

**Erica Duarte-Silva**

**Esporidade e sexualidade em *Valeriana scandens* L.:  
aspectos embriológicos, citogenéticos e de sistema reprodutivo**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath**

**Tese submetida à avaliação do Programa de Pós-  
graduação em Botânica, da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos  
necessários para obtenção do título de Doutor  
em Ciências: Botânica**

**Porto Alegre**

**2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Esporidade e sexualidade em *Valeriana scandens* L.:  
aspectos embriológicos, citogenéticos e de sistema reprodutivo**

**Erica Duarte-Silva**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araújo Mariath**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação  
em Botânica da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como um dos requisitos para a  
obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Porto Alegre**

**Janeiro 2010**

**‘Quase que nada sei,  
mas desconfio de muita coisa.’**

Fala do Riobaldo, personagem central  
da obra *Grandes Sertões: Veredas*  
de Guimarães Rosa.

**Dedico este trabalho**  
**aos meus pais, Angela M<sup>a</sup> Hauck Duarte Silva e**  
**Joel Antonio da Silva**

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS, e a equipe de professores de mesmo pelo apoio durante o curso de Doutorado.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de Doutorado.

Ao meu orientador e ‘Mestre’, Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath, por sua dedicação, profissionalismo, incentivo, e particularmente, pelo seu comprometimento e entusiasmo pela ciência. Muito obrigado por tudo!

Ao meu co-orientador de mestrado, Dr. Nelson Sabino Bittencourt, por me apresentar a embriologia vegetal de tal forma que decidi fazer dela o tema do meu doutorado. A você, um agradecimento em especial.

À equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFRGS. Aos técnicos, Marco Alexandre da Silva e Juliana Troleis. Aos professores, Dr. Paulo Oliveira, Dr. Rinaldo Pires dos Santos, Dra. Alexandra Mastroberti e Dra. Cecília Chiara-Moço. E a todos os alunos de graduação, pós-graduação e pós-doutorado, em especial, aos que me receberam em 2006, e me ensinaram os valores e as rotinas do laboratório: Dra. Lia Rodrigues, Dra. Jaqueline Sarzi Sartori e Dr. Adriano Silvério. Muito obrigado a toda a equipe pelas discussões acadêmicas e pela amizade!

Ao Dr. André Luis Laforga Vanzela, e a equipe do Laboratório de Biodiversidade e Recuperação de Ecossistemas da UEL-PR: Juca San Martin, Carlos Roberto M. da Silva, Marcos L. Gaeta e Priscila M. Yuyama, pela parceria nas análises citogenéticas do presente trabalho.

A Dra. Lia Rosane Rodrigues, pela parceria nas análises de viabilidade polínica

dessa tese. Agradeço ao Dr. André Vanzela e Dra. Lia Rodrigues pela atenção dispensada, pelo apoio e pelo aprendizado.

Aos pesquisadores Dr. João Marcelo S. de Oliveira (UFSM, RS), Dra. Karen de Toni (Jardim Botânico do Rio de Janeiro), Dra. Ana Cláudia Guerra Araujo (Cenargen-DF), Dr. Alfredo Elio Cocucci (Universidad de Córdoba, Argentina), Dr. Joseph Williams (University of Tennessee, Knoxville, EUA) e Dr. Andrea Cocucci (Universidad de Córdoba, Argentina) pelas valiosas contribuições sugeridas durante discussões acadêmicas em congressos e encontros científicos, visitas ao Laboratório de Anatomia Vegetal da UFRGS, ou por correspondências.

Ao colega de pós-graduação Luís Fernando Paiva Lima, pela localização de diversas populações de *Valeriana scandens* no estado do Rio Grande do Sul. Ao prof. Dr. Luis Rios de Moura Baptista, pela permitir o trabalho de campo em sua propriedade, no município de Dom Pedro de Alcântara, RS, e pela localização da população estudada e apoio nos trabalhos de campo.

À minha família de Porto Alegre, conhecida como Liga do Xis: Paulo Roberto da Silva, Adriano Silvério, Julio Cesar de Lima, Rafael Arenhart e Anderson Machado. À doce Lisa, e à minha companheira do último semestre, Letícia Souto.

Um agradecimento muito especial a minha família: minhas avós Norberta e Bárbara, meus pais, Angela e Joel, e ao pai da Anita, Adriano Silvério. Obrigada por tudo que realizaram pela promoção do meu crescimento pessoal e profissional!

## **PREFÁCIO**

A presente tese é apresentada na forma de artigos, contidos em capítulos, opção que facilita a posterior publicação dos trabalhos. Entretanto, todos os artigos seguem a formatação do Capítulo II, já submetido a um periódico científico. A formatação igual de todos os artigos tem por objetivo único padronizar a tese.

O Capítulo I constitui o referencial teórico, uma análise crítica sobre os conceitos e concepções relacionados à temática da tese. O capítulo II já foi analisado por uma banca de professores do programa de pós-graduação em Botânica da UFRGS, no Exame de Qualificação, submetido e aceito pelo periódico 'Sexual Plant Reproduction'. Os capítulos III e IV são artigos científicos a serem publicados em revistas com corpo de revisores e impacto na área. O capítulo V foi acrescido na tese por conter observações complementares ao escopo da mesma e, apesar de estar organizado em formato de artigo, requer estudos adicionais para a publicação. O capítulo VI constitui as considerações finais e o capítulo VII, as perspectivas.

## SUMARIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>XIX</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XII</b>
<b>CAPITULO I – Referencial teórico</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Esporidade e sexualidade em plantas com semente</b>	<b>16</b>
<b>1.2. O gênero <i>Valeriana</i></b>	<b>29</b>
1.2.1. Sistemática e distribuição geográfica	29
1.2.2. Esporogênese, gametogênese e embriogênese de <i>Valeriana</i>	32
1.2.3 A espécie <i>Valeriana scandens</i>	33
<b>1.3. Objetivos</b>	<b>36</b>
<b>1.4 Referências bibliográficas</b>	<b>37</b>
<b>CAPITULO II – Developmental and cytogenetic analyses of pollen sterility in <i>Valeriana scandens</i> L.</b>	<b>48</b>
<b>Abstract</b>	<b>50</b>
<b>Keywords</b>	<b>50</b>
<b>Introduction</b>	<b>51</b>
<b>Material and methods</b>	<b>52</b>
<b>Results</b>	<b>53</b>
Microsporogenesis of fertile anthers	53
Microgametogenesis of fertile anthers	54
Microsporogenesis and microgametogenesis of sterile anthers	54
Cytogenetical analysis	54
<b>Discussion</b>	<b>55</b>
<b>References</b>	<b>57</b>



<b>Figures</b>	<b>59</b>
----------------	-----------

<b>CAPITULO III: Non-significant correlation among three pollen viability methods in <i>Valeriana scandens</i> L.</b>	<b>65</b>
---	-----------

<b>Abstract</b>	<b>67</b>
-----------------	-----------

<b>Keywords</b>	<b>67</b>
-----------------	-----------

<b>Introduction</b>	<b>68</b>
---------------------	-----------

<b>Material and methods</b>	<b>69</b>
-----------------------------	-----------

<b>Results and Discussion</b>	<b>70</b>
-------------------------------	-----------

<b>References</b>	<b>71</b>
-------------------	-----------

<b>Tables</b>	<b>72</b>
---------------	-----------

<b>Figure</b>	<b>73</b>
---------------	-----------

<b>CAPITULO IV – Gynosporogenesis and gynogametogenesis of perfect and pistillate flowers of <i>Valeriana scandens</i> L. (Caprifoliaceae s.l.)</b>	<b>74</b>
---	-----------

<b>Abstract</b>	<b>76</b>
-----------------	-----------

<b>Keywords</b>	<b>76</b>
-----------------	-----------

<b>Introduction</b>	<b>77</b>
---------------------	-----------

<b>Material and methods</b>	<b>77</b>
-----------------------------	-----------

<b>Results</b>	<b>78</b>
----------------	-----------

<b>Discussion</b>	<b>79</b>
-------------------	-----------

<b>References</b>	<b>80</b>
-------------------	-----------

<b>Figures</b>	<b>82</b>
----------------	-----------

<b>CAPITULO V - Aspectos de biologia reprodutiva de <i>Valeriana scandens</i> L. (Caprifoliaceae sensu lato)</b>	<b>85</b>
--	-----------

<b>Introdução</b>	<b>86</b>
-------------------	-----------

<b>Material e métodos</b>	<b>88</b>
---------------------------	-----------

Trabalho de campo	88
Estudo da antese	88
Visitantes florais	89
Sistema reprodutivo	89
Germinação e crescimento do tubo polínico	89
Análise do desenvolvimento da semente	90
Germinação de plântulas	90
<b>Resultados e Discussão</b>	<b>90</b>
<b>Referências</b>	<b>94</b>
<b>Figuras</b>	<b>96</b>
<b>CAPITULO VI – Considerações finais</b>	<b>101</b>
<b>CAPITULO VII – Perspectivas</b>	<b>104</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

*AG* - Agamous

*AGL11* – Agamous-like 11

*ap3* - Apetala 3

APG – Angiosperm Phylogeny Group

*BAM* (Arabidopsis)- Barely any meristem

*BcMF2*- *Brassica campestris* Male Fertile 2

*BR 97 17971*- Brasil 97 17971

CALS5 – Callose synthase 5

*CESA* - Cellulose synthase

CMA- célula mãe de andrósporo

*def* – Deficiens

FDA – fluoresceína diacetato

*glo* –Globosa

GMC- gynospore mother cell

ICN – Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

h – hora/hour

L. - Lineu

MADS – As iniciais dos seguintes genes: *MCMI*, *AG*, *DEF* e *SRF* (vide denominação de cada gene no ordenamento alfabético)

MBM – Herbário do Jardim Botânico de Curitiba, Paraná, Brasil.

ME- Microscópio estereoscópio

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

min – minuto/minute

mm- milímetro

MMC- microspore mother cell

*ms* – Male sterile

*nefl* – No exine formation

*OSINV2* – Acid invertase

*OsPGM* – Phosphoglucomutase

*OsUGP* - Uridine diphosphate-glucose pyrophosphorylase  
*OsAGPL3* - Adenosine diphosphate-glucose pyrophosphorylase  
*OsSSI* - Soluble starch synthase  
P – Herbário do Museu Nacional de História Natural de Paris, França  
*pi* - Pistillata  
*RIP1*- Rice immature pollen 1  
RS – Rio Grande do Sul  
*Rsus* – Sucrose synthase  
SEM- Scanning electron microscopy  
*Sep* – Sepaloidea  
*s.l.* – *sensu lato*  
*SRF* – Serum response factor  
VIC- Herbário Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil

## RESUMO

*Valeriana* L. (Caprifoliaceae *s.l.*) contem metabólitos utilizados na produção de fitoterápicos que previnem ansiedade e insônia, e melhora a qualidade do sono. O centro de biodiversidade do gênero está localizado na América do Sul, e espécies brasileiras apresentam alto potencial para exploração econômica devido a suas propriedades farmacológicas. Conhecimento básico a cerca da reprodução sexual é um pré-requisito para a domesticação de plantas nativas. *Valeriana scandens* L. possui a mais ampla distribuição do gênero no continente americano e porta flores perfeita e pistilada, a última, com pólen estéril. A espécie é composta de duas variedades com diferentes ploidias, *V. scandens* var. *scandens* ( $2n=28$ ) e *V. scandens* var. *candolleana* ( $2n=56$ ), ambas com ocorrência no RS, Brasil. Cruzamentos entre essas variedades podem ocorrer dando origem a híbridos com esterilidade do pólen. O presente estudo investigou a esterilidade do pólen em *V. scandens* com análises embriológicas e citogenéticas; analisou a viabilidade das flores perfeitas baseado em três diferentes métodos; investigou o sistema reprodutivo da espécie baseado em análises embriológicas (ginosporogênese, ginogametogênese e desenvolvimento da semente) e baseado em aspectos de biologia reprodutiva. Como resultados, análises embriológicas usando microscopia óptica e eletrônica de varredura mostrou que anteras estéreis desenvolvem de forma similar as férteis até o final da meiose. Após este estágio, as tétrades estéreis não se separam devido a fusão da exina entre andrósporos adjacentes, similar ao pólen estéril do mutante *ms-cd11* de *Brassica*. Além disso, grãos de pólen imaturos separados também degeneram. A análise citogenética da célula mãe de andrósporo (CMA) mostrou que a população é diplóide e pertence à variedade *V. scandens* var. *scandens* ( $2n=28$ ). A esterilidade do pólen não é causada por um distúrbio citogenético. As CMAs analisadas da prófase I até o estágio de tétrade, mostraram uma meiose regular, indicando que o fenótipo ‘pólen esteril’ de *V. scandens* é um processo pós-meiótico formado pela fusão da exina entre andrósporos adjacentes. Este trabalho investigou a viabilidade do pólen de *V. scandens* baseado em três métodos: (1) corabilidade polínica com Alexander; (2) fluoresceína diacetato (FDA); (3) germinação *in vitro*. Nas flores perfeitas, 95% dos grãos de pólen reagem ao Alexander, 47% apresentam reação fluorocromática ao FDA, e 30% germinaram em meio de cultura. Análises de variância e testes de correlação indicam que as três técnicas oferecem distintas inferências e não é

possível estimar a germinabilidade do pólen pela reação do FDA ou Alexander, e vice-versa. Neste trabalho, foi analisado em microscopia de campo claro, a ginosporogenese e ginogametogenese das flores perfeita e pistilada de *V. scandens*, com o intuito de investigar a presença ou ausência de desenvolvimento de embriões apomíticos. Ginosporogênese e ginogametogênese de ambos os fenótipos florais não mostraram diferenças. No desenvolvimento do rudimento seminal, um único ginófito é formado, de origem meiótica. Nenhuma apomixia foi detectada e nenhum embrião adventício foi observado. Estudos de biologia mostraram que as flores perfeitas são autopolinizadas nas primeiras horas de antese, antes da visita do polinizador. Flores pistiladas, com pólen estéril, sofrem polinização cruzada. Nenhum embrião adventício foi observado durante o desenvolvimento da semente nem durante a germinação das plântulas.

## ABSTRACT

*Valeriana* L. (Caprifoliaceae *s.l.*) contains metabolites used to produce phytomedicines that prevent anxiety and insomnia, and improve the quality of sleep. The biodiversity center of *Valeriana* is located in South America, and Brazilian species present a high potential for economic exploitation due to pharmacological properties. Basic knowledge about plant sexual reproduction is a prerequisite for the domestication of native plants. *Valeriana scandens* has the widest distribution of genus in American continent and bears perfect and pistillate flowers, the latter, with sterile pollen. The species is composed of two varieties with different ploidy; *V. scandens* var. *scandens* ( $2n=28$ ) and *V. scandens* var. *candolleana* ( $2n=56$ ), both occur in RS, Brazil. Crosses between these varieties might occur giving rise to hybrids with pollen sterility. The present study aims to investigate the pollen sterility of *V. scandens* with developmental and cytogenetic analyses; analyse the pollen viability of perfect flowers based on three different methods; investigate the species breeding system with developmental analysis (ginosporogenesis, ginogametogenesis, seed development) and reproductive biology aspects. As results, developmental analysis using light microscopy and scanning electron microscopy showed that sterile anthers develop similarly to fertile anthers until the end of meiosis. After this stage, sterile tetrads do not separate as a consequence of exine fusion between adjacent androspores, similar to sterile pollen of *Brassica ms-cd11* mutant. In addition, separated, vacuolate immature pollen degenerates. The cytogenetic analysis of the androspore mother cell (AMC) showed that the diploid population of *V. scandens* var. *scandens* ( $2n=28$ ) has pollen sterility that is not caused by a cytogenetic disturbance. The AMCs analyzed, from prophase I to tetrad stage, showed a regular meiotic process, indicating the phenotype of *V. scandens* sterile pollen is a post-meiotic process formed by fusion of exine between opposite androspores. This work investigated the pollen viability of *Valeriana scandens* based on three methods: (1) Alexander staining, (2) fluorescein diacetate (FDA) fluorochromatic reaction, (3) *in vitro* germination. In perfect flowers, 95% of the pollen grains reacted to Alexander, 47% presented fluorochromatic reaction to FDA and 30% germinated in culture medium. Analysis of variance and correlation tests indicate that the three techniques offer distinct inferences and it was not possible to estimate pollen germinability by means of the reaction

to Alexander or FDA and vice-versa. In this work, we analysed, with light microscopy, the gynosporogenesis and gynogametogenesis of *V. scandens* perfect and pistillate flowers, aiming to investigate the presence, or absence, of apomictic embryos development. Gynosporogenesis and gynogametogenesis of both floral fenotypes showed no differences. In seminal rudiment development, a single gynophyte is formed by a meiotic pathway. No apomixes was detected and no adventicious embryos were observed. Reproductive biology studies showed that perfect flowers are self-pollinated in the first hours of anthesis, before pollinator visitation. Pistillate flowers, with pollen sterile, are cross-pollinated. No adventicious embryo was observed during seed development neither during seedling germination.



## Capítulo I : Referencial teórico

## Capítulo I : Referencial teórico

### 1.1. Esporidade e sexualidade em plantas com semente

O ciclo de vida das plantas consiste em duas gerações: uma esporofítica, diplóide, e uma gametofítica, haplóide (Hofmeister 1851; Cocucci 1969; Cocucci e Mariath 1995). Nas plantas com semente, a geração gametofítica, e portanto sexual, se inicia a partir de um esporo que através de divisões mitóticas, desenvolve uma estrutura multicelular denominada gametófito. No caso deste processo ocorrer no androceu, o gametófito masculino é denominado de microgametófito, andrófito ou grão de pólen. Se ocorrer no gineceu, o gametófito feminino é denominado de megagametófito, ginófito ou saco embrionário. Portanto, nas plantas com semente, a geração sexual gametofítica é reduzida e nutricionalmente dependente do esporófito, e a estrutura das plantas, exceto o saco embrionário e os grãos de pólen, pertencem à geração esporofítica (Cocucci 1969; Cocucci e Hunziker 1994; Cocucci e Mariath 1995).

