



LUCIANA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DA ANTERA E DO
GRÃO DE PÓLEN EM ESPÉCIES DE
Erythroxylum P. BROWNE
(ERYTHROXYLACEAE)**

LAVRAS – MG

2013

LUCIANA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DA ANTERA E DO GRÃO DE PÓLEN EM
ESPÉCIES DE *Erythroxylum* P. BROWNE (ERYTHROXYLACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Estrutura e Funcionamento das Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Adriana Tiemi Nakamura

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silva, Luciana da.

Desenvolvimento da antera e do grão de pólen em espécies de
Erythroxylum P. Browne (Erythroxylaceae) / Luciana da Silva. –
Lavras : UFLA, 2013.

57 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Adriana Tiemi Nakamura.

Bibliografia.

1. Microgametogênese. 2. Microsporogênese. 3. Estames. 4.
Heterostilia. 5. Malpighiales. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 583.2140438

LUCIANA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DA ANTERA E DO GRÃO DE PÓLEN EM
ESPÉCIES DE *Erythroxylum* P. BROWNE (ERYTHROXYLACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Estrutura e Funcionamento das Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 09 outubro 2013.

Dra. Simone de Pádua Teixeira

USP

Dra. Mariana Esteves Mansanares

UFLA

Dra. Adriana Tiemi Nakamura
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

Ao Raul

Razão da minha alegria e do meu viver!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me iluminar em todos os momentos de minha vida e por nunca deixar que eu desista de meus objetivos.

À Sociedade Brasileira, por me proporcionar a oportunidade de conclusão deste trabalho em uma universidade pública de ensino.

À Profa. Dra. Adriana Tiemi Nakamura, pela orientação e confiança, pelo sorriso, paciência, compreensão, dedicação e, principalmente, pela amizade durante todo este período.

À Universidade Federal de Lavras, em especial Pro - Reitorias de Pós-Graduação e de Pesquisa, e Biblioteca Universitária.

À FAPEMIG pelo financiamento deste projeto de pesquisa (processo nº. CRA APQ 04619-10) e pela bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Edson Simão pelas coletas e conselhos.

Às Profas. Dra. Flávia de Freitas Coelho e Dra. Mariana Esteves Mansanares, pela avaliação e contribuição a este trabalho durante o período de qualificação.

A todos os professores e funcionários vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada.

Aos bolsistas e estagiários, especialmente, Afonso, Carol, Ígor e Fabiana, que me acompanharam no laboratório, sempre alegres e com muita disposição.

Aos companheiros de mestrado e doutorado do programa, que, no decorrer desta caminhada, contribuíram muito para o meu crescimento.

À minha família, minha sustentação. Agradeço pelo amor de vocês.

Ao meu amor, Anderson Selvati, que esteve ao meu lado em todos os momentos e, com muito carinho, sempre me incentivou e apoiou.

Minha gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional. Sou-lhes eternamente grata.

RESUMO

Malpighiales apresenta sua monofilia caracterizada por dados moleculares, no entanto, as relações filogenéticas dentro da ordem são problemáticas, em função do grande número de famílias que abrange. Erythroxylaceae, uma das 39 famílias de Malpighiales, apresenta quatro gêneros, dentre eles, *Erythroxylum* P. Browne, o único que ocorre no Brasil. O gênero é um dos mais comuns dos cerrados brasileiros e apresenta uma característica peculiar, flores heterostílicas, com dois tipos morfológicos, brevistiladas e longistiladas. Esse estudo foi realizado com o objetivo de descrever o desenvolvimento da antera e grão de pólen das flores brevistiladas e longistiladas em *Erythroxylum campestre*, *E. cuneifolium* e *E. suberosum*, espécies nativas, mas que ocorrem em habitats distintos do cerrado de Minas Gerais. Esses dados visam a auxiliar na compreensão de aspectos ecológicos e reprodutivos, além de fornecer dados para futuros estudos filogenéticos dentro da família e da ordem Malpighiales. Os resultados demonstram que o androceu dos dois morfos florais e das três espécies é composto por dez estames distribuídos em dois verticilos (antessépalos e antepétalos), com filetes conatos na base. O desenvolvimento da parede da antera é do tipo dicotiledôneo. O botão floral das três espécies apresenta cinco camadas parietais: epiderme, endotécio, duas camadas médias e tapete. A epiderme é unisseriada, com conteúdo fenólico, o endotécio apresenta espessamento secundário do tipo “baseplate”, os dois estratos de camada média são efêmeros e o tapete é secretor. A microsporogênese é simultânea e forma tétrades tetraédricas. Os grãos de pólen são bi e tricululares nas flores longistiladas, bicelulares nas flores brevistiladas e em ambos os morfos são tricolporados e dispersos em mônades. Os grãos de pólen são ortodoxos e apresentam pollenkitt aderidos a sua superfície, em ambos os morfos. As flores longistiladas apresentam o pólen bem formado, com amido e lipídeos, já o pólen das flores brevistiladas apresenta grande incidência de má formação, verificada pelo formato irregular, e ausência de amido. Outra característica quanto aos grãos de pólen, é a ocorrência de pólenes de tamanho menor em flores longistiladas. O desenvolvimento da antera e dos grãos de pólen das espécies de *Erythroxylum* evidenciou caracteres importantes para a taxonomia e, também, para a ecologia de Erythroxylaceae.

Palavras-chave: Microsporogênese. Microgametogênese. Estames. Heterostilia. Malpighiales.

ABSTRACT

Malpighiales presents its morphology characterized by molecular data. However, the phylogenetic relations inside the order are problematic due to the large number of families it encompasses. Erythroxylaceae, one of the 39 Malpighiales families presents four genus, among them are *Erythroxylum* P. Browne, the only one occurring in Brazil. This genus is one of the most common in the Brazilian cerrado and presents a peculiar characteristic, heterostylous flower with two morphological types, pin and thrum. The objective of this study was describing the development of the anther and pollen grain of pin and thrum flowers in *Erythroxylum campestre*, *E. cuneifolium* and *E. suberosum*, native species which occur in distinct habitats in the cerrado in Minas Gerais, Brazil. These data aim at aiding in understanding ecological and reproductive aspects, as well as provide data for future phylogenetic studies inside the family and the Malpighiales order. The results demonstrated that the androecium of the two morpho-flowers and the three species is comprised of ten stamens distributed in two whorls, with stamens are connate basally at the base. The development of the anther wall is of the dicotyledonous type. The floral bud of the three species present five parietal layers: epidermis, endothelium, two medium layers and the tapetum. The epidermis is uniserial, with phenolic content, the endothecium presents secondary thickening of the baseplate type, the two medium layer strata are ephemeral and the tapetum is secretory. The microsporogenesis is simultaneous and form tetrahedral tetrads. The pollen grains as bi and tri-cellular in the thrum flowers, and bi-cellular in the pin flowers, and tricolporate and dispersed in monads. The pollen grains are orthodox and present pollenkit adhered to its surface in both morphos. The thrum flowers present well-formed pollen with starch and lipids, while the pin flowers present a large incidence of mal-formation verified by the irregular form and absence of starch. Another characteristic regarding pollen grain is the occurrence of smaller pollen grains in thrum flowers. The development of the anther and pollen grains of the *Erythroxylum* revealed important characters for the Erythroxylaceae taxonomy and ecology.

Keywords: Microsporogenesis. Microgametogenesis. Stamens. Heterostyly. Malpighiales.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ramos férteis mostrando morfologia das três espécies de <i>Erythroxylum</i> estudadas	34
Figura 2	Morfologia da flor de <i>Erythroxylum campestre</i>	35
Figura 3	Secção transversal do botão de <i>Erythroxylum</i> evidenciando os dez estames (A-C).....	36
Figura 4	Desenvolvimento da parede da antera em <i>Erythroxylum</i> . Secções longitudinais (A, B) e secções transversais (C, D, E, F).....	37
Figura 5	Microsporogênese e Microgametogênese em <i>Erythroxylum</i> . Secções transversais (B, C, D, F, G) e longitudinais (A, E) de anteras	38
Figura 6	Grãos de pólen de <i>E. campestre</i> (A-E), <i>E. cuneifolium</i> (F-I) e <i>E. suberosum</i> (J-N)	39
Figura 7	Diferenças anatômicas entre os morfos de <i>Erythroxylum</i>	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Filogenia da ordem Malpighiales, com ênfase em Erythroxyloaceae	13
2.2	Heterostilia	15
2.3	Desenvolvimento da antera e do grão de pólen	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Espécies estudadas e locais de coleta.....	25
3.2	Exame anatômico: desenvolvimento da antera, microsporogênese e microgametogênese	26
3.3	Maceração da parede da antera.....	27
3.4	Grão de pólen: forma e presença de “pollenkitt”.....	27
3.5	Terminologia para grão de pólen.....	28
4	RESULTADOS	29
4.1	Morfologia das flores.....	29
4.2	Parede da antera	29
4.3	Microsporogênese e Microgametogênese.....	31
4.4	Grão de pólen	32
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Malpighiales é constituída por 39 famílias, 716 gêneros e cerca de 16000 espécies sendo sua monofilia caracterizada por dados moleculares (STEVENS, 2013). As relações filogenéticas dentro da ordem são problemáticas, mas têm sido parcialmente esclarecidas por Chase et al. (2002), Davis e Chase (2004), Davis et al. (2005), Soltis et al. (2011), Tokuoka (2007, 2008) e Tokuoka e Tobe (2006). Em decorrência do grande número de famílias que Malpighiales abrange, mais estudos, ainda, são necessários, a fim de elucidar a complexa relação entre elas, inclusive Erythroxylaceae.

Erythroxylaceae apresenta cerca de 240 espécies distribuídas em quatro gêneros: *Erythroxylum* P. Browne, gênero encontrado nos quatro continentes, principalmente, na América tropical; *Aneulophus* Benth., *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* Exell & Mendonça, gêneros, exclusivamente, africanos e que contam com poucos representantes (DALY, 2004).

Erythroxylum é um dos gêneros mais comuns nos cerrados brasileiros (SOUZA; LORENZI, 2012) e suas espécies possuem, além da importância ecológica, aplicações farmacológicas e na medicina popular (LOIOLA et al., 2007). Dentre as espécies do gênero, a mais conhecida é *Erythroxylum coca* Lam., pois é dela que se extrai a cocaína.

O gênero apresenta espécies arbóreas, arbustivas ou subarbustivas, com folhas e ramos alternos ou opostos. As folhas são glabras, inteiras, membranáceas, cartáceas ou coriáceas e possuem estípulas interpeciolares, persistentes ou caducas, de tamanho e consistência variável (AMARAL JÚNIOR, 1980). As flores são monóclinas, diclamídeas, pentâmeras e heterostílicas, com dez estames de filetes unidos na base, formando um tubo que circunda o pistilo. O ovário é súpero, tricarpelar, trilobular, mas geralmente com

apenas um óvulo diferenciado. O fruto é drupoide, apresentando coloração que varia do vermelho à púrpura (NAKAMURA, 2003).

Estudos de anatomia de órgãos reprodutivos, principalmente de análise floral e embriologia, são ferramentas valiosas que podem auxiliar na delimitação taxonômica e na posição sistemática dos grupos vegetais, além de permitir a compreensão de processos filogenéticos, evolutivos, ontogenéticos e ecológicos, conforme já observado por Carvalho, Nakamura e Sajo (2009), Furness (2011, 2012), Remizowa et al. (2011), Rudall e Bateman (2002), Rudall e Conran (2012) e Sajo, Furness e Rudall (2009), entre outros.

Características do desenvolvimento da antera e dos grãos de pólen de *Erythroxylum* são descritos por Narayana (1960, 1964) e Rao (1968). A antera apresenta epiderme, endotécio fibroso, duas a três camadas médias e tapete secretor. O desenvolvimento da antera é do tipo dicotiledôneo, em *E. havanense* Jacq. (VÁZQUEZ-SANTANA; DOMÍNGUEZ; MÁRQUEZ-GUZMÁN, 1996). A microsporogênese é simultânea e a tetrade de micrósporos formada é do tipo tetraédrico, sendo os grãos de pólen dispersos no estágio tricelular (RAO, 1968; NARAYANA, 1964). Essas características da microsporogênese e microgametogênese, embora pouco exploradas, podem ser constantes para a família, e podem ser consideradas importantes para a delimitação do táxon dentro de Malpighiales.

