquesporial, as quais darão origem ao tegumento do óvulo (Figuras 5A-C). Apenas uma célula arquesporial se diferencia em célula mãe de megásporo (CMM) (Figuras 5A, D-I). Em *C. sceptrum*, não foi observada a célula arquesporial, apenas uma região de células de citoplasma mais denso, onde ela deve ter se originado (Figura 4D) e a CMM já diferenciada (Figuras 5E, H, K). Durante esta diferenciação, há um avanço rápido na curvatura do óvulo, o qual se torna anátropo (Figuras 5G-L). O desenvolvimento do tegumento circundando a protusão do nucelo (CMM e epiderme nucelar) pode ser observado durante a curvatura do óvulo (Figuras 5D-F, 6A-C). Nas espécies do gênero *Cuspidaria*, o encontro das margens do tegumento para formar a micrópila ainda não ocorreu na fase de CMM (Figuras 5G, H), mas já ocorreu, formando a micrópila em *T. micranthus* (Figura 5I).

O nucelo é reduzido, sendo constituído pela epiderme nucelar, uma camada de células que envolvem a CMM que teve origem na zona I da placenta, e um grupo de células na base da CMM, onde futuramente será formada a hipóstase (Figuras 5G-L). As células da hipóstase adquirem paredes mais espessadas de coloração arroxeada pelo Azul de Toluidina O (Figuras 5G, I-L), persistindo até os estádios finais do desenvolvimento do óvulo. A hipóstase é,

provavelmente, derivada da Di II, já que a divisão periclinal das células da zona II foi observada na maioria das placentas analisadas durante a iniciação do primórdio (Figuras 3A-H).

Adjacente à epiderme nucelar, células da camada interna do tegumento, se diferenciam em endotélio e apresentam um conteúdo citoplasmático mais denso que as demais (Figuras 5G-L). Nas três espécies, essas células passam por divisões periclinais, resultando em um endotélio biestratificado (Figuras 5G-L). Nas espécies do gênero *Cuspidaria* observa-se um alongamento periclinal das células do endotélio, já em *Tynanthus* essas células se alongam anticlinalmente (Figuras 5G-L).

Logo abaixo da hipóstase, observam-se células que passaram por divisões anticlinais e periclinais, as quais possuem conteúdo citoplasmático denso e são alongadas periclinalmente, tornando-se afiladas, as quais constituem o procâmbio do óvulo (Figuras 5A, D, E, H, L). O procâmbio das três espécies teve origem nas células derivadas das zonas II e III (Figuras 4A, C-F). Nas espécies de *Cuspidaria*, o procâmbio se diferenciou quando a CMM ainda não estava alongada e o óvulo não estava totalmente curvado, enquanto em *T. micranthus* a diferenciação ocorreu quando a CMM já estava totalmente alongada com o óvulo anátropo (Figura 5L).

Durante a megagametogênese ocorre um acúmulo de grãos de amido na região micropilar do tegumento do óvulo (Figuras 7A-F). O início da degeneração da epiderme nucelar pode ser verificado desde o momento de alongamento da CMM, quando começam a ser observados células colapsadas, com núcleo reduzido e escassez de citoplasma (Figuras 5G, I, J-K), restando apenas alguns remanescentes celulares na região calazal ao final da megagametogênese (Figuras 7F, 8A-C). Nas três espécies analisadas as células do endotélio da região mediana até região micropilar do megagametófito degeneraram-se expondo seus grãos de amido, persistindo apenas na região calazal (Figuras 7F, 8A, C).

Nos óvulos das espécies de *Cuspidaria* e em *F. platyphylla* o tegumento se expande, formando um prolongamento na região micropilar do óvulo (PM), com células volumosas de organização frouxa, as quais contém grande quantidade de grãos de amido em *C. sceptrum* (Figuras 8A-F). Em *Cuspidaria* esse prolongamento começa a se formar ainda nos botões florais, entre o final da megaesporogênese e o início da megagametogênese (Figuras 7C, D), mas fica nítido somente nas flores em antese (Figuras 8A-D, 9A-E). Em *C. convoluta* o prolongamento do tegumento é menos conspícuo do que o prolongamento de *C. sceptrum* e é melhor visualizado em secções longitudinais laterais dos óvulos e sob MEV (Figuras 8A, B,

9A, B). Em *C. sceptrum* e *F. platyphylla* é possível observar que este tecido se expande lateralmente, o que é comprovado sob MEV (Figuras 8D, F, 9C-F). O PM circunda toda a região da micrópila, mas em alguns óvulos apresenta-se de forma descontínua (Figuras 9C). O tegumento dos óvulos não apresenta o PM em *T. micranthus* (Figuras 9G, H).

Nas três espécies, ocorre um alongamento anticlinal nas células da epiderme do septo, as quais passam a apresentar organização frouxa e aspecto papiloso (Figura 10). Esta diferenciação se inicia no final da megasporogênese e início da megagametogênese, sendo que estas células se tornam um pouco mais alongadas anticlinalmente e frouxas até antese diferenciando em tecido transmissor (Figura 10).

## Discussão

### *Placenta e tecido transmissor*

A organização das placentas em *C. convoluta* e *C. sceptrum* é semelhante, em ambas as espécies são formadas as cristas placentíferas pouco salientes, sendo as placentas identificadas regiões do septo nas quais as células apresentam um conteúdo citoplasmático mais denso. O mesmo parece ocorrer em *F. platyphylla* (Singer, 2007), mas difere de *T. micranthus*, que possui as cristas placentíferas muito salientes. Estes dados indicam que as cristas placentíferas salientes observadas em espécies da tribo Jacarandae e do clado *Tabebuia alliance* (Bittencourt & Mariath, 2002a; Bittencourt & Semir, 2005; Bittencourt & Semir, 2006; Singer, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Pereira Jr., 2011) devem ser o estado de caráter mais basal na família e que a ausência de saliência dessas cristas deve ter surgido na tribo Bignonieae. Como a amostragem de espécies de Bignonieae observadas quanto a este caráter é reduzida, podemos afirmar apenas que a ausência saliência de cristas ocorre no clado *Arrabidaeae and allies* (*sensu* Lohmann, 2006), parecendo ter havido uma reversão deste caráter no gênero *Tynanthus*.

Em *C. convoluta* e *C. sceptrum* foi observada apenas uma fileira de óvulos em cada polo de placenta, oposto ao relatado por Lohmann & Taylor (2014), que definem a presença de duas séries de óvulos por placenta como uma sinapomorfia do gênero. Nas imagens de MEV do presente trabalho a presença de apenas uma fileira de óvulos é clara durante a iniciação dos primórdios em *C. convoluta*, mas em estádios mais avançados, à medida que os óvulos aumentam em volume, parece haver uma sobreposição dos mesmos, o que também pode ser observado nas seções transversais do ovário. Esta sobreposição parece ser

responsável pelas diferentes interpretações sobre o número de fileiras de óvulos por polo de placenta. Da mesma forma, Lohmann & Taylor (2014) definem que a presença de uma série de óvulos por placenta seria uma sinapomorfia do gênero *Fridericia*, o que corrobora nossas observações de *F. platyphylla* (Figura 9F) no presente trabalho, mas diverge do encontrado por Singer (2007) que afirma que *F. platyphylla* teria duas fileira de óvulos por polo de placenta. Entretanto, no trabalho de Singer (2007) observa-se apenas uma fileira de óvulos em seções transversais do ovário, mas dando a impressão de serem duas fileiras quando analisados sob MEV, o que seria também uma sobreposição dos óvulos como mencionado acima. Sendo assim, o acompanhamento dos primórdios de óvulos desde as fases iniciais de desenvolvimento parece ser crucial para uma correta interpretação deste caráter.

Embora estes cuidados sejam necessários para a interpretação do número de fileiras de óvulos por polo de placenta, este caráter é diagnóstico para os clados de Bignoniaceae. Dos clados pertencentes ao grande grupo *Arrabidaeae and allies* (*sensu* Lohmann, 2006), concluímos que *Cuspidaria* e *Fridericia* possuem claramente uma fileira de óvulos por placenta, *Tynanthus* e *Lundia* duas fileiras e *Tanaecium* possui uma ou duas fileiras por placenta, merecendo investigações mais aprofundadas, enquanto *Xylophragma* é caracterizado por apresentar múltiplas séries de óvulos por placenta (Lohmann & Taylor, 2014). Desta forma, pode-se dizer que no clado *Arrabidaeae and allies* (*sensu* Lohmann, 2006) o estado de caráter basal seria apresentar duas fileiras de óvulos por placenta, com uma redução para uma fileira em *Cuspidaria* e *Fridericia* e um aumento para múltiplas fileiras em *Xylophragma*. Quando se analisa este caráter para a família como um todo, observa-se que a tribo Jacarandaeae é bastante variável, com quatro fileiras de óvulos por placenta em *J. mimosifolia*, três em *J. simplicifolia*, e duas *D. laurifolia* (Singer, 2007). Tendo havido um aumento no número de fileiras por polo de placenta no clado *Tabebuia alliance* com uma variação de seis a sete fileiras de óvulos em *Handroanthus ochraceus* (Cham.) Mattos (= *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl.) (Bittencourt, 1992), cinco fileiras em *C. antisiphilitica* e *P. cereifera* (Singer, 2007), e uma diminuição em Bignonieae como relatado acima.

O tecido transmissor possui a função de orientação e fornecer nutrientes para os tubos polínicos além de poder secretar substâncias que estimulam ou inibem seu crescimento (Lerster, 2004). Este tecido comumente se diferencia na epiderme interna ou camadas celulares adjacentes à superfície interna dos carpelos (Gasser & Beers, 1993), podendo ter continuidade desde o estilete até o ovário (Lerster, 2004). Suas células são altamente secretoras, sendo a presença de secreções mucilaginosas na matriz comumente observada (Gasser & Beers, 1993). Em *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath, 2002a) e *C.*

*antisyphilitica* (Pereira Jr., 2011), foi observada a diferenciação do tecido transmissor desde o início da diferenciação das placentas. Em *H. impetiginosus* o tecido transmissor é bastante saliente logo antes da polinização (Bittencourt & Semir, 2005), e é também observado em *J. racemosa*. (Bittencourt & Semir, 2006). O tecido transmissor de *H. impetiginosus* é caracterizado por Bittencourt & Semir (2005) como sendo constituído de células arredondadas, vacuoladas, com conteúdo citoplasmático denso, espaços intracelulares relativamente grandes e matriz extracelular abundante. Souza e colaboradores (2008) relatam a presença de células papilosas com grandes núcleos na epiderme da região placentária do ovário de *Dolichandra unguis-cati* (L.) L.G. Lohmann (= *Macfadyena unguis-cati* (L.) A.H. Gentry) (tribo Bignoniaceae), porém os autores não caracterizam estas células como tecido transmissor. Em *C. convoluta*, *C. sceptrum* e *T. micranthus* somente no final da megasporogênese e início da megagametogênese começa a ser observada uma diferenciação das células da epiderme na região do septo em células papilosas frouxamente organizadas no presente estudo, parecendo ocorrer o mesmo em *F. platyphylla* (Singer, 2007).

O desenvolvimento dos óvulos de *T. micranthus* é basípeto (ocorre no sentido do ápice para a base) semelhante ao descrito para *J. simplicifolia*, *J. mimosifolia* e *D. laurifolia* (Singer, 2007), membros da tribo Jacarandae. Enquanto em *C. sceptrum* o desenvolvimento dos óvulos acrópeto, semelhante ao observado para *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath, 2002a), *C. antisyphilitica* e *P. cereifera* (tribo Crescentieae), membros do clado *Tabebuia alliance*, bem como a *F. platyphylla*, da tribo Bignoniaceae (Singer, 2007).

#### *Ontogenia do óvulo*

Os primórdios de óvulos das três espécies possuem organização trizonada, com a túnica composta por duas camadas de células e o corpo, como proposto por Bouman (1984). A camada de túnica mais externa, aqui chamada de zona I, passa por divisões anticlinais; a camada mais interna, aqui chamada de zona II, passa por divisões anticlinais e periclinais; e o corpo, aqui chamado de zona III, não apresenta um padrão regular de divisões. As divisões das zonas II e III promovem a iniciação do primórdio de óvulo. No entanto, este padrão difere do que é observado em outras espécies consideradas trizonadas, *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath, 2002a) e *C. antisyphilitica* (Pereira Jr., 2011), membros do clado *Tabebuia alliance*, nas quais ocorrem divisões periclinais predominantemente na zona III para a elevação do primórdio (Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011). Na família Bignoniaceae também foram encontrados primórdios bizonados, iniciados a partir de divisões

periclinais na camada subepidérmica (zona II) da placenta em *J. mimosifolia*, (Galati & Strittmatter, 1999).

Ao adotar uma classificação mais flexível, os primórdios de óvulos das espécies estudadas de *Cuspidaria* e *Tynanthus* (Tribo Bignoniaceae) seguem o terceiro tipo de iniciação proposto por Warming (1878 *apud* Batygina, 2002) em que são observadas divisões periclinais nas zonas II e III. De acordo com esta classificação, *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter, 1999) se enquadra no tipo 1, em que a iniciação do primórdio se dá através de divisões periclinais na zona II, e *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath, 2002a) e *C. antisiphilitica* (Pereira Jr., 2011) (*Tabebuia* alliance) se enquadram no tipo 2, na qual iniciação do primórdio se dá através de divisões periclinais na zona III. Tendo em vista esta classificação de Warming (1878 *apud* Batygina, 2002) é possível que análises mais minuciosas deste caractere possam reforçar estes diferentes padrões entre os grupos.

Em *J. mimosifolia*, apenas uma célula arquesporial foi observada (Galati & Strittmatter, 1999). Já em outras Bignoniaceae como *Kigelia africana* (Lam.) Benth (= *Kigelia pinnata* (Jacq.) DC.), *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Govindu, 1950), *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath, 2002a) e *C. antisiphilitica* (Pereira Jr., 2011), assim como nas espécies estudadas no presente trabalho, a diferenciação de duas células arquesporais ocorreu em alguns óvulos.

Vários ciclos de divisões celulares na camada epidérmica promovem o crescimento do tegumento do óvulo, o que é acompanhado pela sua curvatura. O tegumento em plantas simpétalas surge principalmente a partir de divisões da camada epidérmica (Warming, 1878 *apud* Bittencourt & Mariath, 2002a), mas pode haver participação da camada subepidérmica (Bouman & Schier, 1979). Nas três espécies estudadas o único tegumento tem origem a partir de divisões da camada epidérmica e subepidérmica. Tal característica é comum ao observado em *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath, 2002a) e *C. antisiphilitica* (Pereira Jr., 2011) (*Tabebuia* alliance) e diferente do que foi observado em *J. mimosifolia* (Tribo Jacarandaeae) (Galati & Strittmatter, 1999) onde apenas a camada epidérmica participa da formação do tegumento. Sugerindo então, que a formação do tegumento pelas camadas epidérmica e subepidérmica é derivada dentro da família, sendo compartilhadas por membros do clado *Tabebuia* alliance e que da tribo Bignoniaceae.

O crescimento do tegumento ocorre mais rapidamente em *T. micranthus*, nesta espécie, a organização da micrópila ocorre na fase de CMM, já em *C. convoluta* e *C. sceptrum* o fechamento do tegumento e organização da micrópila ocorre na fase final da tétrade linear de megásporos, quando os megásporos micropilares começam a degenerar.