A investigação científica acerca da sexualidade em plantas iniciou-se no século XVII por Rudolph Camerarius (1694) em sua obra *De Sexu Plantarum Epistola*. Camerarius foi o primeiro a afirmar a existência de sexo em plantas, porém identificou, de forma equivocada, sexualidade em estruturas esporofíticas, visto que estabeleceu serem os estames e os pistilos, ‘órgãos’ masculinos e femininos.

Carolus Linnaeus estabeleceu um sistema de classificação que abrange dois princípios básicos: o uso das palavras latinizadas ou latinas para denominar grupos de organismos, bem como, o uso de categorias que distribuem os organismos em agrupamentos amplos até chegar a agrupamentos limitados. Fundador da taxonomia moderna, os seus dois trabalhos mais importantes são *Genera Plantarum* e *Species*

*Plantarum* (Linnaeus 1754). Em ambos os trabalhos, Linnaeus classificou as plantas de acordo com o artificial “Sistema sexual”. Linnaeus posicionou as plantas com semente em vinte e quatro classes baseado no número de estames e pistilos (Linné 1810)<sup>1</sup>. Suas descrições das flores eram comparadas aos relacionamentos sexuais humanos, o que causou polêmica e escândalo na sociedade da época (Quammen 2007). A flor de *Fuchsia*, por exemplo, é classificada nesse sistema contendo oito estames masculinos em torno de um pistilo feminino, pertencendo à classe 8, descrita como ‘oito homens na suíte nupcial de uma única mulher’ (Quammen 2007).

No século XIX, Hofmeister (1851) publica a teoria da alternância de gerações, admitindo a existência de duas gerações para briófitas e pteridófitas, uma esporofítica e outra gametofítica (Cocucci 1969).

Darwin (1877) foi o primeiro a discutir o desenvolvimento de diferentes tipos florais em plantas da mesma espécie e denominou as flores como hermafroditas, femininas e masculinas. A nomenclatura adotada por Darwin, de atribuir sexualidade às flores são terminologias utilizadas na biologia até os dias atuais em parte considerável das produções científicas (Richards 1997; Barrett 2002; Mitchell e Diggle 2005). A obra de Hofmeister, considerada tão genial como a de Mendel ou Darwin, foi pouco difundida no meio científico (Kaplan e Cooke 1996). Os estudiosos da biologia, tendo Darwin como seu pressuposto primordial e direcionador, comumente observam a flor sob a visão de Camerarius e Linnaeus, tal como um órgão sexual, atribuindo sexualidade à estruturas esporofíticas e portanto, assexuadas. Os termos flor feminina e flor masculina contêm um equívoco por englobar tanto estruturas de origem esporofítica, as quais não se atribui sexo

---

<sup>1</sup> Linné é a tradução de Linnaeus para a língua francesa. A obra citada ‘Linné 1810’ é uma edição do livro de Linnaeus publicada na França.

(cálise, colola, androceu e gineceu), como estruturas gametofíticas, que expressam sexualidade como o gametófito feminino (saco embrionário) e o masculino (grão de pólen). Ao termo hermafrodita cabe tecer mais uma crítica: todo gametófito em angiospermas e gimnospermas é unissexuado e, por sua vez, o hermafroditismo é uma condição presente em pteridófitas isosporadas nas quais um único esporângio dá origem aos gametófitos masculino e feminino (Cocucci 1969; 1973; 1980; Cocucci e Hunziker 1994; Cruden & Lloyd 1995).

Os termos ‘feminino’, ‘masculino’ e ‘hermafrodita’ (Camerarius 1694; Linnaeus 1754, 1810; Darwin 1877) deveriam ser substituídos por “imperfeita pistilada”, “imperfeita estaminada” e “perfeita”, respectivamente (Cocucci 1980; Greyson 1994; Cruden e Lloyd 1995; APG 2007). Isto se deve ao fato da flor constituir-se em uma estrutura esporofítica que abriga um ou dois gametófitos, dependentes nutricionalmente do esporófito (Cocucci 1973). Baseado nesses pressupostos, Cocucci & Mariath (1995) propõem a denominação das flores como “monospóricas”, quando se desenvolve apenas um tipo de esporo (andrósporos ou ginósporos) e “bispóricas”, quando a flor apresenta os dois tipos de esporos. O presente trabalho adota os termos flor perfeita, imperfeita pistilada e imperfeita estaminada, devido ao seu uso corrente na literatura científica atual (APG 2007), evitando apenas a conotação sexual.

Não obstante a questão conceitual da compreensão da flor enquanto uma estrutura que abarca tecidos da geração esporofítica e da gametofítica, os estudos de evolução floral se desenvolveram muito, e constituem atualmente um dos temas de discussão nas áreas da evolução, ecologia e genética. Charles Darwin (1877) reconheceu que as plantas com semente possuem uma incrível diversidade de sistemas reprodutivos, ‘diversificação sexual’ esta, determinada por fatores ecológicos e genéticos que constituem um dos

problemas centrais da biologia evolutiva (Barrett 2002). A integração da filogenia, ecologia e estudos em genética de populações tem fornecido novas idéias sobre os mecanismos de seleção que são responsáveis pelas maiores transições evolutivas entre os modos de reprodução (Barrett 2002). Por ‘diversificação sexual’ entende-se, na perspectiva aqui apresentada, uma diversidade de tipos de esporófitos, que abarcam flores de diferentes morfologias, podendo portar tanto gametófitos funcionais, femininos e masculinos, ou apenas um desses dois tipos. Cocucci e Mariath (1995), e Cocucci (2006), propõem, no âmbito dos trabalhos sobre reprodução e melhoramento vegetal, limitar a terminologia sexual aos gametófitos, erradicando a terminologia sexual aplicada aos esporófitos.

No século XX, a despeito do significativo progresso na reconstrução das filogenias das plantas com semente, o problema científico da origem evolutiva da flor manteve-se nas pesquisas da Botânica e da Biologia Evolutiva (Theissen *et al.* 2002). Nas últimas décadas, novas abordagens sobre a origem da flor foram realizadas pela genética do desenvolvimento e da evolução.

Os verticilos florais se desenvolvem a partir de genes codificados pelos fatores de transcrição do domínio MADS, presentes nas plantas com sementes e ausentes em pteridófitas e briófitas (Theissen *et al.* 2002). No modelo ABC, investigado em *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinium majus*, a função ‘A’ do domínio MADS é responsável pelo desenvolvimento da sépala, as funções ‘A’ e ‘B’, em conjunto, formam a pétala, ‘B’ e ‘C’ desenvolvem o estame, e ‘C’, o carpelo. (Coen e Meyerowitz 1991). O desenvolvimento de diferentes tipos de flores (perfeitas, estaminadas e pistiladas) é causado pela expressão de genes relacionados com a formação de estames e carpelos. Como exemplo, o mutante *pi / ap3 / def glo / sep* de *Antirrhinium majus* desenvolve flores pistiladas, formando sépalas, pétalas, e carpelos no lugar dos estames (Coen e Meyerowitz 1991). Os genes com a função

D foram posteriormente identificados em *Petunia* e são responsáveis pelo desenvolvimento do rudimento seminal, todavia, a similaridade da sua sequência sugere uma correspondência com o gene *AGL11* de *Arabidopsis* (Angenent e Colombo 1996).

Ao contrário das gimnospermas, a maioria das espécies de angiosperma apresenta flores perfeitas. Flores estaminadas e pistiladas evoluíram da flor perfeita, por causas múltiplas, em pelo menos 160 famílias de angiospermas (Mitchell e Diggle 2005). A formação de flores estaminadas e pistiladas a partir da flor perfeita se deve a processos homeóticos que levam a conversão de carpelos em estames e vice-versa; a mutações que cessam a organogênese inicial; ou, a falha no desenvolvimento do verticilo em algum momento da esporo-gametogênese, levando ao desenvolvimento de estaminódios e pistilódios (Mitchel e Diggle 2005). Vale ressaltar que, neste último processo, podem ocorrer dois tipos de esterilidade, a esporofítica e a gametofítica, causadas por falhas na esporogênese ou gametogênese, respectivamente (Kaul 1988).

A esterilidade estaminal, também conhecida, no âmbito agrônômico e biotecnológico como “macho-esterilidade”, consiste na falha em algum estágio da androsporogênese e androgametogênese, que leva a não formação de um andrófita viável. Por andrófita viável entende-se um grão de pólen morfológicamente típico, ativo metabolicamente, capaz de emitir de tubo polínico, e este, conduzir os gametas masculinos até o saco embrionário (veja revisão em Dafni e Firmage 2000). O termo “macho-esterilidade” seria mais apropriado para designar somente eventos de esterilidade relacionados às falhas da androgametogênese, não atribuindo sexo a fases esporofíticas (Cocucci e Mariath 1995). Como o termo é utilizado na literatura, indistintamente, para qualquer falha no desenvolvimento da antera e do grão de pólen, adotaremos no presente trabalho o termo ‘esterilidade estaminal’ para falhas nos estádios iniciais da

androsporogênese e ‘esterilidade do pólen’ para falhas em estádios posteriores à formação da esporoderme.

A detecção e investigação da esterilidade estaminal em plantas, comestíveis e medicinais, são de suma importância, pois elas auxiliam no melhoramento vegetal, já que são naturalmente livres de autopolinização e, portanto, mais facilmente manipuláveis em experimentos de sistema reprodutivo para a produção de linhagens com determinada característica de interesse (Bhat *et al.* 2005).

O estudo da androsporogênese e androgametogênese em casos de esterilidade estaminal consegue determinar o estágio em que cessa o desenvolvimento do esporo (na fase esporofítica) ou do grão de pólen (na fase gametofítica). Além disso, permite, aliado a ferramentas da citogenética, imunocitoquímica e microscopia eletrônica de transmissão, inferir sobre as causas desta falha. Uma vez identificado o estágio crítico para a ocorrência da esterilidade estaminal, estudos de biologia molecular podem ser realizados para detectar os genes envolvidos na expressão da esterilidade. Estudos embriológicos para a investigação da esterilidade estaminal são comuns em plantas comestíveis de larga comercialização como soja, trigo, arroz, feijão e milho e pouco estudadas em plantas medicinais utilizadas na indústria fitoterapêutica.

A formação de estaminódios é causada por diferentes eventos embriológicos, motivados por fatores ambientais e genéticos igualmente diversos. Em cada estágio de desenvolvimento embriológico, diferentes genes atuam e suas falhas podem levar ao mesmo resultado: a esterilidade do estame e do pólen. Mutantes *bam1* e *bam2*, de *Arabidopsis*, não desenvolvem endotécio, camada média e células do tapete, e as células-mães de andrósporos, por sua vez, degeneram antes da meiose (Hord *et al.* 2006). Muitos casos de esterilidade estaminal estão relacionados a problemas do tapete. A função do

tapete está relacionada à síntese de enzimas necessárias para a separação dos andrósporos da tétrade, bem como à nutrição dos grãos de pólen (Goldberg *et al.* 1993). A degeneração do tapete ocorre normalmente nos estádios tardios do desenvolvimento do grão de pólen e tem sido considerado como um processo de morte celular programada ou apoptose (Papini *et al.* 1999; Li *et al.* 2006). Entretanto, a apoptose, precoce ou tardia, leva a eventos de esterilidade estaminal como em arroz (*Oriza sativa* L.) cuja degradação do tapete é tardia, obliterando o lóculo da antera e causando colapso dos andrósporos (Li *et al.* 2006). Já no mutante BR 97-17971, de *G. max*, ocorre a degeneração precoce do tapete, na telófase II da meiose, com ausência ou falha da citocinese da célula-mãe de andrósporo, formando um cenócito, ou por vezes, uma tétrade com alguns andrósporos degenerados (Bione *et al.* 2002).

Outro evento relacionado ao tapete é a vacuolação anormal das células tapetais em *Bidens cervicata* Sherff. (Asteraceae) que leva à desintegração do tecido esporogênico (Sun & Ganders 1987).

No caso do milho (*Zea maiz* L., Poaceae), mutantes para os genes *ms 23* e *ms 32* apresentaram divisões periclinais na camada do tapete seguido da sua não-diferenciação, ocasionando a morte celular do tecido esporogênico na prófase I da meiose (Chaubal *et al.* 2000). Em *Helianthus annus* L. (Asteraceae) ocorre divisões periclinais desordenadas do tapete, mostrando sinais de desorganização nas organelas e na parede celular, com isso, as tétrades de andrósporos se desintegram (Horner Jr. 1977).

Problemas na formação da tétrade de andrósporos também levam à esterilidade. Em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L., Leguminosae), ocorre abortos no estágio de tétrade devido à conexões citoplasmáticas que são mantidas entre os andrósporos, indicando citocinese incompleta ou aberrante (Johns *et al.* 1998). Um mutante da linhagem



6492 de *Arabidopsis* (Brassicaceae), apresenta no estágio de tetrade, oito micrósporos envolvidos por calose (Peirson *et al.* 1996). Dois outros mutantes (linhagens 7219 e 7593) apresentam tétrades de micrósporos de diferentes tamanhos com falhas na produção de calose e no desenvolvimento de vacúolos, bem como, cenócitos multinucleados ao invés de tétrades, envolvidos pela parede da célula-mãe de andrósporo (Peirson *et al.* 1996). Distúrbios na síntese e degradação de calose e no ‘timing’ em que ocorrem esses processos levam à esterilidade. O mutante ms 32 de *Arabidopsis* apresenta degradação precoce de calose logo após a meiose devido à formação, no mesmo estágio, de grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso nas células tapetais, provável responsável pela síntese e, ou, secreção de calose no lóculo da antera (Fei & Sawhney 1999). Já no mutante para o gene *cals5*, da mesma espécie, a deposição de calose é quase nula na célula-mãe de andrósporo e na tetrade, causando a degeneração dos andrósporos (Dong *et al.* 2005).

Uma vez formadas as tétrades de andrósporos, existem casos em que os andrósporos interrompem seu desenvolvimento nesse estágio. Em *Allium schoenoprasum*, dois mutantes para esterilidade estaminal (*wi* e *st1*) não apresentam dissolução da calose após a formação das tétrades de micrósporos, ocasionando a não-deposição de esporopolenina (Engelke *et al.* 2002).

Aborto de grãos de pólen também pode ocorrer na fase de desenvolvimento da esporoderme. O mutante *nefl* de *Arabidopsis thaliana* apresenta grãos de pólen com primexina e esporoderme sem esporopolenina, sintetizada e acumulada no lóculo da antera (Ariizumi *et al.* 2004). Em mutantes *cesa1* e *-6* de *Arabidopsis*, a deficiência na síntese de celulose na esporoderme leva ao aborto do grão de pólen (Persson *et al.* 2007). Mutantes *rip1* de *Oryza sativa* desenvolveram grãos de pólen estéreis devido ausência na formação da intina (Han *et al.* 2006).

Ainda em *Oryza sativa*, a presença de grãos de pólen vazios é resultante de interações alélicas dos loci *S-a*, *S-b* e *S-c* que levam a anormalidades na migração do núcleo do andrósporo para a periferia celular, onde ocorre a mitose assimétrica e conseqüente formação das células vegetativa e generativa (Zhang *et al.* 2006). Neste mesmo trabalho, grãos de pólen corados, porém inviáveis, estão relacionados à falhas na migração da célula generativa, e do núcleo da vegetativa, para o centro do pólen, bem como falhas na formação das células espermáticas (Zhang *et al.* 2006). Em *Arabidopsis*, o andrófito bicelular entra em morte celular programada, após deficiência na divisão da célula generativa para formação das células espermáticas, causada pela falta da enzima chave ‘Serine Palmitoyltransferase’ (Teng *et al.* 2008).

A síntese de substâncias de reserva é um evento crítico para o desenvolvimento do andrófito. A síntese e o acúmulo do amido foram investigadas em andrófitos de *O. sativa* e seis genes que atuam na via metabólica sacarose-amido foram identificados (*Rsus*, *OSINV2*, *OsPGM*, *OsUGP*, *OsAGPL3* e *OsSSI*), mutantes para esses genes são deficientes na produção de amiloplastos e constituem uma classe estéril denominada tipo HL (Kong *et al.* 2008).

Esporófitos de *Arabidopsis* recessivos para o gene (*atatg6/atatg6*) desenvolvem andrófitos com morfologicamente típicos, porém, incapazes de emitir tubo polínico (Fujiki *et al.* 2007). Já os transgênicos de *Brassica campestris*, desprovidos do gene *BcMF2*, apresentaram, na esporoderme, a proporção péctica da exintina superdesenvolvida e da endintina subdesenvolvida, ocasionando crescimento *in vitro* de tubos polínicos em formato de balões (Huang *et al.* 2009).

Quando há o pleno desenvolvimento do andrófito, e subsequente germinação do tubo polínico, o processo sexual ocorre com a fecundação das células espermáticas

(gametas masculinos) com a oosfera e a célula média (gametas femininos), sendo que a segunda fecundação descrita, da fusão do núcleo da célula espermática com os núcleos polares da célula média, gera o endosperma da semente (Nawashin 1898). O endosperma é denominado por Trelease (1916) de embrião xenófito, e considerado uma geração acessória se comparada às gerações gametofíticas e esporofíticas (Cocucci 1969; Cocucci & Mariath 1995). O endosperma é uma estrutura dramaticamente modificada na sua forma e função originais, ou seja, a fecundação que dá origem ao endosperma em angiospermas, tem seu equivalente na formação do embrião diplóide supranumerário em Gnetales (veja revisão de Friedman & Williams 2004). O elo de ligação do processo evolutivo do endosperma triplóide, a partir do embrião supranumerário diplóide, foi, em grande parte, identificada com o endosperma diplóide da angiosperma basal *Nuphar polysepalum* (Williams & Friedman 2002).