Uma característica interessante do gênero *Erythroxylum* é que seus representantes apresentam flores heterostílicas. Já em 1979a, Ganders verifica heterostilia em *Erythroxylum coca* e relata diferenças entre os morfos, principalmente no que diz respeito à quantidade e ao tamanho dos grãos de pólen produzidos. Estudos com *E. havanense* enfocam a esterilidade masculina em plantas brevistiladas, demonstrando que a espécie pode estar evoluindo para a dioiccia (ÁVILA-SAKAR; DOMINGUEZ, 2000; CUEVAS et al., 2005; DOMINGUEZ et al., 1997; ROSAS; DOMINGUEZ, 2009; ROSAS; PEREZ-

ALQUICIRA; DOMINGUEZ, 2005). Barros (1998) ao estudar os sistemas reprodutivos e a polinização em *Erythroxylum campestre* A. St.-Hil, *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil e *Erythroxylum tortuosum* Mart., conclui que o dimorfismo floral promove o fluxo de pólen, incrementa a polinização, além de atuar como uma barreira para a autofertilização.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho descrever o desenvolvimento da antera e do grão de pólen em *Erythroxylum campestre* A. St.-Hil, *Erythroxylum cuneifolium* (Mart.) O. E. Schulz e *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil, verificando a ocorrência de semelhanças e diferenças entre os morfotipos florais e entre as espécies, visando auxiliar na compreensão de aspectos ecológicos e reprodutivos, além de fornecer dados para futuros estudos filogenéticos dentro da família e da ordem Malpighiales.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Filogenia da ordem Malpighiales, com ênfase em Erythroxylaceae

A ordem Malpighiales é um clado fortemente sustentado como monofilético (DAVIS et al., 2005; WURDACK; DAVIS, 2009), com amplos estudos filogenéticos moleculares (CHASE et al., 1993; SAVOLAINEN et al., 2000a, 2000b; SOLTIS et al., 2000; WURDACK; DAVIS, 2009), e no entanto, suas relações interfamiliares e infrafamiliares não estão bem compreendidas, tornando-se um dos clados menos resolvido das angiospermas (FURNESS, 2011; WURDACK; DAVIS, 2009).

Malpighiales é composta por 39 famílias, as quais, anteriormente, eram distribuídas por Cronquist (1981) em 13 diferentes ordens. Segundo Wurdack e Davis (2009), a ordem, em sua atual circunscrição, foi identificada pela primeira vez por análises morfológicas e moleculares realizadas por Chase et al. (1993). O nome “Malpighiales” foi apropriado de Hutchinson (1926, 1959) e aplicado no primeiro estudo do grupo de filogenia das Angiospermas (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP - APG, 1998).

Há estudos de morfologia que visam a elucidar os problemas de relacionamento entre as famílias que compõem Malpighiales. Tokuoka e Tobe (1999), estudando representantes de Euphorbiaceae sugerem, a partir da análise de dados embriológicos, que a tribo Drypeteae deve ser elevada ao táxon de família: Putranjivaceae, a qual estaria próxima, filogeneticamente, de Erythroxylaceae e Rhizophoraceae. Tobe e Raven (2011), estudando a embriologia de Irvigiaceae, relatam que as comparações realizadas dentro da ordem demonstram que esta família não apresenta afinidades com as demais famílias do grupo. Os autores relatam, ainda, que 45% das famílias de

Malpighiales são pouco conhecidas e, portanto, há necessidade de uma investigação mais profunda para comparação das famílias dentro da ordem.

Com relação aos grupos mais estreitamente relacionados com Erythroxylaceae, estudos filogenéticos demonstram que Rhizophoraceae é grupo-irmão de Erythroxylaceae, sendo as duas aceitas como famílias distintas ou reunidas em apenas uma: Rhizophoraceae (APG, 2003). Em 2009, considerando as diferenças morfológicas das famílias, o grupo de estudos de filogenia das angiospermas (APG, 2009) reconhece ambas as famílias e, neste contexto, corrobora este estudo e, também, o de Souza e Lorenzi (2012), reconhecendo o clado Erythroxylaceae. Matthews e Endress (2011) e Wurdack e Davis (2009), ainda, incluem Ctenolophonaceae como grupo irmão de Erythroxylaceae e Rhizophoraceae. Soltis et al. (2005) ressaltam que somente alguns representantes de Rhizophoraceae vivem em manguezais e que o gênero africano *Aneulophus* (Erythroxylaceae) é morfológicamente semelhante a alguns representantes da primeira família, sendo considerado gênero intermediário entre as duas famílias (APG, 2009).

A estreita relação entre Erythroxylaceae e Rhizophoraceae foi sugerida por compartilharem um tipo muito específico de plastídeo que contém cristais de proteínas, presentes nos elementos de tubo crivado do floema (SETOGUCHI; KOSUGE; TOBE, 1999). Tokuoka e Tobe (1999) relatam o compartilhamento de características embriológicas, incluindo exotégmen fibroso em sementes maduras, formação de endotélio e tegumento interno multiplicativo e espesso.

Thiebaut e Hoffmann (2005) comparam a morfologia de coléteres de Erythroxylaceae e Rhizophoraceae e relatam que os mesmos diferem na posição, arranjo e tamanho, concluindo que não há correlação dos coléteres encontrados entre os representantes das duas famílias. Matthews e Endress (2011) afirmam que a estrutura floral das duas famílias sustenta os dados moleculares que as correlacionam. Entre as estruturas florais, descritas pelos autores, podemos citar:

tubo floral; sépalas valvares; estames anexos em dois verticilos diferentes; estames antepétalos mais longos que os estames antessépalos; protuberância no ovário no lado dorsal; óvulos crassinucelados; endotélio; camada distinta de idioblastos no mesofilo das sépalas. Em estudos anteriores ao advento da biologia molecular, inúmeros autores relacionavam parentesco entre Erythroxylaceae e Linaceae (NARAYANA, 1960, 1964; NARAYANA; RAO, 1978; RAO, 1965, 1968), embora hoje já se saiba que esses são clados distintos e distantes.

Diante das controvérsias aqui apresentadas sobre as relações filogenéticas dentro de Malpighiales, pesquisas adicionais ainda são necessárias para elucidar as relações entre seus representantes (APG, 2003, 2009; FURNESS, 2011; LOIOLA et al., 2007; SOUZA; LORENZI, 2012). Em estudo recente de caracterização estrutural das flores de Malpighiales, Endress, Davis e Mattews (2013) afirmam que há, relativamente, poucos trabalhos sobre desenvolvimento floral na ordem e, portanto, amplas comparações de desenvolvimento do androceu, ainda, não são possíveis, ratificando a importância desses estudos.

2.2 Heterostilia

Heterostilia é um tipo de polimorfismo floral, geneticamente controlado, em que as flores hermafroditas apresentam diferentes comprimentos de estiletes e filetes, podendo ser distílicas, com flores brevistiladas ou thrum (estiletes curtos e estames com filetes longos) e longistiladas ou pin (estiletes longos e estames com filetes curtos), ou tristílicas, que contêm, além desses dois morfos, flores medistiladas (estilete curto, filetes longos e médios; estilete médio, filetes longos e curtos; estilete longo, filetes médios e curtos) (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

As plantas com flores heterostílicas apresentam um sistema de autoincompatibilidade dialélica esporofítica que impede a fecundação intramorfos (GANDERS, 1979a).

Segundo Vuilleumier (1967), o termo heterostilia foi proposto por Hildebrand em 1867. Neste estudo, Hildebrand descreve o mecanismo de reprodução de plantas da mesma espécie que contêm flores com duas ou três diferentes razões entre comprimento de estilete e estigma. Ele, também, indica que plantas com flores de mesma morfologia não são compatíveis e afirma que a diferença no comprimento das partes florais é um mecanismo de polinização cruzada mediada por insetos.

Ainda no mesmo estudo, Vuilleumier relata que Darwin, em 1877, na publicação "*The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species*" adota a terminologia de Hildebrand, ratificando que o termo heterostilia deve ser limitado para casos em que um morfo floral é fértil somente quando fertilizada pelo grão de pólen produzido pelo outro morfo. Ademais, foi Darwin, em 1877, que introduz termos como cruzamento legítimo entre os morfos, cruzamento ilegítimo, flores pin e thrum. Darwin, já neste estudo, nota dimorfismos entre os morfos florais, além do comprimento estigma/estilete, tais como: tamanho e forma do pólen e superfície estigmática.

Estudos posteriores evidenciam o dimorfismo floral, além do tamanho do pólen, como na quantidade de grãos de pólen produzidos por cada morfo, na escultura da exina, na presença de amido no pólen, na coloração do pólen, nas papilas do estigma e na morfologia e tamanho da corola (GANDERS, 1979a).

A heterostilia é conhecida para 24 famílias de Angiospermas, sendo comumente encontrada em representantes de Rubiaceae (JUDD et al., 2009). Nesta família, são observados estudos de biologia floral, como os de Castro e Oliveira (2002) e Teixeira e Machado (2004). O número de estudos anatômicos que focam na comparação dos morfos florais é inferior, quando comparado aos

estudos de biologia floral. Dentre os poucos estudos anatômicos com espécies distílicas ou tristílicas e que comparam o desenvolvimento floral entre morfos, podemos destacar Dominguez et al. (1997), com Erythroxylaceae, Strange, Rudall e Prychid (2004), com Pontederiaceae e Souza et al. (2008), com Rubiaceae. Neste último, a comparação é focada, principalmente, na morfologia dos grãos de pólen.

Estudos específicos com *Erythroxylum* e que comparam a biologia floral ou morfoanatomia floral no gênero são escassos e teve início com os estudos de Ganders (1979b). Neste estudo, o autor analisa a heterostilia em *E. coca* e observa que as flores longistiladas produzem mais grãos de pólen que as flores brevistiladas, embora o pólen da brevistilada seja maior que o da longistilada. O autor relaciona, também, o mecanismo como uma forma de proteção à autofecundação.

Barros (1998), em seu estudo de biologia floral com espécies de *Erythroxylum*, cita a presença de flores distílicas para *E. campestre*, *E. suberosum* e *E. tortuosum*. A autora compara o diâmetro do grão de pólen das flores longistiladas e brevistiladas e conclui que *E. campestre* e *E. suberosum* apresentam diferenças significativas que podem estar relacionadas com o número de grãos de pólen produzidos (flores longistiladas com grãos de pólen menores e em maior número que as brevistiladas). Além disso, a autora ratifica a importância do dimorfismo floral das espécies de *Erythroxylum*, o qual funciona como um meio de promover o fluxo de pólen entre os dois tipos de flores incrementando a alogamia.

Há, também, trabalhos que analisam a evolução das plantas, relacionando as espécies distílicas de *Erythroxylum* à tendência de esterilidade masculina. A evolução para dioícia, com o surgimento de espécies com indivíduos de sexos separados, pode partir de plantas hermafroditas heterostílicas, quebrando o sistema de incompatibilidade (BARRET, 2002;

GIBBS, 1990). O trabalho de Dominguez et al. (1997) evidencia a tendência à esterilidade masculina em plantas brevistiladas de *Erythroxylum havanense*, demonstrando diferenças marcantes no desenvolvimento do androceu entre os morfos. Os autores relatam que a espécie apresenta um sistema parcialmente ginodioico, indicando condições para a evolução para a dioicia.

Conforme Cuevas et al. (2005), os morfos de *E. havanense* apresentam diferenças na fertilidade do pólen e mais alta esterilidade masculina associada às flores brevistiladas, sugerindo, assim, que a espécie está sujeita a um processo de especialização do gênero. Ávila-Sakar e Dominguez (2000) demonstram que os indivíduos de *E. havanense* com flores brevistiladas produzem um maior número de sementes e o desempenho vegetativo é superior aos indivíduos que desenvolvem as flores longistiladas, compensando, assim, sua perda da função masculina.