Variações no estágio de fechamento do tegumento foram observadas em outras espécies de Bignoniaceae. Em *P. cereifera* (Govindu, 1950) (Tribo Crescentieae), *C. antisiphilitica* (Pereira Jr., 2011), *Tabebuia rosea* (Bertol.) Bertero ex A.DC. (*Tabebuia alliance*), *Stereospermum chelonoides* DC e *D. falcata* (*Paleotropical clade*) (Merha & Kulkarni, 1985), o tegumento se fecha no estágio de CMM como observado para *T. micranthus*. Já em *Millingtonia hortensis* L.f. (Oroxyleae), *Fernandoa adenophylla* (Wall. ex G.Don) Steenis (= *Heterophragma adenophyllum* (Wall. ex G.Don) Seem. ex Benth. & Hook.f) (*Paleotropical clade*) (Merha & Kulkarni, 1985) e *H. pulcherrimus* (*Tabebuia alliance*) (Bittencourt & Mariath, 2002a), o fechamento da micrópila é concluído no estágio de tétrade linear de megásporos, como observado para as espécies de *Cuspidaria* no presente estudo. Em *J. mimosifolia* (tribo Jacarandae), *K. africana* (*Paleotropical clade*) e *T. stans* (tribo Tecomeae), no estágio de CMM, o tegumento ainda não está fechado e encontra-se até a metade do nucelo (Govindu, 1950). O momento de fechamento do tegumento para a formação da micrópila é bastante variável na família, impedindo qualquer discussão acerca de sua distribuição. Entretanto, levando-se em consideração apenas as espécies analisadas neste estudo, o tegumento parece se fechar mais rapidamente em óvulos menores, o que acontece com *T. micranthus*, e mais lentamente em óvulos maiores, no caso das espécies de *Cuspidaria*. Seria interessante que esta inferência fosse testada em estudos posteriores em outras espécies da família para sua confirmação.

Nas três espécies a camada interna do tegumento diferencia-se em endotélio, sendo uma característica comum a todas as espécies de Bignoniaceae já estudadas, (Govindu, 1950; Galati & Strittmatter, 1999; Ghatak, 1956; Mehra & Kulkarni, 1985; Bittencourt & Mariath, 2002a; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2008; Pereira Jr., 2011; Sampaio *et al.*, 2013). Nas espécies de *Cuspidaria* a diferenciação do endotélio ocorre no estágio do alongamento da CMM, quando as células são alongadas tangencialmente/periclinalmente, enquanto em *T. micranthus*, a diferenciação fica evidente durante a meiose I e as células variam de isodiamétricas a alongadas anticlinalmente. As células podem ser isodiamétricas ou tangencialmente alongadas, nos estádios iniciais do desenvolvimento do óvulo, mas invariavelmente se tornam radialmente alongadas em estádios mais avançados (Kapil & Tiwari, 1978). As células alongadas radialmente de *Tynanthus* são semelhantes ao encontrado em *H. ochraceus* e *C. antisiphilitica* (Sampaio *et al.*, 2007; Pereira Jr., 2011), bem como se assemelham às células de formato isodiamétrico descritas para *H. chrysotrichus* (Souza *et al.*, 2008). Já em *H. pulcherrimus*, as células do endotélio são tangencialmente alongadas (Bittencourt & Mariath, 2002a), como observado para as espécies de *Cuspidaria*. Podemos

observar que o formato das células do endotélio é bastante variável, pois foi constante apenas para grupos de espécies muito próximos como as espécies de *Cuspidaria* analisadas, bem como *H. chrysotrichus* e *H. ochraceus* (consideradas espécies muito próximas *sensu* Gentry, 1992), não possuindo constância no gênero *Handroanthus*, já que uma espécie um pouco mais distante, *H. pulcherrimus*, já apresentou um padrão distinto.

A diferenciação da hipóstase na região calazal foi observada nas três espécies estudadas no presente trabalho. Essa característica também é encontrada em todos os trabalhos que a investigaram em espécies de Bignoniaceae (Mauritzon, 1935; Govindu, 1950; Ghatak, 1956; Mehra & Kulkarni, 1985; Johri *et al.*, 1992; Galati & Strittmatter, 1999; Bittencourt & Mariath, 2002a; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2008; Pereira Jr., 2011; Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014). A presença de óvulos com endotélio é considerada um estado de caráter mais derivado entre as angiospermas, em comparação com a presença de hipóstase, a qual é considerada um caráter basal (Kapil & Tiwari, 1978; Von Teichman & Van Wyk, 1991). A presença concomitante de endotélio e hipóstase é considerada um aspecto raro dentro das angiospermas, visto que só ocorre em nove famílias (Von Teichman & Van Wyk, 1991).

Swamy (1941) e Govindu (1950) sugerem que a principal função da hipóstase é nutrir o megagametófito, enquanto Mehra & Kulkarni (1985) que a hipóstase impede o crescimento agressivo do haustório calazal do endosperma durante o desenvolvimento da semente devido à presença de paredes espessas. De acordo com as observações realizadas no presente trabalho, embora a hipóstase possua células de paredes espessas, estas não parecem apresentar espessamento secundário ou deposição de lignina e, em estudos da ontogenia da semente, são degradadas gradualmente pelo haustório calazal do endosperma (Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013, Capítulo 3). Dessa forma, a hipóstase não seria tão efetiva em impedir o crescimento agressivo do haustório calazal, mas poderia sim contribuir com a nutrição do megagametófito, como também sugerido para *H. ochraceus* devido à presença de carboidratos em suas células (Sampaio *et al.*, 2007).

As evidências de degeneração da epiderme nucelar durante a megagametogênese, enquanto a expansão do megagametófito na região micropilar do óvulo leva a um colapso das células do endotélio nesta região, foram observadas no presente trabalho, bem como em outras espécies de Bignoniaceae já investigadas quanto a estes parâmetros (Mauritzon, 1935; Govindu, 1950; Ghatak, 1956; Mehra & Kulkarni, 1985; Galati & Strittmatter, 1999; Bittencourt & Mariath, 2002a; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2008; Pereira Jr., 2011; Sampaio *et al.*, 2013). Comumente a degeneração das células do endotélio é

associada à pressão mecânica exercida pelo crescimento do megagametófito na região micropilar (Bittencourt & Mariath, 2002a). No entanto, essa degeneração também já foi associada a uma morte celular geneticamente controlada (Tilton & Lersten, 1981).

Os óvulos maduros das três espécies são anátropos, unitegumentados e tenuinucelados, sendo a presença das duas últimas características comum para a ordem Lamiales (Judd *et al.*, 2009). Óvulos anátropos são o mais comum em Bignoniaceae, embora óvulos hemianátropos ocorram em *Millingtonia*, *Oroxylum* (Oroxyleae), *Stereospermum*, *Kigelia* (*Paleotropical clade*) e *P. cereifera* (*Tabebuia alliance*) (Govindu, 1950; Ghatak, 1956; Mehra & Kulkarni, 1985).

Em *C. convoluta* e *C. sceptrum* e *F. platyphylla* foi observado um prolongamento do tegumento na região micropilar do óvulo, cujas células são volumosas, de organização frouxa. Até o momento, em nenhuma das espécies de Bignoniaceae já estudadas foi reportada a presença de tal estrutura ou algo semelhante. O fato de este prolongamento estar presente nestes gêneros e ausente em *T. micranthus*, indica que possa ser um estado de caráter característico do clado *Arrabidaeae and allies* (Lohmann, 2006) que tenha sido perdido em *Tynanthus*. Segundo Tucker (1997), caracteres expressados mais cedo no desenvolvimento são mais estáveis e podem ser utilizados para caracterizar níveis mais altos da hierarquia (subfamílias, tribos), enquanto estados de caracteres especializados, que são expressos em fases mais avançadas do desenvolvimento, geralmente caracterizam gêneros ou espécies. O prolongamento do tegumento na região micropilar surge tardiamente no desenvolvimento do óvulo, parecendo caracterizar um conjunto de gêneros do clado *Arrabidaeae and allies*.

A elevação dos primórdios de óvulos através de divisões celulares nas zonas II e III da placenta difere do já descrito para *J. mimosifolia*, *H. pulcherrimus* e *C. antisiphilitica* (Galati & Strittmatter, 1999; Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011), podendo ser um padrão característico para Bignoniaceae, mas que precisa ser melhor investigado. As espécies estudadas compartilham o fato de o tegumento ter sido originado pela camada epidérmica e subepidérmica como em espécies do clado *Tabebuia alliance* (Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011) e diferindo do encontrado em *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter, 1999). Assim, sugere-se que o surgimento do tegumento a partir da camada epidérmica é uma característica basal na família e a formação a partir das camadas epidérmica e subepidérmica é uma característica derivada. O número de fileiras de óvulos por polo de placenta varia de duas a quatro na tribo Jacarandaeae, tendo aumentado para mais de cinco em *Tabebuia alliance* e diminuído para uma ou duas na tribo Bignoniaceae, indicando ser uma característica distintiva para estes clados e para categorias hierarquicamente inferiores. Nossos dados esclarecem

alguma incongruência no número de fileiras de óvulos por polo de placenta, podendo-se afirmar que tanto *Cuspidaria* quanto *Fridericia* apresentam apenas uma fileira. A presença de um tecido transmissor pouco proeminente nas espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus*, diferindo do tecido transmissor bastante proeminente em espécies do clado *Tabebuia alliance* (*sensu* Olmstead *et al.*, 2009), pode ser uma característica diagnóstica de Bignonieae e merece ser melhor investigada, o que pode ter implicações no crescimento do tubo polínico e na penetração dos óvulos.

As cristas placentíferas pouco salientes, a presença de apenas uma fileira de óvulos por polo de placenta e a presença de um prolongamento característico do tegumento na região micropilar dos óvulos são características compartilhadas pelas espécies estudadas de *Cuspidaria* bem como por *F. platyphylla* (Singer, 2007). Indicando que estas características possam ser mais amplamente distribuídas entre as espécies do clado *Arrabidaeae and allies* (*sensu* Lohmann, 2006), mas que foram modificadas em *Tynanthus*, grupo irmão de *Cuspidaria*. O desenvolvimento basípeto dos óvulos, a micrópila formada no estágio de CMM e o alongamento anticlinal das células do endotélio desde a sua diferenciação ainda são características que podem distinguir as espécies de *Tynanthus* de seu grupo irmão, *Cuspidaria*. Os dados sobre a morfologia da placenta e ontogenia do óvulo são semelhantes entre *Cuspidaria sceptrum* e *C. convoluta*, entretanto, não podem ser reportados como características do gênero, uma vez que são compartilhadas com *F. platyphylla*. Dessa forma, embora os resultados deste estudo sejam úteis para separar espécies *Tynanthus* e *Cuspidaria*, eles não podem ser utilizados para corroborar a nova circunscrição de *Cuspidaria sceptrum*.

## Referências Bibliográficas

- ALVES, M. F. **Populações haploides e apomíticas de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae) com diferentes sistemas reprodutivos.** 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- BATYGINA, T. B. **Embryology of flowering plants-Terminology and concepts. - Generative organs of flower.** v.1, Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd ed. New Dheli. 2002.
- BITTENCOURT JR., N. S. **Anatomia floral de *Tabebuia ochraceae* (Cham.) Standly (Bignoniaceae): Histologia, vascularização e ontogenia com especial referência ao desenvolvimento do óvulo e da antera.** 1992. Monografia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.
- BITTENCOURT JR., N. S.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): Megasporogenesis and integument development. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 103-115, 2002a.
- BITTENCOURT JR., N. S.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): Embryo Sac Development. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 117-127, 2002b.
- BITTENCOURT JR., N. S.; SEMIR, J. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 166, p. 493-506, 2005.
- BITTENCOURT JR., N. S.; SEMIR, J. Floral biology and late-acting self-incompatibility in *Jacaranda racemosa* (Bignoniaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 54, 315-324, 2006,
- BITTENCOURT JR. N. S.; MORAES, C. I. G. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae) a histological study of post-pollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, p. 59-76, 2010.

- BOUMAN, F. The ovule. *In: Embryology of Angiosperms* (B.M. Johri, ed.). Springer-Verlag, Berlin, 1984, p. 123-157.
- BOUMAN, F; SCHIER, S. Ovule ontogeny and seed development in *Gentiana* with a discussion on the evolutionary origem of the single integument. **Acta Bot. Neerl.**, v. 28, p. 467- 478, 1979.
- CORNER, E. J. H. **The seed of dicotyledons**. Cambrige University Press, London. 1976.
- DAVIS, O. L. **Systematic embryology of the Angiosperms**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, Inc., 1966, p. 528.
- ENDRESS, P. K. Flower Structure and Trends of Evolution in Eudicots and Their Major Subclades. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 97, n. 4, p. 541-583, 2010.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique, some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, p. 123-142, 1968.
- GANDOLPHI G.; BITTENCOURT JR, N. S. Sistema reprodutivo do Ipê-Branco-*Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 24, p. 840-851, 2010.
- GALATI, B. G.; STRITTMATTER, L. I. Ovule ontogeny and megasporogenesis in *Jacaranda mimosifolia* D. Don. (Bignoniaceae). **Phytomorphology**, Jodhpur, v. 49, n. 1, p. 67-74, 1999.
- GASSER, C. S.; BEERS, K. R. Pistil development. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1231-1239, 1993.
- GENTRY, A. H. Bignoniaceae, Part 2 - Tribe Tecomeae. **Flora Neotropica**, v. 56, p. 1-370, 1992.
- GERRITS, P. O.; SMID, L. A new, less toxic polymerisation system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v. 132, p. 81-85, 1983.
- GHATAK, J. A contribution to the life-history of *Oroxylum indicum* Vent. **Proceedings of the Indian Academical Science**, v. 43, p. 72-87, 1956.
- GOVINDU, H. C. Studies in the embryology of some members of Bignoniaceae. **Proceedings of the Indian Academy of Science B**, v. 32, p. 164-178, 1950.

- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B.; SRIVASTAVA, P. S. **Comparative Embryology of Angiosperms**, Springer-Verlag, Berlin. 1992.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHU, M. J. **Sistemática vegetal um enfoque filogenético**. 3°. ed. Artmed. 2009.
- KAPIL, R.N.; TIWARI, S.C. The integumentary tapetum. **The Botanical Review**, v. 44, p. 457-490, 1978.
- LERSTEN, N. R. **Flowering plant embryology**. Blackwell Publishing, Austrália. 2004.
- LOHMANN, L. G. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, v. 93(2), p. 304-318, 2006.
- LOHMANN, L. G.; TAYLOR, C. M. A new generic classification of tribe Bignoniaceae (Bignoniaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 99, p. 348-489, 2014.
- MAURITZON, J. Etwas uber die embryologie der Bignoniaceen. **Botaniska Notiser**, p. 60-77, 1935.
- MEDEIROS, M. C. M. P, de; LOHMANN, L. G. Two new species of *Tynanthus* Miers (Bignoniaceae, Bignoniaceae) from Brazil. **PhytoKeys**, v. 42, p. 77-85, 2014.
- MEHRA, K. R.; KULKARNI, A. R. Embryological studies in Bignoniaceae. **Phytomorphology**, v. 35, p. 239-251, 1985.
- MC DOWELL, E. M.; TRUMP, B. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414, 1976.
- OLMSTEAD, R. G.; ZHANG, M. L.; LOHMANN, L. G.; GROSE, S. O. ; ECKERT, A. J. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 1731-1743, 2009.
- PEREIRA JR, E. J. **Ontogenia do Óvulo e da Antera de *Cyathostemma antisyphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae)**, 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Genética)-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2011.