Devido a falta de mobilidade do gametófito feminino (ou saco embrionário), as plantas com semente podem ser interpretadas, em primeira instância, como organismos que realizam cruzamentos passivos e aceitam quaisquer gametas masculinos, indiscriminadamente (Carlson *et al.* 2009). Grãos de pólen (ou gametófitos masculinos) incompatíveis têm sua germinação bloqueada quando pertencem a uma espécie diferente, ou quando pertencem a mesma flor, e esta, está programada para a polinização cruzada (Carlson *et al.* 2009). As reações de auto-incompatibilidade, dos diferentes tipos (esporofíticas, gametofíticas e ‘de ação tardia’), já foram intensamente estudadas (Gibbs 1993; Nettancourt 1997; Wheeler *et al.* 2001; Nasrallah 2002; Hiscock e Tabah 2003; Bittencourt *et al.* 2003; Kermicle e Evans 2005; Takayama e Isogai 2005; Hua *et al.* 2008; Kay & Schemske 2008). Entretanto, variações em polinizações compatíveis, tais como competição entre tubos polínicos, são menos conhecidas nas escalas celular e molecular, e

esses cruzamentos ditos ‘não-aleatórios’ são de particular interesse, pois resultam em seleção sexual (Carlson *et al.* 2009). Todavia, espécies que executam auto-polinização estão sujeitas à depressão endogâmica, que consiste na redução do sucesso reprodutivo em cruzamentos com indivíduos geneticamente aparentados. Mecanismos que evitem a depressão endogâmica, como a hercogamia, são considerados forças direcionadoras para a evolução da morfologia floral e dos sistemas reprodutivos (Darwin 1877; Charlesworth e Charlesworth 1987; Richards 1997; Barrett 2003).

A hercogamia consiste na separação espacial da apresentação e da recepção de pólen em flores, e entre flores, do mesmo esporófito, enquanto que a dicogamia consiste na separação temporal entre o pleno desenvolvimento do pólen e do saco embrionário na flor, e entre flores, do mesmo esporófito (Webb e Lloyd 1986). O termo hercogamia é utilizado de forma generalizada para descrever flores perfeitas entomófilas nas quais a auto-polinização é evitada por significativa separação espacial entre pólen e estigma, entretanto é classificada em diferentes graus, descritos a seguir: **hercogamia homomórfica**, na qual todas as flores de uma espécie são iguais e perfeitas, ou seja, sem polimorfismo floral; **hercogamia recíproca**, com a presença de dois ou mais morfos florais perfeitos, com posição recíproca de estigmas e anteras, também denominada de heterostilia; e, **hercogamia interfloral**, quando estames e pistilos estão separados em flores diferentes de um mesmo indivíduo (Webb e Lloyd 1986; Endress 1994).

Segundo Medrano *et al.* (2005), de fato, existem evidências de uma relação positiva entre o grau de hercogamia e a taxa de polinização cruzada, descritos em inúmeros trabalhos (Breese 1959; Karron *et al.* 1997; Brunet e Eckert 1998; Motten e Stone 2000). Entretanto, há casos de espécies que possuem consideráveis variações na separação espacial

de anteras e estigmas, mas são auto-compatíveis, e geram uma progênie que sobrevive até a maturidade (Medrano *et al.* 2005).

A despeito das bem conhecidas vantagens da reprodução sexual para transmissão das características hereditárias, as plantas também desenvolveram várias estratégias para a propagação da sua progênie sem envolver o sexo (Raghavan 1997).

O termo apomixia era utilizado no início do século passado para designar todas as formas de reprodução assexuada, mas tem sido frequentemente utilizado em um sentido mais restrito, para conceituar processos de reprodução assexuada que ocorrem no âmbito do rudimento seminal e levam à formação de sementes (Raghavan 1997; Koltunow e Grossniklaus 2003). Apomixia em plantas pode ser definida como a formação assexuada de sementes através de tecidos originários no rudimento seminal, sejam eles de origem esporofítica ou gametofítica (Koltunow 1993; Koltunow e Grossniklaus 2003). Ela se desenvolve na ausência de fecundação, gerando embriões portando apenas o genótipo parental materno (Raghavan 1997; Koltunow e Grossniklaus 2003).

As configurações de sacos embrionários de espécies apomíticas e sexualmente reprodutoras são idênticas, entretanto, a origem dessas estruturas é diversa (Grossniklaus *et al.* 2001). Baseados nisso, os estudos de ginosporogênese e ginogametogênese são de suma importância para a caracterização da apomixia, e tal como nos estudos de esterilidade estaminal, fornece informações sobre estádios e processos nos quais ocorre a apomixia que, posteriormente, serão investigados à luz da biologia molecular, para a detecção das causas genéticas destes processos.

A apomixia é valiosa para a agricultura porque ela pode fixar o vigor híbrido, produzindo sementes híbridas de forma mais econômica (Koltunow *et al.* 1998). Segundo Bhat *et al.* (2005) a introdução de indivíduos apomíticos em plantações contendo

indivíduos de origem sexuada é tão revolucionária que justifica o sustentado esforço científico internacional, seu impacto na agricultura pode ser profundo e seu escopo extremamente grande, incluindo: (a) fixação genética imediata de qualquer planta desejada; (b) revolução nos procedimentos de semeadura ou produção de sementes, movendo de estratégias baseadas em grupos de indivíduos para estratégias baseadas em plantas individuais; (c) preparação de cultivares híbridos para cada espécie do campo, facilitando o desenvolvimento, a produção de biomassa e a manutenção de linhagens parentais elites e seus derivados híbridos; (d) substituição de sementes artificiais e outras propagações vegetativas; (e) produção de plantas ambientalmente protegidas de transferência horizontal de genes ou caracteres transgênicos entre populações vizinhas, através da introdução de indivíduos apomíticos autônomos, em variedades com esterilidade estaminal.

Apomixia ocorre, de forma homoplásica, em mais de 40 famílias, a partir de diferentes ancestrais sexuados (Koltunow *et al.* 1998; Grossniklaus *et al.* 2001). Reprodução sexuada e apomixia não são mutuamente exclusivas e ambos os processos ocorrem em paralelo na maioria dos casos, com a produção de uma prole apomítica e sexuada (Raghavan 1997; Grossniklaus *et al.* 2001). Devido a essa inter-relação, a apomixia tem sido interpretada como uma desregulação da reprodução sexuada no tempo e no espaço (Grossniklaus *et al.* 2001; Koltunow e Grossniklaus 2003).

Baseada na origem das células das quais se desenvolvem os embriões apomíticos, a apomixia é classificada em três mecanismos principais: embrionia adventícia, aposporia e diplosporia (Koltunow e Grossniklaus 2003; Bhat *et al.* 2005). A embrionia adventícia consiste na formação de embriões a partir de células do rudimento seminal que iniciam seu desenvolvimento na maturidade do saco embrionário (Koltunow e Grossniklaus 2003). Trata-se de uma apomixia relacionada com a formação de embriões, geralmente diplóides,

a partir de células do esporófito (Bhat *et al.* 2005). A aposporia e a diplosporia são tipos de apomixia gametofítica e relacionadas a plantas poliplóides (Bhat *et al.* 2005). A apomixia gametofítica está relacionada a apomeiose (Nogler 1984). No tipo apospórico, as células do nucelo, por mitose, desenvolvem diretamente em um saco embrionário não-reduzido (Nogler 1984). Na diplosporia, a célula-mãe de ginósporo não realiza meiose e forma um saco embrionário por mitoses, com todas as células não-reduzidas distribuídas da mesma forma que um ginófito de origem meiótica (Nogler 1984). A ocorrência simultânea de mais de um tipo de apomixia é chamada de apomixia mista (Koltunow e Grossniklaus 2003).

A origem do embrião xenofítico ou endosperma dá-se de forma autônoma ou pela fecundação dupla do ginófito cujo endosperma formado nutre tanto o embrião de origem sexual quanto os embriões de origem apomítica, no caso da embrionia adventícia (Koltunow e Grossniklaus 2003). O desenvolvimento autônomo do endosperma também ocorre embora seja um evento raro em angiospermas (Koltunow e Grossniklaus 2003).

A grande maioria das espécies apomíticas são poliplóides em vários graus (Kumar 2006). Alguns poliplóides, devido a problemas meióticos, podem ter pólen estéril, e a apomixia torna-se um sistema de reprodução relevante na ausência do gametófito masculino viável, uma vez que desenvolve sementes com embriões viáveis, sem fecundação (Richards 1997).

## **1.2. O gênero *Valeriana***

### **1.2.1. Sistemática e distribuição geográfica**

Valerianaceae Batsch compreende de 8 a 14 gêneros e, aproximadamente, 350 espécies distribuídas, em sua maioria, no hemisfério norte e na América do Sul, onde a maior diversificação ocorre nos Andes (Xena de Enrech 1993; Sobral 1999; Hidalgo *et al.*

2004; Bell e Donoghue 2005). O gênero *Valeriana* L. é o mais abundante, com 200 espécies (Hidalgo *et al.* 2004). Trata-se do único gênero da família Valerianaceae existente no Brasil (Barroso *et al.* 1991). É dividido em dois subgêneros, *Porteria* e *Phyllactis*, e no último está incluída a espécie, do presente estudo, *V. scandens* (Eriksen 1989). Uma dos caracteres diagnósticos do sub-gênero *Phyllactis* é a presença, no estágio maduro, de anteras biloculadas, ao passo que *Porteria* possui anteras tetralobuladas (Eriksen 1989). No Brasil ocorrem 17 espécies, a maioria delas são ervas da região dos Campos de Cima da Serra no estado do Rio Grande do Sul (Sobral 1999; von Poser *et al.* 2004).<sup>2</sup>

De acordo com APG III (2009) *Valeriana* pertence à Caprifoliaceae Juss. (1789) nom. cons., que posiciona-se na Ordem Dipsacales, em Asterids, Campanulids relacionado com Aquifoliales, Escalloniales, Asterales, Paracryphiales, Apiales e Bruniales.

Em Cronquist (1981), a ordem Dipsacales abarca as famílias Valerianaceae, Caprifoliaceae, Dipsacaceae, Adoxaceae e Morinaceae. No APG III (2009), Valerianaceae, Dipsacaceae, Diervillaceae, Linnaeaceae e Morinaceae estão reunidos em Caprifoliaceae.

As espécies de *Valeriana* possuem como características diagnósticas, flores simpétalas, fortemente assimétricas ou com simetria bilateral, ovário ínfero, tricarpelar com apenas um carpelo fértil na maturidade e placentação do tipo apical, além de frutos do tipo aquênio e ausência de endosperma (Eriksen 1989). A família exibe considerável diversidade na morfologia da flor e do fruto (Bell e Donoghue 2005).

O gênero de hábito predominantemente herbáceo, sendo que algumas espécies arbustivas ou trepadeiras; filotaxia oposta e sem presença de estípulas ou gavinhas no caso das espécies trepadeiras; flor pouco vistosa, entomófila, perfeita ou imperfeita pistilada e

---

<sup>2</sup> Aquênio este, denominado cipsela, resultado do desenvolvimento de um fruto de ovário ínfero. Os aquênios verdadeiros seriam àqueles derivados de ovário súpero (nota da autora).



estaminada; cálice modificado em *pappus* em algumas espécies; corola pentalobada, gibosa; nectário formado por tricomas secretores da epiderme interna da corola; androceu trímero, epipétalo, antera biloculada ou tetraloculada, com deiscência rimosa, estaminódios eventualmente presentes em flores pistiladas; estilete cilíndrico, trifido, com estigma terminal; fruto seco, elíptico, biconvexo, marrom (Wagenitz e Leins 1982; Gütlein e Weberling 1986; Eriksen 1989; Xena de Enrech 1993; Sobral 1999; Duarte-Silva 2006). Baseado em observações de campo e espécimes de herbário, a fenologia de floração ocorre de agosto a janeiro nas regiões tropicais brasileiras, com pico de floração em outubro (Duarte-Silva 2006).

*Valeriana* possui espécies medicinais com ação calmante, dentre elas, *Valeriana officinalis*, espécie euroasiática da qual são produzidos fitoterápicos comercializados no Brasil e exterior (von Poser *et al.* 2004). Não há medicamentos produzidos a partir de valerianas brasileiras. Entretanto, estudos fitoquímicos com espécies nativas revelam que algumas delas, como *V. glechomifolia* Meyer possuem maior concentração de valepotriatos que *V. officinalis* L. (von Poser *et al.* 2004). Embora o princípio ativo das valerianas seja atribuído aos flavonóides, espécies com altos teores de valepotriatos possuem alta eficiência farmacológica (Xena de Enrech 1993). Estudos sobre ecologia de polinização e de reprodução das espécies do gênero, potencialmente medicinais, são escassos, correspondendo a menos de 5% dos estudos realizados sobre *Valeriana*. Ao mesmo tempo, tais trabalhos são imprescindíveis para avaliar o estado de conservação e o risco de extinção das mesmas.

### 1.2.2. Esporogênese, gametogênese e embriogênese de *Valeriana*

Os estudos embriológicos existentes foram realizados com espécies de *Valeriana* e outros gêneros de Valerianaceae do hemisfério Norte (Asplund 1920). Com relação às espécies sul-americanas, que constituem grande parte da diversidade do gênero, não existem estudos.

Análises realizadas em *Valeriana*, destacam o desenvolvimento do androceu bem precoce, ocorrendo simultaneamente ou logo após o desenvolvimento da corola (Asplund 1920). As anteras são biloculadas e bisporangiadas no sub-gênero *Phillactis*, onde está posicionada *V. scandens* (Xena de Enrech 1993; Bell e Donoghue 2005). As células arqueosporiais originam-se da camada subdérmica (Asplund 1920) e a origem dos estratos parietais da antera é do tipo Dicotiledôneo de acordo com a classificação de Davis (1966). A diferenciação final dos estratos parietais da antera formam a epiderme, o endotécio fibroso, uma camada media efêmera e o tapete amebóide (Asplund 1920). Em *Valeriana officinalis*, o tapete multinucleado se desenvolve através de 3 mitoses, sendo octonucleado em células grandes ( $2n \times 8$ ), bem como, tetranucleado em células menores, devido à núcleos de restituições ou fusões de fusos, durante a anáfase (Skalinska 1958; D'Amato 1984). A androsporogênese é simultânea em *V. supina* Ard. (Asplund 1920). As tétrades de andrósporos são tetraédricas (Asplund 1920; Shugaeva 1979; Xena de Enrech 1993). Os andrósporos dão origem a um grão de pólen tricelular no momento da dispersão (Asplund 1920). O grão-de-pólen é tricolporado, tectado e microequinado (Xena de Enrech 1993).

O rudimento seminal de *Valeriana* é anátropo, unitegumentado e tenuinucelado (Asplund 1920; Johri *et al.* 1992). Duas a três células subepidérmicas do nucelo se diferenciam nas células arqueosporiais (Asplund 1920). Em espécies de Valerianaceae, células do parênquima tegumentar adjacentes ao endotécio do tapete tegumentar, sintetizam

e secretam substâncias mucilaginosas resultantes da ativação dos dictiossomos, vacuolação do citoplasma, desaparecimento de amido e gradual degeneração do citoplasma (Batygina 2002). As paredes celulares são de natureza celulósica, positivas à reação de cloreto de zinco iodado (Asplund 1920). A formação do saco embrionário em Valerianaceae é de origem monospórica, exceto em *Valeriana nitida* que é de origem tetraspórica (Asplund 1920). No saco embrionário maduro, os núcleos polares fundem-se antes da fecundação, formando um núcleo secundário, e as antípodas são persistentes, ainda durante a primeira divisão do endosperma (Asplund 1920).

Na região próxima à micrópila, do rudimento anátropo, a epiderme do funículo é papilosa, com células semelhantes à encontrada na giba da corola (Asplund 1920). Essas células constituem tricomas nectaríferos unicelulares, capitados, formados por uma ‘base’ (porção proximal, mais estreita e inserida na epiderme) e uma ‘cabeça’ (porção distal alargada) apresentando projeções labirínticas da parede celular, na face secretora (Duarte-Silva 2006).

Após a fecundação o número de camadas de células do tegumento se reduz a apenas uma, constituindo a testa da semente (Asplund 1920). A embriogênese é do tipo Asteráceo, o endosperma é celular, a semente é exalbuminosa e contém um embrião estreito (Asplund 1920; Johri *et al.* 1992).

### 1.2.3 A espécie *Valeriana scandens*

*V. scandens* é a espécie de mais ampla distribuição do gênero no Neotrópico, ocorrendo no estado da Florida (EUA), México, América Central e Antilhas, e América do Sul, nos Andes e Brasil (Xena de Enrech 1993). Na Floresta Atlântica, *V. scandens* ocorre do sudeste de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul em zonas tropicais de altitude e

subtropicais (von Poser *et al.* 2004). Segundo observações de espécimes de herbário (VIC, MBM e ICN) suas populações distribuem-se em Florestas Ombrófila Densa, Estacional semi-decidual e Ombrófila Mista com Araucárias (Duarte-Silva 2006).