Os resultados encontrados por Rosas, Perez-Alquicira e Dominguez (2005), em estudos com a esterilidade masculina e a sincronia reprodutiva, também, indicam que a perda parcial da função masculina em indivíduos brevistilados de *E. havanense* é compensado por um aumento da função feminina. Embora esses dados sejam bastante significativos para uma espécie do gênero, para outra, *E. suberosum*, Del-Carlo e Buzato (2006) concluem, ao avaliar o nível de esterilidade masculina, que a distilia é estável na espécie.

Já em *Erythroxylum undulatum* Plowman Berry, Tobe e Gomez (1991) verificam apenas flores longistiladas, caracterizando a espécie como monomórfica. Os autores afirmam que a espécie é derivada de um ancestral distílico e apresenta formação de embrião apomítico. As sementes, cujos embriões são resultado dessa reprodução assexuada, segundo os mesmos autores, são responsáveis pela produção de cerca de 15% das sementes totais produzidas pela espécie.

2.3 Desenvolvimento da antera e do grão de pólen

A antera, estrutura responsável pela produção do grão de pólen (gametófito masculino), apresenta morfologia extremamente variável nos grupos vegetais e possui grande importância para estudos de evolução das Angiospermas (JUDD et al., 2009; SIMPSON, 2006), além de auxiliar na classificação de famílias e gêneros (ARCY, 1996). A antera pode conter dois ou mais lóculos, geralmente quatro (ENDREWSS, 1996). Em cada microsporângio, verifica-se a diferenciação de quatro camadas parietais, que protegem e nutrem o tecido meristemático o qual originará os micrósporos: epiderme, endotécio, camada média e tapete.

A epiderme é um tecido contínuo ao longo da antera, derivada de um conjunto de células que se dividem com a expansão do órgão. Podem estar presentes nesta camada estômatos e tricomas (ARCY, 1996). Na maturidade da antera, a epiderme é tipicamente fina, podendo ocorrer colapso, compressão, distensão ou ruptura de suas células (MARIATH; SANTOS; BITTENCOURT JÚNIOR, 2012).

A camada subepidérmica da antera é o endotécio, geralmente possui espessamentos de celulose ou lignina que são depositados durante o amadurecimento do órgão (MANNING, 1996). É caracterizado como estrato mecânico, participando da abertura da antera e exposição dos grãos de pólen (ESAU, 1977; KEIJZER, 1987). Alguns estudos relatam que o padrão de deposição da parede secundária, presente nesta camada, pode ser um importante caráter taxonômico (DETTKE; SANTOS, 2011; FRENCH, 1985; MANNING, 1996; MANNING; LINDER, 1990; TEBBIT, 1999).

A camada média, presente entre o endotécio e tapete, pode ser formada ou não durante o desenvolvimento da antera. Sua função, ainda, é desconhecida, seu número de estratos é variável e, geralmente, são camadas efêmeras, sendo

obliteradas ao final do desenvolvimento (MARIATH; SANTOS; BITTENCOURT JÚNIOR, 2012).

O tapete é um tecido em contato com o tecido esporogênico e é responsável pela nutrição dos micrósporos e dispersão dos grãos de pólen, podem ser: secretor e plasmodial e um tipo intermediário: invasivo (FURNESS, 2008; FURNESS; RUDALL, 1998).

O desenvolvimento do grão de pólen ocorre em cada microsporângio. Para que os grãos de pólen sejam diferenciados, são necessários dois processos: microsporogênese (formação dos micrósporos, por meiose dos microsporócitos ou célula mãe dos micrósporos) e microgametogênese (formação dos gametas masculinos). Durante a meiose, podem ocorrer dois tipos de citocinese: o sucessivo, onde ao final da meiose I forma-se uma parede celular entre os dois núcleos (díades) e o simultâneo, o qual não se forma parede até a formação dos quatro núcleos haploides, nesta fase, os micrósporos em tétrades estão envolvidos por uma parede de calose, logo após, ocorre a liberação das tétrades e conclusão do processo de formação dos micrósporos.

Os micrósporos passam pelo processo de microgametogênese. Este processo tem início com o aumento de volume do micrósporo, aparecimento de pequenos vacúolos que mais tarde se fundem e originam um único e grande vacúolo. A célula do micrósporo entra em mitose e origina duas células desiguais: a vegetativa e a generativa, esta última mais na periferia. A célula vegetativa ocupa a maior parte do microgametófito jovem e comprime a generativa contra a esporoderme. A célula generativa sofre um estrangulamento, assumindo, gradativamente, uma forma alongada e falciforme. Posteriormente, ocorre a segunda divisão mitótica do processo, para formação dos gametas masculinos, na célula generativa. Em 70% das angiospermas o grão de pólen é liberado na forma bicelular constituído pelas células vegetativa e generativa. No restante, o microgametófito é disperso na forma triclular, apresentando a célula

vegetativa e duas espermáticas, os microgametas (MARIATH; SANTOS; BITTENCOURT JÚNIOR, 2012).

Estudos sobre o desenvolvimento do grão de pólen e da antera têm sido realizados com o intuito de fornecer embasamento a hipóteses das recentes relações filogenéticas de Malpighiales. Furness (2012), em suas análises de pólen e tapete, realizadas em cinco famílias de Malpighiales, indica que características como o pólen disperso em mônade, a forma subsferoidal, a abertura tricolporada, a superfície perfurada ou reticulada e a exina com columela tectante ou semitectante, além da microsporogênese simultânea, tapete secretor e pólen bicelular, são provavelmente caracteres plesiomórficos para o clado “Clusioid”, um dos cladogramas apresentados por Wurdack e Davis (2009) para a ordem.

Furness (2011) compara a estrutura e desenvolvimento do pólen e tapete em Malpighiales, enfatizando que no clado “Parietal” observam-se sinapomorfias como o pólen com endoaberturas alongadas. A autora relata que Passifloraceae apresenta o pólen de maior tamanho dentro do clado “Parietal”, maior variedade das endoaberturas e tapete plasmodial, além de pólen colporado com mais de três aberturas e bicamada de intina. Esses dois últimos caracteres são encontrados, também, em Violaceae, sustentando uma relação de parentesco entre as duas famílias. Exceto no clado “Parietal”, o pólen é altamente diversificado dentro da ordem, podendo ser consequência de sua diversidade ecológica, como também da rápida radiação de Malpighiales durante o médio Cretáceo.

Ainda com relação ao desenvolvimento da antera em Malpighiales, a presença de caracteres como cristais estiloides no tapete, idioblastos com drusas no endotécio e microsporogênese simultânea e sucessiva, auxiliam na distinção de *Croton* e *Asterae* de outros gêneros de Euphorbiaceae, além de,

possivelmente, representar autapomorfias para a tribo Crotonae (DE-PAULA; SAJO, 2011).

Para outras ordens, os estudos que incluem a análise da antera e grão de pólen, também, trazem suas contribuições. Na família Mayacaceae, Carvalho, Nakamura e Sajo (2009) relatam pela primeira vez, a presença de anteras tetrasporangiadas em *Mayaca fluviatilis*, colocando um fim nas discussões acerca da presença de antera bisporangiada neste, que é um dos quatro representantes da família. Esta citação ratificou a presença de Mayacaceae na ordem Poales.

Em Poaceae, Sajo, Furness e Rudall (2009) relatam pela primeira vez a microsporogênese simultânea para a família, no gênero *Streptochaeta* o qual pertence à subfamília Anomochlooideae, considerada basal para a família. Esse relato sugere que esta característica é uma autapomorfia para o gênero, uma vez que em todas as demais Poaceae a microsporogênese é sucessiva. Este caráter, embora inusitado, não interfere na morfologia do pólen, muito semelhante ao das demais Poaceae.

Outra característica conflitante encontrada na espécie por Sajo, Furness e Rudall (2009) é quanto ao tipo de desenvolvimento da antera, reduzido. As autoras consideram duas hipóteses para a presença desta característica: ou se trata de uma homoplasia, uma vez que este caráter é observado em *Pharus* (subfamília Pharoideae, também considerada basal para a família) ou se trata de uma reversão. Sajo, Furness e Rudall (2009) relatam, ainda, que não há espessamento do endotécio em *Streptochaeta* e que este tecido se degenera nos estádios iniciais de desenvolvimento da antera. Essas características ímpares, observadas no desenvolvimento da parede da antera e na microsporogênese de *Streptochaeta*, podem evidenciar informações sobre a evolução do grupo e estar relacionadas, por exemplo, com o tipo de polinização, que, para grupos

ancestrais de gramíneas anemófilas, é concretizada por insetos, muito embora mais estudos, ainda, sejam necessários a este respeito.

Quanto a características do grão de pólen, como tipo de reserva, quantidade de água e presença de pollenkitt, estes são considerados importantes para o conhecimento da ecologia das espécies. Pacini, Guarnieri e Nepi (2006), em uma revisão sobre desenvolvimento, apresentação e dispersão do grão de pólen, relatam que há acúmulo de amido na sua fase de desenvolvimento e maturação. Esse composto é total ou parcialmente convertido em outros carboidratos, antes da abertura da antera, os quais podem modificar a pressão de turgor interna do microgametófito, permitindo ao pólen com estas características uma maior resistência em ambientes hostis.

Em relação ao teor de água no grão de pólen, Franchi et al. (2011) o correlaciona com estratégias ecológicas e fisiológicas e demonstram que o pólen responde de maneira diferente em relação à umidade relativa do ambiente, sendo afetada sua viabilidade de dispersão e manutenção. Esses autores classificam como ortodoxo o pólen que apresenta tolerância à dessecação, caracterizado por resistir no ambiente por um período maior, aguardando condições mais favoráveis para germinação, e recalcitrantes, os que são eliminados com teores de umidade relativamente altos, apresentando rápida germinação, pois o processo de reidratação pode ser desnecessário.

Já a presença de pollenkitt está relacionada ao tipo de dispersão do grão de pólen, sendo encontrado, principalmente, nas espécies com polinização zoofílica (PACINI; HESSE, 2005). Segundo esses autores, o pollenkitt pode exercer sua atividade, durante a apresentação do pólen, atuar na seleção de um polinizador específico, desempenhar sua função na dispersão ou quando o pólen disperso entrar em contato com o estigma.

O pollenkitt é uma mistura de material hidrofóbico, composto, principalmente, por lipídios saturados e insaturados, carotenoides, flavonoides,

proteínas e carboidratos. A ele são atribuídas até 20 funções distintas. Entre as diferentes funções do pollenkitt, podemos citar: facilitar a dispersão, proteger o pólen contra perda de água e raios UV, manter unidos os grãos, durante o transporte, atrair animais, tornar o pólen visível ou ocultá-lo aos olhos dos animais, evitar a predação por meio do cheiro, permitir aderência ao corpo do inseto e recompensa aos polinizadores (PACINI; HESSE, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécies estudadas e locais de coleta

Erythroxylum campestre A. St.-Hil. é um subarbusto, arbusto ou arvoreta, com folhas, às vezes caducas, cartáceas a coriáceas, em geral elípticas com estípulas maiores que os pecíolos. Apresenta fascículos com 6-12 flores, em geral na axila foliar, flores brevistiladas e longistiladas, com 7-9 mm de comprimento, exibindo pedicelo crasso, cálice verde com lobos triangulares, pétala que varia do branco ao creme, oblongo-elíptica e ovário obovoide. Floresce e frutifica o ano inteiro. Distribuição exclusivamente na América do Sul, ocorrendo na Guiana, Bolívia, Paraguai e Brasil. No Brasil foi registrado nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, sendo encontrada no domínio cerrado, cerradão, campo rupestre e transição cerrado/campo úmido (LOIOLA, 2001).