- RENÓ, L. R.; MOSCHETA, I. S.; BRACCINI A. de L. Morfo-anatomia do fruto e semente de amarelinho (*Tecoma stans* (L.) Kunth - Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 18-30, 2007.
- SAMPAIO, D. S.; COSTA M. E.; PAOLI A. A. S. Ontogenia da semente de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 289-302, 2007.
- SAMPAIO, D. S. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações nos sistema de autoincompatibilidade**. Tese. (Doutorado em Ecologia) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil. 2010.
- SAMPAIO, D. S.; BITTENCOURT JR, N. S.; OLIVEIRA, P. E. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma species* (Bignoniaceae) from central Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 173, p. 77-91, 2013.
- SINGER, R. F. **Estudos ontogenéticos de flor e fruto de espécies de Bignoniaceae com ênfase na taxonomia**. 2007. 134f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- SOUZA, L. A.; IWAZAKI, M. C.; MOSCHETA, I. Morphology of the pericarp and seed of *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. (Bignoniaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 407-418, 2005.
- SOUZA, L. A. de; OLIVEIRA OYAMA, S. de; MUNERATTO J. C. Morphology and anatomy of the developing fruit of *Macfadyena unguis-cati* (L.) A.H. Gentry, Bignoniaceae. **Acta Botânica Venezuelica**, v. 31, p. 1-13, 2008.
- SWAMY, B. G. L. Contributions to the life history of *Bignonia megapotamica*. **Journal of the Indian Botanical Society**, v. 20, p. 299-305, 1941.
- TILTON, V. R.; LERSTEN, N. R. Ovule development in *Ornithoglum caudatum* (Liliaceae) with a review of selected papers on angiosperm reproduction. III. Nucellus and megagametophyte. **New Phytologist**, v. 88, p. 77-504, 1981.
- TUCKER S. C. Floral evolution, development and convergence: the hierarchical significance hypothesis. **International Journal of Plant Science**, v. 158, p. 143-161, 1997.

VON TEICHMAN, I, F. L. S.; VAN WYK, A, E F. L. S. Trends in the evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachychalazy and recalcitrance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 105, p. 211-237, 1991.

## **CAPÍTULO 2**

### **MEGASPOROGÊNESE E MEGAGAMETOGÊNESE EM ESPÉCIES DE *CUSPIDARIA* E *TYNANTHUS* (BIGNONIEAE: BIGNONIACEAE)**

**Resumo: Megasporogênese e megagametogênese em espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus* (Bignoniaceae: Bignoniaceae)**

O estudo da embriologia de angiospermas pode contribuir tanto para a compreensão da sua biologia reprodutiva como para auxiliar em problemas da sistemática dos grupos. Em Bignoniaceae, existem poucos estudos embriológicos, sendo que na tribo Bignonieae, a maior da família, nenhuma espécie foi estudada quanto à megasporogênese e megagametogênese até o momento. Dessa forma, objetivou-se estudar a megasporogênese e megagametogênese através de análises histológicas em *Cuspidaria convoluta*, *Cuspidaria sceptrum* e *Tynanthus micranthus*, a fim de obter dados embriológicos para a tribo que pudessem ser comparados às demais Bignoniaceae. Foram observados óvulos com má formação em *C. convoluta* antes e durante a megasporogênese, os quais podem estar relacionados a uma baixa frutificação e frutos atrofiados presentes na área de estudo. Após a meiose é originada uma tétrade linear de megásporos, com uma maior deposição de calose entre o(s) megásporo(s) funcional(ais) e os demais, evidenciando a função de favorecer o desenvolvimento dos megásporos calazais, já que dificulta a translocação de nutrientes para os demais. A vacuolação precoce do megásporo calazal de *C. sceptrum* indica que a megagametogênese seja mais acelerada nesta espécie. Em *C. convoluta* foram observados óvulos com mais de um megásporo funcional, o que possibilita o desenvolvimento de mais de um megagametófito em um mesmo óvulo, embora esta situação não tenha sido observada no presente trabalho. O megásporo calazal cresce e passa por três cariocineses sucessivas, formando um saco embrionário monospórico do tipo *Polygonum* comum na família Bignoniaceae. A variação na disposição das tétrades de megásporos e na longevidade das antípodas dentro de espécies e gêneros mostra que estes aspectos não devem ser utilizados em filogenia. O estudo da megasporogênese e megagametogênese em espécies de Bignonieae mostram que estas etapas do processo de reprodução sexuada são muito semelhantes às demais espécies da família, evidenciando a grande conservação de caracteres embriológicos em Bignoniaceae.

**Palavras-chave:** embriologia, megagametófito, Bignoniaceae.

## Introdução

Em Bignoniaceae, poucas espécies foram estudadas quanto à embriologia, os trabalhos já realizados abordam aspectos da megasporogênese e megagametogênese, eventos pós-polinização, bem como descrição de apomixia esporofítica em algumas de suas espécies. Na tribo Jacarandae foram estudadas duas espécies de *Jacaranda* (Govindu, 1950; Galati & Strittmatter, 1999); na tribo Tecomeae, *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Johri *et al.*, 1992); na tribo Catalpeae, *Catalpa bignonioides* Walter (Mauritzon, 1935); no clado *Paleotropical clade* uma espécie de *Kigelia* (Govindu, 1950), uma de *Fernandoa*, uma de *Stereospermum*, uma de *Dolichandrone* (Mehra & Kulkarni, 1985) e uma de *Spathodea* (Bittencourt *et al.*, 2003); no clado *Tabebuia alliance* uma espécie de *Parmentiera* – tribo Crescentieae (Govindu, 1950), duas de *Tabebuia* (Mehra & Kulkarni, 1985; Gandolphi & Bittencourt, 2010), cinco de *Handroanthus* (Bittencourt, 1992; Bittencourt & Mariath, 2002a e b; Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Semir, 2005; Bittencourt & Moraes, 2010; Alves, 2014) e uma de *Cybistax* (Pereira Jr., 2011); na tribo *Oroxyleae* uma espécie de *Oroxylum* (Ghatak, 1956) e uma de *Millingtonia*; e na tribo Bignonieae apenas *Anemopaegma acutifolium* DC. (Sampaio *et al.*, 2013) foi investigada.

A megasporogênese e megagametogênese da família Bignoniaceae são bastante características. Na maioria das espécies estudadas a célula mãe de megásporos passa pela meiose formando uma tétrade linear de megásporos (Mehra & Kulkarni, 1985; Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011; Alves, 2014). Variações quanto ao formato da tétrade foram observadas, tendo sido registrados os formatos em T, isobilateral ou um arranjo decussado (Govindu, 1950; Galati & Strittmatter, 1999). A presença de mais de um megásporo funcional e mais de um megagametófito foi relatada para *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose e para *A. acutifolium*, os quais podem gerar sementes poliembriônicas, embora tenham parecido ser eventos isolados (Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014).

Bittencourt & Mariath (2002b) sugerem que várias características da embriologia são comuns para todas as espécies Bignoniaceae, como o desenvolvimento do megagametófito tipo *Polygonum*, o qual possui a região micropilar mais larga, a absorção das células nucelares e do endotélio adjacentes ao megagametófito, células da região calazal diferenciadas em hipóstase e presença de sinérgides que são mais largas na porção calazal e mais afiladas na porção micropilar no saco embrionário maduro. A longevidade das antípodas parece divergir entre as espécies da família (Bittencourt & Mariath, 2002b). As antípodas podem começar a se degenerar antes do óvulo ser fecundado, apresentando citoplasma reduzido e núcleos pouco evidentes (Govindu, 1950; Ghatak, 1956; Mehra & Kulkarni, 1985; Bittencourt, 1992;

Gandolphi & Bittencourt, 2010). Ou persistem até os estádios iniciais do endosperma (Govindu, 1950; Johri *et al.*, 1992; Bittencourt & Mariath, 2002b; Bittencourt *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2013).

Em espécies de *Handroanthus* e *Anemopaegma* foram verificadas células da hipóstase se diferenciando em embriões adventícios em óvulos não fecundados bem como em sementes jovens com o endosperma em início de desenvolvimento, caracterizando as espécies como apomíticas esporofíticas (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014). Apenas a apomixia esporofítica foi verificada em Bignoniaceae até o momento, de forma que os eventos de megasporogênese e megagametogênese não foram alterados nestas espécies, uma vez que elas necessitam da fecundação dos núcleos polares para que haja o desenvolvimento do endosperma (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014). Nestas espécies ainda foram observadas duas sinérgides penetradas por diferentes tubos polínicos em um mesmo óvulo, embora não se saiba seus efeitos para a biologia das espécies (Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014).

A tribo Bignonieae foi muito pouco estudada quanto à embriologia, havendo apenas o estudo com *A. acutifolium* que objetivou investigar os eventos posteriores à polinização e verificar a ocorrência de apomixia (Sampaio *et al.*, 2013). Embora tenha sido observado um grande conservadorismo nas características embriológicas da família, com algumas exceções, a tribo Bignonieae permanece inexplorada quanto estes caracteres. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é estudar a megasporogênese e a megagametogênese de *Cuspidaria convoluta* (Vell.) A.H. Gentry, *Cuspidaria sceptrum* (Cham.) L.G. Lohmann e *Tynanthus micranthus* Corr. Méllö ex K. Schum. (Bignonieae), contribuindo para o entendimento da reprodução nestas espécies e da organização do gametófito feminino em Bignoniaceae de forma mais abrangente.

## **Material e Métodos**

### *Espécies estudadas e locais de estudo*

*Cuspidaria convoluta* é uma liana conhecida pela sua exuberante floração (Lorenzi & Souza, 2008). Suas folhas são compostas por três folíolos elípticos com ápices afilados e com tricomas na face abaxial, podendo apresentar gavinhas simples na posição do folíolo mediano. As flores são dispostas em inflorescências apicais, possuem corola rosa clara com o interior esbranquiçado e cálice campanulado com cinco lobos agudos a acuminados. O fruto é uma cápsula septicida com margens elevadas, dando aspecto de um fruto alado. Ocorre no Paraguai, Bolívia, Argentina e Brasil nos estados Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de

Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, além de poder ser encontrada cultivada em outros locais (Lohmann & Taylor, 2014). *Cuspidaria sceptrum* é um subarbusto, que também possui folhas compostas por três folíolos elípticos cobertos por tricomas nas faces adaxial e abaxial. As flores são dispostas em inflorescências terminais e possuem corola e cálice de coloração rosa. O cálice é petaloide, urceolado e se rasga após a protrusão da corola, o que dá um aspecto danificado às suas margens, mas permanece seco envolvendo o fruto durante o desenvolvimento (Sampaio, 2010). O fruto é uma cápsula septicida com margens lisas e grande quantidade de tricomas glandulares. Os tricomas glandulares que conferem aspecto de pegajoso à planta ainda podem ser encontrados no caule e folhas. Ocorre na Bolívia e no Brasil é encontrada nos estados Bahia, Distrito Federal, Rondônia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Lohmann & Taylor, 2014).

*Tynanthus micranthus* é uma liana lenhosa com forte cheiro de cravo, suas folhas são trifolioladas e o folíolo terminal é frequentemente substituído por gavinhas trifidas (Medeiros & Lohmann, 2015). Suas flores são pequenas, brancas e bastante perfumadas. A corola é membranácea, infundibuliforme e bilabiada com os dois lobos superiores fundidos (Lohmann & Taylor, 2014). O cálice é verde, campanulado e usualmente 5-denticulado. O ovário é densamente pubescente, com disco nectarífero (Lohmann & Taylor, 2014). Os frutos possuem margens elevadas que frequentemente se desenvolvem em alas (Lohmann & Taylor, 2014). É encontrada no Paraguai, Argentina e Brasil, no qual ocorre nos estados Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (Lohmann & Taylor, 2014).

*Cuspidaria convoluta* e *T. micranthus*, foram coletadas de setembro de 2014 a março de 2015, no Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, MG (19°51'30.7" S, 44° 0'29.4" W). Durante as coletas de *C. convoluta*, percebeu-se que apesar de haver uma floração maciça poucos frutos foram formados, e os frutos formados estavam atrofiados. As coletas de *C. sceptrum* foram realizadas entre os meses de abril e agosto de 2015 em uma população natural do Município de Uberlândia, nas bordas da área de reserva legal do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (18°58'43.8" S, 48°17'40,3" W). O material testemunho foi depositado no *Herbarium Urbelandense* (HUFU), Uberlândia, MG, sob os números: *C. convoluta* - HUFU 71.549; *C. sceptrum* - HUFU 71.547; e *T. micranthus* - HUFU 71.548.

### *Análises Histológicas*

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Morfologia Vegetal Microscopia e Imagem da Universidade Federal de Uberlândia. A fim de analisar a

megasporogênese e a megagametogênese das espécies em estudo, foram coletados botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento e flores em antese. Logo após a coleta, o material foi dissecado e os ovários foram fixados em solução de glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Mc Dowell & Trump, 1976). Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica e passou por uma série etanol:clorofórmio (3:1, 1:1, 3:1) para retirada das ceras epicuticulares, retornando para o etanol 100%. A inclusão foi realizada em hidroxietilmetacrilato (Leica Historesin Embedding Kit) (Gerrits & Smid, 1983). Os ovários foram seccionados transversalmente obtendo-se cortes longitudinais dos óvulos. Os cortes seriados de 2 - 3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo de rotação (RM2135, Leica) equipado com navalha descartável (Leica 818 High Profile Microtome Blades). O material foi corado com Azul de Toluidina O 0,05%, em tampão benzoato de sódio, pH 4,4 (Feder & O'brien, 1968) e as lâminas montadas com Permount. A análise das lâminas e a fotodocumentação foram realizadas em microscópio óptico (Olympus BX 51) com câmera digital acoplada (Olympus DP70).

## Resultados

Em *C. convoluta* foram observados óvulos com nucelo degenerando (Figura 1A) e do conteúdo citoplasmático da célula mãe de megásporo (CMM) para fora do óvulo (Figura 1B). No entanto, esta má formação não ocorreu em todos os óvulos e não prejudicou o estudo da megalogênese e megagametogênese da espécie.

Nas três espécies a megalogênese foi semelhante. A CMM, é volumosa e alongada no sentido longitudinal, apresenta núcleo proeminente e durante a meiose I, a placa metafásica se orienta perpendicularmente ao eixo longitudinal do óvulo (Figuras 2A-F). A primeira divisão meiótica origina uma díade de megásporos (Figuras 2G, H). A segunda divisão meiótica ocorre simultaneamente nos dois megásporos, também com as placas metafásicas orientadas perpendicularmente ao eixo longitudinal do óvulo (Figura 2H), formando uma tétrade linear de megásporos (Figuras 2I-P).

Em ambas as espécies há uma deposição de calose nas paredes transversais entre os megásporos, a qual é identificada por não se corar pelo Azul de Toluidina O, sendo mais proeminente entre os dois megásporos calazais (Figuras 2M-P). O megásporo calazal torna-se mais volumoso e passa a ser denominado megásporo funcional (Figuras 2N, P), enquanto os outros três megásporos se degeneraram (Figuras 2J, P). O megásporo funcional começa a apresentar a formação de vacúolos, o que pode ser considerado o início da megagametogênese (Figuras 2K, L, N). Em *C. sceptrum*, foi observado um megásporo calazal volumoso, com um

grande vacúolo no polo calazal, antes mesmo de os demais megásporos iniciarem a sua degeneração (Figura 2N). Enquanto em *C. convoluta* e *T. micranthus* observou-se um megásporo calazal volumoso e sem vacúolos proeminentes quando os demais megásporos já não apresentavam núcleos definidos e tinham citoplasma muito escuro, sendo interpretados como indícios de colapso e degeneração celular (Figuras 2J, P).

No entanto, em *C. convoluta* foram encontrados outros dois padrões de degeneração dos megásporos, nos quais apenas dois megásporos se degeneram. Em um dos casos, foram observados dois megásporos calazais intactos, vacuolados e os megásporos micropilares se degenerando (Figura 2K). Neste caso, a deposição de calose mostra-se mais proeminente na parede transversal que separa os megásporos funcionais daqueles em degeneração. Ainda foram observados o megásporo calazal com dois vacúolos nos polos micropilar e calazal, o megásporo adjacente ao calazal e o da extremidade micropilar se degenerando e o de posição intermediária com morfologia semelhante à do calazal, embora tenha apresentado menor tamanho (Figura 2L).