*Valeriana scandens* é uma trepadeira com caule fistuloso, entre-nós alongados, heterofilia, possuindo folhas de simples a tripartidas, com ápice cordado e base aguda. As flores são de cor branca a creme, e são inconspícuas (0,9 – 2 mm de comprimento) (Sobral 1999). Em população estudada do sudeste brasileiro, foram encontrados 3 morfos denominados de *flor pistilada 1*, *flor pistilada 2*, e *flor perfeita* (Duarte-Silva 2006). A *flor pistilada 1* possui corola branca, gibosa; a giba localiza-se na porção proximal do tubo floral e é pouco proeminente se comparada à dos demais morfos; a corola possui tamanho intermediário em relação aos demais morfos e lobos radiais na antese; as anteras são pequenas, exertas, sem pólen e o estilete longo e exerto; no óvulo, o saco embrionário é estruturalmente normal, semelhante aos demais morfos; a *pistilada 2* possui corola branca, pequena, gibosa e com lobos radiais na antese; as anteras são de tamanho intermediário em relação aos demais morfos, exertas e com pólen inviável; o estilete é curto e exerto; a *perfeita* possui corola creme, maior que as demais, com giba proeminente, lobos reflexos na antese; as anteras são exertas, maiores que as demais, com pólen viável; o estilete é curto e incluso. Nos morfos, os nectários são formados por tricomas secretores unicelulares situados na epiderme da face interna da giba e suas sementes são viáveis. As flores *pistilada 2* e *perfeita*, apresentam um septo que isola a giba do restante do tubo, formando uma câmara nectarífera (Duarte-Silva 2006). As flores perfeitas e pistiladas foram encontradas tanto em indivíduos separados quanto no mesmo indivíduo (Duarte-Silva 2006).

*V. scandens* possui três variedades, *V. scandens* var. *scandens*, *V. scandens* var. *candolleana* (Gard.) Muell., e *V. scandens* var. *subcordata*, distintas pela distribuição geográfica, morfologia foliar e ploidia. *V. scandens* var. *scandens* ocorre no estado da Florida (EUA), Antilhas Maiores, América Central, Venezuela e Brasil, sua ploidia é  $2n=28$ , para amostra procedente do Brasil, suas folhas são tripartidas; *V. scandens* var. *candolleana*, ocorre no México, América Central Antilhas Maiores, Venezuela, Colômbia, Equador e Peru, poliplóide em relação à anterior com  $2n=56$ , para amostra procedente da Colômbia, suas folhas são simples, ovado-cordadas com margem serrada ou dentada; a terceira variedade, *V. scandens* var. *subcordata*, tem registro de ocorrência restrito à Venezuela e ao norte do Brasil, e não teve sua ploidia analisada, e suas folhas são simples, cordadas, com margem inteira ou ligeiramente crenada (Xena de Enrech 1993). Essas variedades citadas acima foram descritas para a Flora de Valerianaceae da Venezuela, enquanto que no Brasil, os tratamentos taxonômicos não abordam descrições de variedades, tampouco, sua distribuição geográfica. Observações de herbários de espécimes coletados no Brasil apontam dados controversos aos encontrados por Xena de Enrech (1993). Observações dos herbários ICN e MBM apontam a presença do fenótipo *Valeriana scandens* var. *candolleana*, para o Rio Grande do Sul. Por sua vez, observações realizadas no herbário P, revelam a presença do fenótipo *Valeriana scandens* var. *subcordata* para a cidade do Rio de Janeiro, material coletado por Saint-Hilaire. Coletas de plantas com esse fenótipo também foram realizadas no sudeste de Minas Gerais em 2005 e depositadas no herbário VIC.

Estudos taxonômicos têm demonstrado que *Valeriana scandens* L. apresenta polimorfismo floral (Müller 1885; Xena de Enrech 1993; Sobral 1999). Müller (1885) considera as flores de *V. scandens* como “femininas” e “masculinas”, Xena de Enrech

(1993) como pistiladas e perfeitas. Duarte-Silva (2006) descreve a presença de estames e pistilos em todas as flores da espécie, sendo que nas flores perfeitas encontram-se anteras férteis e nas pistiladas, anteras sem grãos de pólen.

Além da identificação da presença de anteras não-funcionais em *V. scandens*, os trabalhos expostos acima revelam o conflito da terminologia de sexualidade em plantas. No caso de *V. scandens*, não se sabe a esporidade das flores tidas como pistiladas, já que não existem estudos da androsporogênese capazes de avaliar se há a formação de andrósporos em estádios imaturos da antera deste tipo floral.

A denominada ‘expressão sexual’ de *V. scandens* é discutida em vários trabalhos, com diferentes conclusões, sendo caracterizada como hermafrodita ou subpolígama por Müller (1885), ginodióica por Xena de Enrech (1993), monóica ou ginodióica por Sobral (1999). Duarte-Silva (2006) constatou a existência de ginodioicia-ginomonocia em uma população da espécie, ou seja, a presença de indivíduos portando somente flores pistiladas, indivíduos portando somente flores perfeitas e indivíduos portando flores pistiladas e perfeitas.<sup>3</sup>

Em relação à biologia reprodutiva de *V. scandens*, a produção de frutos com sementes viáveis é abundante em flores pistiladas e perfeitas embora seja pouco frequente a observação de visitantes florais em campo (Duarte-Silva 2006). Esse fato sugere a presença de reprodução apomítica nas flores pistiladas e/ou autopolinização nas flores perfeitas.

### **1.3. Objetivos**

Diante disso, o presente projeto visa investigar, do ponto de vista embriológico e citogenético, a esterilidade estaminal das flores pistiladas; realizar uma análise quantitativa

---

<sup>3</sup> Informacoes sobre a ‘expressao sexual’ de outras especies de *Valeriana*, ver Duarte-Silva (2006).

da viabilidade polínica dos estames férteis; investigar mecanismos de reprodução na espécie (auto-polinização, polinização cruzada ou apomixia), analisando a ginosporigênese, ginogametogênese, desenvolvimento da semente e alguns aspectos de biologia reprodutiva; e, contribuir na discussão terminológica da esporidade e sexualidade em angiospermas.

#### 1.4 Referências bibliográficas

Angenent GC, Colombo L (1996) Molecular control of ovule development. *Trends of Plant Science* 1:228–32

APG II. 2007. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. USA: Sinauer Associates. 3° ed.

APG III. 2009. Un update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of Linnean Society*. 161 (2): 105-202.

Ariizumi, T.; Hatakeyama, K.; Hinata, K.; Inatsugi, R.; Nishida, I.; Sato, S.; Kato, T.; Tabata, S.; Toriyama, K. 2004. Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39: 170-181

Asplund, E. 1920. Studien über die Entwicklungsgeschichte der Blüten einiger Valerianaceen. **Kungl. Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar** 61: 1- 66.

Backlund, A. A.; Moritz, T. 1998 Phylogenetic implications of the expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. **Biochemistry Systematic Ecology** 26: 309-335.

Barrett, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. **Nature Genetics** 3 (April): 274-284.

- Barret, S.C.H. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing selfing paradigm and beyond. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B** 358: 991–1004.
- Barroso, G. M.; Peixoto, A. L.; Costa, C. G.; Ichaso, C. L. F.; Guimarães, E. F.; Lima, H. C. 1991. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Volume 3. Viçosa: UFV.
- Bell, C. D.; Donogue M. J. 2005. Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. **Organisms, Diversity and Evolution** 5: 147-159.
- Bhat, V.; Dwivedi, K.K.; Khurana, J. P.; Sopory, S.K. 2005. Apomixis: An enigma with potencial applications. Special section: Embriology of flowering plants. **Current Science** 89 (10): 1879-1893.
- Bione, N. C. P.; Pagliarini, M. S.; Almeida, L. A.; Seifert, A. L. 2002. An ms2 male sterile, female-fertile soybean sharing phenotypic expression with other ms mutant. *Plant Breeding* 121: 307-313.
- Bittencourt, N.S.; Gibbs, P.E.; Semir J. 2003. Histological study of post-pollination events in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), a species with late-acting self-incompatibility. **Annals of Botany** 91: 827-834.
- Blanvillain, R.; Boavida, L.C.; McCormick, S.; Ow., D.W. 2008. *EXPORTIN1* genes are essential for development and function of the gametophytes in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics** 180: 1493-1500.
- Breese E.L. 1959. Selection for different degrees of out-breeding in *Nicotiana rustica*. **Annals of Botany** NS 23: 331-344.



- Brunet, J.; Eckert, C.G. 1998. Effects of floral morphology and display on outcrossing in blue columbine, *Aquilegia caerulea* (Ranunculaceae). **Functional Ecology** 12: 596-606.
- Camerarius, R. J. 1694. **De Sexu Plantarum Epistola**.
- Carlson, A.L.; Telligman M.; Swanson R.J. 2009. Incidence and post-pollination mating in *Arabidopsis thaliana*. **Sexual Plant Reproduction** *in press*.
- Charlesworth, D.; Charlesworth B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18: 237-268.
- Chaubal R.; Zanella C.; Trimnell M. R.; Fox T. W.; Albertsen M. C.; Bedinger P. 2000. Two male-sterile mutants of *Zea mays* (Poaceae) with an extra cell division in the anther wall. **American Journal of Botany** 87 (8): 1193-1201.
- Cocucci, A. E. 1969. El proceso sexual en angiospermas. **Kurtziana** 5: 407-423.
- Cocucci, A. E. 1973. Some suggestions on the evolution of gametophytes of higher plants. **Phytomorphology** 23: 109-124.
- Cocucci, A. E. 1980. Precisiones sobre la terminología sexológica aplicada a angiospermas. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica** 11 (1,2): 75-81.
- Cocucci, A.E.; Hunziker A.T. 1994. **Los ciclos biológicos en el reino vegetal**. Argentina: Academia Nacional de Ciencias. 2°ed. 99p.
- Cocucci, A. E.; Mariath, J. E. A. 1995. Sexualidade em plantas. **Ciência Hoje** 18 (106): 51-61.

- Cocucci, A.E. 2006. La embriologia e los sistemas reproductivos de Angiospermae. p.97-102. In: Mariath, J.E.A.; Santos, R.P. (org.) **Os Avanços da Botânica no início do século XXI**. 57° Congresso Nacional de Botânica. Sociedade Botânica do Brasil. 752p.
- Coen, E. S.; Meyerowitz, E.M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- Cronquist, A. 1981. **The evolution and classification of flowering plants**. Nova York: The New York Botanical Garden.
- Cruden R.W.; Lloyd R.M. 1995 Embryophytes have equivalent sexual phenotypes and breeding systems: why not a common terminology to describe them? **American Journal of Botany** 82: 816-825.
- Dafni A.; Firmage D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution** 222: 113-132.
- D'Amato F. 1984. Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. Chapter 11. In: Johri, B.M. **Embryology of Angiosperms**. Springer-Verlag. 830p.
- Darwin, C.R. 1877. **The different forms of flowers on plants of the same species**. Murray, London, UK.
- Davis, G.L. 1960. **Systematic Embriology of Angiosperms**. N. Y. John Wiley.
- Dong, X.; Zonglie, H.; Sivaramakrishnan, M.; Mahfouz, M.; Verma, P.S. 2005. Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. **The Plant Journal** 42: 315-328.
- Donoghue, M.J.; Bell, C.D.; Winkworth R.C. 2003. The evolution of reproductive characters in Dipsacales. **International Journal of Plant Sciences** 164 (5 Suppl.): S453-S464.

- Duarte-Silva, É. 2006. Morfologia floral e expressão sexual em *Valeriana scandens* L. (Valerianaceae). Universidade Federal de Viçosa-MG. Dissertação de mestrado.
- Endress, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press.
- Eriksen, B. 1989. Notes on generic and infrageneric delimitation on Valerianaceae. **Nordic Journal of Botany** 9(2): 179-187.
- Engelke, T.; Hülsmann, S.; Tatlioglu T. 2002. A comparative study of microsporogenesis and anther wall development in different types of genic and cytoplasmic male sterilities in chives. **Plant Breeding** 121: 254-258.
- Fei H.; Sawhney V. K. 1999. MS32-regulated timing of callose degradation during microsporogenesis in *Arabidopsis* is associated with the accumulation of staked rough ER in tapetal cells. **Sexual Plant Reproduction** 12 (3): 188-193.
- Friedman, W.E. 1995. Organismal duplication, inclusive fitness theory and altruism: Understanding the evolution of endosperm and the angiosperm reproductive syndrome. **Proceedings of National Academy of Sciences USA** 92: 3913-3917.
- Friedman, W.E.; Williams, J. 2004. Developmental evolution of the sexual process in ancient flowering plant lineages. **The Plant Cell** 16: S119-A132.
- Fujiki, Y.; Yoshimoto, K.; Ohsumi, Y. 2007. An *Arabidopsis* homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. **Plant Physiology** 143: 1132-1139.
- Gibbs, P.E.; Bianchi M. 1993. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta** 106(1): 64-71.
- Goldberg, R. B.; Beals, T.P.; Sanders, P. M. 1993. Anther development: Basic principles and practical applications. **The Plant Cell** 5: 1217-1229.

- Greyson, R.I. (1994). **The development of flowers**. Oxford University Press, Oxford.
- Grossniklaus, U.; Nogler G. A.; Dijk P. J. 2001. How to avoid sex. The genetic control of gametophytic apomixes. **The Plant Cell** 13: 1491-1498.
- Han M.; Jung K.; Yi G.; Lee D.; An G. 2006. *Rice immature pollen 1 (RIP1)* is a regulator of late pollen development. **Plant and cell physiology** 47(11):1457-1472.
- Hidalgo, O.; Garnatje, T.; Susanna, A.; Mathez, J. 2004. Phylogeny of Valerianaceae based on *matk* and ITS markers, with reference to *matk* individual polymorphism. **Annals of Botany** 93: 283-293.
- Hiscock, S.J.; Tabah, D.A. 2003. The different mechanisms of sporophytic self incompatibility. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 358:1037–1045
- Hofmeister, W. 1851. **Über Keimung und Fruchtbildung höherer Kryptog. usw.** Veg. Unters.
- Hord, C.L.H.; Chen C.; DeYoung B.J.; Clark S.E.; Ma H. 2006. The *BAMI/BAM2* receptor-like kinases are important regulators of early *Arabidopsis* anther development. **Plant Cell** 18, 1667– 1680.
- Horner Jr., H. T. 1977. A Comparative Light- And Electron-Microscopic Study of Microsporogenesis in Male-Fertile and Cytoplasmic Male-Sterile Sunflower (*Helianthus Annuus*) **American Journal of Botany** 64 (6):745-759.
- Hua, Z.H., Fields, A., Kao, T.H. 2008. Biochemical models for S-RNasebased self-incompatibility. **Molecular Plant** 1:575–585.
- Huang, L.; Cao, J.; Zhang, A.; Ye, Y.; Liu, T. 2009. The Polygalacturonase gene BcMF2 from *Brassica campestris* is associated with intine development. **Journal of Experimental Botany** 60: 301-313.

- Johns C.; Lu M.; Lyznik A.; Mackenzie S. 1998. A mitochondrial DNA sequences is associated with Abnormal Pollen Development in Cytoplasmic Male Sterile Bean Plants. **Genetics** (150): 383-391.
- Johri, B. M.; Ambegaokar, K.B; Srivastava, P.S., 1992. **Comparative embriology of angiosperms**. Volume 2. Berlin: Springer-Verlag.
- Kaplan, D.R.; Cooke T.J. 1996. The genius of Wilhelm Hofmeister: The origin of causal-analytical research plant development. **American Journal of Botany** 83(12): 1647-1660.
- Karron, J.D.; Jackson, R.T.; Thumser, N.N.; Schlicht, S.L. 1997. Outcrossing rates of individual *Mimulus ringens* genets are correlated with anther-stigma separation. **Heredity** 79: 242-370.
- Kaul, M.L.H. 1988. **Male sterility in higher plants**. Monographs on the theoretical and applied genetics, 10. Berlin, Alemanha: Springer-Verlag. 1005 p.
- Kay K.M., Schemske D.W. 2008. Natural selection reinforces speciation in a radiation of neotropical rainforest plants. **Evolution** 62: 2628–2642
- Kermicle J.L., Evans M.M.S. 2005. Pollen-pistil barriers to crossing in maize and teosinte result from incongruity rather than active rejection. **Sexual Plant Reproduction** 18:187–194.
- Koltunow, A. M. 1993. Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell** 5: 1425-1437.
- Koltunow A. M.; Johson S. D.; Bicknell R. A. 1998. Sexual and apomictic development in *Hieracium*. **Sexual Plant Reproduction** 11: 213-230.