Erythroxylum cuneifolium (Mart.) O. E. Schulz é um arbusto ou subarbusto de até 6 m de altura com caule fino, apresenta folhas curto-pecioladas, elípticas ou subovadas, membranáceas e diáfanas quando jovens e cartáceas ou subcoreáceas quando adultas, tamanho variável, dependendo do hábitat e estípulas enérveas. Flores com pedicelo crasso, de 1,5-4,0 mm de comprimento, sépalas semiovadas e acuminadas, pétalas ovadas ou subovadas, brevistiladas e longistiladas. Floresce de agosto a fevereiro, frutificando de setembro a março. Apresenta ampla distribuição, tendo sua ocorrência relatada no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, Paraguai, Argentina e Bolívia. Habita floresta estacional semidecidual, cerrado, capões, capoeiras e matas ciliares (AMARAL JÚNIOR, 1980).

Erythroxylum suberosum A. St.-Hil é uma árvoreta de até 3 m de altura (OLIVEIRA-FILHO, 2006), com folhas pecioladas oblongo-obovadas, de base aguda e ápice arredondado, às vezes emarginado e dorso discolor. Flores pediceladas na axila foliar, geralmente em fascículos, com sépalas conatas na base e pétalas brancas, oblongas (FLORA BRASILIENSIS, 2013). Floresce de agosto a dezembro. Encontrado no cerrado, com ocorrência nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Alagoas, Pernambuco, Ceará, Maranhão, Amapá, Amazonas, Acre e, também, no Paraguai, Bolívia e Venezuela (MENDONÇA; CERVI; GUIMARÃES, 1998).

Foram coletados botões florais em diversas fases de desenvolvimento, flores em antese e flores pós-antese de ambos os morfos de *Erythroxylum campestre* e *Erythroxylum suberosum*, ocorrentes em áreas próximas do Parque Florestal Quedas do Rio Bonito, município de Lavras, região sul de Minas Gerais e somente longistiladas de *Erythroxylum cuneifolium*, ocorrentes no Parque Natural Municipal Victório Siquierolli, no município de Uberlândia, Minas Gerais. Materiais testemunhos foram depositados no Herbário ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras) apresentando os seguintes registros 27328, 27324 e 27326, respectivamente.

3.2 Exame anatômico: desenvolvimento da antera, microsporogênese e microgametogênese

Para avaliação do desenvolvimento da antera e a formação de esporos e gametas masculinos, botões florais em vários estádios, flores em antese e pós-antese foram fixados em solução de Karnovsky por 24 h, posteriormente lavados em tampão fosfato (KARNOVSKY, 1965), desidratados, gradativamente, em solução de etanol e conservados em etanol 70%.

Para confecção do laminário permanente, as amostras foram desidratadas em série etílica, infiltradas e incluídas em hidroxietil-metacrilato Leica®, seccionadas em micrótomo de deslize ou rotatório, coradas com azul de toluidina (O`BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e montadas em Permount®. Todo o laminário foi analisado em microscópio óptico, sendo os resultados descritos e comparados com os disponíveis na literatura levantada. Os resultados foram registrados com auxílio de microscópio trinocular acoplado ao capturador de imagens.

3.3 Maceração da parede da antera

Para visualização do espessamento da camada mecânica, endotécio, realizou-se maceração da antera segundo Franklin (1945 apud KRAUS; ARDUIN, 1997). Anteras fixadas em Karnovsky (1965) e conservadas em etanol 70% foram colocadas em solução de peróxido de hidrogênio e ácido acético, permanecendo na estufa por 48 h. Posteriormente, foram armazenadas no refrigerador por uma semana. As anteras foram lavadas em água destilada, pressionadas com auxílio de bastão, coradas em azul de toluidina (O`BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e montadas entre lâmina e lamínula, em gelatina glicerinada.

3.4 Grão de pólen: forma e presença de “pollenkitt”

Para caracterizar a forma do pólen, no momento de sua apresentação e detectar a presença de “pollenkitt”, grãos de pólen foram removidos de anteras deiscentes e submetidos, imediatamente após coleta, a testes em óleo de imersão, água, Lugol e Sudan III (PACINI; HESSE, 2005) e montados entre lâmina e

lamínula para observação em microscópio de luz, seguindo a metodologia descrita por Pacini, Guarnieri e Nepi (2006).

3.5 Terminologia para grão de pólen

A terminologia adotada para descrever a classificação do grão de pólen, quanto ao seu status hídrico, seguiu Pacini, Guarnieri e Nepi (2006), que denomina ortodoxo o grão de pólen com um conteúdo hídrico inferior a 30% e, recalcitrante, o grão de pólen com um conteúdo hídrico superior a 30%.

4 RESULTADOS

4.1 Morfologia das flores

As espécies *Erythroxylum campestre*, *E. cuneifolium* e *E. suberosum* (Figura 1) apresentam flores longistiladas e brevistiladas (Figura 2 A, B), as quais são pentâmeras, cíclicas, completas e possuem coloração variando de branca a levemente amarelada (Figura 1). Em secção transversal, exibem formato pentagonal (Figura 3 A, B, C).

As cinco sépalas e pétalas são livres entre si e entre os verticilos (Figura 3 A, B, C). O androceu é composto por dez estames (estames antessépalos e antepétalos) (Figura 3 A, B, C), cujos filetes são conatos somente pela base. As flores brevistiladas exibem todos os estames na mesma altura, já as longistiladas, apresentam os estames em dois níveis, sendo os antessépalos mais curtos que os antepétalos (Figura 2 A, B). O gineceu é tricarpelar, cujos carpelos são conatos apenas pela região do ovário (Figura 3 A, B). Apresenta um lóculo fértil e dois inférteis. O único carpelo fértil diferencia apenas um único óvulo.

4.2 Parede da antera

No desenvolvimento da antera das três espécies de *Erythroxylum* estudadas, a protoderme recobre o tecido meristemático. A diferenciação das camadas parietais da antera não difere entre as espécies nem entre os morfos florais.

O desenvolvimento da parede da antera é do tipo dicotiledôneo. Abaixo da protoderme, a camada parietal primária, divide-se periclinalmente originando as camadas parietais secundárias externa e interna. A camada parietal secundária externa divide-se, originando o endotécio, camada logo abaixo da protoderme, e

a camada média. Esta se divide novamente formando dois estratos de camadas médias. O extrato secundário interno diferencia diretamente em tapete. O tecido meristemático, subjacente à camada parietal secundária interna, origina o arqueosporio (Figura 4 A, B, C).

O botão floral das três espécies de *Erythroxylum* estudadas apresenta estame jovem com as anteras bitecas, tetrasporangiadas (Figura 4 C), com cinco camadas parietais já diferenciadas: epiderme, endotécio, duas camadas médias e tapete (Figura 4B).

No início do desenvolvimento, a epiderme, o endotécio, as camadas médias e o tapete pouco se diferenciam entre si (Figura 4 A). Numa fase um pouco mais avançada, mas ainda em botão jovem, observa-se epiderme unisseriada e composta por células de formato levemente convexo a papiloso, de tamanhos variados e com conteúdo fenólico (Figura 4 B, C). O endotécio é composto por células vacuoladas, alongadas tangencialmente e com núcleo evidente (Figura 4 B, C, D). Internamente ao endotécio, diferenciam-se dois estratos de camadas médias (Figura 4 B, C) cujas células apresentam paredes finas e formato alongado tangencialmente. O tapete é representado por uma camada de células de paredes delgadas, com formato variável, citoplasma denso ou por vezes hialino, com vacúolo diferenciado e um núcleo conspícuo e centralmente disposto na célula (Figura 4 B, C). Nas espécies estudadas, o tapete é secretor.

Conforme o botão se diferencia e a flor atinge a fase de pré-antese e antese, a epiderme mantém suas características, ocorre a diferenciação do endotécio, cujas células exibem formato variando de cuboide a levemente alongado radialmente e espessamento secundário. As células, também, desenvolvem um vacúolo central, que lhe confere o aspecto hialino (Figura 4 E). Nestas células, apenas um núcleo pode ser observado (Figura 4 E). O espessamento do endotécio é do tipo “baseplate”, apresenta uma placa na parede

periclinal interna, com projeções que se comunicam com a parede periclinal externa, a qual se mantém primária (Figura 4 E, F, G, H).

As camadas médias são obliteradas ao final do desenvolvimento da antera (Figura 4 E, F). O tapete, durante a fase final de tétrades, torna-se binucleado (Figura 5 D). Posteriormente, diminui o seu volume tornando-se alongado tangencialmente, a cuboide e permanece com citoplasma denso e binuclear, embora os núcleos reduzam o tamanho (Figura 4 D, 5 E, F). Posteriormente, quando o grão de pólen já está totalmente diferenciado, não é mais observado (Figura 4 F, 5 G).

Na antera madura, a epiderme é persistente (Figura 4 E, F, 5 F, G). Nesta fase, ocorre a ruptura dos tecidos entre os dois lóculos, que se unem (Figura 4 F). Na região do estômio, região de fragilidade da epiderme da antera (Figura 4 F), ocorre o rompimento das células epidérmicas, promovida pelo endotécio, provocando sua abertura em fenda longitudinal e consequente liberação dos grãos de pólen.

4.3 Microsporogênese e Microgametogênese

Em secção longitudinal da antera jovem, as células arqueporiais apresentam citoplasma denso e núcleo conspícuo (Figura 4 B, 5 A). Estas se dividem uma vez, por mitose, dando origem aos microsporócitos ou célula-mãe do micrósporo. A célula-mãe do micrósporo passa por meiose, formando uma dúode de micrósporos (Figura 5 B) e logo após, uma tétrade de micrósporos, sem formação de parede após cada divisão, caracterizando a microsporogênese simultânea (Figura 5 C). A tétrade de micrósporos formada é do tipo tetraédrico (Figura 5 C) e, ao final desta fase, ocorre a citocinese, com deposição de calose, separando os micrósporos (Figura 5 D, E). Nesta fase, já se inicia a deposição da

esporoderme (Figura 5 E). Posteriormente, a parede calósica é dissolvida, ocorrendo a liberação dos micrósporos.

A partir desse momento, ocorre o início da microgametogênese, quando a célula entra em mitose assimétrica, dando origem ao grão de pólen bicelular (Figura 5 F). Após a citocinese, originam-se duas células de tamanhos desiguais: a vegetativa e a generativa (Figura 5 F). A célula vegetativa tem um núcleo esférico central, ocupa a maior parte do volume do gametófito jovem, já a célula generativa, encontra-se na periferia da vegetativa. Posteriormente, a célula generativa migra para a região central, aproximando-se do núcleo da célula vegetativa. Verifica-se que a célula generativa apresenta o citoplasma denso e o núcleo evidente (Figura 5 F). A célula generativa pode, ainda, dividir-se dando origem a duas células espermáticas, originando grãos de pólen tricolulares (Figura 5 G).

Em todas as espécies estudadas foram observados, no lóculo da antera madura das flores longistiladas, grãos de pólen bi e tricolulares. Em *E. campestre* e *E. suberosum* observou-se a maior quantidade de grãos de pólen tri em relação aos bicelulares e em *E. cuneifolium* a incidência de pólen bicelulares foi maior. Na flor brevistilada (*E. campestre* e *E. suberosum*), notam-se apenas pólen bicelulares.

4.4 Grão de pólen

As espécies de *Erythroxylum* apresentam grãos de pólen que são liberados da antera madura em mônades (Figura 5 F, G). Exibem três aberturas, os cólporos (Figura 6 J). Essas características foram observadas nos grãos das flores longistiladas e brevistiladas.

Em óleo de imersão, os grãos de pólen exibem formato subesferoidal (Figura 6 B, G, K), sendo alongados no eixo polar. Quando observados em água,

os pólenes hidratam e mudam seu formato, tornando-se arredondados (Figura 6 A, F, J). A mudança de formato do pólen, quando na observação óleo/água, permite classificá-lo como harmomegático, parcialmente desidratado ou ortodoxo.

Quando submetidos ao teste histoquímico, o pólen dos dois morfos apresenta reação positiva ao reagente Sudan III, evidenciando o pollenkitt (Figura 6 C, H, L). Também ocorre a reação positiva ao Lugol, evidenciando que a reserva de carboidrato dos grãos de pólen é amiláceo, nas flores longistiladas (Figura 6 D, I, M). Nas flores brevistiladas, observam-se raros grãos de pólen com presença de amido e, na grande maioria, não se identifica o carboidrato (Figura 6 E, N).