Em *C. convoluta* e *C. sceptrum* observou-se um megagametófito uninucleado com um núcleo central e dois vacúolos, um no polo micropilar e outro no calazal (Figuras 2L, 3A). Este estágio não foi observado para *T. micranthus*. Após a primeira divisão mitótica do megagametófito, um núcleo se localiza em seu polo calazal e o outro no micropilar, sendo separados por um vacúolo central (Figuras 3B-D). Além desse vacúolo central, foram observados um vacúolo menor na extremidade calazal e outro na extremidade micropilar do megagametófito de *C. convoluta*, enquanto em *C. sceptrum* e *T. micranthus* apenas o vacúolo da extremidade calazal foi observado (Figuras 3B-D). Nas três espécies estes vacúolos menores nas extremidades do megagametófito vão desaparecendo e o vacúolo central aumenta em volume e polariza ainda mais os núcleos (Figuras 3E, F). A expansão deste vacúolo central promove a expansão do megagametófito, a qual se dá principalmente na região micropilar do óvulo (Figuras 3E, F). Os vacúolos possuem conteúdo citoplasmático rosado, indicando a presença de polissacarídeos (Figuras 3A-E).

Posteriormente, estes núcleos passam por uma segunda divisão mitótica, dando origem a um megagametófito tetranucleado (Figuras 3G-I). A terceira divisão mitótica origina um megagametófito de oito núcleos, sendo quatro em cada extremidade (não documentado). Um núcleo de cada extremidade migra para o centro do megagametófito para formar os núcleos polares. Após a celularização, forma-se um saco embrionário do tipo *Polygonum*, sendo constituído por três antípodas na região calazal, por uma célula média contendo dois núcleos

polares no centro, e o aparato oosférico constituído por duas sinérgides e uma oosfera, os quais são organizados de forma triangular (Figuras 4A-K).

Com desenvolvimento do megagametófito, as células do aparato oosférico passam por uma expansão. As sinérgides apresentam vacúolos voltados para a região calazal e núcleo na região micropilar ou mediana das células (Figuras 4A, D, H e J). São longitudinalmente alongadas, com extremidade calazal mais larga em relação à região micropilar que é afilada (Figuras 4D, H, J). A oosfera apresenta a maior parte do vacúolo voltado para o polo micropilar, sendo que o núcleo está voltado para o polo calazal (Figuras 4C, K). A oosfera de *C. sceptrum* apresenta múltiplos vacúolos (Figura 4H). As antípodas começam a se degenerar já durante a antese. Antes do óvulo ser penetrado as antípodas apresentam citoplasma reduzido e núcleos pouco evidentes (Figuras 4C, G, H, K).

## Discussão

Em *C. convoluta*, *C. sceptrum* e *T. micranthus*, apenas uma célula segue o desenvolvimento e se diferencia em célula mãe de megásporo (CMM), assim como ocorre em *Handroanthus pulcherrimus* (Sandwith) Mattos (= *Tabebuia pulcherrima* Sandwith) (Bittencourt & Mariath, 2002a) e *Cybistax antispyhilitica* (Mart.) Mart. (Pereira Jr., 2011). Por outro lado, em algumas espécies as duas células arquesporais podem se diferenciar em CMM e formar dois sacos embrionários como descrito para *Kigelia africana* (Lam.) Benth (= *Kigelia pinnata* (Jacq.) DC.) e *T. stans* (Govindu, 1950). A degeneração do nucelo, bem como o extravasamento do conteúdo da CMM observados em alguns óvulos de *C. convoluta*, podem estar associados à baixa frutificação e à presença de frutos com poucas sementes desenvolvidas nesta espécie.

Nas três espécies estudadas a megasporogênese foi semelhante. A CMM é muito volumosa e alongada no sentido longitudinal. Passa pela meiose formando uma tétrade linear de megásporos, assim como observado em outras espécies na família (Mehra & Kulkarni, 1985; Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011; Alves, 2014). Variações foram encontradas, como tétrades em formato de T ou isobilateral em como *K. africana* (Govindu, 1950), tétrades variando ente lineares ou com formato em T em *Jacaranda simplicifolia* K. Schum. (Galati & Strittmatter, 1999) e com arranjo decussado como em *Parmentiera cereifera* Seem. (Govindu, 1950). Devido à disposição das tétrades variar dentro de uma mesma espécie e estas disposições diferentes da linear estarem dispersas em diferentes grupos da família, este aspecto não parece ter relevância para a sistemática.

Durante a meiose foi observada uma deposição de calose nas paredes transversais entre os megásporos, sendo mais proeminente entre os dois megásporos calazais, como registrado para outras espécies da família (Galati & Strittmatter, 1999; Bittencourt & Mariath, 2002a; Pereira Jr., 2011; Alves, 2014). É interessante notar que em *C. convoluta*, em um óvulo com dois megásporos aparentemente funcionais, a deposição de calose mais proeminente separa estes dois megásporos calazais dos dois micropilares em degeneração. Kapil & Tiwari (1978) propõe que a calose dificulta a translocação de nutrientes para os megásporos micropilares, favorecendo o desenvolvimento do megásporo calazal, o que faz sentido quando observamos o ocorrido com *C. convoluta*, quando apresentou dois megásporos funcionais adjacentes. Bouman (1984) ainda sugere que a deposição de calose pode funcionar como um filtro molecular ou nutricional diminuindo a permeabilidade da parede celular, permitindo que cada megásporo siga o desenvolvimento independente. Além disso, Lersten (2004) associa a deposição de calose à proteção dos megásporos contra patógenos.

*Cuspidaria convoluta* e *T. micranthus* apresentaram um megásporo calazal volumoso e sem vacúolos proeminentes quando os demais megásporos estavam se degenerando como observado nas demais Bignoniaceae (Ghatak, 1956; Merha & Kulkarni, 1985; Bittencourt & Mariah, 2002b; Pereira Jr., 2011). Entretanto, em *C. sceptrum*, foi observado um megásporo calazal volumoso, com um grande vacúolo no polo calazal, antes de os demais megásporos iniciarem a sua degeneração, indicando que a megagametogênese nesta espécie está ocorrendo de forma mais acelerada do que nas demais.

Ao final da megasporogênese, a degeneração dos megásporos micropilares segue o padrão de degeneração para formação de um saco embrionário monospórico do tipo *Polygonum*, em que os megásporos micropilares degeneram e o megásporo calazal segue o desenvolvimento para formação de um megagametófito (Lersten, 2004). No entanto, em *C. convoluta* foram encontrados casos em que apenas dois megásporos se degeneravam e os outros dois pareciam ser funcionais. Existe a possibilidade de dois megásporos funcionais se desenvolverem em dois megagametófitos distintos, já que em *H. serratifolius* (Alves, 2014) e *A. acutifolium* (Sampaio *et al.*, 2013) foram observados óvulos com dois megagametófitos. Além disso, em *H. serratifolius* (Alves, 2014), a origem desses dois megagametófitos está associada à sequência no desenvolvimento de dois megásporos, como observado para *C. convoluta*.

Além do vacúolo central formado no início da megagametogênese, no estágio binucleado foram observados um vacúolo menor na extremidade calazal e outro na

extremidade micropilar do megagametófito de *C. convoluta*, enquanto em *C. sceptrum* e *T. micranthus* apenas o vacúolo da extremidade calazal foi observado. A presença de vacúolos menores na extremidade calazal e micropilar do megagametófito no estágio binuclear também foi observado em *H. pulcherrimus* e *C. antisiphilitica* e são derivados dos vacúolos presentes nos polos do megásporo funcional (Bittencourt & Mariah, 2002b; Pereira Jr., 2011), como observado no presente trabalho. Em *Jacaranda mimosifolia* D. Don., parece que estes vacúolos também estão presentes, embora não tenham sido descritos (Govindu, 1950).

Após a celularização, forma-se um saco embrionário do tipo *Polygonum*. Esse tipo de saco embrionário é o mais comum em angiospermas e foi encontrado em todas as demais espécies de Bignoniaceae já estudadas (Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992; Govindu, 1950; Ghatak, 1956; Mehra & Kulkarni, 1985; Galati & Strittmatter, 1999; Bittencourt & Mariath, 2002b; Bittencourt *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004; Gandolphi & Bittencourt, 2010; Pereira Jr., 2011, Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014). O formato e disposição das células do aparato oosférico assemelham-se ao já descrito para outras espécies da família (Govindu, 1950; Ghatak, 1956; Mehra & Kulkarni, 1985; Bittencourt & Mariath, 2002b; Bittencourt *et al.*, 2003; Gandolphi & Bittencourt, 2010; Pereira Jr., 2011, Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014). A oosfera de *C. sceptrum* apresenta mais de um vacúolo, o que também foi observado em *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath, 2002b).

Em Bignoniaceae a longevidade das antípodas pode variar de espécie para espécie (Bittencourt & Mariath, 2002b). No presente estudo, as antípodas começam a se degenerar antes do óvulo ser fecundado, apresentando citoplasma reduzido e núcleos pouco evidentes, assim como observado em *Oroxylum indicum* (L.) Kurz (tribo Oroxyleae) (Ghatak, 1956), *K. africana* (Paleotropical clade) (Govindu, 1950), *H. ochraceus* (Bittencourt, 1992) e *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sandwith (Gandolphi & Bittencourt, 2010), ambas pertencentes ao clado *Tabebuia alliance*. Batygina (2002) descreve antípodas efêmeras como sendo usuais nas angiospermas, nas quais a degeneração ocorre durante a preparação para a fecundação ou logo após a fecundação. Em *A. acutifolium* (tribo Bignonieae) as antípodas persistem até os estádios iniciais do endosperma (Sampaio *et al.*, 2013), bem como observado em *Millingtonia hortensis* L.f. (tribo Oroxyleae), em *Tabebuia rosea* (Bertol.) Bertero ex A.DC. (Mehra & Kulkarni, 1985), *T. stans*, *P. cerifera* (Govindu, 1950), *H. pulcherrimus* (Bittencourt & Mariath, 2002b) clado *Tabebuia alliance*; *Fernandoa adenophylla* (Wall. ex G.Don) Steenis. (= *Heterophragma adenophyllum* (Wall. ex G.Don) Seem. ex Benth. & Hook.f.), *Stereospermum chelonoides* DC., *Dolichandrone falcata* Seem., (Mehra e Kulkarni, 1985) e *Spathodea campanulata* P. Beauv. (Bittencourt *et al.*, 2003) (Paleotropical clade) e *J.*

*mimosifolia* (Govindu, 1950) (tribo Jacarandae). Através da observação dos dados do presente trabalho, bem como das espécies estudadas por diferentes autores podemos dizer que a longevidade das antípodas não possui valor filogenético, variando dentro dos diferentes clados.

Os aspectos da megasporogênese e megagametogênese de *C. convoluta*, *C. sceptrum* e *T. micranthus*, as primeiras espécies investigadas quanto a estes aspectos da embriologia em Bignoniaceae, são muito semelhantes às demais espécies da família, evidenciando a grande conservação de caracteres embriológicos (Johri *et al.*, 1992). A vacuolação precoce do megásporo calazal de *C. sceptrum* indica que a megagametogênese inicie-se mais cedo nesta espécie em comparação com as demais Bignoniaceae. O fato de o depósito de calose ter se concentrado entre os dois megásporos funcionais e os dois degenerativos em *C. convoluta*, evidencia que a função do depósito de calose pode realmente estar relacionada a uma maior concentração de nutrientes nos megásporos funcionais como postulado por Kapil & Tiwari (1978). Algumas características como a disposição das tétrades de megásporos e longevidade das antípodas variam dentro de espécies, gêneros e tribos não sendo úteis em estudos de sistemática. A baixa frutificação e produção de frutos atrofiados em *C. convoluta* podem estar relacionados à presença de óvulos com má formação, mas também podem ser influenciados pelo sistema reprodutivo das plantas. Por fim, a presença de dois megásporos funcionais em *C. convoluta* pode gerar óvulos com mais de um megagametófito e, consequentemente, sementes com mais de um embrião de origem sexuada, como postulado para *H. serratifolius* (Alves, 2014), embora não acarretem em elevados índices de sementes poliembriônicas como verificado para as espécies apomíticas da família (Costa *et al.*, 2004; Bittencout & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013).

## Referências Bibliográficas

- ALVES, M. F. **Populações haploides e apomíticas de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae) com diferentes sistemas reprodutivos.** 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- BATYGINA, T. B. **Embryology of flowering plants. Terminology and concepts. Vol. 1: generative organs of flower.** Enfield, USA.: Science Publishers Inc, 2002. 421p.
- BITTENCOURT JR., N. S. **Anatomia floral de *Tabebuia ochraceae* (Cham.) Standley (Bignoniaceae): Histologia, vascularização e ontogenia com especial referência ao desenvolvimento do óvulo e da antera.** 1992. Monografia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.
- BITTENCOURT JR., N. S.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): megasporogenesis and integument development. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 103-115, 2002a.
- BITTENCOURT JR, N. S.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): embryo sac development. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 117-127, 2002b.
- BITTENCOURT JR, N. S., GIBBS, P. E.; SEMIR, J. Histological study of post-pollination events in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), a species with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany**, v. 91, p. 827-834, 2003.
- BITTENCOURT JR., N. S.; SEMIR, J. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 166, p. 493-506, 2005.
- BITTENCOURT JR. N. S.; MORAES, C. I. G. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae) a histological study of post-pollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, p. 59-76, 2010.

- BOUMAN, F. The ovule. In **Embryology of Angiosperms** (B.M. Johri, ed.). Springer-Verlag, Berlin, 1984, p. 123-157.
- COSTA, M. E.; SAMPAIO, D. S.; PAOLI, A. A. S.; LEITE, S. C. A. L. Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 395-406, 2004.
- DAVIS, O. L. **Systematic embryology of the Angiosperms**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, Inc., 1966, 528 p.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique, some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, p. 123-142, 1968.
- GALATI, B. G.; STRITTMATTER, L. I. Ovule ontogeny and megasporogenesis in *Jacaranda mimosifolia* D. Don. (Bignoniaceae). **Phytomorphology**, Jodhpur, v. 49, n. 1, p. 67-74, 1999.
- GANDOLPHI G.; BITTENCOURT JR, N. S. Sistema reprodutivo do Ipê-Branco-*Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 24, p. 840-851, 2010.
- GERRITS, P. O; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v. 132, p. 81-85, 1983.
- GHATAK, J. A contribution to the life-history of *Oroxylum indicum* Vent. **Proceedings of the Indian Academical Science**, v. 43, p. 72-87, 1956.
- GOVINDU, H. C. Studies in the embryology of some members of the Bignoniaceae. **Proceedings of the Indian Academical Science**, v. 32, p. 164-178, 1950.
- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B; SRIVASTAVA, P. S. **Comparative Embryology of Angiosperms**, Springer-Verlag, Berlin, 1992.
- KAPIL, R. N.; TIWARI, S. C. The integumentary tapetum. **The Botanical Review**, v. 44, p. 457-490, 1978.
- LERSTEN, N. R. **Flowering plant embryology, with emphasis on economic species**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004.