- Koltunow A. M.; Grossniklaus U. 2003. Apomixis: a development perspective. **Annual Review Plant Biology** 54: 547- 574.
- Kumar, S. 2006. Apomixis revisited. **Current Science** 90 (3): 277-278.
- Li, N.; Da-Sheng, Z.; Hai-Sheng, L.; Xiao-xing L.; Wan-qi L.; Zheng, Y.; Huang-Wei C.; Wang J.; Tie-Qiao W.; Hai H.; Luo, D.; Hong, M.; Da-Bing Z. 2006. The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. **The Plant Cell** 18: 2999-3014.
- Linnaeus C. 1754. **Genera Plantarum. Historiae naturalis classica.** Vol. 3. Weinheim: H.R. Engelmann. 5° ed.
- Linné, C.1810. **Système sexuel des végétaux: suivant les classes, les orders, les genres et les espèces, avec les caractères et les differences.** Paris: Arthus-Bertrand. 2° ed.
- Medrano, M.; Herrera, C.M.; Barrett, S.C.H. 2005. Hercogamy and Mating Patterns in the Self-compatible Daffodil *Narcissus longispathus*. **Annals of Botany** 95: 1105-1111.
- Mitchell, C.H.; Diggle, P.K. 2005. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse development transitions. **American Journal of Botany** 92(7): 1068-1076.
- Motten, A.F.; Stone, J.L. 2000. Heritability of stigma position and the effect of stigma-anther separation on outcrossing in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). **American Journal of Botany** 87: 337-347.
- Muller, C.A. 1885. Valerianaceae. In: Martius, K.F.P. (Org.) **Flora Brasiliensis**, Monachii, 6: 339-350.
- Nasrallah, J.B. 2002. Recognition and rejection of self in plant reproduction. **Science** 296:305–308

- Nawaschin, S. 1898. Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilum martagon* und *Fritillaria tenella*. **Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petesburg** 377-382.
- Nettancourt D. 1997. Incompatibility in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction** 10:185–199
- Nogler, G.A. 1984. Gametophytic apomixis. In: In: Johri, B.M. **Embryology of Angiosperms**. Spring-Verlag. 830p.
- Nukhimovskii E.L.; Seminikhin, I.D. 1989. Biomorphology and embryogenesis of *Valeriana officinalis* L. cultivated in Moscow Oblast (Russian, SFSR, USSR). **Rastitel'Nye Resursy** 25: 16-32.
- Quammen, D.; Shimitz, H. June 2007. A passion for order. **National Geographic**. USA: National Geographic Society.
- Papini, A; Mosti, S.; Brighigna, L. 1999. Programmed-cell death events during tapetum development of angiosperms. **Protoplasma** 207: 213-221.
- Peirson, B. N.; Owen H. A.; Feldmann K. A.; Makaroff, C.A. 1996. Characterization of three male sterile mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibiting alterations in meiosis. **Sexual Plant Reproduction** 9 (1): 1-16.
- Raghavan, V. 1997. **Molecular Embriology of Angiosperms**. UK, Cambridge: Cambridge University Press.
- Richards, A.J. 1997. **Plant breeding systems**. UK: Chapman & Hall. 2° ed.
- Russel, S.D. 2003. Plant sexuality, cell expression and preferential fertilization. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica** 38 (3-24): 349-356.

- Shugaeva, E. V. 1972. Abnormalities of microsporogenesis in *Valeriana nitida* K.R. polyploids. **Soviet Genetics** **8(7)**:37-46.
- Shugaeva, E. V. 1979. Male sterility of *Valeriana officinalis* L.s.l. . **Soviet Genetics** **15 (1)**: 138-143.
- Silva, A.L.; Rech, S.B.; von Poser, G.L. 2002. Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to south Brazil, **Planta Medica** **68**: 570-573.
- Skalinska M. 1958. Studies in the karyological differentiation of the tapetum of *Valeriana officinalis* L. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica** **1**: 45-54.
- Smith M. B.; Palmer R. G.; Horner R. T. 2002. Microscopy of a cytoplasmic male-sterile from an interspecific cross between *Glycine max* and *G. soja* (Leguminosae). **American Journal of Botany** **89(3)**: 417-426.
- Sobral, M. 1999. Valerianaceae. **Boletim do Instituto de Biociências UFRGS, série Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul** **58**: 1-61.
- Southworth, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. **The Journal of Histochemistry and Citochemistry** **21 (1)**: 73-80.
- Stebbins, G.L. 1974. Flowering plants: **Evolution above species level**. USA, Cambridge: Harvard University Press.
- Sun M.; Ganders F.R. 1987. Microsporogenesis in male-sterile and hermaphroditic plants of nine gynodioecious taxa in Hawaiian *Bidens* (Asteraceae). **American Journal of Botany** **74(2)**: 209-217.
- Takayama, S.; Isogai, A. 2005. Self-incompatibility in plants. **Annual Review of Plant Biology** **56**:467–489.
- Teng C.; Dong H.; Shi L.; Deng Y.; Mu J.; Zhang J.; Yang X.; Zuo J. 2008. Serine



Palmitoyltransferase, a key enzyme for male gametophyte development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** 146: 1322- 1332.

Theissen, G.; Becker, A.; Winter, K.; Münser, T.; Kirchner, C.; Saedler, H. 2002. How the land plants learned their floral ABCs: the role of MADS-box genes in the evolutionary origin of flowers. In: Cronk, Q.C.B.; Bateman, R.M.; Hawkins, J.A. (eds.) *Developmental genetics and plant evolution*. London: Taylor & Francis.

Trelease, W. 1916. Two new terms cormophytaster and xeniophyte axiomatically fundamental in botany. **Proceedings of the American Philosophical Society** 55 (3): 237-242.

von Poser, G.L.; Rech S.B., Silva A.L., Sobral M. 2004. Valerianas brasileiras. Potencial terapêutico de espécies do sul do país. **Ciência Hoje** 32: 35-38.

Xena de Enrech, N. 1993. Contribución al estudio del género *Valeriana* en Venezuela: distribución geográfica, caracteres morfoanatomicos, cariologicos y palinologicos de interés taxonomico y evolutivo. **Acta Botanica Venezuelica** 16: 105-136.

Wagenitz, G. and Laing, B. 1984. Die Nektarien der Dipsacales und ihre systematische Bedeutung. **Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie** 104: 483-507.

Webb, C.J.; Lloyd, D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigma in angiosperms. II Herkogamy. **New Zealand Journal of Botany** 24: 163-178.

Wheeler M.J.; Franklin-Tong V.E.; Franklin F.C.H. 2001. The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. **New Phytologist** 151: 565-584.

Williams, J. H.; Friedman, W.E. 2002. Identification of diploid endosperm in an early

angiosperm lineage. **Nature** 415: 522-526.

Zhang Z.; Lu Y.; Liu X.; Feng J.; Zhang G. 2006. Cytological mechanism of pollen abortion resulting from allelic interaction of F1 pollen sterility locus in rice (*Oryza sativa* L.). **Genetica** 127: 295-302.

**Capítulo II - Developmental and cytogenetic  
analyses of pollen sterility in *Valeriana  
scandens* L.**

Artigo submetido a Revista Sexual Plant Reproduction

em 20 de agosto de 2009.

Aceito em 10 de dezembro de 2009.

## Developmental and cytogenetic analyses of pollen sterility in *Valeriana scandens* L.

Erica Duarte-Silva · André L. L. Vanzela ·  
Jorge E. A. Mariath

Received: 20 August 2009 / Accepted: 10 December 2009  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** *Valeriana scandens* presents perfect and pistillate flowers, the latter with sterile anthers. The species is composed of two varieties with different ploidy; *V. scandens* var. *scandens* ( $2n = 28$ ) and *V. scandens* var. *candolleana* ( $2n = 56$ ), both of which occur in RS, Brazil. Crosses between these varieties may give rise to hybrids with pollen sterility. In this study, we analyzed the microsporogenesis and microgametogenesis of sterile and fertile anthers, and also investigate whether pollen sterility is caused by an irregular meiotic process. Developmental analysis using light microscopy and scanning electron microscopy showed that sterile anthers develop similarly to fertile anthers until the end of meiosis. After this stage, sterile tetrads do not separate as a consequence of exine fusion between adjacent microspores, which is similar to sterile pollen of *Brassica ms-cd11* mutants. In addition, vacuolated immature pollen grains degenerate after separation. The cytogenetic analysis of the microspore mother cell (MMC) showed that the diploid population of *V. scandens* var. *scandens* ( $2n = 28$ ) has pollen sterility that is not caused by a cytogenetic disturbance. The MMCs analyzed from prophase I to tetrad stage showed a regular meiotic process, indicating the phenotype of *V. scandens*

sterile pollen is a postmeiotic process formed by fusion of exine between opposite microspores.

**Keywords** Anther development · Meiotic behavior · Pollen sterility · Tetrad release · *Valeriana*

### Introduction

*Valeriana* is widely known for use in producing phyto-medicines to reduce anxiety and insomnia, and to improve sleep quality (Xena de Enrech 1993). Considered the main genus of Valerianaceae (Dipsacales, Asteridae), *Valeriana* has been positioned as a genus derived from Caprifoliaceae (Dipsacales, Euasterids II) in a phylogenetic analysis based on morphological and molecular characters (Donoghue et al. 2001). It contains 200 species, distributed mainly in the mountainous regions of Eurasia and South America (Weberling 1970; Bell and Donoghue 2005). Although its center of origin is Asia, the present-day center of diversity is South America (Bell and Donoghue 2005). *Valeriana scandens* L. has the widest distribution in the genus on the American continent, from Florida (USA) to Argentina and Southern Brazil, and bears perfect and pistillate flowers, the latter with sterile anthers (Xena de Enrech 1993; Sobral 1999).

The inability of a plant to produce functional pollen grains is termed pollen sterility (Shivanna 2003). Pollen sterility occurs in a great part of gynodioecious species of *Valeriana* that often present pistillate flowers with sterile reduced anthers (Eriksen 1989). There are few studies on microsporogenesis and microgametogenesis of *Valeriana* (Asplund 1920; Shugaeva 1972, 1979). Microsporogenesis and microgametogenesis of European Valerianaceae species were described by Asplund (1920). However, pollen

Communicated by Scott Russell.

E. Duarte-Silva · J. E. A. Mariath (✉)  
LAVeg, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),  
Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil  
e-mail: jorge.mariath@ufrgs.br

A. L. L. Vanzela  
LaBRE, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências  
Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL),  
Londrina, PR 86051-990, Brazil

sterility was not investigated in gynodioecious species studied. Cytogenetic analysis was performed with experimental polyploids of *Valeriana nitida*, and disturbances were found in microsporogenesis, such as uni- or trivalents in almost all microspore mother cells that lead to 65% of irregular tetrads (Shugaeva 1972). In *Valeriana officinalis*, the anther of pistillate flowers presented senescence of sporogenic and tapetal cells during the premeiotic period of interphase and prophase I (Shugaeva 1979). Both cited species occur in the Northern Hemisphere (Shugaeva 1972, 1979). Microsporogenesis and microgametogenesis in South American valerians are unknown. Histological information about the androecium is restricted to mature anthers, which are biloculate in South American species and tetraloculate in Eurasian species (Eriksen 1989).

*Valeriana scandens* possesses three varieties with different ploidy levels: *V. scandens* var. *scandens* ( $2n = 28$ ) and *V. scandens* var. *candolleana* ( $2n = 56$ ). The latter is a polyploid of the first (Xena de Enrech 1993); the ploidy level of the third variety, *Valeriana* var. *subcordata* is unknown (Xena de Enrech 1993). Herbarium data (ICN, MBM) showed that varieties with polyploid and diploid phenotypes occur in Rio Grande do Sul state, South Brazil. Crosses between these varieties might occur, giving rise to hybrids with pollen sterility. This study analyzes the microsporogenesis and microgametogenesis of fertile and sterile anthers of a *V. scandens* population at Morro Santana Reserve, Porto Alegre-RS, South Brazil and examines whether pollen sterility is caused by a cytogenetic disturbance.

## Materials and methods

For developmental and cytogenetic analyses, flowers of *Valeriana scandens* at different stages were collected from 25 individuals at Morro Santana Reserve, Porto Alegre, RS, Southern Brazil, (30 04'22"S, 51 07'32"W), from August to December of 2006, 2007 and 2008. Voucher specimens (ICN 153433, 153434, 153435, 153436) were deposited in the ICN Herbarium, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

For developmental analysis, anthers were fixed in 2% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.8 (Gabriel 1982), dehydrated in ethanol and embedded in hydroxyethylmethacrylate (Gerrits and Smid 1983). Samples were sectioned at 1.5–4  $\mu\text{m}$  with a Zeiss Mikron microtome. Sections were stained with 0.05% toluidine blue O, pH 4.4 (Feder and O'Brien 1968) for observation using bright field microscopy. Callose was identified using aniline blue fluorescence (Martin 1959), using a 340–380-nm UV

filter and epifluorescence microscopy. The observations and digital photomicrographs were performed with a Leica DMR-HC microscope and a DFC500 digital camera. For scanning electron microscopy, the material was dehydrated in ethanol (Gersterberger and Leins 1978), critical point dried and sputter coated with gold. Observations and electron micrographs were made with a JEOL 5800 SEM at 20 kV.

For cytogenetic analysis, buds in premeiotic, meiotic and postmeiotic stages were fixed in an ethanol/acetic acid solution (3:1, v/v) for 1–12 h. Samples were digested for 40 min in 37°C, in a mixture of 20% (v/v) cellulase and hemicellulase and 20% (v/v) pectinase, and squashed in a drop of 45% acetic acid. The coverslip was removed after immersion in liquid nitrogen. Samples were hydrolyzed in a drop of 1 M HCl for 8 min at 37°C and stained with 1% acetic hematoxylin for 40 s. Observations and digital photomicrographs were made using a Leica DM-4500B microscope with a DFC350 digital camera.

## Results

Two different morphs are present in the sampled population of *V. scandens*. The first one develops only perfect flowers with fertile anthers, and the second exhibits perfect and pistillate flowers (Fig. 1a–d).

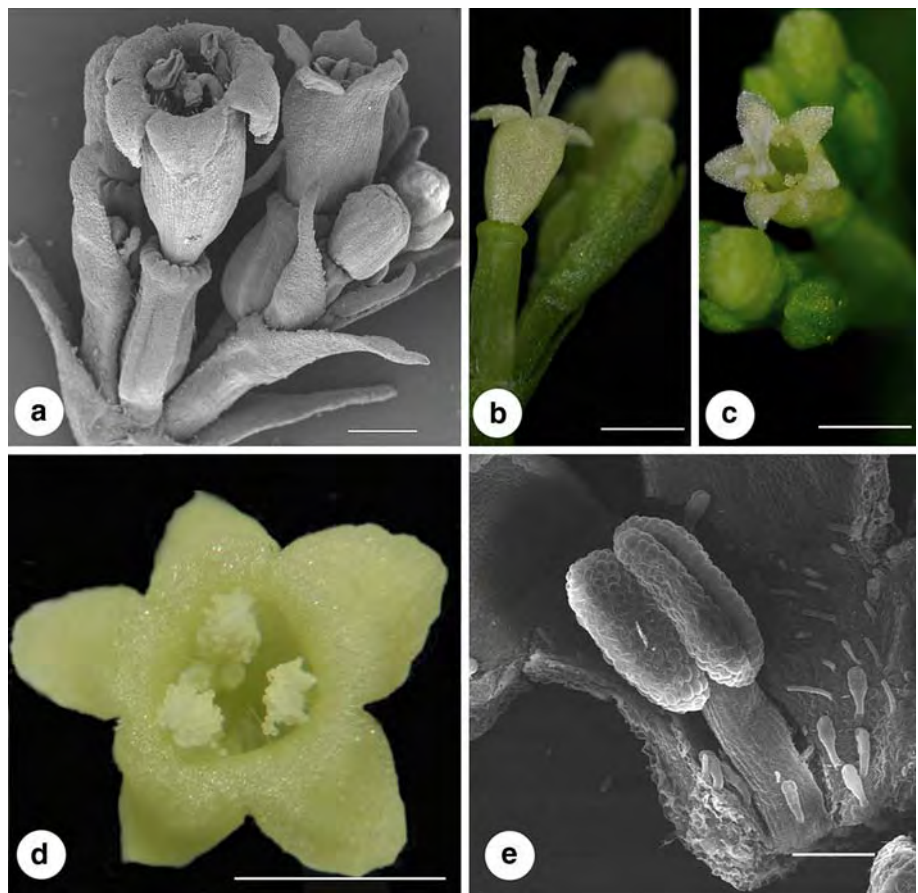
Androecia are trimerous, subexserted, with staminodia in pistillate flowers (Fig. 1c) and stamens in perfect ones (Fig. 1d). Stamens and staminodia present mature biloculate anthers with rimose dehiscence (Figs. 1e, 2a). In fertile anthers, pollen grains are released in monads (Fig. 2a, b). In sterile anthers, pollen grains are released in permanent tetrads (Fig. 2c, d). Adjacent pollen grains have their sporoderm fused near aperture regions (Fig. 2d).

We first examined microsporogenesis and microgametogenesis of fertile anthers for comparison with the development of sterile anthers.

### Microsporogenesis of fertile anthers

The final differentiation of anther parietal layers results in an epidermis, endothecium, a uniseriate middle layer and tapetum (Fig. 3a). During mitotic divisions of sporogenous tissue, the tapetal cells become binucleated (Fig. 3a). After this stage, tapetal cells enlarge and become vacuolated. At the same stage, the middle layer becomes suppressed (Fig. 3b). Sporogenous tissue cells differentiate into microspore mother cells (MMC) (Fig. 3b), which secrete callose around themselves, inside their pectin-rich cellulosic cell walls. At this stage, tapetal cells become tetranucleate and invade the

**Fig. 1** Floral morphs of *Valeriana scandens* from Reserva do Morro Santana, Porto Alegre-RS, Brazil. **a** The inflorescence exhibits perfect (left) and pistillate flowers (right), both at anthesis stage (SEM). **b** Pistillate flower. **c** Corolla tube apex of pistillate flower with staminodia. **d** Perfect flowers with stamen at tube corolla apex and include stigma. **e** Perfect flower stamen at pre-anthesis (SEM). Bars 500  $\mu$ m (Fig. 1a–d). Bars 100  $\mu$ m (Fig. 1e)



locule (Fig. 3c). The MMCs, surrounded by callose, give rise to tetrahedral tetrads of microspores (Fig. 3d, e). At this stage, the aperture regions, which appear to have a thinner callose wall, start to differentiate (Fig. 3e). The primexine wall develops inside the callose wall (Fig. 3f, g). After callose dissolution, sporopollenin is deposited onto the primexine matrix and differentiates into a tectate exine with microechinate ornamentation.