Ainda com relação aos pólenes, agora comparando os morfos, as flores longistiladas apresentam uma grande quantidade de grãos de pólen bem formados, com formato circular, citoplasma denso (Figura 7 A, C). Quanto ao tamanho, observa-se que as flores longistiladas produzem pólen de tamanho visualmente menor, em *E.campestre* e *E. suberosum* (Figura 6 D, E, M, N).

Verifica-se alta ocorrência de grãos de pólen mal formados em flores brevistiladas de *E. campestre* e *E. suberosum* (Figura 7 B, D, F). Observa-se que um dos quatro microsporângios pode atrofiar-se e, por vezes, observa-se um dos lóculos da antera com tapete hipertrofiado tomando todo o espaço do saco polínico sendo, portanto, ausentes os grãos de pólen (Figura 7 E).

Uma observação interessante foi que em *E. cuneifolium*, nas flores longistiladas, ocorre maior incidência de má formação de grãos de pólen, quando comparada as outras duas espécies.



Figura 1 Ramos férteis mostrando morfologia das três espécies de *Erythroxylum* estudadas

Nota: A: *E. campestre*. B: *E. cuneifolium*. C: *E. suberosum*. Barra: 1 cm (A, C); 3 cm (B).

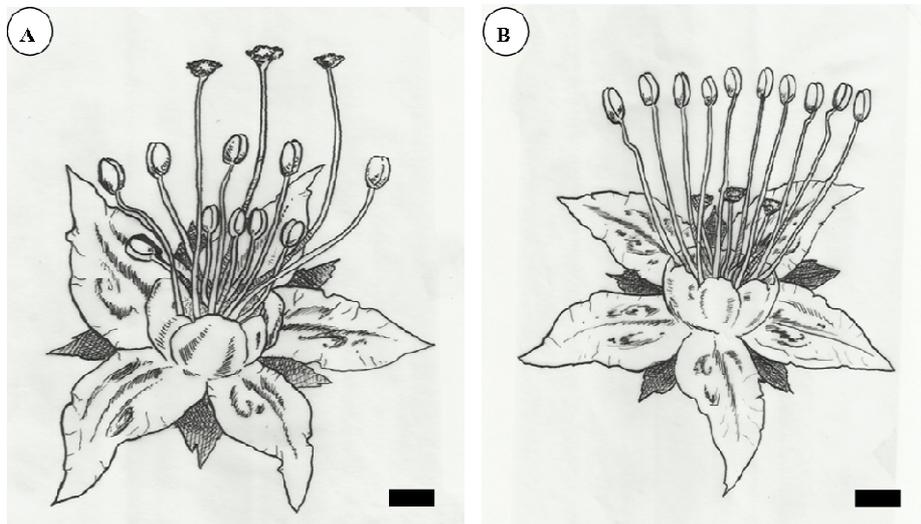


Figura 2 Morfologia da flor de *Erythroxylum campestre*

Nota: A: Flor longistilada com os estames em duas alturas. B: Flor brevistilada com todos os estames na mesma altura. Barra: 1 mm (A, B).

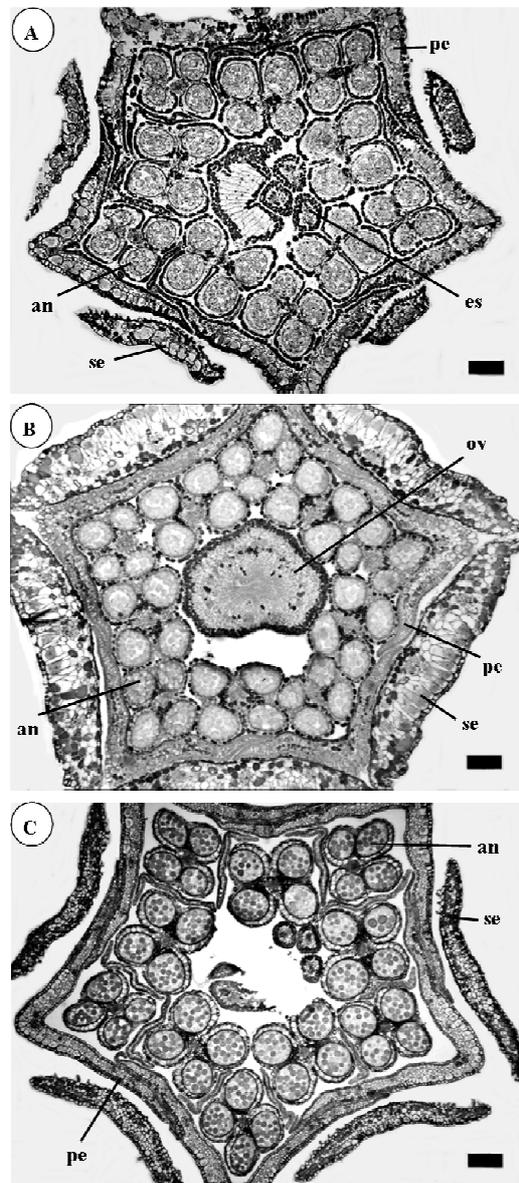


Figura 3 Secção transversal do botão de *Erythroxylum* evidenciando os dez estames (A-C)

Nota: A: *E. campestre*. B: *E. cuneifolium*. C: *E. suberosum*. (an: antera, es: estilete, ov: ovário, pe: pétala, se: sépala). Barra: 200 μm (A, B, C).

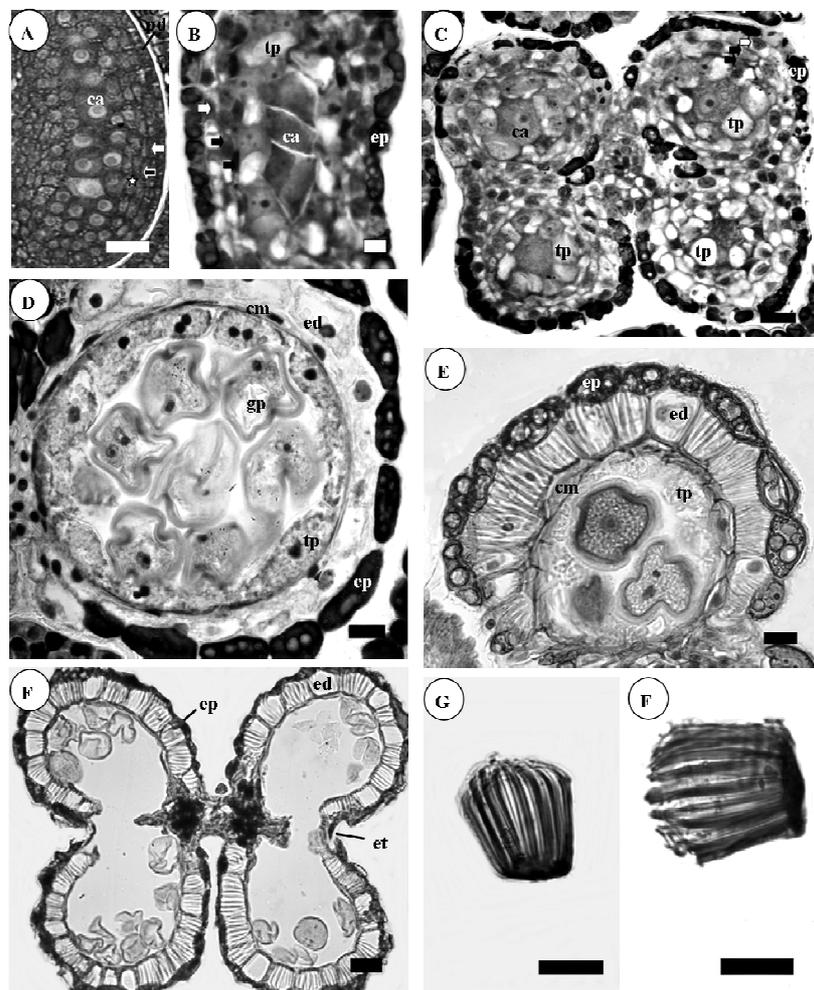


Figura 4 Desenvolvimento da parede da antera em *Erythroxylum*. Secções longitudinais (A, B) e secções transversais (C, D, E, F)

Nota: A: Estratificação da antera apresentando quatro camadas parietais em *E. suberosum*. B: Antera de *E. campestre* com cinco camadas parietais e células arquesporiais. C: Antera biteca, tetrasporangiada de *E. campestre*, com cinco camadas parietais e células arquesporiais. D: Detalhe do microsporângio de *E. campestre*; tapete secretor binucleado. E: Espessamento do endotécio em *E. campestre*. F: Fusão dos lóculos em *E. campestre*. Endotécio em *E. campestre* (G) e *E. suberosum* (H). (ca: célula arquesporial, cm: camada média, ed: endotécio, ep: epiderme, et: estômio, gp: grão de pólen, pd: protoderme, tp: tapete, estrela: tapete, seta branca: endotécio, seta preta: camada média). Barra: 10 μm (B), 20 μm (A, C, D, E, F, G, H).

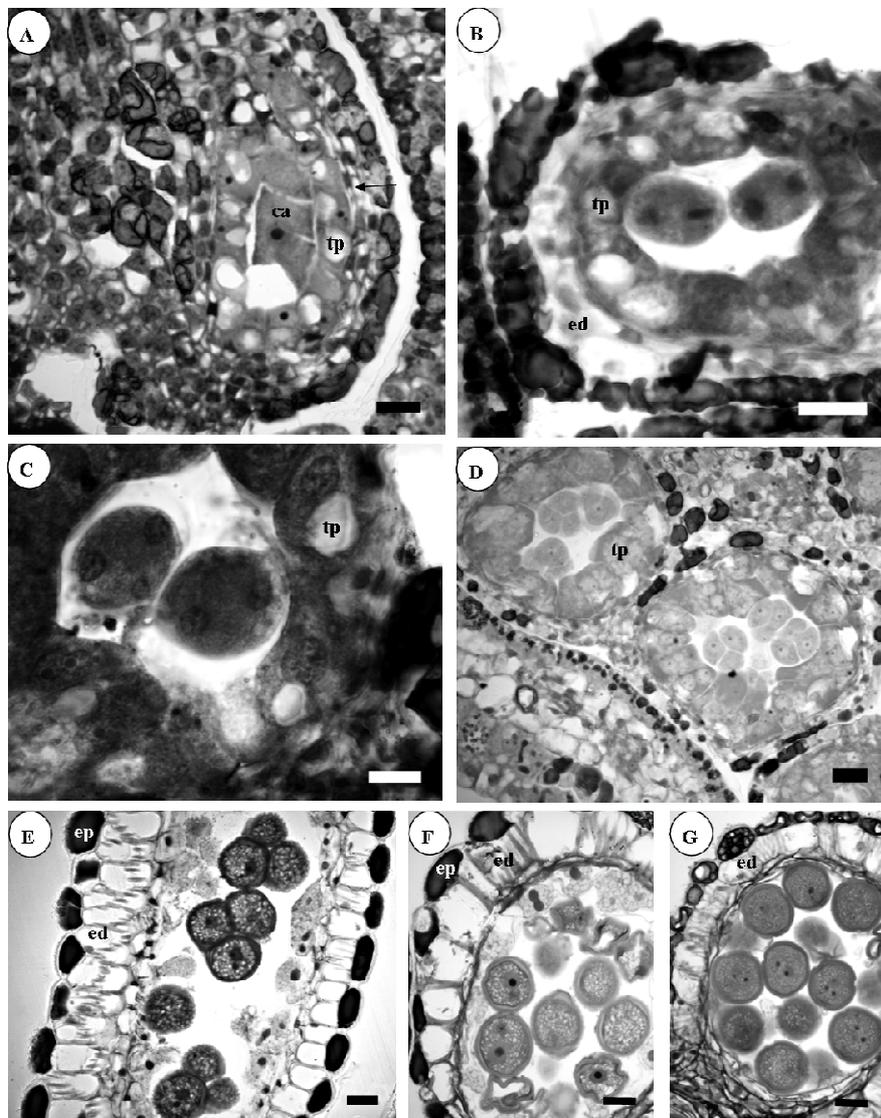


Figura 5 Microsporogênese e Microgametogênese em *Erythroxylum*. Secções transversais (B, C, D, F, G) e longitudinais (A, E) de anteras

Nota: A: Células arquesporiais em *E. campestre*. B: Célula em divisão meiótica de *E. campestre*. C: Tétrade de micrósporos do tipo tetraédrico em *E. suberosum*. D: Citocinese das tétrades e detalhe do tapete secretor binucleado em *E. cuneifolium*. E: Micrósporos em iminência de separação em *E. suberosum*. F: Grãos de pólen bicelulares em *E. cuneifolium*. G: Grão de pólen tricelular em *E. suberosum*. Barras: 20 μm (A, B, D e E); 10 μm (C, F e G).