- LOHMANN, L. G; TAYLOR, C. M. A new generic classification of tribe Bignonieae (Bignoniaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 99, p. 348-489, 2014.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil**. 4º ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.
- MEDEIROS, M. C. M. P. de; LOHMANN, L. G. Phylogeny and biogeography of *Tynanthus* Miers (Bignonieae, Bignoniaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 85, p. 32-40, 2015.
- MEHRA, K. R.; KULKARNI, A. R. Embryological studies in Bignoniaceae. **Phytomorphology**, v. 35, p. 239-251, 1985.
- MC DOWELL, E. M.; TRUMP, B. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414, 1976.
- PEREIRA JR, E. J. **Ontogenia do Óvulo e da Antera de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae)**, 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Genética)-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2011.
- SAMPAIO, D. S. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações nos sistema de autoincompatibilidade**. Tese. (Doutorado em Ecologia) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil. 2010.
- SAMPAIO, D. S.; BITTENCOURT JR, N. S.; OLIVEIRA, P. E. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from central Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 173, p. 77-91, 2013.

### **CAPÍTULO 3**

#### **ONTOGENIA DA SEMENTE DE ESPÉCIES DE *CUSPIDARIA* E *TYNANTHUS* (BIGNONIEAE: BIGNONIACEAE)**

**Resumo: Ontogenia da semente de *Cuspidaria* e *Tynanthus* (Bignoniaceae: Bignoniaceae)**

A estrutura das sementes nas angiospermas ainda é muito pouco conhecida e a falta de estudos de ontogenia dificulta a análise de caracteres evolutivos. O presente trabalho tem como objetivo a análise da ontogenia da semente a fim de discutir questões como a presença de endosperma em sementes maduras, o número de células do haustório calazal, a constituição do envoltório membranáceo e formato do hilo em espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus*. Os resultados mostram que a diferenciação do haustório calazal ocorre no início do desenvolvimento e a do haustório micropilar em estádios posteriores. Foi encontrado haustório calazal com quatro células nas três espécies estudadas, sendo característico para as Bignoniaceae, bem como para Jacarandae e Tecomeae, sendo, por isso, interpretado como um estado de caráter basal das Bignoniaceae. O endosperma passa de biestratificado para multiestratificado como já relatado para a família e na semente em estágio mais avançado de desenvolvimento as células do endosperma periféricas se diferenciam no endosperma diferenciado tardiamente, o qual apresenta células mais justapostas e permanece na semente madura. Com o desenvolvimento da semente ocorre degeneração de células da mesotesta nas adjacências do endotélio, havendo um rompimento deste tecido. Na semente madura o conjunto endosperma diferenciado tardiamente e endotélio formam o envoltório membranáceo dos embriões, o qual parece ser comum para todas as Bignoniaceae. Embora o endosperma permaneça na semente madura ela é classificada como exalbuminosa, uma vez que a maior parte de nutrientes para a germinação da semente e crescimento inicial da plântula seja oriundo do embrião. O prolongamento da região micropilar dos óvulos de *Cuspidaria* não acompanha o desenvolvimento da semente, ficando inconspícuo nas sementes maduras. As sementes do gênero *Cuspidaria* possuem hilo predominantemente arredondado ou oval, enquanto as do gênero *Tynanthus* possuem hilo linear, embora algumas exceções sejam empecilhos para a caracterização dos gêneros e mereçam ser melhor investigadas.

**Palavras chave:** anatomia da semente, envoltório membranáceo, hilo.

## Introdução

Os estudos ontogenéticos são de fundamental importância para a compreensão da morfologia e anatomia das sementes (Fahn, 1990), permitindo um melhor entendimento da evolução dessas estruturas, bem como de relações filogenéticas entre as espécies (Von Teichman & Van Wyk, 1991). As análises de ontogenia e morfologia da semente de Bignoniaceae são escassas (Mehra & Kulkarni, 1985; Costa, 1995; Shivaramiah, 1998; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Renó *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Gandolphi & Bittencourt, 2010; Sampaio *et al.*, 2013) e estudos que façam uma compilação desses dados evidenciando os caracteres de importância ecológica e sistemática que mereçam estudos mais detalhados inexistem. Assim, várias questões importantes sobre a morfologia das sementes de Bignoniaceae permanecem em aberto, como a importância da morfologia do hilo na caracterização dos grupos, o destino do prolongamento da região micropilar do óvulo encontrada em algumas Bignonieae, a falta de um consenso na descrição de sementes albuminosas ou exalbuminosas, bem como sobre a constituição do envoltório membranáceo dos embriões, além da distribuição do número de células do haustório calazal do endosperma nos diferentes clados.

As sementes de Bignoniaceae geralmente possuem alas hialinas e membranáceas, são exalbuminosas, com embrião do tipo transverso-oblongo, cotilédones bilobados, carnosos, eixo embrionário reto, cônico, curto, localizado no istmo da base da semente (Corner, 1976; Barroso *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2005; Renó *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2008; Lohmann & Taylor, 2014). A maior parte dos trabalhos com sementes maduras de Bignoniaceae descrevem o endosperma como ausente ou limitado (Hyakutake & Grotta, 1965; Panizza, 1967; Corner, 1976; Beltrati & Piccolo, 1979; Mehra & Kulkarni, 1985; Gabrielli & Castro, 1995; Costa, 1995; Ferreira & Cunha, 2000; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Renó *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2013), mas outros enfocam na constituição do envoltório membranáceo dos embriões na semente madura (Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes 2010; Sampaio *et al.*, 2013; Alves 2014). Um prolongamento do tegumento do óvulo foi descrito para espécies de *Cuspidaria* e *Fridericia*, podendo ser uma característica exclusiva destes gêneros ou estar mais amplamente distribuído em Bignonieae (Capítulo 2). Tal prolongamento parece ter importância durante a penetração do óvulo pelo tubo polínico (Capítulo 2), mas não se sabe qual seu destino em estádios subsequentes do desenvolvimento da semente.

A morfologia do hilo possui formato variável, sendo relatado o formato ovóide a obovóide ou orbicular em *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook.f. ex S. Moore (=

*Tabebuia caraiba* (Mart.) Bur) (Ferreira & Cunha, 2000); como uma cicatriz estreita alongada transversalmente em *Handroanthus ochraceus* (Cham.) Mattos (= *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl) (Sampaio *et al.*, 2007) (ambas pertencentes ao clado *Tabebuia alliance*), o que pode auxiliar na distinção entre esses gêneros. Em *Amphilophium mansoanum* (DC.) L.G. Lohmann (= *Distictella mansoana* (DC.) Urb.) (Beltrati & Piccolo, 1979) (Tribo Bignonieae) também é descrito como cicatriz estreita alongada transversalmente; e ainda pode ser punctiforme e em depressão em *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don. *subsp. spectabilis* (Mart. ex A. DC) Gentry (Gurgel *et al.*, 2006) (tribo Jacarandaeae). São necessários outros estudos para definir se este caractere realmente possui alguma importância sistemática.

Dados ontogenéticos revelam a presença de um endotélio e de um endosperma celular (Mauritzon, 1935; Ghatak, 1956; Davis, 1966; Corner, 1976; Mehra & Kulkarni, 1985; Shivaramiah, 1998; Bittencourt *et al.*, 2003; Bittencourt & Semir, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Gandolphi & Bittencourt, 2010). A presença hipóstase é um estado de caráter considerado basal, sendo raramente encontrado junto ao endotélio (Kapil & Tiwari, 1978; Von Teichman & Van Wyk, 1991). A presença de haustórios calazal e micropilar do endosperma verificada nas espécies de Bignoniaceae (Mauritzon, 1935; Govindu, 1950; Ghatak, 1956; Mehra & Kulkarni, 1985; Shivaramiah, 1998; Bittencourt & Semir, 2005; Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Gandolphi & Bittencourt, 2010; Sampaio *et al.*, 2013), é considerada uma característica comum para a ordem Lamiales (Judd *et al.*, 2009). O endosperma ainda é classificado nos tipos *Catalpa*, com haustório calazal de duas a quatro células, e *Incarvillea*, com haustório calazal de apenas uma célula (Mauritzon, 1935), porém, a evolução deste caráter ainda não foi estudada na família devido ao pequeno número de trabalhos desenvolvidos na área.

Uma estrutura membranácea que envolve todo o embrião foi descrita e denominada de envoltório membranáceo, podendo apresentar importantes funções como impedir o deslocamento de nutrientes, criar um espaço de ar que auxilie na flutuabilidade da semente através do rompimento da mesotesta, controlar o desenvolvimento dos embriões e, possivelmente, ainda ter alguma utilidade na germinação das sementes (Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007). Existem divergências quanto à constituição desta estrutura, já tendo sido descrita como um conjunto de endosperma, remanescentes do nucelo e do tegumento interno (Beltrati & Piccollo, 1979), ou de endotélio e nucelo (Gabrielli & Castro, 1995), ou de endosperma e endotélio (Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014), ou ainda de apenas poucas camadas do endosperma (Mehra & Kulkarni, 1985; Costa, 1995). Entretanto, a presença de nucelo na constituição do

envoltório é improvável, já que os óvulos são tenuinucelados, sendo a epiderme nucelar degenerada durante o desenvolvimento do óvulo e a hipóstase durante o desenvolvimento da semente (Sampaio *et al.*, 2007), podendo ter havido equívocos na interpretação da estrutura devido à ausência de estudos ontogenéticos. Sampaio e colaboradores (2007) sugerem que espécies que possuem o envoltório membranáceo têm a ontogenia e constituição semelhantes, tendo em vista a importância dos eventos para a formação dessa estrutura, como eventos de morte celular programada e diferenciação tardia de células do endosperma.

Os gêneros *Cuspidaria* e *Tynanthus* são grupos irmãos e pertencem ao clado *Arrabidaea and allies* incluso na tribo Bignonieae (Lohmann, 2006). Em um estudo filogenético recente utilizando dados morfológicos e moleculares houve a inclusão de quatro espécies que anteriormente pertenciam ao gênero *Arrabidaea* (atualmente desmembrado) em *Cuspidaria*, sendo elas *Arrabidaea inaequalis* (DC ex Splitg.) Baill, *Arrabidaea lachnaea* (Bureau) Sandwith, *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith e *Arrabidaea sceptrum* (Cham.) Sandwith, além de *Pyrostegia cinerea* Bureau & K. Schum que também passou a fazer parte do gênero que possui, atualmente, 17 espécies (Lohmann & Taylor, 2014). Já o gênero *Tynanthus* é considerado monofilético (Lohmann, 2006), o qual inclui 15 espécies de lianas (Lohmann & Taylor, 2014).

Com o exposto, o presente trabalho teve como objetivo elucidar aspectos da ontogenia e morfologia da semente de Bignoniaceae, investigando espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus*. Os principais aspectos a serem discutidos são se o endosperma está presente na semente madura, o número de células do haustório calazal em comparação com outras espécies da família, o desenvolvimento do prolongamento da micrópila em *Cuspidaria*, a ontogenia e constituição do envoltório membranáceo, bem como a morfologia do hilo de 14 espécies de *Cuspidaria* e oito espécies de *Tynanthus*. Assim pretende-se verificar se existem aspectos morfológicos da ontogenia da semente que possam caracterizar suas espécies.

## **Material e Métodos**

### *Espécies estudadas e área de estudo*

Para as análises histológicas e análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foram utilizadas as espécies *Cuspidaria sceptrum* (Cham.) L.G. Lohmann, *Cuspidaria convoluta* (Vell.) A.H. Gentry e *Tynanthus micranthus* Corr. Méllö ex K. Schum e para as análises de morfologia do hilo sob estereomicroscópio foram utilizadas as espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus* apresentadas na Tabela 1.

O gênero *Cuspidaria* DC. possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os estados brasileiros, sendo constituído por 17 espécies e duas variedades (Flora do Brasil 2020 em construção). São lianas com folhas opostas, simples ou compostas 2-3 folioladas com ou sem gavinha simples e com folíolos de venação pinada e glândulas agrupadas nas axilas das nervuras (Lohmann & Taylor, 2014). Flores são dispostas em inflorescências que podem ser tirsóides, terminais ou axilares, possuem corola de coloração magenta, rosa ou vermelha, campanulada, com cálice verde a púrpuro, urceolado a cupular. O fruto é uma cápsula linear achatada, septicida, com sementes aladas (Lohmann & Taylor, 2014). Em algumas espécies os frutos possuem margens elevadas que frequentemente se desenvolvem em alas, como observado, por exemplo, em *C. convoluta* (Lohmann & Taylor, 2014). Segundo as autoras, a presença de pólen em tétrades e duas séries de óvulos por placenta constituem uma sinapomorfia do gênero.

*Tynanthus* Miers ocorre em vários estados brasileiros, estando distribuído nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Flora do Brasil 2020 em construção), além de possuir representantes distribuídos do sul do México até na Bolívia (Lohmann & Taylor, 2014). Inclui 15 espécies de lianas (Lohmann & Taylor, 2014), sendo que 11 ocorrem no Brasil (Flora do Brasil 2020 em construção). As espécies do gênero possuem ramos cilíndricos e forte cheiro de cravo, o qual não é encontrado em qualquer outro gênero (Lohmann & Taylor, 2014). As folhas compostas por 2-3 folíolos, sendo que o folíolo central frequentemente é substituído por gavinhas. Na maioria das espécies as gavinhas são trifidas, mas *T. macranthus*, *T. guatemalensis* e *T. polyanthus* possuem gavinhas simples (Medeiros & Lohmann, 2014). As flores são dispostas em inflorescências tirsóides, terminais ou axilares, são relativamente pequenas, possuem um disco nectarífero pouco desenvolvido, a corola é branca, infundibuliforme, bilabiada com os dois lobos superiores fundidos, cálice campanulado e usualmente 5-denticulado. Os frutos são uma cápsula linear septicida coriácea, possuem margens elevadas que frequentemente se desenvolvem em alas e possuem sementes aladas (Lohmann & Taylor, 2014).

As coletas de *Cuspidaria sceptrum* foram realizadas entre os meses de abril e agosto de 2014 em populações naturais do Município de Uberlândia, nas bordas da área de reserva legal do Clube de Caça-Pesca Itororó (18°58'43.8" S, 48°17'40,3" W). As coletas de *C. convoluta* e *T. micranthus* foram realizadas de setembro de 2014 a março de 2015, no Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, MG (19°51'30.7" S, 44° 0'29.4" W). O material testemunho foi depositado no *Herbarium Urbelandense* (HUFU), Uberlândia,

MG, sob os números HUFU 71.547 para *C. sceptrum*, HUFU 71.459 para *C. convoluta*, e HUFU 71.548 para *T. micranthus*.

### *Análises histológicas*

As análises foram realizadas no Laboratório de Morfologia Vegetal Microscopia e Imagem da Universidade Federal de Uberlândia. Foram coletadas flores em antese e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento de *C. sceptrum*, *C. convoluta* e *T. micranthus*. Logo após a coleta o material foi dissecado e os ovários e sementes foram fixados em solução de gluteraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Mc Dowell & Trump, 1976). Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica e passou por uma série etanol:clorofórmio para retirada das ceras epicuticulares. Os ovários passaram pela série curta de etanol:clorofórmio (3:1, 1:1, 3:1) e as sementes pela série completa (3:1, 1:1, 1:3, 1:1, 3:1). Posteriormente, ovários e sementes retornaram ao etanol 100%. A inclusão foi realizada em hidroxietilmetacrilato (Leica Historesin Embedding Kit) (Gerrits & Smid, 1983). O ovário foi seccionado transversalmente obtendo-se cortes longitudinais dos óvulos, enquanto as sementes foram seccionadas transversal e longitudinalmente. Os cortes seriados de 3-5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo de rotação (RM2135, Leica) equipado com navalha descartável Leica (Leica 818 High Profile Microtome Blades). O material foi corado com Azul de Toluidina O 0,05%, em tampão benzoato de sódio, pH 4,4 (Feder & O'Brien, 1968) e as lâminas montadas em Permount. A análise das lâminas e a fotodocumentação foram realizadas em microscópio óptico (Olympus BX 51) com câmera digital (Olympus DP70) acoplada.