#### Microgametogenesis of fertile anthers

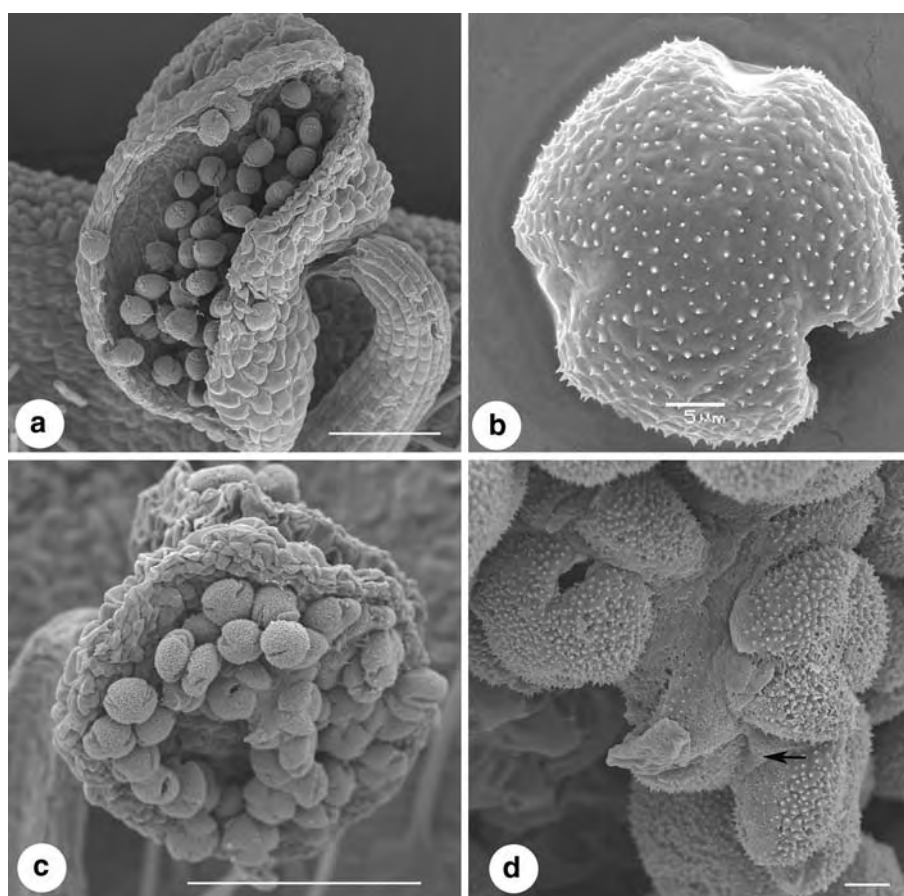
Immature pollen grains become vacuolated and after mitosis give rise to the vegetative and generative cells (Fig. 4a, b). At this stage, endothecium cells increase in thickness parietally and the tapetum senesces (Fig. 4a). In bicellular pollen, the large vacuole is converted into small vacuoles and soluble saccharides appear to be converted into starch grains (Fig. 4c). At this stage, a conspicuous sporoderm is formed by intine and exine (Fig. 4c, d). The exine is formed by an inner basal layer (nexine), columella, tectum and ornamentations (sexine) (Fig. 4b–e). The generative cell undergoes mitosis and gives rise to two elliptically shaped sperm cells (Fig. 4d, e). The mature anther is

biloculate (Fig. 4f). Often, pollen tube growth occurs inside the locule (Fig. 4g, h).

#### Microsporogenesis and microgametogenesis of sterile anthers

The final differentiation of parietal layers and sporogenous tissue in sterile anthers is identical to that in fertile anthers. In one observed specimen, the MMCs did not complete cytokinesis at end of meiosis, but developed into permanent tetrads with connecting regions (Fig. 5a, b). Microspores display deformed nuclei and dense cytoplasm containing starch grains, including in the connecting regions between tetrad cells (Fig. 5b). In most sterile anthers, the MMCs are surrounded by callose and give rise to microspores fused in the aperture regions (Fig. 5c). Sporopollenin deposition forms a continuous tectum between adjacent microspores of tetrad (Fig. 5c) and vacuolated immature pollen grains degenerate (Fig. 5d, e). At this stage, the formation of a coenocytic tapetum is observed (Fig. 5f). Immature pollen cytoplasm appears to become degraded (Fig. 5e, f); only the exine remains (Fig. 5g).

**Fig. 2** SEM analysis of anthers and pollen grains, fertile and sterile, of *Valeriana scandens*. **a** Fertile anther. **b** Fertile pollen grain, at polar view, showing microechinate ornamentation and three apertures (acetolyzed material). **c** Sterile anther. **d** Sterile pollen grains. The sporopollenin deposition forms a continuous tectum between adjacent pollen grains of tetrad, at aperture region (arrow). Bars 100  $\mu\text{m}$  (Fig. 2a, c). Bars 5  $\mu\text{m}$  (Fig. 2b, d)



### Cytogenetic analysis

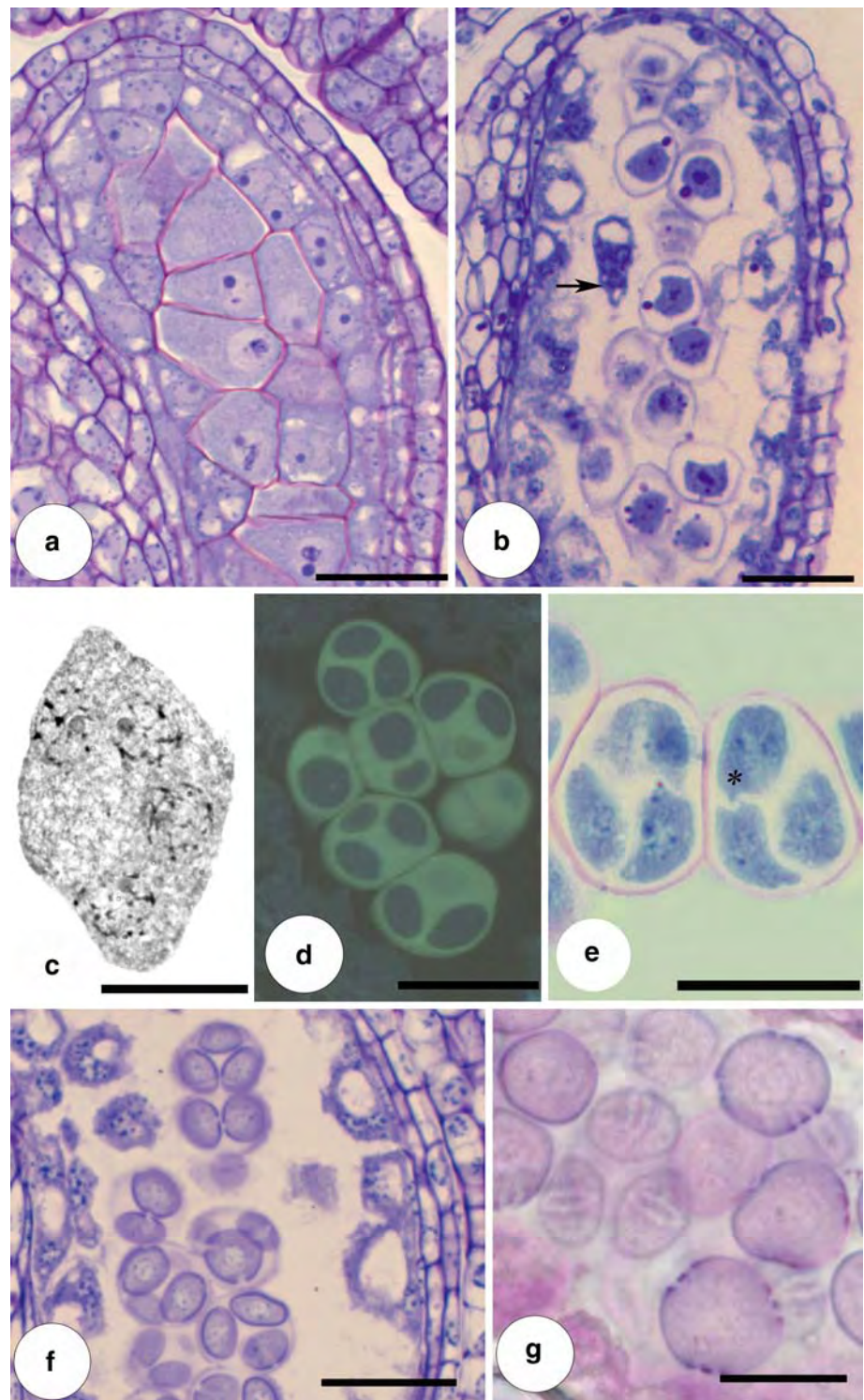
Cytogenetic characterization of fertile and sterile anthers was performed from meiosis until microspores tetrad formation (Fig. 6a–i). A total of 610 cells were analyzed for *V. scandens*: 143 in diakinesis, 126 in metaphase I, 7 in metaphase II, 22 in anaphase I, 20 in anaphase II, 27 in telophase I and 265 in telophase II. The chromosome number, counted in MMCs in diakinesis, revealed that the studied population is diploid ( $2n = 28$ ) belonging to *Valeriana scandens* var. *scandens*, without cytogenetic disturbance in fertile and sterile anthers. At the microspore mother cell stage, no chromosome migration was observed throughout the cytomeiotic channels. At diakinesis, just chromosome bivalents were observed (Fig. 6d). Only 3.97% MMCs observed in metaphase I showed a disturbance (Fig. 6e). There was regular chromosome segregation at anaphase I and II (Fig. 6f, h). At the tetrad stage, micronuclei were not observed (Fig. 6i), and cytokinesis was simultaneous. Uninucleate microspores were formed.

### Discussion

*Valeriana scandens* develops sterile anthers in an identical pattern to fertile anthers until the end of meiosis, but at this

stage immature pollen grains of sterile anthers start to display malformation, fusion of sporoderm and degeneration of cytoplasm. In angiosperms, pistillate flowers with sterile anthers evolved from perfect flowers many times during evolution (Mitchell and Diggle 2005). Pistillate flowers often form staminodia, vestigial structures that have been recognized as rudiments from the ancestral fertile anther (Mitchell and Diggle 2005). In flowering plants, the stamen fails at some stage of microsporogenesis or microgametogenesis, developing into staminodia (Kaul 1988; Shivanna 2003). This failure of stamen formation may result from meiotic disturbance, biochemical modification (e.g., activity and timing of callase activity), hormonal changes (gibberellin deficiency, high levels of cytokinins) or environmental factors, e.g., particularly temperature and photoperiod (Shivanna 2003). Based on these possibilities, there are multiple causes of pollen sterility that are widely discussed in the literature; however, the studied cases are based on few species that are of high economic value, particularly for the food industry, like *Glycine max*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Solanum lycopersicum*, *Olea europaea*, *Vitis vinifera*, as well as mutants developed from *Arabidopsis* and *Brassica* (reviewed by Kaul 1988; Shivanna 2003). Studies of phytochemical and Brazilian native

**Fig. 3** Microsporogenesis of *Valeriana scandens* fertile anthers. **a** Microsporangium with final differentiation of the anther parietal layers: epidermis, endothecium, middle layer, binucleate tapetum and microspore mother cell (MMC) at prophase I of meiosis. **b** MMCs surrounded by callose inside anther locule. Invasive tapetum around MMCs (*arrow*). **c** Cytogenetic characterization of tetranucleate tapetum cell. **d** Tetrads surrounded by callose (aniline blue stain). **e** Tetrads at the same stage (Toluidine Blue O stain). A thin callose wall is observed in aperture region (*asterisk*). **f** Microspores presenting primexine around monads (toluidine blue O stain). **g** Microspores with primexine (periodic acid–Schiff stain). The aperture region formation is observed. *Bars* 20  $\mu\text{m}$  (Fig. 3a, b, d–g). *Bars* 10  $\mu\text{m}$  (Fig. 3c)



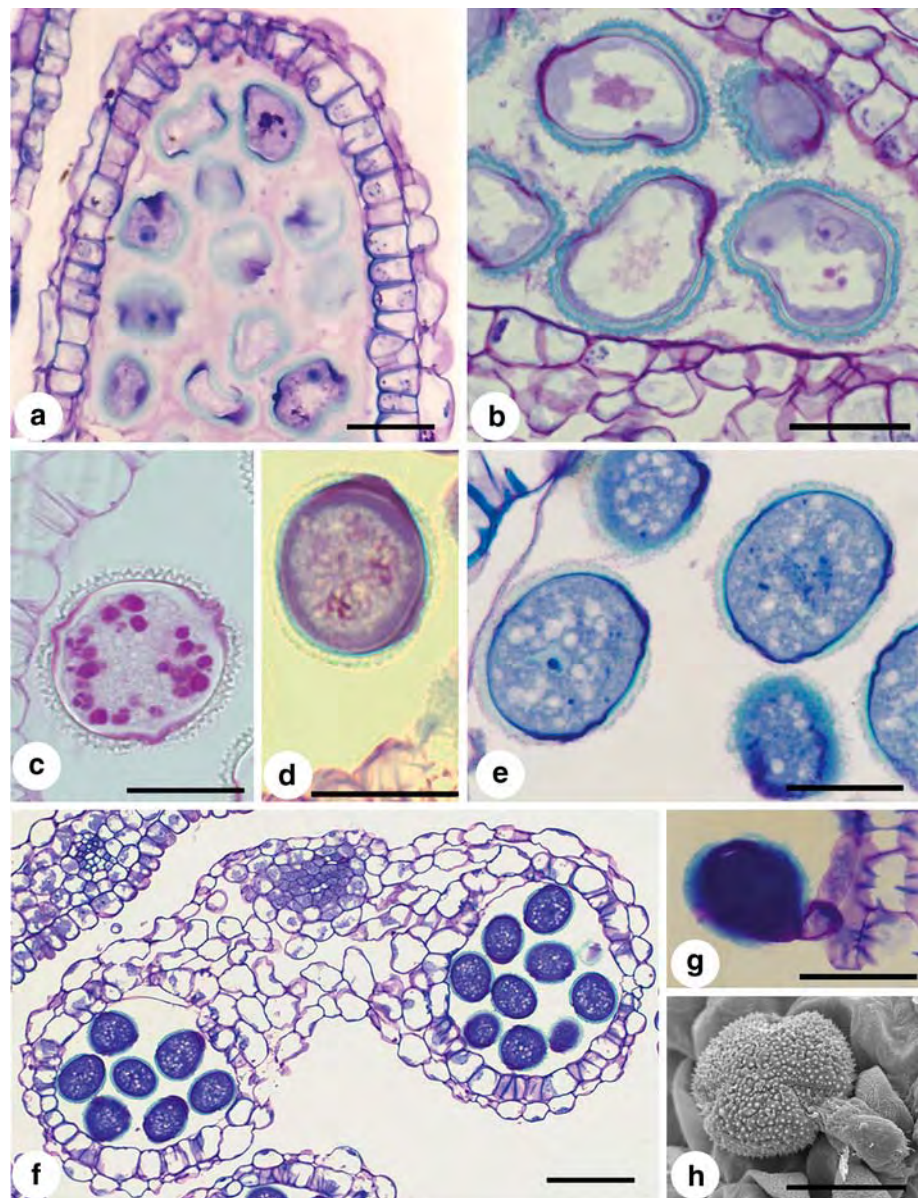
species with phytomedicinal potential, like valerians, are scarce.

Pollen sterility in *V. scandens* is caused by immature pollen cell death at the vacuolate stage. It differs from *V. officinalis*, in which precocious senescence of the tapetum causes the death of the microspore mother cell

(Shugaeva 1979). Tapetum development in *V. scandens* is of the invasive syncytial type, as in Euroasiatic species of *Valeriana*, *Valerianella*, *Fedia* and *Centranthus* already investigated by Asplund (1920). Different descriptions were used by different authors to classify the tapetum types of these cited genera. Nevertheless, the terms



**Fig. 4** Microgametogenesis of *Valeriana scandens* fertile anthers. **a** Anther at bicellular pollen stage showing the endothecium parietal thickness (periodic acid–Schiff with toluidine blue O). **b** Vacuolate bicellular pollen. **c** Bicellular pollen with starch grains and small vacuoles (periodic acid–Schiff). **d** Generative cell mitosis. **e** Three-cellular pollen with vegetative cell nucleus (*left*) and the two sperm cells (*right*). **f** Mature anther with two locules. **g** Pollen tube growing precociously at anther. **h** Pollen tube growth inside anther analyzed in SEM. Bars 20  $\mu\text{m}$



periplasmodial, invasive and ameboid refer to the same type of tapetum, and they are all cases of periplasmodium formation (Batygina 2002). Plasmodial tapeta predominate in Asteraceae (Asterales) and Caprifoliaceae *s.l.* (Dipsacales) (Furness 2008), both of the Euasterids II clade.