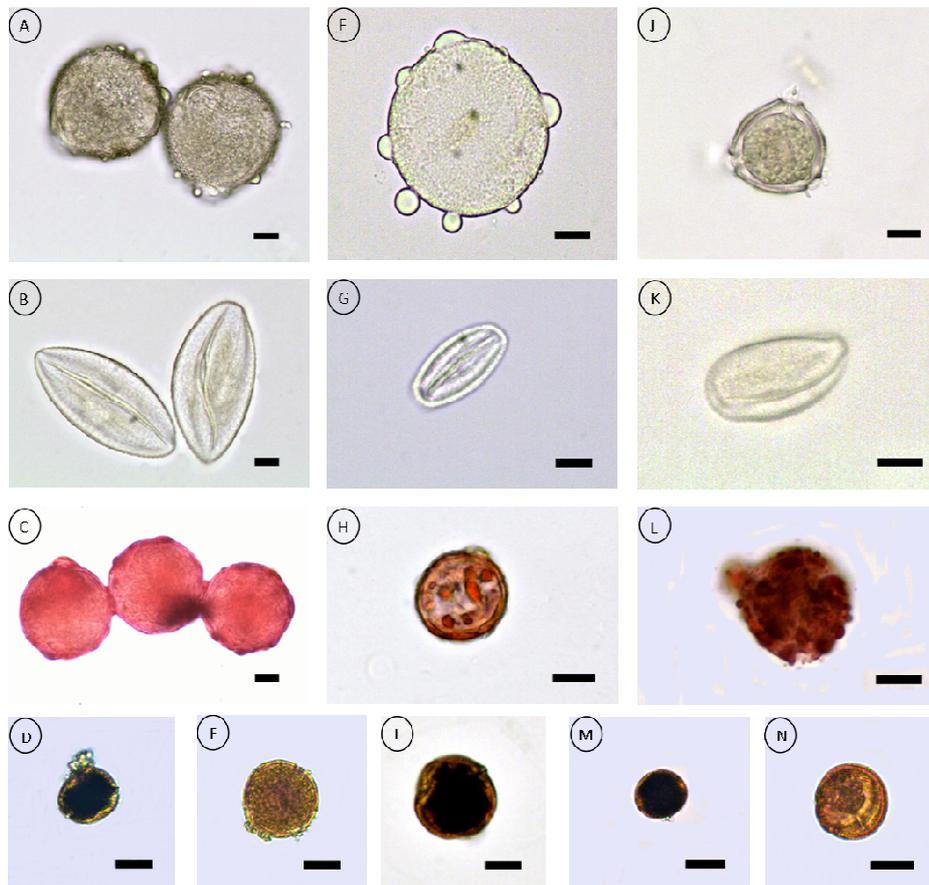


Figura 6 Grãos de pólen de *E. campestris* (A-E), *E. cuneifolium* (F-I) e *E. suberosum* (J-N)

Nota: A, F, J: meio aquoso. B, G, K: óleo de imersão. C, H, L: Sudan III. D, E, I, M, N: Lugol. D, I, M: Flor longistila. E, N: Flor brevistila. Barra: 10 µm (A, B, C, F, G, H, I, J, K, L); 20 µm (D, E, M, N).

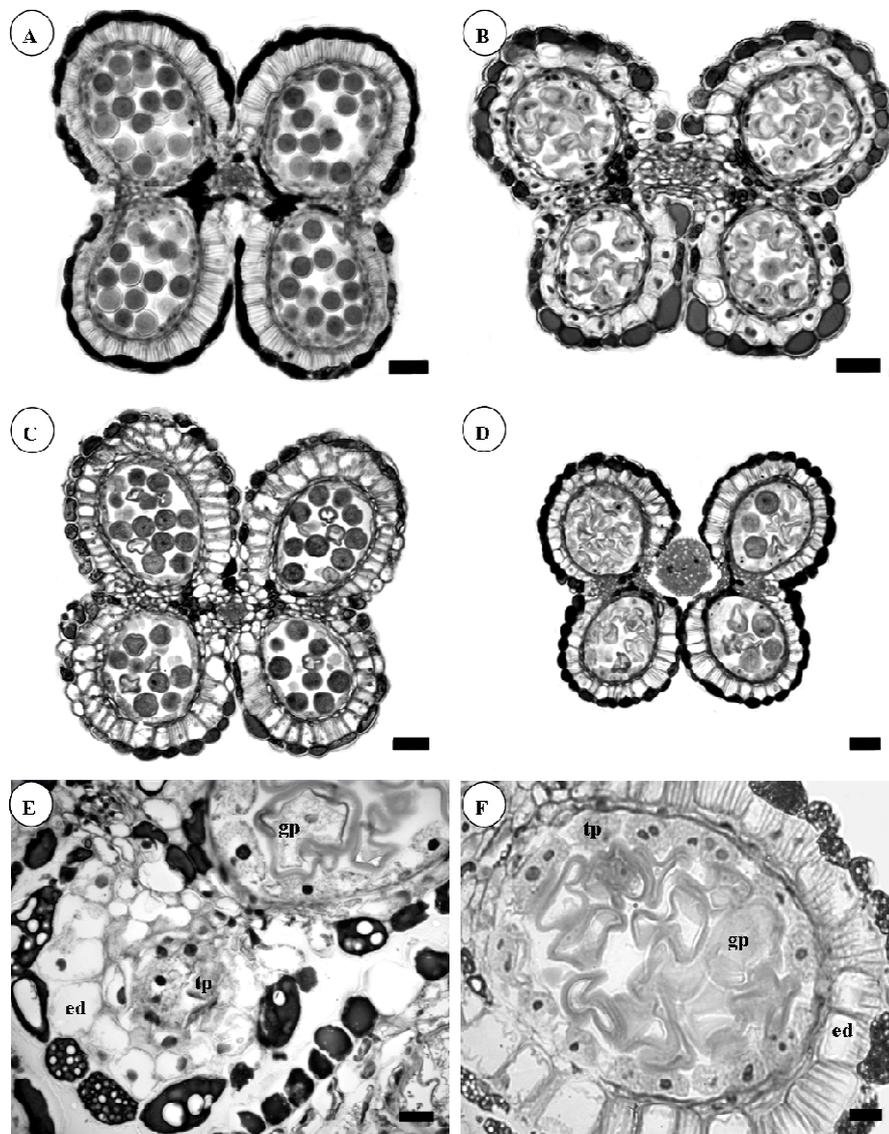


Figura 7 Diferenças anatômicas entre os morfos de *Erythroxylum*

Nota: A: Antera de *E. campestre* flor longistilada. B: Antera de *E. campestre* flor brevistilada. C: Antera de *E. suberosum* flor longistilada. D: Antera de *E. suberosum* flor brevistilada. E: Detalhe do microsporângio mal formado em *E. campestre*. F: Detalhe do microsporângio com grãos de pólen mal formados em *E. suberosum* (ed: endotécio, gp: grão de pólen, tp: tapete). Barra: 20 μm (E, F); 50 μm (A, B, C, D).

5 DISCUSSÃO

As espécies *Erythroxyllum campestre*, *E. cuneifolium* e *E. suberosum* apresentaram a parede da antera com cinco camadas parietais, formada pela epiderme, endotécio, duas camadas médias e tapete secretor, e exibiu o padrão de formação da parede do tipo dicotiledôneo, conforme já destacado por Vázquez-Santana, Domínguez e Márquez-Guzmán (1996) em *Erythroxyllum havanense*. Esta característica parece ser constante para as espécies do gênero e pode ser um caráter importante em nível genérico. Além disso, pode ser utilizado para ratificar separação das famílias Erythroxyllaceae e Rhizophoraceae, uma vez que Juncosa e Tobe (1988) relataram o desenvolvimento da parede do tipo básico e monocotiledôneo para uma tribo, Gynotrocheae, da segunda família.

O endotécio possui espessamento de parede característico, conforme demonstrado por Manning (1996) ao analisar 125 famílias de Angiospermas. O mesmo autor descreveu três tipos de espessamento do endotécio diante das variações observadas, “baseplate”, em formato de “U” e “helicoidal”.

Em determinadas famílias, o endotécio pode ser um caráter utilizado para auxiliar nos estudos sistemáticos e filogenéticos, por exibir espessamento padrão dentro das espécies. French (1985) relatou que a família Araceae exibe basicamente um tipo de endotécio, anular- helicoidal. Manning e Linder (1990) descreveram que, para Poaceae, o endotécio pode ser do tipo “baseplate” ou anelar e as hipóteses filogenéticas sugerem que o tipo “baseplate” seja a condição basal para a família. Tebbit (1999) afirmou que o endotécio apresenta um valor sistemático moderado na família Begoniaceae. Dettke e Santos (2011) descreveram a presença dos três tipos de endotécio na família Passifloraceae, em *Passiflora* “baseplate” e em formato de “U” e “helicoidal” em *Decaloba*. Os

autores afirmaram que esta característica pode ser útil como diagnóstica para os subgêneros e com grande potencial nas análises filogenéticas.

Manning (1996) registrou o endotécio em formato de “U” para a família Erythroxyloaceae, no entanto, o tipo “baseplate” foi compatível com as três espécies estudadas. O autor relatou que, em famílias com maior número de representantes, pode ocorrer o espessamento “baseplate” e, concomitantemente, pode ocorrer endotécio com espessamento em “U”, pelo menos em algumas espécies. Erythroxyloaceae pode ser considerada uma família pequena, comparando-se com Poaceae, Orchidaceae e Fabaceae, por exemplo, e, portanto, essa variação não era esperada. Cabe ressaltar que o autor não descreve qual foi a única espécie descrita em seu estudo, lembrando que Erythroxyloaceae apresenta quatro gêneros. Se o autor referiu-se a *Erythoxylum*, podemos inferir que este caráter seja relevante em nível infragenérico, talvez para subgêneros, conforme verificaram Dettke e Santos (2011) com o gênero *Decaloba*, Passifloraceae.

Outro caráter importante da antera, observado nas espécies estudadas, é o tapete secretor, também conhecido como glandular ou parietal (FURNESS; RUDALL, 2001). Para que ocorra a nutrição dos micrósporos e desenvolvimento dos grãos de pólen, a parede celular do tapete desintegra parcialmente durante a meiose, facilitando, assim, o transporte de substâncias, como também de esporopolenina sintetizada nesta camada, e que, também, é encontrada na membrana peritapetal, localizada na face externa tangencial do tapete (PACINI, 1997).

Furness (2012) relatou que a presença do tapete secretor, provavelmente, é uma característica plesiomórfica de Malpighiales. O tapete do tipo secretor é comum em eudicotiledôneas, degenerando num estágio relativamente tarde, durante a fase de micrósporo livre e desenvolvimento do grão de pólen (FURNESS; RUDALL, 2001). Para as espécies estudadas, observou-se a

degeneração tardia, no estágio em que os grãos de pólen já estão formados, nas flores em antese. Provavelmente, o tapete das espécies de *Erythroxyllum* estudadas atua na formação do pollenkit, depositado no final do desenvolvimento dos pólenes, o que explica a persistência do tapete nas anteras quase maduras.