### *Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia da Faculdade de Engenharia Química, da Universidade Federal de Uberlândia. Logo após a coleta de sementes jovens, as mesmas também foram fixadas em solução de gluteraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Mc Dowell & Trump, 1976). Logo em seguida o material foi desidratado em série etílica e série etanol:acetona (1:0, 1:1: 0:1), ficando 15 minutos em cada solução. Posteriormente, o material foi seco em aparelho de ponto crítico (Leica CPD 300) e fixado nos “stubs” com auxílio de fita dupla face. A metalização do material foi feita com ouro em equipamento Leica SCD 050. A análise e

digitalização das imagens foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura, Zeiss (EVO|MA10).

### *Análises morfológicas*

Para análises comparativas da morfologia do hilo na semente madura, foram consultadas as coleções dos seguintes herbários: Herbário da Universidade de Brasília (UB), Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB), Herbário da Universidade de São Paulo (SPF), Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (IBSP), Herbário do Museu Nacional do Rio de Janeiro (R) e *Herbarium Uberlandense* (HUFU) da Universidade Federal de Uberlândia. Foram encontradas exsiccatas de 14 espécies do gênero *Cuspidaria* e oito do gênero *Tynanthus* que possuíam sementes disponíveis para análise (Tabela 1). As análises morfológicas das sementes e a fotodocumentação foram realizadas em estereomicroscópio Leica M205C e as imagens adquiridas com câmera Leica DFC 295 no Laboratório de Aracnologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Tabela 1. Relação das espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus* disponibilizadas em diferentes Herbários, para a análise da morfologia da semente. Os asteriscos indicam qual *volcher* foi utilizado para foto das sementes.

	Espécies	Número do voucher	Número de semente
1	<i>Cuspidaria argentea</i> (Wawra) Sandwith	UB 18585 *	2
2	<i>Cuspidaria cinerea</i> (Bureau ex K.Schum.) L.G. Lohmann (=Pyrostegia cinérea Bureau ex K. Schum)	R 128140	2
2	<i>Cuspidaria cinerea</i>	R 223083 *	2
3	<i>Cuspidaria convoluta</i> (Vell.) A.H. Gentry	SPF 189087 *	2
3	<i>Cuspidaria convoluta</i>	BHCB 144237	3
3	<i>Cuspidaria convoluta</i>	R 127603	3
3	<i>Cuspidaria convoluta</i>	IBSP 102884	2
4	<i>Cuspidaria cratensis</i> (J.C. Gomes) A.H. Gentry ex L.G. Lohmann (=Saldanhaea cratensis J.C. Gomes)	R 23890	2
4	<i>Cuspidaria cratensis</i>	UB 59721 *	2
5	<i>Cuspidaria floribunda</i> (DC.) A.H. Gentry	SPF 188490	2
5	<i>Cuspidaria floribunda</i>	SPF 171627 *	2
5	<i>Cuspidaria floribunda</i>	UB 19807	3
5	<i>Cuspidaria floribunda</i>	UB 43141	2
6	<i>Cuspidaria inaequalis</i> (DC. ex Splitg.) L.G.Lohmann (=Arrabidaea inaequalis (DC. ex Splitg.) Baill	IBSP 226159 *	6
6	<i>Cuspidaria inaequalis</i>	UB 17094	2
7	<i>Cuspidaria lasiantha</i> (Bureau & K. Schum.) L.G. Lohmann (=Arrabidaea lachnaea (Bureau) Sandwith	UB (09-08-1965) *	2
8	<i>Cuspidaria lateriflora</i> (Mart.) DC.	IBSP 53709 *	3
8	<i>Cuspidaria lateriflora</i>	R 23783	3
8	<i>Cuspidaria lateriflora</i>	UB (07-09-11)	2
9	<i>Cuspidaria multiflora</i> DC.	SPF 154482 *	2

10	<i>Cuspidaria octoptera</i> A.H. Gentry	UB 19823 *	3
11	<i>Cuspidaria pulchella</i> (Cham.) K. Schum.	SPF 195012 *	3
11	<i>Cuspidaria pulchella</i>	R 23899	3
12	<i>Cuspidaria pulchra</i> (Cham.) L.G.Lohmann (=Arrabidaea pulchra (Cham.) Sandwith)	SPF 82653 *	2
12	<i>Cuspidaria pulchra</i>	BHCB 48574	3
12	<i>Cuspidaria pulchra</i>	UB 1733	2
13	<i>Cuspidaria sceptrum</i> (Cham.) L.G.Lohmann (=Arrabidaea sceptrum (Cham.) Sandwith)	BHCB 989 *	3
14	<i>Cuspidaria subincana</i> A.H. Gentry	R 22274 *	3
1	<i>Tynanthus cognatus</i> (Cham.) Miers	SPF 195343	3
1	<i>Tynanthus cognatus</i>	R 36346 *	3
2	<i>Tynanthus elegans</i> Miers	SPF 195340 *	4
3	<i>Tynanthus fasciculatus</i> (Vell.) Miers	SPF 96658	3
3	<i>Tynanthus fasciculatus</i>	SPF 194999 *	2
3	<i>Tynanthus fasciculatus</i>	R 36349	3
3	<i>Tynanthus fasciculatus</i>	IBSP 45881	1
4	<i>Tynanthus guatemalensis</i> Donn. Sm	SPF 168788 *	2
5	<i>Tynanthus micranthus</i> Corr.Mello ex K. Schum	SPF 107633 *	2
6	<i>Tynanthus polyanthus</i> (Bureau) Sandwith	SPF 188935 *	3
6	<i>Tynanthus polyanthus</i>	R 223082	2
7	<i>Tynanthus pubescens</i> A.H. Gentry	IBSP216747 *	3
8	<i>Tynanthus schumannianus</i> (Kuntze) A.H. Gentry	R 22109*	3
8	<i>Tynanthus schumannianus</i>	R 223081	4

## Resultados

### *Óvulo*

Os óvulos maduros das três espécies possuem características semelhantes, ambos são anátropos, unitegumentados, com o nucelo representado apenas por uma hipóstase diferenciada na região calazal do óvulo (Figuras 1A-C). A porção mais calazal da lateral do megagametófito é circundada pela camada interna do tegumento diferenciada em endotélio, sendo que esta camada está colapsada da região mediana até a região micropilar, expondo uma grande quantidade de grãos de amido (Figuras 1A-C). As espécies de *Cuspidaria* apresentam um prolongamento na região micropilar do tegumento, sendo mais proeminente em *C. sceptrum*, no qual podem ser observados grãos de amido (Figura 1A).

### *Semente em estágio inicial de desenvolvimento*

O início da endospermogênese foi observado apenas em *T. micranthus*. Após uma das sinérgides ser penetrada pelo tubo polínico, ela passa a apresentar conteúdo citoplasmático denso e uma alça citoplasmática entre o zigoto e a célula média, surgindo, então, o núcleo primário do endosperma (Figura 2A). A primeira divisão do endosperma é transversal seguida por citocinese, resultando em uma célula na câmara calazal e outra na câmara micropilar (Figuras 2B, C). A partir deste estágio, a célula da câmara calazal apresenta conteúdo citoplasmático denso, apontando-a como precursora do haustório calazal do endosperma (Figura 2C). Posteriormente, ocorre uma divisão longitudinal na célula de uma das câmaras, resultando em um endosperma de três células (Figuras 2D, E). Em seguida, a outra célula também passa pelo segundo ciclo mitótico, se dividindo longitudinalmente e originando um endosperma com quatro células (Figura 2F). As células da câmara micropilar, então, dividem-se transversalmente de maneira sincrônica, formando um endosperma com seis células (Figura 2G), estágio que também foi observado em *C. convoluta* (Figura 2H). As células centrais do endosperma dividem-se transversalmente, dando origem a um endosperma de oito células observado em *C. sceptrum*, no qual as células dos polos micropilar e calazal apresentavam-se mais volumosas, alongadas longitudinalmente e com conteúdo citoplasmático denso, indicando sua diferenciação em células haustoriais (Figura 2I).

A mesotesta passa por inúmeras divisões celulares em diferentes planos, promovendo seu alongamento (Figuras 3A-E), além de haver um aumento no prolongamento da região micropilar de *C. sceptrum* (Figuras 3A-C). As células da exotesta e da endotesta/endotélio dividem-se apenas anticlinalmente para acompanhar a expansão da

semente (Figuras 3A-E). No polo calazal da semente, as células da exotesta tornam-se alongadas anticlinalmente, dando origem à ala da semente nesta região (Figuras 3C, E). A mesotesta é constituída por células parenquimáticas com grandes vacúolos e com poucos espaços intercelulares (Figuras 3A-H). Entretanto, em *T. micranthus*, as células da região calazal da mesotesta apresentam um conteúdo citoplasmático denso e grãos de amido (Figura 3E). Neste estágio são observadas as células da endotesta diferenciadas em endotélio na porção calazal da lateral da cavidade da semente. O endotélio é constituído por células alongadas anticlinalmente e de conteúdo citoplasmático denso, embora tenham sido observados vacúolos em *C. convoluta* (Figuras 3F-H).

As células centrais do endosperma continuam passando por divisões anticlinais/transversais, dando origem a um endosperma alongado e bisseriado, mas ainda escasso (Figuras 3C-H). As células das extremidades calazal e micropilar do endosperma apresentam-se mais volumosas e com um conteúdo citoplasmático denso, caracterizando-as como células haustoriais (Figuras 4A-H). As duas células da câmara calazal do endosperma dividiram-se longitudinalmente mais uma vez, formando um haustório calazal de quatro células (Figuras 4B, D, F-H).

Posteriormente, as demais células centrais do endosperma passam por divisões periclinais, tornando-o multiestratificado, o qual torna-se adjacente ao endotélio (Figuras 5A, B). As do endotélio, que é bi ou tri-estratificado, também parecem se proliferar, passando divisões em diferentes planos (Figuras 5A, B). Neste estágio, observa-se um aumento de espaços intercelulares e o rompimento de algumas células da mesotesta em *C. sceptrum*, cerca de quatro camadas celulares de distância da cavidade da semente (Figura 5A). Também observa-se a degeneração de células da hipóstase ao redor das células do haustório calazal (Figuras 5 A, B). Na mesotesta de *C. sceptrum* e *C. convoluta* foram observados cristais de oxalato de cálcio neste estágio de desenvolvimento (Figuras 5C, D), já em *T. micranthus* os cristais só foram observados em sementes mais desenvolvidas. Uma substância corada de verde pelo Azul de Toluidina O, a qual se concentra na porção mais externa da mesotesta das três espécies, indica a presença de compostos fenólicos (Figuras 5C, E, F). O feixe rafeal é paralelo à cavidade da semente, sendo encontrados elementos de vaso com espessamento secundário em *C. sceptrum* e *C. convoluta* já neste estágio (Figuras 5G-H).

Através das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura pôde-se observar que ainda nesse estágio de semente jovem o prolongamento de tegumento na região micropilar é bastante conspícuo em *C. sceptrum* e *C. convoluta* (Figuras 6A-D). Nas laterais deste prolongamento é observado o desenvolvimento de alas que se estendem sobre a abertura da

micrópila (Figuras 6B, C, D, F). *Tynanthus micranthus*, que não possui a estrutura, apresenta um inconspícuo crescimento das alas nesta região (Figuras 6E-F).

#### *Semente em estágio médio de desenvolvimento*

É possível perceber o início da degeneração de células do endosperma na região ao redor do embrião (Figura 7A). As células da periferia do endosperma continuam se dividindo, principalmente periclinamente, dando origem a células isodiamétricas com conteúdo citoplasmático denso, as quais constituem um endosperma diferenciado tardiamente (Figura 7B). Em algumas regiões da semente são observadas várias camadas de endotélio (Figura 7B). As células da mesotesta adjacentes ao endotélio são degeneradas em toda a extensão da semente nas três espécies estudadas, exceto na região calazal (Figuras 7A-D, 8A, B). Na região micropilar da semente, na qual o endotélio está ausente e a mesotesta tem contato direto com o endosperma, uma porção da mesotesta fica aderida ao haustório micropilar e a outra permanece aderida à exotesta (Figuras 7A, D). Sendo assim, o conjunto de células composto pelo endosperma diferenciado tardiamente aderido ao endotélio/mesotesta é considerado um envoltório membranáceo do embrião (Figuras 7B, 8A, B).

Neste estágio, as células do feixe rafeal apresentaram-se diferenciadas em elementos de vaso também em *T. micranthus* (Figura 8C). Nas regiões de rompimento da mesotesta em sementes de *C. convoluta* e *T. micranthus* são observados cristais (Detalhe das Figura 8C e Figura E). As células da exotesta também possuem cristais de oxalato de cálcio, e as paredes anticlinais e periclinais apresentam espessamento secundário (Figuras 8B, D).

#### *Semente madura*

A semente madura é constituída por um embrião robusto envolto pelo envoltório membranáceo e por um fino tegumento da semente constituído por uma mesotesta de células frouxas, variando de 5 a 10 camadas de células, contendo muitos espaços intercelulares, e uma exotesta de uma camada de células esclerificadas (Figuras 9A, B, 10A). Na semente madura o haustório calazal já foi totalmente digerido, mas o haustório micropilar ainda está presente, embora já aparente estar inativo já que suas células carecem de conteúdo citoplasmático (Figuras 9A-D). As substâncias azul-esverdeadas relatadas nos estádios iniciais de desenvolvimento ainda podem ser verificadas na mesotesta das três espécies (Figuras 9F-G). Neste estágio já podem ser observados cristais de oxalato de cálcio na exotesta de *C. sceptrum* como relatado para as duas outras espécies (Figura 10A).

Na semente madura quase todo endosperma já foi consumido, exceto o endosperma diferenciado tardiamente, o qual possui as células pequenas com conteúdo citoplasmático denso (Figuras 10A-F). Nas três espécies, o conjunto endotélio/mesotesta - endosperma diferenciado tardiamente, denominado de envoltório membranáceo, envolve todo o embrião (Figuras 9A, B, 10A). As células do endotélio/mesotesta podem estar totalmente aderidas às células do endosperma diferenciado tardiamente como observado em *C. sceptrum* (Figuras 10A, B), ou colapsadas e soltas do endosperma em diferentes pontos do envoltório membranáceo como observado em *C. convoluta* e em *T. micranthus* (Figuras 10C-F).

O prolongamento do tegumento observado em óvulos e sementes jovens de *C. sceptrum* e *C. convoluta* não se prolifera acompanhando o desenvolvimento do tegumento da semente, ficando atrofiado. Na análise da histologia da semente madura, apenas pôde-se perceber a presença de vestígios do prolongamento da região micropilar em *C. sceptrum* (Figuras 11A-D), sendo que em *C. convoluta* só foi possível observá-lo sob MEV em sementes em desenvolvimento (Figuras 6C, D). Em sementes maduras de *C. sceptrum*, o prolongamento do tegumento aparece como um pequeno grupo de células que são escondidas pelas células das alas (Figuras 11A-D).

### *Morfologia do hilo*

Foi possível observar uma variação quanto ao formato do hilo entre as 22 espécies analisadas dos dois gêneros. As sementes do gênero *Cuspidaria* possuem hilo predominantemente arredondado ou oval, com exceção a *C. subicana* que possui hilo linear (Figura 12). *Cuspidaria argentea* e *C. lasiantha* possuem um formato intermediário, com o hilo largo, porém mais alongado (Figura 12). Já nas sementes do gênero *Tynanthus* o hilo é predominantemente linear, com exceção de *T. elegans* e *T. micranthus* que possuem hilo com formato oval (Figura 13). As espécies analisadas não apresentaram variação no formato do hilo entre sementes do mesmo fruto ou outros frutos da mesma espécie.