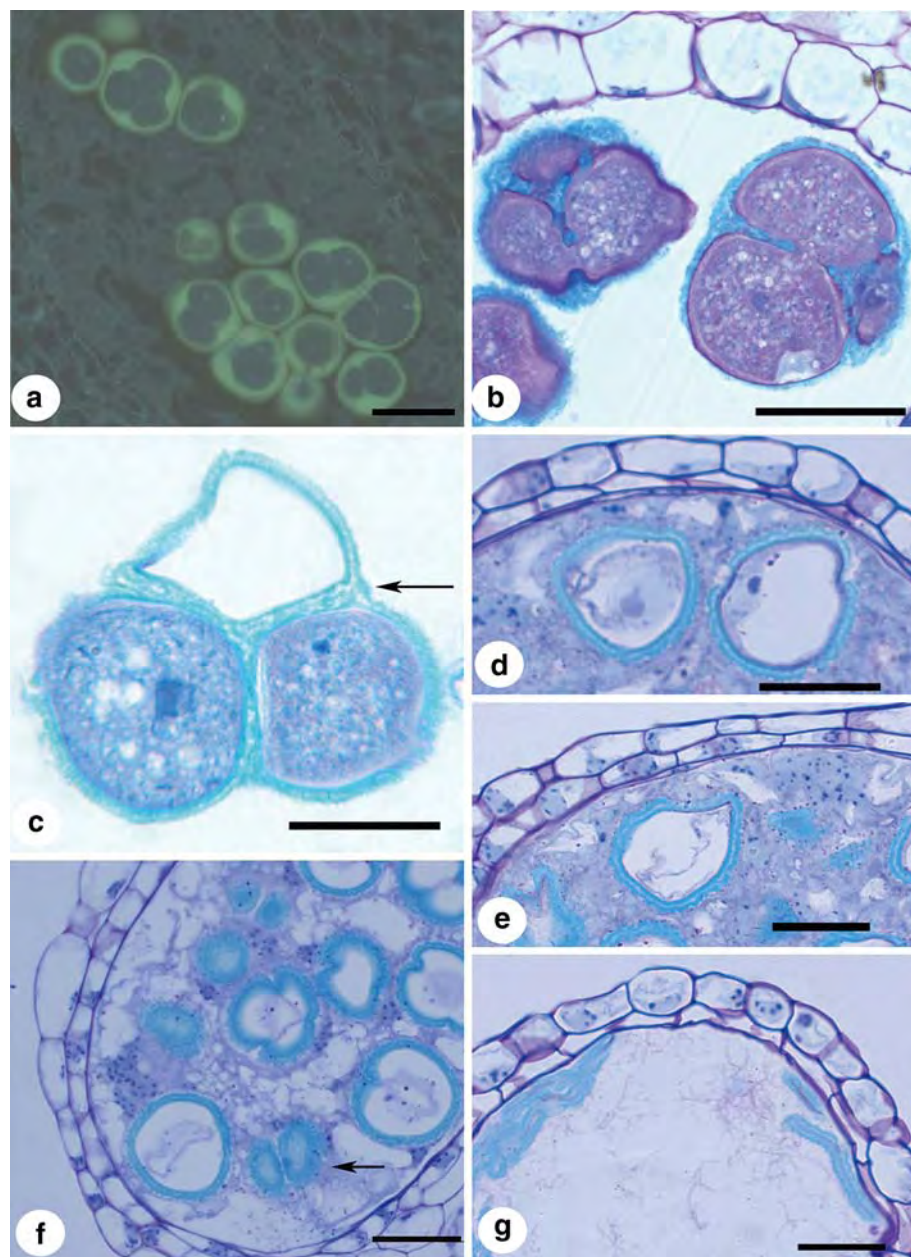
Since pollen sterility was observed at stages after meiosis, there was a possibility that pollen sterility might be involved in cytogenetic disturbance. However, cytogenetic analysis revealed that the population studied belongs to a diploid variety of *Valeriana scandens* var. *scandens*, which displays normal meiosis. Based on this, pollen sterility in *V. scandens* is not related to aneuploidy/disploidy, as observed in *V. nitida*.

In the case of *V. scandens*, the adjacent microspores within tetrads often displayed fused exine walls forming

permanent tetrads. The mature anther, at anthesis, appeared to contain only collapsed exines. Exine fusion creates natural, fertile, permanent tetrads in Juncaceae, Ericaceae and Oenotheraceae, in which the formation of permanent tetrads is related to the extendibility and timing of callose deposition (Blackmore et al. 2007).

In addition to variances in timing and callose deposition, problems in the deposition of the MMC primary wall can also result in the formation of fused tetrads in flowering plants. In *Arabidopsis thaliana*, *QUARTET* (*QRT*) genes are required for pollen separation during normal flower development. In contrast, *qrt* mutants do not degrade the MMC primary cell wall, and pollen grains are released in tetrads, but interestingly remain fertile (Francis et al. 2006).

**Fig. 5** Microsporogenesis and microgametogenesis of sterile anthers. **a** Microspores tetrad at cytokinesis stage showing the centripetal callose deposition. **b** Tetrads with malformation. Cytoplasmic connecting between microspores. **c** The sporopollenin deposition forms a continuous tectum between opposite microspores of tetrad (*arrow*). **d** Vacuolate immature pollen grain degenerate. **e** Immature pollen grain cytoplasm degenerate. **f** Coenocytic tapetum observed at immature pollen stage. **g** Anther at preanthesis stage showing the empty locule with the pollen exine collapsed. Bars 20  $\mu$ m

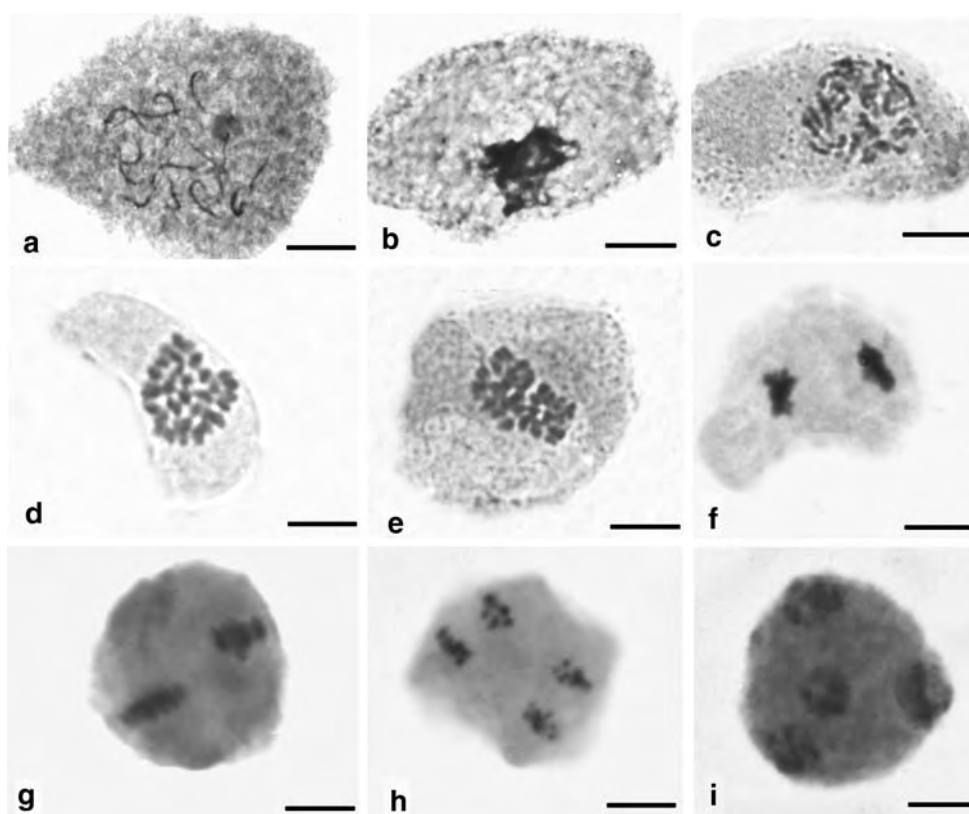


Pollen sterility of *V. scandens*, which appears to be caused by immature pollen cell death and sporoderm malformation, is very similar to the phenotype of *Brassica ms-cdl1* mutants, in which tetrads become fused after a delay in callose dissolution, leading to fusion of exine walls of adjacent microspores; in these mutants only collapsed exine walls remain within the locules (Kang et al. 2008). In *Brassica ms-cdl* mutants, the collapsed pollen phenotype is mainly controlled by the sporophyte genome, and not by haploid gametophytes (Wang et al. 2005). The mutant *ms-cdl1* may directly or indirectly influence gene expression that degrades the microspores mother cell wall and callose wall, as alteration of wild-type *MS-CDL*

appears to block the expression of a great number of genes involved in microspore development following the tetrad stage (Lou et al. 2007). Similarities between *V. scandens* and *Brassica ms-dcl1* sterile mutants are evident, and pollen sterility in the studied species is of the sporophytic type.

In *Valeriana*, each study of pollen sterility has reported disturbance at a different stage of microsporogenesis: precocious senescence of tapetum in *V. officinalis* (Shugaeva 1979), aneuploidy in *V. nitida* meiosis (Shugaeva 1972), and immature pollen degeneration followed by sporoderm malformation in *V. scandens* (present study). Thus, pollen sterility in the genus *Valeriana* appears to be

**Fig. 6** Cytogenetic characterization of *Valeriana scandens* var. *scandens* meiosis. **a** Prophase I, leptotene. **b** Prophase I, pachytene. **c** Prophase I, pachytene. **d** Prophase I, diakinesis. **e** Metaphase I. **f** Anaphase I. **g** Metaphase II. **h** Anaphase II. **i** Telophase II showing simultaneous cytokinesis. Bars 10  $\mu$ m



an example of homoplasy–evolution of a similar character in separate groups of organisms, resulting from convergence, parallelism or evolutive reverses (Hufford 1997; Mitchell and Diggle 2005).

**Acknowledgments** This research is part of the first author's Doctoral thesis, developed in the Post Graduate Program of Botany at UFRGS, Brazil, and it was supported by Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES). We also thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a research grant to the other authors.

## References

- Asplund E (1920) Studien über die Entwicklungsgeschichte der Blüten einiger Valerianaceen. Kungl Svenska Vetenskapsakademien Handlingar 61:1–66
- Batygina TB (2002) Embryology of flowering plants, terminology and concepts I: generative organs of flowers. Science Publishers, Enfield
- Bell CD, Donoghue MJ (2005) Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. Org Divers Evol 5:147–159
- Blackmore S, Wortley AH, Skarvla JJ, Rowley JR (2007) Pollen wall development in flowering plants. New Phytol 174:483–498
- Donoghue MJ, Eriksson T, Reeves PA, Olmstead RG (2001) Phylogeny and phylogenetic taxonomy of Dipsacales, with special reference to *Sinadoxa* and *Tetradoxa* (Adoxaceae). Harv Pap Bot 6:459–479
- Eriksen B (1989) Notes on generic and infrageneric delimitation in the Valerianaceae. Nord J Bot 9:179–187
- Feder N, O'Brien TP (1968) Plant microtechnique, some principles and new methods. Am J Bot 55:123–142
- Francis KE, Lam SY, Copenhagen GP (2006) Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by *QUARTET1*, a pectin methylesterase gene. Plant Physiol 142:1004–1013
- Furness C (2008) A review of the distribution of plasmodial and invasive tapeta in eudicots. Int J Plant Sci 169:207–223
- Gabriel BL (1982) Biological electron microscopy. Van Nostrand Reinhold, Princeton
- Gerrits PO, Smid L (1983) A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. J Microsc 132:81–85
- Gersterberger P, Leins P (1978) Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae) Anwendung einer neuen Präparationsmethode. Ber Deutsch Bot Ges 91:381–387
- Hufford L (1997) The roles of ontogenetic evolution in the origins of floral homoplasies. Int J Plant Sci 158:S65–S80
- Kang J, Zhang G, Bonnema G, Fang Z, Wang X (2008) Global analysis of gene expression in flower buds of *Ms-cdl1* *Brassica oleracea* conferring male sterility by using an *Arabidopsis* microarray. Plant Mol Biol 66:177–192
- Kaul MLH (1988) Male sterility in higher plants. Monographs on the theoretical and applied genetics, 10. Springer, Berlin, p 1005
- Lou P, Kang J, Zhang G, Bonemma G, Fang Z, Wang X (2007) Transcript profiling of a dominant male sterile mutant (*Ms-cdl1*) in cabbage during flower bud development. Plant Sci 172:111–119
- Martin FW (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. Stain Technol 34:125–128
- Mitchell CH, Diggle PK (2005) The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse development transitions. Am J Bot 92:1068–1076

- Shivanna KR (2003) Pollen biology and biotechnology. Science Publishers, EUA
- Shugaeva EV (1972) Abnormalities of microsporogenesis in *Valeriana nitida* K.R. polyploids. *Sov Genet* 8:37–46
- Shugaeva EV (1979) Male sterility of *Valeriana officinalis* L. s.l. *Sov Genet* 15:138–143
- Sobral M (1999) Valerianaceae. *Boletim do Instituto de Biociências UFRGS, série Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul* 58: 1–61
- Wang X, Lou P, Bonemma G, Yang B, He H, Zhang Y, Fang Z (2005) Linkage mapping of the dominant male sterile gene *Ms-cdl1* in *Brassica oleracea*. *Genome* 48:848–854
- Weberling F (1970) Familie Valerianaceae. In: Hegi G (ed) *Illustrerte Flora von Mitteleuropa*. C. Hanser, Munich, pp 97–176
- Xena de Enrech N (1993) Contribución al estudio del género *Valeriana* en Venezuela: distribución geográfica, caracteres morfoanatómicos, citológicos y palinológicos de interés taxonómico y evolutivo. *Acta Bot Venez* 16:105–136

**Capítulo III: Non-significant correlation among three pollen viability methods in *Valeriana scandens* L.**

Nota de pesquisa a ser submetida a Revista Euphytica

Erica Duarte-Silva \* Lia R. Rodrigues \* Jorge E. A. Mariath

## **Non-significant correlation among three pollen viability methods in *Valeriana scandens* L.**

E. Duarte-Silva<sup>1</sup> \* J. E. A. Mariath

Address: Laboratório de Anatomia Vegetal, Instituto de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Fax number: 55 51 3308 7755

e-mail: jorge.mariath@me.com

L. R. Rodrigues

Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, RS, Brazil

---

<sup>1</sup> This article is part of the doctoral thesis of the first author, at Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

**Abstract** Brazilian species of *Valeriana* present a high potential for economic exploitation due to pharmacological properties. Basic knowledge about the reproductive biology of these native plants is prerequisite to domestication. This work investigated the pollen viability of *Valeriana scandens* based on three methods: (1) Alexander staining, (2) fluorescein diacetate (FDA) fluorochromatic reaction, (3) *in vitro* germination. *V. scandens* presents pistillate and perfect flowers. In perfect flowers, 95% of the pollen grains reacted to Alexander, 47% presented fluorochromatic reaction to FDA and 30% germinated in culture medium. Low germination rates were expected since *in vitro* conditions do not simulate stigma surface. Considering the relationship between number of ovules and pollen grains, a pollen germinability *in vitro* rate of 30% is not a limitation for seed set in *V. scandens*. Analysis of variance and correlation tests indicate that the three techniques offer distinct inferences and it was not possible to estimate pollen germinability by means of the reaction to Alexander or FDA and vice-versa.

**Keywords:** *Valeriana*, Alexander, fluorescein diacetate, pollen tube germination, *in vitro* germination, correlation test.

## Introduction

*Valeriana* L. (Caprifoliaceae *s.l.*) contains metabolites used to produce phytomedicines that prevent anxiety and insomnia, and improve the quality of sleep (von Poser *et al.* 2004; Xena de Enrech 1993). The biodiversity center of *Valeriana* is located in South America (Xena de Enrech 1993), and Brazilian species present a high potential for economic exploitation due to pharmacological properties (von Poser *et al.* 2004). Basic knowledge about reproductive biology, like pollen viability, is prerequisite for the domestication of native plants. Studies of *Valeriana* pollen viability and pollen tube *in vitro* germination can contribute to basic and applied studies on plant breeding in this group. *Valeriana scandens* L., as well as many *Valeriana* species, presents floral polymorphism bearing pistillate flowers with staminodia and perfect flowers with three stamens (Xena de Enrech 1993). Staminodia of pistillate flowers do not present pollen grains or pollen without cellular content otherwise perfect flowers present pollen grains with a vegetative and two sperm cells (Duarte-Silva *et al.* 2010). Viability tests of *Valeriana* are restricted to the carmine test of *V. scandens* stamen and staminodia (Duarte-Silva 2006).

The current pollen evaluation techniques offer contradictory inferences concerning male gametophyte functionality (also known simply as ‘pollen grain’). In the literature, there are several methods for evaluating pollen quality *in vitro* including: stainability tests of pollen cellular content, tests based on the integrity of the cells membranes, and *in vitro* germinability test (see Dafni and Firmage 2000). In stainability tests, Carmine or Alexander associate viability with the presence of protoplasts (Kearns and Inouye 1993; Alexander 1969). Presently these tests are believed to be inconsistent since the presence of protoplasts of typical morphology can not be considered as viability, specially, in cells already dead by fixation (Rodrigues *et al.* 2006). The fluorochromatic reaction to fluoresceine diacetate (FDA, Heslop-Harrison and Heslop-Harrison 1970), based on the state of the male gametophyte cells membrane, is a well-established technique to determine pollen viability (Widholm 1972; Heslop-Harrison *et al.* 1984), despite also offering an indirect estimation of pollen viability. The presence of enzymatic activity may not guarantee that pollen grains are able to germinate. On the other hand, the *in vitro* germinability test is a fully quantitative method, which, in many species, shows correlations with seed-set, the real fecundation ability of the male gametophyte (Dafni and Firmage 2000).

This work aims to investigate pollen viability of *V. scandens* perfect flowers based on three different methods: (1) pollen stainability with Alexander stain (Alexander,



1969), (2) fluorochromatic reaction to FDA to measure enzymatic activity (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison 1970), and (3) pollen *in vitro* germination (Santos and Mariath 1997). This article focuses on a comparison among methods to support information about the reproductive biology of *Valeriana*.

### **Material and methods**

The individuals studied are part of populations situated in forest fragments in Rio Grande do Sul state, southern Brazil. The first population, in the city of Porto Alegre, RS (30°04'22''S and 51°07'32''W), and the second, in the town of Dom Pedro de Alcântara, RS (29°23'S and 49°50'W). Branches of inflorescences containing buds, one day before anthesis, were collected from 10 individuals during October 2008. Voucher specimens was deposited in the ICN Herbarium, Brazil (ICN 153433, 153434, 153435, 153436).