Outra observação foi que o tapete persistente apresentou dois núcleos em suas células, característica comum para este tecido, segundo Rudall e Furness (1997). As autoras, também, relataram que o número de núcleos do tapete pode variar dependendo do estágio de desenvolvimento da antera. Wunderlich (1954) destacou que divisões nucleares podem ocorrer nas células do tapete. Pacini (1997) descreveu que as células multinucleadas do tapete secretor é resultado de mitoses com ausência de citocinese. É possível que o tapete binucleado das espécies estudadas seja observado em razão da cariocinese das células do tapete as quais iniciam o desenvolvimento uninucleadas e, na fase de tétrades de micrósporos, evidenciam aspecto binucleado, que permanece até os estádios finais do desenvolvimento do grão de pólen.

Quanto à microsporogênese, os resultados indicaram que em *Erythroxyllum* ocorre o tipo simultâneo, caráter plesiomórfico para Malpighiales (FURNESS, 2011). As tétrades produzidas por este tipo de microsporogênese são predominantemente tetraédricas e usualmente estão associadas com três aberturas equatoriais no pólen (FURNESS; RUDALL, 2004), verificado para as três espécies de *Erythroxyllum* estudadas.

Narayana (1960) relatou que os grãos de pólen da família Erythroxyllaceae, na fase de dispersão, são bicelulares. Narayana (1964) e Rao (1968), entretanto, ao estudarem a embriologia da família, descreveram que os grãos de pólen maduros são tricolulares. Essa divergência na literatura pode ter sido causada pela observação de apenas um dos morfos, uma vez que esses autores não fizeram a distinção entre os morfos florais em seus estudos. Em

nosso estudo, os resultados demonstraram que as espécies estudadas apresentam pólen bi ou tricolular. Vázquez-Santana, Domínguez e Márquez-Guzmán (1996), observando os dois morfos, só relatou a presença de pólen bicelular na espécie *E. havanense*. A presença da polimorfia (grãos de pólen bi e tricolulares na mesma antera) é um caráter relatado por Furness (2011) para as famílias Euphorbiaceae, Passifloraceae e Salicaceae, todas pertencentes à ordem Malpighiales, embora não sejam relatadas espécies heterostílicas para estas famílias (GANDERS, 1979a).

Brewbaker (1967) relatou a rara ocorrência de anteras com grãos de pólen bi e tricolulares, verificando que o pólen bicelular apresenta autoincompatibilidade gametofítica, pois ocorre a inibição do tubo polínico na altura do estilete ou ovário; já o pólen tricolular, autoincompatibilidade esporofítica, ocorrendo a inibição do tubo no estigma. Ganders (1979a) afirmou que em plantas distílicas, o sistema de autoincompatibilidade é esporofítica, sendo a especificidade do pólen determinada pelo genótipo diploide do esporófito, isto é, da planta mãe.

A presença de polimorfia em *Erythroxylum* é relatada pela primeira vez nesse estudo. Acredita-se que os grãos de pólen viáveis são dispersos somente na fase tricolular. Acredita-se, ainda, que a ocorrência de grãos pólen bicelulares esteja ligada à inviabilidade dos mesmos, uma vez que foram observados em maior incidência nas flores brevistiladas de *E. campestre* e *E. suberosum*. Apesar disso, Barros (1998) verificou que a quantidade de frutos produzidos por flores brevistiladas e longistiladas não variou entre as espécies de *E. campestre*, *E. suberosum* e *E. tortuosum*. Talvez, nessas espécies a ocorrência de pólen inviáveis seja compensada de alguma forma, provavelmente pela eficiência do transporte dos poucos pólen viáveis das flores brevistiladas para as longistiladas.

A diferença na morfologia do grão de pólen observado em óleo e em água permite classificá-lo como ortodoxo (PACINI; GUARNIERI; NEPI, 2006). Franchi et al. (2011) correlacionaram o teor de água com estratégias ecológicas e fisiológicas, demonstrando que o pólen responde de maneira diferente em relação à umidade relativa do ambiente.

O equilíbrio de água nos grãos de pólen é essencial para a sua viabilidade. Em geral, quanto menor o teor de água, menos ativo é o metabolismo do pólen, característica que permite maior resistência a ambientes hostis, com alta temperatura e baixa umidade relativa (GUARNIERI et al., 2006), situação encontrada comumente em ambientes de cerrado, onde as espécies de *Erythroxylum* são encontradas. A tolerância à dessecação está relacionada com o ambiente e não com a sistemática, sendo condicionada por fatores genéticos e influenciada pelas mudanças ambientais, conduzindo em alterações na ecofisiologia da reprodução floral (FRANCHI et al., 2011). Apesar de *E. cuneifolium* ter sido coletada em área de mata, seu pólen apresentou características do tipo ortodoxo, não exibindo variação relacionada com as diferenças abióticas; ainda que a espécie habite local diferente das outras duas, todas são encontradas no bioma Cerrado.

Outra característica dos grãos de pólen das espécies de *Erythroxylum* estudadas foi a presença do pollenkitt, em todos os grãos de pólen observados e em ambos os morfotipos florais. O pollenkitt é depositado sobre e entre os espaços existentes na exina (PACINI; HESSE, 2005). A presença de pollenkitt está relacionada à polinização zoofílica. Barros (1998), em seu trabalho com *Erythroxylum*, demonstrou que as flores heterostílicas foram visitadas por vespas, abelhas e dípteros, indistintamente entre os morfos. A autora considerou polinizadores efetivos: as vespas dos gêneros *Brachygastra*, *Polistes*, *Polybia* e *Pepsis*, e polinizadores ocasionais as abelhas *Trigona spinipes* e *Apis mellifera*.

Grãos de amido estão presentes no pólen de flores longistiladas de *Erythroxyllum* estudadas, já nas flores brevistiladas, este carboidrato não foi observado na grande maioria dos grãos. Este dado corrobora com Dominguez et al. (1997) para *E. havanense*. Ganders (1979a) relatou que o dimorfismo floral pode diferir quanto à presença de amido no pólen, situação esta encontrada nas espécies de *Erythroxyllum*.

Pacini, Guarnieri e Nepi (2006), em uma revisão sobre desenvolvimento, apresentação e dispersão do grão de pólen, relataram que o amido é total ou parcialmente convertido em outros carboidratos, antes da abertura da antera, os quais podem modificar a pressão de turgor interna do microgametófito, permitindo ao pólen com estas características uma maior resistência em ambientes hostis. Portanto, os grãos de pólen das flores longistiladas podem permanecer viáveis no ambiente por um período maior, em decorrência da presença de amido em seu interior, processo que, provavelmente, não ocorre com os pólenes das flores brevistiladas, influenciando, assim, na sua viabilidade e, conseqüentemente, na polinização.

A comparação anatômica das anteras demonstrou que há diferenças entre os morfos. Flores longistiladas exibem grande quantidade de grãos de pólen bem formados e presença de amido, já as flores brevistiladas demonstram o inverso, uma grande quantidade de grãos de pólen mal formados e ausência do amido. Essas características observadas no pólen das brevistiladas, provavelmente, estão relacionadas ao tapete, no entanto, não foi possível identificar neste estudo as prováveis alterações deste tecido.

Alterações no desenvolvimento da antera de *Erythroxyllum havanense* foram observadas por Domínguez et al. (1997). Flores brevistiladas falharam ao desenvolver um androceu fértil, em virtude da formação anormal do tecido esporogênico, ausência de tapete e micrósporos mal formados. Nesta espécie, a flor brevistilada apresentou um maior desempenho nos genitores femininos,

durante a fase de maturação da semente, e germinação e crescimento de mudas em longo prazo, compensando, assim, sua perda de aptidão masculina. Neste morfo, as flores se especializam na diferenciação da parte feminina e as longistiladas, no androceu (ÁVILA-SAKAR; DOMÍNGUEZ, 2000). Esse maior desempenho da função feminina pode ter ocorrido, também, em consequência do maior número de grãos de pólen bem formados nas flores longistiladas levando, portanto, ao maior sucesso da polinização nas flores brevistiladas.

Cuevas et al. (2005) descreveram os padrões gerais de esterilidade masculina em *E. havanense*, considerando o fato um dos primeiros passos na evolução da especialização de gênero. Del-Carlo e Buzato (2006) avaliaram o grau de esterilidade masculina em *E. suberosum* e observaram que não há diferença de sucesso reprodutivo entre os morfos. Esses autores relataram que há uma frequência baixa do processo de especialização por gênero em ambos os morfos, sendo a distilia, evolutivamente, estável na espécie.

As espécies de *E. campestre* e *E. suberosum* estudadas apresentaram o passo inicial a tendência à esterilidade masculina nas flores brevistiladas, pois verificou-se uma grande quantidade de grãos de pólen mal formados, demonstrando ser parcialmente macho estéril, como relatado anteriormente em estudos com *E. havanense*. O processo que leva à esterilidade masculina pode representar a primeira etapa da dioécia, no entanto, a evolução do gênero só ocorrerá se os indivíduos estéreis masculinos compensar com aumento de aptidão da função feminina (ÁVILA-SAKAR; DOMÍNGUEZ, 2000).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença do grão de pólen tricolporado, com formato subesferoidal, tapete secretor e microsporogênese do tipo simultânea, encontrados nas três espécies, são caracteres considerados plesiomórficos, relatados para outras famílias de Malpighiales.

As flores heterostílicas do gênero apresentam diferenças entre os morfos, somente no grão de pólen e na fase final do seu desenvolvimento. Flores brevistiladas desenvolvem grande quantidade de grãos de pólen malformados, bicelulares e sem amido, enquanto flores longistiladas apresentaram pólen bem formados e com presença de amido como reserva.

O habitat onde as três espécies de *Erythroxylum* são encontradas não alterou o desenvolvimento da antera, entretanto, o número de células no grão de pólen pode variar.

REFERÊNCIAS

AMARAL JUNIOR, A. Erythroxylláceas. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora ilustrada catarinense, parte I**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1980. p. 3-64.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An ordinal classification for the families of flowering plants: APG. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 85, n. 4, p. 531-553, 1998.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the order and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 141, n. 4, p. 399-436, Apr. 2003.

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**, London, v. 161, n. 2, p. 105-121, Oct. 2009.

ARCY, W. G. d'. Anthers and stamens and what they do. In: ARCY, W. G. d'; KEATING, R. C. (Ed.). **The anther: form, function and phylogeny**. Cambridge: Cambridge University, 1996. p. 1-24 .

ÁVILA-SAKAR, G.; DOMÍNGUEZ, C. A. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. **Evolution**, Lancaster, v. 54, n. 3, p. 866-877, June 2000.

BARRET, S. C. H. The evolution of plant sexual diversity. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, p. 274-284, Apr. 2002.

BARROS, M. G. Sistemas reprodutivos e polinização em espécies simpátricas de *Erythroxyllum* P. Br. (Erythroxyllaceae) do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 159-166, ago. 1998.

BERRY, P. E.; TOBE, H.; GOMEZ, J. A. Agamospermy and the loss of distyly in *Erythroxyllum undulatum* (Erythroxyllaceae) from northern Venezuela. **American Journal of Botany**, Ames, v. 78, n. 5, p. 595-600, May 1991.

BREWBAKER, J. L. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. **American Journal of Botany**, Ames, v. 54, p. 1069-1083, 1967.

CARVALHO, M. L. S.; NAKAMURA, A. T.; SAJO, M. G. Floral anatomy of Neotropical species of Mayacaceae. **Flora**, London, v. 204, n. 3, p. 220-227, Jan. 2009.

CASTRO, C. C. de; OLIVEIRA, P. E. de. Pollination biology of distylous Rubiaceae in the Atlantic Rain Forest, SE Brazil. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 4, n. 5, p. 640-646, Sept. 2002.

CHASE, M. W. et al. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 80, n. 3, p. 528-580, 1993.

CHASE, M. W. et al. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. **Kew Bulletin**, Kew, v. 57, n. 1, p. 141-181, 2002.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. 1262 p.