## **Discussão**

### *Endosperma*

O endosperma celular desde o início do seu desenvolvimento é característico das espécies de Bignoniaceae (Mauritzon, 1935; Ghatak, 1956; Davis, 1966; Mehra & Kulkarni, 1985; Shivaramiah, 1998; Bittencourt *et al.*, 2003; Bittencourt & Semir, 2005; Sampaio *et al.*,

2007). O desenvolvimento inicial do endosperma é similar ao das espécies analisadas até então (Mauritzon, 1935; Govindu, 1950; Ghatak, 1956; Mehra & Kulkarni; Johri *et al.*, 1992; Shivaramaiah, 1998; Bittencourt *et al.*, 2003; Bittencourt & Semir, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013 Alves, 2014), sendo que normalmente a divisão longitudinal das células das câmaras calazal e micropilar acontece de forma sincrônica, dando origem a um endosperma de quatro células, embora algumas vezes a divisão seja assincrônica quando se forma um endosperma de três células. Essa assincronia já foi observada nas espécies *Spathodea campanulata* Beauv. (Bittencourt *et al.*, 2003), *H. ochraceus* (Sampaio *et al.*, 2007), *Anemopaegma acutifolium* DC. (Sampaio *et al.*, 2013) e *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Alves, 2014) e parece ser uma constante em *T. micranthus*, como evidenciado neste trabalho.

O endosperma na semente em estágio inicial de desenvolvimento é biestratificado e após o alongamento da semente ele se torna multiestratificado, sendo que as divisões periclinais que geram esta estratificação ocorrem predominantemente nas regiões média e calazal do endosperma, assim como relatado para em *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (Souza *et al.*, 2005; Bittencourt & Moraes, 2010), *H. ochraceus* (Sampaio *et al.*, 2007) e *H. serratifolius* (Costa, 1995; Alves, 2014).

A degeneração do endosperma em torno do embrião e a manutenção de um endosperma diferenciado tardiamente na semente madura também foram relatadas para *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, *H. ochraceus*, *H. chrysotrichus* e *A. acutifolium* (Renó *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013). Nossos dados confirmam a presença de endosperma em sementes maduras, embora seja representado por um reduzido número de células. Apesar de este endosperma poder contribuir durante a germinação das sementes, acredita-se que pela maior parte dos nutrientes ser fornecida pelo embrião, deve haver um consenso na classificação das sementes como exalbuminosas, como sugerido por Sampaio e colaboradores (2007).

Nas espécies estudadas foi observada a diferenciação do haustório calazal no início do desenvolvimento do endosperma pelas duas células mais calazais passarem a apresentar um conteúdo citoplasmático mais denso, quando o endosperma possui por volta de seis a oito células, embora esta diferenciação só se torne completa quando o haustório possui as quatro células que o caracterizam. Assim como observado nas espécies do presente trabalho, em outras espécies da família a diferenciação do haustório calazal também ocorre no início do desenvolvimento do endosperma (Govindu 1950; Ghatak, 1956; Mehra & Kulkarni 1985, Shivaramiah, 1998; Bittencourt & Semir, 2005; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*,

2013; Alves, 2014). O haustório micropilar se desenvolve mais tardiamente, a partir do estágio de oito células, embora difira muito da sua iniciação em outras espécies como *Tabebuia rosea* (Bertol.) Bertero ex A.DC (Mehra & Kulkarni, 1985), *H. ochraceus* (Sampaio *et al.*, 2007) e *H. chrysotrichus* (Bittencourt & Moraes, 2010), *H. serratifolius* (Alves, 2014), *A. acutifolium* (Sampaio *et al.*, 2013), nas quais ele parece se desenvolver em endospermas que já estão multiestratificados.

Nas três espécies estudadas foi encontrado um haustório calazal com quatro células, sendo classificado como do tipo *Catalpa*. Outras espécies de Bignoniaceae que possuem o haustório de quatro células são *Jacaranda mimosifolia* D. Don (Govindu, 1950), da tribo Jacarandae; *T. stans* (Govindu, 1950), *Tecoma smithii* Hort. e *Campsis radicans* (L.) Seem. (Shivaramiah, 1998), que fazem parte da tribo Tecomeae; além de *A. acutifolium* (Sampaio *et al.*, 2013), a qual pertence à tribo Bignonieae, bem como as espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus* estudadas no presente trabalho. Dessa forma, pode-se dizer que o haustório de quatro células é o estado de caráter mais basal da família, uma vez que as tribos Jacarandae e Tecomeae são consideradas basais (Olmstead *et al.*, 2009) e, ainda, que a tribo Bignonieae manteve conservado este estado de caráter. O registro de *Campsis grandiflora* (Thunb.) K. Schum (= *Incarvillea grandiflora* Poir.) com apenas uma célula no haustório calazal (Mauritzon, 1935) surpreende, uma vez que *C. radicans* apresentou quatro células (Shivaramiah, 1998), estimulando uma nova análise da espécie para elucidar a questão. Outro dado conflituoso que merece novos estudos seria o obtido para *Dolichandra unguis-cati* (L.) L.G. Lohmann (= *Macfadyena unguis-cati* (L.) A.H. Gentry), da tribo Bignonieae, que apresentou duas células no haustório calazal (Shivaramiah, 1998), o que significaria uma modificação dentro de Bignonieae.

*Incarvillea olgae* Regel, *Incarvillea compacta* Maxim. e *Incarvillea delavayi* Bureau & Franch. estão inclusas na tribo Tecomeae e apresentam o haustório calazal de uma célula (Mauritzon, 1935), o que pode ser uma característica específica do gênero nesta tribo, o qual se distingue também por apresentar espécies de porte herbáceo e um número cromossômico que diverge grandemente dos demais membros da família (Gentry, 1980).

Foi encontrado o haustório do tipo *Catalpa* com duas células em todas as seis espécies estudadas dos gêneros *Tabebuia* e *Handroanthus* (Merha & Kulkani, 1985; Shivaramiah, 1998; Bittencourt & Semir, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Gandolphi & Bittencourt, 2010), os quais estão inseridos no clado *Tabebuia alliance*; e em duas espécies do gênero *Parmentiera*, da tribo Crescentieae, que também faz parte deste clado (Govindu, 1950; Shivaramiah, 1998). O haustório com duas células ainda foi descrito para

*Stereospermum chelonoides* DC, *Dolichandrone falcata* Seem. e *Fernandoa adenophylla* (Wall. ex G.Don) Steenis (= *Heterophragma adenophyllum* (Wall. ex G.Don) Seem. ex Benth. & Hook.f.) (Merha & Kulkani, 1985), as quais pertencem ao clado *Paleotropical clade*, grupo irmão de *Tabebuia alliance*. *Catalpa* e *Oroxyleae* são tribos irmãs dos clados *Tabebuia alliance* e *Paleotropical clade*, compondo o grande grupo *Crescentiina*, sendo que em *Catalpa bignonioides* Walter (Catalpeae), também foi observado haustório calazal com duas células (Mauritzon, 1935). Entretanto, Merha & Kulkani (1985) descrevem *Millingtonia hortensis* L. f., da tribo *Oroxyleae*, como possuindo haustório calazal de quatro células e Shivaramiah (1998) relata que a espécie possui haustório calazal com duas células. Dada a relação de *Oroxyleae* e *Catalpeae*, que estão inclusas em *Crescentiina* (*sensu* Olmstead *et al.*, 2009), é provável que a interpretação de Shivaramiah (1998) esteja correta e de que a espécie possua haustório calazal de duas células como encontrado nos clados irmãos.

Dessa forma, pode-se inferir que o haustório calazal de duas células seja um estado de caráter adquirido pelo clado *Crescentiina*. Por outro lado, o haustório calazal do tipo *Incarvillea*, com uma célula, também foi observado em *Kigelia africana* (Lam.) Benth (= *Kigelia pinnata* (Jacq.) DC) e *Markhamia lutea* (Benth.) K.Schum. (= *Dolichandrone platycalyx* Baker) (Shivaramiah, 1998), membros do *Paleotropical clade* (*sensu* Olmstead *et al.*, 2009), indicando que algumas de suas espécies apresentam uma modificação deste caráter, com um haustório calazal de apenas uma célula.

Com os dados expostos acima, acreditamos que o número de células do haustório calazal do endosperma seja um caráter de suma importância na caracterização dos grandes grupos de Bignoniaceae. Sugerimos que utilizar uma classificação que considere uma, duas ou quatro células do endosperma separadamente seja mais interessante para interpretações da evolução desta estrutura na família do que a classificação adotada por Mauritzon (1935), na qual o haustório calazal de duas a quatro células é classificado no tipo *Catalpa*, e os haustórios de uma célula no tipo *Incarvillea*.

#### *Envoltório membranáceo*

O rompimento de células da mesotesta também foi observado em *H. ochraceus* (Sampaio *et al.*, 2007), *H. chrysotrichus* (Souza *et al.*, 2005; Bittencourt & Moraes, 2010), *H. serratifolius* (Costa, 1995) e *A. acutifolium* (Sampaio *et al.*, 2013), parecendo ser um tipo de morte celular programada. Essa degeneração de células da mesotesta, bem como a diferenciação do endosperma diferenciado tardiamente e sua aderência ao endotélio são

responsáveis pela formação do envoltório membranáceo, deixando um grande espaço de ar entre ele e a mesotesta.

Sampaio e colaboradores (2007) sugerem que todas as espécies que apresentam o envoltório membranáceo, possuem uma ontogenia e constituição semelhantes para esta estrutura, visto que são necessários eventos importantes para a sua formação. Embora poucas espécies tenham sido investigadas quanto a este caráter, o envoltório membranáceo pode ser visto a olho nú quando se retira o tegumento da semente, sendo uma fina película amarronzada aderida ao embrião (observação pessoal), não existindo, até o momento, relatos de espécies que careçam desta estrutura na família Bignoniaceae. Sendo assim, acredita-se que o envoltório membranáceo seja constituído de endosperma diferenciado tardiamente e endotélio nas Bignoniaceae e que as outras constituições relatadas para suas espécies (Beltrati & Piccollo, 1979; Mehra & Kalkarni, 1985; Gabrielli & Castro, 1995; Costa, 1995) podem ter sido equivocadas devido à ausência de estudos ontogenéticos.

Foi relatada uma longa funcionalidade das células do endotélio e a permanência dessas células aderidas ao endosperma diferenciado tardiamente (Sampaio *et al.*, 2007). Essas características foram comuns ao encontrado em *C. sceptrum*, mas em *C. convoluta* e *T. micranthus* as células do endotélio estão separadas das células do endosperma diferenciado tardiamente em vários pontos ao longo do envoltório, com aspecto degenerativo em algumas sementes. A presença de um endotélio aderido ou não ao endosperma, apresentando ou não células vivas pode estar relacionada ao quão seca se encontra a semente, uma vez que as sementes maduras de *C. convoluta* e *T. micranthus* foram coletadas de frutos que já haviam passado pela deiscência há mais de 5 meses e as de *C. sceptrum* foram coletadas com menos de um mês após a deiscência.

#### *Hipóstase e tegumento da semente*

As células da exotesta da semente na região do corpo possuem espessamento secundário como relatado para as demais espécies da família (Beltrati & Piccollo, 1979; Sampaio *et al.*, 2007). Vários cristais de oxalato de cálcio foram encontrados na mesotesta e exotesta das sementes das três espécies estudadas, os quais também foram relatados na mesotesta de sementes maduras de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Gabrielle & Castro, 1995), na exotesta de sementes maduras de *A. mansoanum* (Beltrati & Piccollo, 1979), e nas células da ala (exotesta) de *J. mimosifolia* (Govindu, 1950). Também foram encontradas substâncias fenólicas na mesotesta das três espécies. A presença de compostos fenólicos no tegumento da semente também foi relatada em *D. mansoana* (Beltrati & Piccollo, 1979). Tanto

os cristais de oxalato de cálcio, como as substâncias fenólicas, os quais foram observados desde o estágio médio de desenvolvimento da semente, devem estar associados à defesa contra herbívora (Boesewinkel & Bouman, 1984).

As células da mesotesta parecem ter importantes funções durante a ontogenia da semente das espécies estudadas, as quais parecem ser comuns para outras espécies de Bignoniaceae (Sampaio *et al.*, 2007). Inicialmente, elas promovem a expansão da semente, através de uma sequência de divisões celulares, posteriormente, passam a ter espaços intercelulares mais proeminentes e suas células parecem passar por morte celular programada nas adjacências do endotélio, que será responsável pela formação do envoltório membranáceo, além de as células remanescentes apresentarem os já referidos cristais e fenólicos que dão proteção ao embrião. O endotélio das espécies estudadas se diferencia ainda no óvulo em desenvolvimento e suas células passam de alongadas tangencialmente no óvulo (Capítulo 1) a alongadas radialmente nas sementes de *Cuspidaria* analisadas neste estudo, como reportado por Kapil & Tiwari (1978). Em *H. ochraceus* foi observada a modificação de um endotélio com alongamento anticlinal nos óvulos e células parcialmente colapsadas ou laminares na semente madura (Sampaio *et al.*, 2007). Na semente madura o endotélio apresenta-se bi a triestratificado como verificado para *H. ochraceus*, *H. chrysotrichus*, *A. acutifolium* (Souza *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2013).

A diferenciação das células do procâmbio em elementos de vaso até o estágio de semente madura foi observada nas espécies estudadas, como também reportado para *H. serratifolius* (Costa, 1995). Por outro lado, em espécies como *H. ochraceus* (Sampaio *et al.*, 2007) e *P. venusta* (Gabrielle & Castro, 1995) as células do procâmbio permanecem indiferenciadas até a maturidade da semente. Esta diferenciação dos elementos traqueais não parece ocorrer em grupos específicos, já que as espécies de *Handroathus* se comportam de maneiras distintas, bem como os membros de Bignoniaceae, devendo estar relacionada a outros fatores.

Embora as células da hipóstase possuam paredes espessas, elas não foram observado a deposição de lignina e não impedem o crescimento agressivo do haustório calazal do endosperma nas espécies estudadas, sendo degradadas como observado para outras Bignoniaceae (Sampaio *et al.*, 2007; Bittencourt & Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013; Alves, 2014). Dessa forma, a função atribuída a esta estrutura de impedir tal crescimento, não foi verificada (Mehra & Kulkarni, 1985). Parece mais provável que sua função esteja relacionada à nutrição do megagametófito, bem como do endosperma e embrião nos estádios

iniciais de desenvolvimento da semente, antes de sua degradação (Von Teichman & Van Wyk, 1991; Swamy, 1941; Govindu, 1950).

Durante o desenvolvimento da semente foi observado um prolongamento do tegumento na região micropilar das espécies de *Cuspidaria*. Até o momento essa estrutura foi encontrada somente nas espécies *C. sceptrum*, *C. convoluta* e no óvulo de flor em antese de *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann (Capítulo 2), podendo ser uma característica comum ao clado *Arrabidaeae and allies* (Lohmann, 2006), devendo ter havido uma perda desta estrutura em *Tynanthus*. No óvulo maduro esse prolongamento é composto por células volumosas de organização frouxa e com grande quantidade de grãos de amido, podendo ser uma característica associada à orientação e crescimento do tubo polínico no momento da penetração do óvulo. Nas fases iniciais de expansão da semente das espécies de *Cuspidaria*, há uma proliferação deste prolongamento, a qual cessa nos estádios posteriores. Esta pequena proliferação após a fecundação pode selar a abertura da micrópila, mas o fato de ficar estagnado posteriormente mostra que suas funções não devem ir além do momento da penetração e estádios iniciais de desenvolvimento da semente.

O formato do hilo parece ser bem característico para as espécies aqui estudadas, bem como relatado para *T. aurea*, *H. ochraceus*, *A. mansoanum* e *J. copaia* (Beltrati & Piccolo, 1979; Ferreira & Cunha, 2000; Gurgel *et al.*, 2006; Sampaio *et al.*, 2007). As sementes do gênero *Cuspidaria* possuem hilo predominantemente arredondado ou oval, enquanto nas sementes do gênero *Tynanthus* o hilo é predominantemente linear, com algumas exceções para ambos os gêneros. As exceções encontradas no presente trabalho devem ser melhor investigadas, novas coletas e confirmações na identificação das espécies podem ser elucidativas. Porém, as variações podem ser reais e representar agrupamentos de espécies com características peculiares, o que deve ser avaliado com base em estudos filogenéticos. Se formos levar em conta a filogenia do gênero *Tynanthus* para discussão dessa variação, observamos que *T. micranthus* pertence ao *labiatus clade*, um clado mais derivado do gênero, e *T. elegans* ao clado *cognatus clade*, sendo este o clado mais basal do gênero (Medeiros & Lohmann, 2015). No caso de *T. elegans* poderia ser um caráter herdado do ancestral do clado que contém os dois gêneros, mas no caso de *T. micranthus* a característica teria surgido de forma independente. Já para o gênero *Cuspidaria* essa análise não é possível, pois a filogenia do gênero não foi estudada. Outros trabalhos que investiguem a morfologia do hilo comparando espécies dentro de um mesmo gênero ou de gêneros irmãos parecem ser promissores para identificar alguns grupos.

## Conclusões

O haustório calazal do endosperma de quatro células parece ser o estado de caráter basal da família, sendo encontrado nas tribos Jacarandaeae, Tecomeae e Bignoniaceae, tendo sido reduzido para duas células no clado Crescentiina, e ainda para uma célula em algumas espécies do *Paleotropical clade* e no gênero *Incarvillea*, da tribo Tecomeae. A presença de um endosperma diferenciado tardiamente, que é o principal componente do envoltório membranáceo dos embriões em sementes maduras, é uma característica importante compartilhada pelas espécies de Bignoniaceae (Mehra & Kulkarni, 1985; Costa, 1995), embora não seja a principal fonte de nutrientes durante a germinação. O prolongamento do tegumento na região micropilar das sementes, que foi descrito apenas para *Cuspidaria* e *Fridericia* e tido como uma sinapomorfia do clado *Arrabidaeae and allies*, não acompanha a expansão da semente de *C. convoluta* ou *C. sceptrum*, indicando que sua função deve estar restrita à antese floral podendo favorecer a penetração do óvulo pelo tubo polínico. A análise da morfologia do hilo demonstrou que as espécies de *Cuspidaria* possuem hilos ovais, enquanto as de *Tynanthus* possuem hilos lineares. Embora algumas exceções dentro dos gêneros possam impedir que este caráter seja utilizado na sistemática, acreditamos que estudos adicionais com novas coletas, além de maiores detalhamentos na filogenia dos grupos, possam sanar este problema.

## Referências bibliográficas

- ALVES, M. F. **Populações haploides e apomíticas de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae) com diferentes sistemas reprodutivos.** 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à Sistemática de dicotiledôneas.** Viçosa: Imprensa Universitária. 1999.
- BELTRATI, C. M.; PICCOLO, A. L. G. Considerações sobre la semilla, la germinación y la plántula de *Distictella mansoana* (Bur.) Urb. **Phytton**, v. 37, p. 85-96, 1979.
- BITTENCOURT JR, N. S., GIBBS, P. E.; SEMIR, J. Histological study of post-pollination events in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), a species with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany**, v. 91, p. 827-834, 2003.
- BITTENCOURT JR., N. S.; SEMIR, J. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 166, p. 493-506, 2005.
- BITTENCOURT JR. N. S.; MORAES, C. I. G. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae) a histological study of post-pollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, p. 59-76, 2010.
- BOESEWINKEL, F. D.; BOUMAN, F. 1984. The seed: Structure. In: JOHRI, B.M. **Embryology of Angiosperms.** Springer-Verlag, Berlin, 1984. Cap 12, p. 567-584.
- CORNER, E. J. H. **The seed of dicotyledons.** Cambrige University Press, London. 1976.
- COSTA, M. E. **Morfo-anatomia da semente e da plântula de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Bignoniaceae).** 1995. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- DAVIS, O. L. **Systematic embryology of the Angiosperms.** Nova Iorque: John Wiley & Sons, Inc., p. 528, 1966.
- FAHN, A. **Plant anatomy.** 4th ed. Pergamon Press, New York, 1990.

- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique, some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, p. 123-142, 1968.
- FERREIRA, R. A.; CUNHA, M. C. L. Aspectos morfológicos de sementes, plântulas e desenvolvimento da muda de craibeira (*Tabebuia caraiba* (Mart.) Bur.) – Bignoniaceae e pereiro (*Aspidosperma pyrifolium* Mart.) – Apocynaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 2, p. 134-143, 2000.
- FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 17 Mar. 2016
- GABRIELLI, A. C.; CASTRO, M. M. Anatomia da semente madura de *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers – Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 18, p. 227-234, 1995.
- GANDOLPHI G.; BITTENCOURT JR, N. S. Sistema reprodutivo do Ipê-Branco-*Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 24, p. 840-851, 2010.
- GENTRY, A. H. Bignoniaceae: Part I (Crescentieae and Tourrettieae). **Flora Neotropica**, v. 25, p. 1-130, 1980.
- GERRITS, P. O.; SMID, L. A new, less toxic polymerisation system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v. 132, p. 81-85, 1983.
- GHATAK, J. A contribution to the life-history of *Oroxylum indicum* Vent. **Proceedings of the Indian Academical Science**, v. 43, p. 72-87, 1956.
- GOVINDU, H. C. Studies in the embryology of some members of Bignoniaceae. **Proceedings of the Indian Academy of Science B**, v. 32, p. 164-178, 1950.
- GURGEL, E. S. C; SANTOS, J. U. M.; CARVALHO, A. C. M.; BASTOS, M. de N. do C. *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don. subsp. *spectabilis* (Mart. ex A. DC) Gentry (Bignoniaceae): aspectos morfológicos do fruto, semente, germinação e plântula. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 1, n. 2, p. 113-120, 2006.

- HYAKUTAKE, S.; GROTTA, A. S. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld. var. *petiolata* Bur. Bignoniaceae. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica de São Paulo**, v. 3, p. 51-78, 1965.
- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B; SRIVASTAVA, P. S. **Comparative Embryology of Angiosperms**, Springer-Verlag, Berlin, 1992.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHU, M. J. **Sistemática vegetal um enfoque filogenético**. 3°. ed. Artmed, 2009.
- KAPIL, R.N.; TIWARI, S.C. The integumentary tapetum. **The Botanical Review**, v. 44, p. 457-490, 1978.
- LOHMANN, L. G. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, p. 304-318, 2006.
- LOHMANN, L. G; TAYLOR, C. M. A new generic classification of tribe Bignonieae (Bignoniaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 99, p. 348-489, 2014.
- MAURITZON, J. Etwas uber die embryologie der Bignoniaceen. **Botaniska Notiser**, p. 60-77, 1935.
- MEHRA, K. R.; KULKARNI, A. R. Embryological studies in Bignoniaceae. **Phytomorphology**, v. 35, p. 239-251, 1985.
- MEDEIROS, M. C. M. P. de; LOHMANN, L. G. Two new species of *Tynanthus* Miers (Bignoniaceae, Bignoniaceae) from Brazil. **PhytoKeys**, v. 42, p. 77-85, 2014.
- MEDEIROS, M. C. M. P. de; LOHMANN, L. G. Phylogeny and biogeography of *Tynanthus* Miers (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 85, p. 32-40 (2015).
- MC DOWELL, E. M.; TRUMP, B. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414, 1976.
- OLMSTEAD, R. G.; ZHURA, M. L.; LOHMANN, L. G.; GROSE, S. O. ; ECKERT, A. J. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 1731-1743, 2009.

- PANIZZA, S. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Jacaranda caroba* (Velloso) DC. Bignoniaceae. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica de São Paulo**, v. 5, p. 93-106, 1967.
- RENÓ, L. R.; MOSCHETA, I. S.; BRACCINI A. de L. Morfo-anatomia do fruto e semente de amarelinho (*Tecoma stans* (L.) Kunth - Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 18-30, 2007.
- SAMPAIO, D. S.; COSTA M. E.; PAOLI A. A. S. Ontogenia da semente de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 289-302, 2007.
- SAMPAIO, D. S.; BITTENCOURT JR, N. S.; OLIVEIRA, P. E. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma species* (Bignoniaceae) from central Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 173, p. 77-91, 2013.
- SHIVARAMIAH, G. Endosperm development in Bignoniaceae. **Phytomorphology**, v. 48, p. 45-50, 1998.
- SOUZA, L. A.; IWAZAKI, M. C.; MOSCHETA, I. Morphology of the pericarp and seed of *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. (Bignoniaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 407-418, 2005.
- SOUZA, L. A de; OLIVEIRA OYAMA, S. de; MUNERATTO J. C. Morphology and anatomy of the developing fruit of *Macfadyena unguis-cati* (L.) A. H. Gentry, Bignoniaceae. **Acta Botânica Venezuelica**, v. 31, p. 1-13, 2008.
- SWAMY, B. G. L. Contributions to the life history of *Bignonia megapota mica*. **Journal of the Indian Botanical Society**, v. 20, p. 299-305, 1941.
- OLMSTEAD, R. G.; ZJHRA, M. L.; LOHMANN, L. G.; GROSE, S. O.; ECKERT, A. J. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 1731-1743, 2009.
- VON TEICHMAN, I, F. L. S.; VAN WYK, A, E. F. L. S. Trends in the evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachychalazy and recalcitrance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 105, p. 211-237, 1991.

## Considerações Finais

Alguns caracteres observados para as espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus* no presente estudo são inéditos para Bignoniaceae, como a elevação dos primórdios de óvulos através de divisões celulares nas zonas II e III da placenta e tecido transmissor pouco proeminente, os quais podem constituir sinapomorfias da tribo Bignonieae. A presença de cristas placentíferas pouco salientes e a presença de um prolongamento do tegumento na região micropilar dos óvulos de *Cuspidaria* e *Fridericia platyphylla* também são inéditos para a família e devem estar mais amplamente distribuídos no clado *Arrabidaeae and allies* (sensu Lohmann, 2006), embora não tenham sido verificados para *T. micranthus*. Esta constatação pode representar uma reversão do caractere no gênero *Tynanthus* ou apontar para inconsistências na filogenia que coloca *Cuspidaria* como grupo irmão de *Tynanthus*. Os dados sobre a morfologia da placenta e ontogenia do óvulo que mostraram semelhanças entre as espécies de *Cuspidaria* e *F. platyphylla* são úteis para separar as espécies de *Cuspidaria* e *Tynanthus*, mas não podem ser utilizados para corroborar a nova circunscrição de *C. sceptrum* (= *Arrabidaea brachypoda*).

Diferentemente dos resultados relativos à morfologia das placentas e ontogenia do óvulo, a megasporogênese e megagametogênese de *C. convoluta*, *C. sceptrum* e *T. micranthus* corroboram o já observado para as demais espécies de Bignoniaceae. O que indica uma grande conservação destes caracteres embriológicos na família, os quais são os responsáveis pela reprodução sexuada de suas espécies a partir de um saco embrionário do tipo *Polygonum*.

O número de células do haustório calazal do endosperma parece ser um caráter capaz de separar os grandes clados de Bignoniaceae. Dessa forma, sugerimos que utilizar uma classificação que considere uma, duas ou quatro células do endosperma separadamente seja mais interessante para interpretações da evolução desta estrutura na família do que a classificação adotada por Mauritzon (1935), na qual o haustório calazal de duas a quatro células é classificado no tipo *Catalpa*, e os haustórios de uma célula no tipo *Incarvillea*, uma vez que estes tipos não correspondem ao encontrado dentro dos clados. Os haustórios de quatro células estão presentes nas tribos mais basais, Jacarandae e Tecomeae, além deste estado de caráter ter sido mantido nas Bignonieae, enquanto os haustórios de duas células parecem ter evoluído no grande clado *Crescentiina*. Os haustórios de uma só célula apareceram algumas vezes em espécies do *Paleotropical Clade* (membro de *Crescentiina*), mas também estão presentes no gênero *Incarvillea* (inserido na tribo Tecomeae), o qual possui uma série de características únicas, como o porte herbáceo e o número cromossômico

diploide muito reduzido em comparação com as demais Bignoniaceae (Goldblat & Gentry, 1979; Gentry 1980).

A presença de um endosperma diferenciado tardiamente na semente madura é compartilhada pelas espécies de Bignoniaceae (Mehra & Kulkarni, 1985; Costa, 1995). Entretanto, concordamos com Sampaio e colaboradores (2007) que sugerem manter a semente sendo classificada como exalbuminosa, uma vez que a principal fonte de nutrientes durante a germinação da semente está contida nos cotilédones. A constituição do envoltório membranáceo de endotélio e endosperma diferenciado tardiamente foi confirmada no presente estudo e parece ser comum para as espécies da família. A morfologia do hilo das sementes maduras parece ser uma característica importante na caracterização de gêneros como *Cuspidaria* e *Tynanthus*, sendo arredondadas no primeiro e lineares no segundo. Entretanto, foram observadas algumas exceções que podem impedir que este caráter seja utilizado em taxonomia, de forma que novos estudos que utilizem exemplares com determinação realizada por especialistas e que possuam maiores detalhamentos na filogenia dos grupos possam sanar este problema.

O presente trabalho demonstrou uma série de características comuns para as Bignoniaceae, bem como caracteres que possuem um potencial uso em estudos de taxonomia e sistemática, os quais evidenciam que estudos ontogenéticos de anatomia e morfologia do óvulo e da semente na família merecem maior investimento. Estes caracteres foram morfologia da placenta, número de séries de óvulos por placenta, origem dos primórdios de óvulos, presença de prolongamento do tegumento na região micropilar dos óvulos, número de células do haustório calazal do endosperma e morfologia do hilo em sementes maduras. Podemos estabelecer claramente caracteres que separam os gêneros *Cuspidaria* e *Tynanthus* como proposto inicialmente e encontramos estados de caráter que parecem ser característicos do clado *Arrabidaeae and allies* (*sensu* Lohmann, 2006), bem como da tribo Bignonieae, os quais merecem ser melhor investigados. Entretanto, não foram encontrados estados de caráter que justificassem a circunscrição de *C. sceptrum* e *F. platyphylla* em gêneros distintos.

## Referências Bibliográficas

- COSTA, M. E. **Morfo-anatomia da semente e da plântula de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Bignoniaceae).** 1995. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- GENTRY, A. H. Bignoniaceae: Part I (Crescentieae and Tourrettieae). **Flora Neotropica**, v. 25, p. 1-130, 1980.
- GOLDBLAT, P.; GENTRY, A. H. Cytology of Bignoniaceae. **Bot. Not.**, v. 132, p. 475-482, 1979.
- LOHMANN, L. G. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae: Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, p. 304-318, 2006.
- MAURITZON, J. Etwas über die embryologie der Bignoniaceen. **Botaniska Notiser**, p. 60-77, 1935.
- MEHRA, K. R.; KULKARNI, A. R. Embryological studies in Bignoniaceae. **Phytomorphology**, v. 35, p. 239-251, 1985.
- SAMPAIO D. S.; COSTA M. E.; PAOLI A. A. S. Ontogenia da semente de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 289-302, 2007.