CUEVAS, E. et al. Patterns of male sterility within and among populations of the distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 176, n. 2, p. 165-172, Mar. 2005.

DALY, D. Erythroxylaceae. In: SMITH, N. et al. (Ed.). **Flowering plants of neotropics**. New York: Princeton University, 2004. p. 143-145.

DAVIS, C. C.; CHASE, M. W. Elatinaceae are sister to Malpighiaceae, Peridiscaceae belong to Saxifragales. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 91, n. 2, p. 262-273, Feb. 2004.

DAVIS, C. C. et al. Explosive radiation of Malpighiales supports a Mid-Cretaceous origin of modern tropical rain forests. **American Naturalist**, Chicago, v. 165, n. 3, p. 36-65, Mar. 2005.

DE-PAULA, O. C.; SAJO, M. G. Morphology and development of anthers and ovules in *Croton* and *Astraea* (Euphorbiaceae). **Nordic Journal of Botany**, Copenhagen, v. 29, n. 4, p. 505-511, Aug. 2011.

DEL-CARLO, S.; BUZATO, S. Male sterility and reproductive output in distylous *Erythroxylum suberosum* (Erythroxylaceae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 88, n. 3, p. 465-474, July 2006.

DETTKE, G. A.; SANTOS, R. P. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, p. 48-74, abr. 2011.

DOMÍNGUEZ, C. A. et al. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 84, n. 5, p. 626-632, May 1997.

ENDRESS, P. K. Diversity and evolutionary trends in angiosperm anthers. In: ARCY, W. G. d'; KEATING, R. C. (Ed.). **The anther: form, function and phylogeny**. Cambridge: Cambridge University, 1996. p. 92-110.

ENDRESS, P. K.; DAVIS, C. C.; MATTEWS, M. L. Advances in the floral structural characterization of the major subclades of Malpighiales, one of the largest orders of flowering plants. **Annals of Botany**, Oxdord, v. 111, n. 5, p. 969-985, Mar. 2013.

ESAU, K. **Anatomy of seeds plants**. New York: Wiley, 1977. 550 p.

FLORA BRASILIENSIS. **Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA**. Disponível em: <<http://florabrasiliensis.cria.org.br/index>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

FRANCHI, G. G. et al. Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 15, p. 5267-5281, Aug. 2011.

FRENCH, J. C. Patterns of endothecial wall thickenings in Araceae: subfamilies Calloideae, Lasioideae and Philodendroideae. **Botanical Gazette**, New York, v. 146, p. 521-533, 1985.

FURNESS, C. A. Comparative structure and development of pollen and tapetum in malpighiales, with a focus on the parietal clade. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 172, n. 8, p. 980-1011, Oct. 2011.

FURNESS, C. A. Pollen evolution in the clusioid clade (Malpighiales). **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 173, n. 9, p. 1055-1082, Nov. 2012.

FURNESS, C. A. Review of the distribution of plasmodial and invasive tapeta in eudicots. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 169, n. 2, p. 207-223, Feb. 2008.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Pollen aperture evolution: a crucial factor for eudicot success? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 154-158, 2004.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. The tapetum and systematics in monocotyledons. **The Botanical Review**, Bronx, v. 64, n. 3, p. 201-239, July 1998.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. The tapetum in basal angiosperms: early diversity. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 162, n. 2, p. 375-392, 2001.

GANDERS, F. R. Biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 17, p. 607-635, 1979a.

GANDERS, F. R. Heterostyly in *Erythroxylum coca* (Erythroxylaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 78, p. 11-20, Jan. 1979b.

GIBBS, P. E. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 13, p. 125-136, 1990.

GUARNIERI, M. et al. Ripe pollen carbohydrate changes in *Trachycarpus fortunei*: the effect of relative humidity. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 19, n. 3, p. 117-124, 2006.

HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants**. London: MacMillan, 1926. 352 p.

HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants**. 2nd ed. London: Oxford University, 1959. 792 p.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.

JUNCOSA, A. M.; TOBE, H. Embryology of tribe gynotrocheae (Rhizophoraceae) and its developmental and systematic implications. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 75, p. 1410-1424, 1988.

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

- KEIJZER, C. J. The processes of anther dehiscence and pollen dispersal. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 105, p. 487-498, 1987.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. (Ed.). **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997. 198 p.
- LOIOLA, M. I. B. **Revisão taxonômica de *Erythroxylum* P. Browne Sect. *Rhabdophyllum* O. E. Schulz (Erythroxylaceae Kunth)**. 2001. 247 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2001.
- LOIOLA, M. I. B. et al. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 473-487, abr./jun. 2007.
- MANNING, J. C. Diversity of endothelial patterns in the angiosperms. In: ARCY, W. G. d'; KEATING, R. C. (Ed.). **The anther: form, function and phylogeny**. Cambridge: Cambridge University, 1996. p. 136-158.
- MANNING, J. C.; LINDER, H. P. Cladistic analysis of patterns of endothecium thickenings in the Poales. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 77, n. 2, p. 196-210, Feb. 1990.
- MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JÚNIOR, N. S. Flor. In: APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2012. p. 305-346.
- MATTHEWS, M. L.; ENDRESS, P. K. Comparative floral structure and systematics in Rhizophoraceae, Erythroxylaceae and the potentially related Ctenolophonaceae, Linaceae, Irvingiaceae and Caryocaraceae (Malpighiales). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 166, n. 4, p. 331-416, Aug. 2011.
- MENDONÇA, J. O.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. A. O gênero *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do Estado do Paraná, Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 41, n. 3, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89131998000300013&script=sci_arttext>. Acesso em: 10 mar. 2013.
- NAKAMURA, A. T. **Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de três espécies de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae)**. 2003. 49 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

NARAYANA, L. L. Embryology of a few species of *Erythroxylum*. **Current Science**, Columbus, v. 33, n. 14, p. 441-442, July 1964.

NARAYANA, L. L. Studies in Erythroxylaceae I. **Proceedings of the Indian Academic Sciences**, Bangalore, v. 51b, p. 270-275, June 1960.

NARAYANA, L. L.; RAO, D. Systematic position of Humiriaceae, Linaceae and Erythroxylaceae in the light of their comparative floral morphology and embryology: a discussion. **Journal of the Indian Botanical Society**, Nagpur, v. 57, p. 258-266, 1978.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. **Catálogo das árvores nativas de Minas Gerais: mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2006. 423 p.

PACINI, E. Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 75, n. 9, p. 1448-1459, Sept. 1997.

PACINI, E.; GUARNIERI, M.; NEPI, M. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 228, n. 1/3, p. 73-77, Aug. 2006.

PACINI, E.; HESSE, M. Pollenkitt: its composition, forms and functions. **Flora**, London, v. 200, n. 5, p. 399-415, 2005.

RAO, D. A contribution to the embryology of Erythroxylaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 38B, p. 53-65, 1968.

RAO, D. Floral anatomy of Erythroxylaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 38B, p. 156-162, 1965.

REMIZOWA, M. V. et al. Harperocallis is congeneric with *Isidrogalvia* (Tofieldiaceae, Alismatales): evidence from comparative floral morphology. **Taxon**, Bratislava, v. 60, n. 4, p. 1076-1094, Aug. 2011.

ROSAS, F.; DOMINGUEZ, C. A. Male sterility, fitness gain curves and the evolution of gender specialization from distyly in *Erythroxyllum havanense*. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 22, n. 1, p. 50-59, Jan. 2009.

ROSAS, L. F.; PEREZ-ALQUICIRA, J.; DOMINGUEZ, C. A. Environmentally induced variation in fecundity compensation in the morph-biased male-sterile distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 92, n. 1, p. 116-122, 2005.

RUDALL, P. J.; BATEMAN, R. M. Roles of synorganisation, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots. **Biological Reviews**, London, v. 77, n. 3, p. 403-441, Aug. 2002.

RUDALL, P. J.; CONRAN, J. G. Systematic placement of dasypogonaceae among commelinid monocots: evidence from flowers and fruits. **The Botanical Review**, Bronx, v. 78, n. 4, p. 398-415, Dec. 2012.

RUDALL, P. J.; FURNESS, C. A. Systematic of *Acorus*: ovule and anther. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 158, n. 5, p. 640-651, 1997.

SAJO, M. G.; FURNESS, C.; RUDALL, P. Microsporogenesis is simultaneous in the early-divergent grass *Streptochaeta*, but successive in the closest grass relative, *Ecdeiocolea*. **Grana**, Stockholm, v. 48, n. 1, p. 27-37, Mar. 2009.

SAVOLAINEN, V. et al. Phylogenetics of flowering plants based upon a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. **Systematic Biology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 306-362, June 2000a.

SAVOLAINEN, V. et al. Phylogeny of the eudicots: a nearly complete familial analysis based on *rbcL* gene sequences. **Kew Bulletin**, Kew, v. 55, n. 2, p. 257-309, 2000b.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 1083-1090, nov./dez. 2002.

SETOGUCHI, H.; KOSUGE, K.; TOBE, H. Molecular phylogeny of rhizophoraceae based on *rbcL* gene sequences. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 112, n. 4, p. 443-455, Dec. 1999.

- SIMPSON, M. G. **Plant systematics**. Ottawa: Elsevier, 2006. 590 p.
- SOLTIS, D. E. et al. Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 98, n. 4, p. 704-730, Apr. 2011.
- SOLTIS, D. E. et al. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 133, n. 4, p. 381-461, Aug. 2000.
- SOLTIS, D. E. et al. **Phylogeny and evolution of Angiosperms**. Washington: Smithsonian Books, 2005. 370 p.
- SOUZA, M. M. et al. Reproductive studies in ipecac (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes; Rubiaceae): pollen development and morphology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 5, p. 981-989, Sept./Oct. 2008.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.
- STEVENS, P. F. **Angiosperm phylogeny website**. Version 12. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 23 jan. 2013.
- STRANGE, A.; RUDALL, P. J.; PRYCHID, C. J. Comparative floral anatomy of Pontederiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 144, n. 4, p. 395-408, Apr. 2004.
- TEBBITT, M. C. The systematic significance of the endothecium in Begoniaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 131, n. 3, p. 203-221, Nov. 1999.
- TEIXEIRA, L. A. G.; MACHADO, I. C. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 853-862, 2004.
- THIEBAUT, L.; HOFFMANN, P. Occurrence of colleter in Erythroxylaceae. **Kew Bulletin**, Kew, v. 60, n. 3, p. 455-459, 2005.
- TOBE, H.; RAVEN, P. H. Embryology of the Irvingiaceae, a family with uncertain relationships among the Malpighiales. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 124, n. 5, p. 577-591, Sept. 2011.

TOKUOKA, T. Molecular phylogenetic analysis of Euphorbiaceae sensu stricto based on plastid and nuclear DNA sequences and ovule and seed character evolution. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 120, n. 4, p. 511-522, July 2007.

TOKUOKA, T. Molecular phylogenetic analysis of Violaceae (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 121, n. 3, p. 253-260, May 2008.

TOKUOKA, T.; TOBE, H. Embryology of tribe *Drypeteae*, an enigmatic taxon of *Euphorbiaceae*. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 215, n. 1, p. 189-208, Mar. 1999.

TOKUOKA, T.; TOBE, H. Phylogenetic analyses of Malpighiales using plastid and nuclear DNA sequences, with particular reference to the embryology of *Euphorbiaceae* sens. str. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 119, n. 6, p. 599-616, Nov. 2006.

VÁZQUEZ-SANTANA, S.; DOMÍNGUEZ, C. A.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, Y. Embriología de *Erythroxyllum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae). **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, México, v. 59, p. 25-33, sept./dic. 1996.

VUILLEUMIER, B. S. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. **Evolution**, Lancaster, v. 21, p. 210-226, June 1967.

WUNDERLICH, R. Über das Antherentapetum mit besonderer Berücksichtigung seiner Kernzahl. **Oesterreichische Botanische Zeitschrift**, Wien, v. 101, p. 1-63, 1954.

WURDACK, K. J.; DAVIS, C. C. Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 96, n. 8, p. 1551-1570, Aug. 2009.