The base of branches containing buds was kept in culture medium (Murashige and Skoog 1962), at room temperature until the beginning of flower anthesis (7h30min) when they were collected. Placing them in culture medium prevented the high dehydration of buds during the transport from field to laboratory, and also, avoided the formation of false negatives in pollen viability.

Three flowers were collected from each individual and their anthers were equally distributed in the three assays, as follows: one anther from each flower, totalizing three anthers, was squashed in an Alexander stain drop, consisting of acid fucsin and malachite green, and observed under light microscope (Alexander 1969). Another anther from each flower was squashed in FDA work-solution (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison 1970), incubated at  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  in darkness for 35 min and observed under fluorescence microscopy (450-490 nm). The presence of 170g sucrose  $\text{L}^{-1}$  in work-solution was previously tested against 110g sucrose  $\text{L}^{-1}$  and 200g sucrose  $\text{L}^{-1}$ . Remaining anthers of each flower was excised and gently compressed in gelled drops of germination medium (2% colorless gelatin; 20% sucrose and 0.01% boric acid) (Santos and Mariath 1997) in a Klein dish, on moistened absorbent paper, inside a closed Petri dish. Different sucrose concentrations were previously tested in germination media. The culture mediums were previously tested with different sucrose concentrations. Material was kept in darkness for 3 hours at  $38^{\circ}\text{C}$ . To be considered positive, the length of pollen tube must be larger than the pollen grain diameter. Material was observed under differential interference contrast microscopy. The observations and photomicrographs were made with a Leica DMR-HC microscope and a DFC-500 digital camera.

#### *Pearson correlation analysis*

The statistical design was entirely randomized, in a factorial design (ten individuals and three reactions) with three repetitions per individual, and a mean of 121 observations

per glass slide, totaling 3621 observations. Normality test, equal variance test, parametric analysis of variance (ANOVA) and correlation analysis were performed on the data. Statistical tests were performed in absolute pondered numbers, but presented as in percentage.

## Results and Discussion

Data concerning pollen numbers with a positive response to the three techniques presented normal distribution and equal variance. Parametric ANOVA detected a highly significant difference among all techniques (Table 1), but not among pollen grains reactions from perfect flowers of the ten individuals (Table 2) indicating low variability to pollen quality in the species. Based on this, there is no partially fertile anther in *V. scandens* populations studied, only fertile anthers on perfect flowers and totally sterile anthers on pistillate flowers. The data confirm recent observations based on histological and citological studies (Duarte-Silva et al 2009).

Ninety-five percent of the 1,176 pollen grains reacted to Alexander stain, showing purple reaction (Fig 1a) with standard deviation of 4.7% and amplitude from 88 to 100%. Similar results were found with acetic carmine with an amplitude from 91 to 98% (Duarte-Silva 2006).

Forty-seven percent of the 1,446 pollen grains evaluated in FDA presented fluorochromatic reaction (Figure 1b) with a standard deviation of 20.8% and amplitude of 27 to 90%. The high variation in the FDA reaction was due to the instability of the work-solution and the variation on the optimum moment of fluorescein retention by cell membrane, both already pointed out by Heslop-Harrison and Heslop-Harrison (1970).

Nearly thirty percent of the 999 pollen grains established in germination medium presented germinated pollen tubes (Figure 1c) with standard deviation 12.6% and range 12 to 54%. Low germination rates are expected since physical and chemical *in vitro* conditions do not simulate stigma surface conditions for pollination (Shivanna and Johri 1989). Nevertheless, considering the relationship between number of seminal rudiments and pollen grains in *V. scandens*, the species presents a mean number of 450 pollen grains per flower for only one embryo sac, inside the seminal rudiment, per flower (Asplund 1920; Duarte-Silva 2006). Theoretically, the *in vitro* pollen germinability of nearly thirty percent is not a limitation for seed set in *V. scandens*. Considering the pistillate flowers that lack viable pollen grains and constitute less than 25% of flowers among the inflorescences sampled, the *in vitro* pollen germinability rate of nearly thirty percent from perfect flowers is sufficient for seed set in perfect and pistillate flowers of *V. scandens*. Studies of germinability *in vivo* of *V. scandens*, simulating natural pollination, are necessary for further investigation of pollen limitation on species.

In correlation tests, all correlation coefficients ( $r$ ) were not significant. In addition, the sample evidence is not sufficient to prove an association between the FDA and Alexander positive reactions. Hence, it is not possible to estimate a high proportion of FDA positive reaction when there is a high proportion of pollen with cellular content.

The higher  $r$  was 0.5522, between positive reaction to FDA and *in vitro* germination. In addition, the  $r$  between positive reaction to Alexander and FDA and the  $r$  between positive reaction to Alexander and *in vitro* germination were both negative (-0.2237 and -0.4823, respectively,) indicating that pollen grains from the same flowers reacted inversely to each technique and confirming that the three techniques offer distinct inferences.

Based on this, it was not possible to estimate pollen germinability by means of the reaction to Alexander stain or FDA and vice-versa. The presence of cellular content does not guarantee pollen metabolic activity or germinability. In the case of *V. scandens*, germinability tests were considered more reliable to verify male gametophyte capacity to develop, live, germinate and grow.

### **Acknowledgments**

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) for financial support; Dr. Luis Rios de Moura Baptista, for enabling the field work at Dom Pedro de Alcântara-RS.

### **References**

- Alexander MP (1969) Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technology* 62:107-112.
- Asplund, E. (1920) Studien über die Entwicklungsgeschichte der Blüten einiger Valerianaceen. *Kungl. Svenska. Vetenskapsakademiens Handlingar* 61: 1- 66.
- Dafni A, Firmage D (2000) Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* 222: 113-132.
- Duarte-Silva E (2006) Morfologia floral e expressão sexual de *Valeriana scandens* L. Magister Science Thesis. Federal University of Viçosa, MG, Brazil.
- Duarte-Silva E, Vanzela AA, Mariath JEA. (2010) Developmental and cytogenetic analysis of pollen sterility in *Valeriana scandens* L. *Sex Plant Reprod. In press.*
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y. (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology* 45:115-120.
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y. Shivanna K. R. (1984) The evaluation of pollen quality, and a further appraisal. *Theor. Appl. Genet.* 67: 367-375.
- Kearns CA, Inouye DW. 1993. *Techniques for pollination biologists*. USA: University Press of Colorado, Niwot.

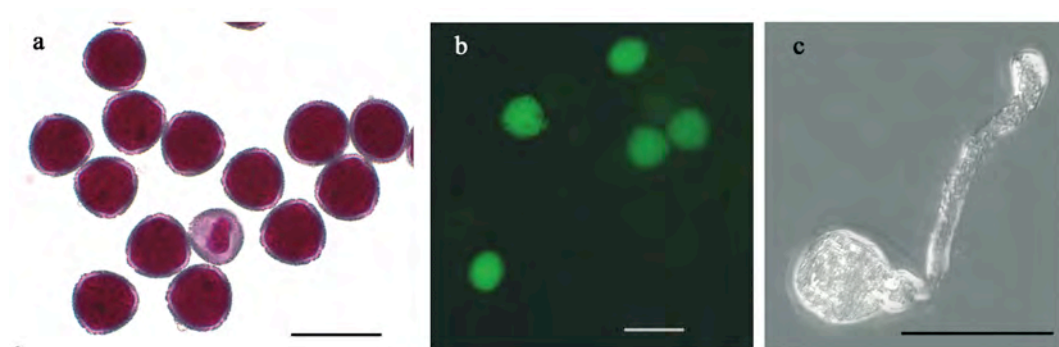
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473-497.
- Rodrigues LR, Forte BC, Bodanese-Zanettini MH (2006) Isolation and culture of soybean microspores and pollen grains. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 537-545.
- Santos RP, Mariath JEA (1997) A Single method for fixing, dehydrating and embedding pollen tubes cultivated *in vitro* for optical and transmission electron microscopy. *Biotechnic and Histochemistry*, v. 72, n. 6, p. 315-319.
- Shivanna KR, Johri BM (1989) *The angiosperm pollen structure and function*. Wiley Eastern Limited, New Delhi.
- Sobral M (1999). Valerianaceae. *Boletim do Instituto de Biosciências UFRGS, série Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul* 58: 1-61.
- von Poser GL, Rech SB, Silva AL, Sobral M. (2004) Valerianas brasileiras: potencial terapêutico de espécies do sul do país. *Ciência Hoje* 32: 35-38.
- Xena de Enrech, N (1993) Contribución al estudio del género *Valeriana* en Venezuela: distribución geográfica, caracteres morfoanatomicos, cariologicos y palinologicos de interes taxonomico y evolutivo. *Acta Botanica Venezuelica* 16: 105-136.
- Widholm JM (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology* 47: 189-194.

**Table 1:** ANOVA of number of pollen grains from *V. scandens* with stainability to Alexander solution, fluorochromatic reaction to fluorescein diacetate (FDA) and *in vitro* germination. Means are expressed in percentages.

Factors	Means		Pr>F
	Percentage	Tukey test	
Technique:			<0,001
Stainability to Alexander	95,1	A	
Fluorochromatic reaction to FDA	46,9	B	
<i>In vitro</i> germination	30,1	C	
General mean	57,3		
Coefficient of variation (%)	23,4		

**Table 2:** ANOVA of number of pollen grains reactions of 10 individuals of *V. scandens* with stainability to Alexander solution, fluorochromatic reaction to fluorescein diacetate (FDA) and *in vitro* germination. Means are expressed in percentages.

Factors	Means		Pr>F
	Percentage	Tukey test	
Individuals:			0,208
UFRGS-31	49,7	-	
DPAOUT-1	51,3		
DPAOUT-3	52,5		
DPAOUT-4	47,0		
DPAOUT-7	50,3		
UFRGS 47	54,9		
UFRGS37	72,7		
UFRGS36	70,4		
UFRGS48	56,7		
UFRGS49	68,0		



**Fig 1** Pollen viability of *Valeriana scandens* based on three different methods. **a** Alexander stain. **b** FDA reaction in fluorescence microscopy. **c** Pollen tube *in vitro* germination, light microscopy, interference contrast. Bars = 50µm

**Gynosporogenesis and gynogametogenesis  
of perfect and pistillate flowers of *Valeriana  
scandens* L. (Caprifoliaceae s.l.)**

Artigo a ser submetido a Revista Phytomorphology

Erica Duarte-Silva \* Jorge E. A. Mariath

**Gynospороgenesis and gynogametogenesis  
of perfect and pistillate flowers of *Valeriana  
scandens* L. (Caprifoliaceae s.l.)**

*MSc. Erica Duarte-Silva \* Dr. Jorge E. A. Mariath*

*LAVeg, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências*

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)*

*91501-970 Porto Alegre RS, Brazil*

Tel: 0 XX 55 51 3308 7655

Fax number: 0 XX 55 51 3308 7755

e-mail: [jorge.mariath@ufrgs.br](mailto:jorge.mariath@ufrgs.br)

**Abstract** *Valeriana scandens* presents floral polymorphism with perfect and pistillate flowers. Developmental analysis of anthers from pistillate flowers showed total pollen sterility, so, the pistillate flower seed set may depend on cross-pollination or apomixes. In this work, we analysed, with light microscopy, the gynosporogenesis and gynogametogenesis of *V. scandens* perfect and pistillate flowers, aiming to investigate the presence, or absence, of apomictic embryos development. Gynosporogenesis and gynogametogenesis of both floral fenotypes showed no differences. The single rudiment is anatropous, unitegmic, with apical placentation. Near the micropyle, the funiculus epidermis differentiates in an obturator. A single archesporium cell lies directly below the nucellar epidermis and gives rise to the gynospore mother cell (GMC). The GMC undergoes meiosis and forms a linear tetrad of gynospores. The chalazal one develops into the immature binucleate gynophyte, typifying a monosporic origin. The gynophyte is *Polygonum* type, with seven cells and seven nuclei since the fusion of polar nuclei originate a secondary nucleus. Concluding, during seminal rudiment development, a single gynophyte is formed by a meiotic pathway. No apomixes was detected and no adventitious embryos were observed.

**Keywords:** *Valeriana*, ovule, megasporogenesis, megagametogenesis, embryo sac



## Introduction

*Valeriana* L. (Caprifoliaceae *sensu lato*) contains metabolites used to produce phytomedicines that prevent anxiety, insomnia, and improve the quality of sleep (von Poser *et al.* 2004; Xena de Enrech 1993). *Valeriana* species are a common component of the alpine flora throughout the Northern Hemisphere as well as the Andes of South America (Bell and Donoghue 2005). Brazilian species present a high potential for economic exploitation due to pharmacological properties, for example, the neotropical species *Valeriana glechomifolia* presents nine times more bioactive compounds than the euroasiatic *Valeriana officinalis* used in Brazilian and international pharmacological industry to produce phytomedicines (von Poser *et al.* 2004). Brazilian pharmacological industry moves US\$ 550 million per year. Despite of Brazil megabiodiversity, great part of phytomedicines species utilized comes from Europe and Asia (Shulz *et al.* 2002).

*Valeriana scandens* L. has the widest distribution of the genus on the American continent, from Florida (USA) to Argentina and Southern Brazil, and bears perfect and pistillate flowers, the latter, with stamen sterility (Xena de Enrech 1993; Duarte-Silva 2006). Duarte-Silva (2006) investigated the mature gynophyte of perfect and pistillate flowers of *V. scandens* and showed that both are morphologically typical, with seven cells: two synergides, egg cell, central cell and three antipodes, as well as, both gynophytes are functional, they developed seeds and seedlings.

Anthers developmental analysis of *Valeriana scandens* pistillate flower showed total pollen sterility (Duarte-Silva *et al.* 2010), so, pistillate flower seed set may depend on cross-pollination or apomixes.

In this work, we analysed the gynosporogenesis and gynogametogenesis of perfect and pistillate flowers of *V. scandens*, aiming to investigate the presence or absence of apomictic embryos development. In *Valeriana* genus, these kind of studies are restricted to Northern Hemisphere species (Asplund 1920). In flowering plants, investigations of embryological analyses are necessary to detect apomictic events. In self- or cross-pollinated species, meiosis is the prelude to gynophyte development while in asexual apomictic species, diploid gynophytes can develop as a result of meiotic aberrations during gynosporogenesis, or anomalies that lead to gynophyte formation from nucellar non archesporial cells (Nogler 1984; Koltunow 1993; Reiser and Fisher 1993).

## Material and methods

A population of *Valeriana scandens*, located at Morro Santana Reserve, Porto Alegre, RS, Southern Brazil, (30 04'22''S, 51 07'32''W), was visited from August to December of 2006, 2007 and 2008 and 25 individuals have their flowers collected in

different stages of development. Voucher specimens were deposited in the ICN Herbarium, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Brazil (ICN 153433, 153434, 153435, 153436).

For developmental analysis of gynosporeogenesis and gynogametogenesis, flowers at different stages of development were fixed in 2% glutaraldehyde in a 0.1M sodium phosphate buffer, pH 6.8 (Gabriel 1982), dehydrated in ethanol and embedded in hydroxyethylmethacrylate (Gerrits and Smid 1983). Samples were sliced at 3-6 $\mu$ m with a Zeiss Mikron microtome, stained with 0.05% toluidine blue O, pH 4.4 (Feder and O'Brien 1968) for observation under light microscopy, using a Leica DMR-HC microscope with a DFC500 digital camera.

The nomenclature used in this work: gynosporeogenesis, gynospore, gynogametogenesis and gynophyte, instead of megasporogenesis, megaspore, megagametogenesis and megagametophyte, correspond to the terms used by Doyle (1953), Cocucci & Mariath (1996) and Pozner (2001).

## Results

Gynosporeogenesis and gynogametogenesis of perfect and pistillate flowers showed no differences.

In both, pistillate and perfect flowers, a single archesporium cell lies directly below the nucellar epidermis, characterizing an tenuinucellate seminal rudiment (Fig 1A). At this stage, the seminal primordium undergoes a 180° curvature. The single archesporial cell gives rise to the gynospore mother cell (GMC) that enlarges and undergoes prophase I of meiosis (Fig 1B). The GMC forms a linear tetrad of gynospores (Fig 1C-E). At the GMC stage, the single integument is initiated and it covers the entire nucellus until the end of meiosis, developing the micropyle (Fig 1C).

The three micropylar gynospores degenerate and the chalazal one develops into the female gametophyte or gynophyte (Fig 1f). The functional gynospore nucleus undergoes mitosis and originates the binucleate gynophyte with a large central vacuole full of soluble carbohydrates (Fig 2A). During gynogametogenesis, the second mitosis cycle gives rise to a tetranucleate gynophyte (Fig 2B-D). The large vacuole is converted in many small vacuoles, their content is assimilated by cytoplasm cell that becomes dense. After the third mitotic cycle, the octonucleate gynophyte is formed. At this stage, nucellar cells are completely obliterated by integument and embryo sac growth. The two nuclei migrate to the center and cellularization of the mature gynophyte gives rise to seven cells: two synergids, egg cell (Fig 2E), central cell, with fused polar nuclei, forming a secondary nucleus (Fig 2F), and three antipodal cells (Fig 2E) typifying the monosporic origin of the *Polygonum* type gynophyte.

The single rudiment is anatropous, unitegmic, tenuinucellate with apical placentation (Fig 2G). The inner layer of integument is differentiated in an integumentary tapetum or endothelium (Fig 2E-G). Cells with large pectin cell walls compose the chalaza and integumental cells outer the endothelium also differentiates like chalaza cells, except for the micropyle region (Fig 2G). Near the micropyle, the funiculus epidermis differentiates in an obturator (Fig 2G). The obturator cells are unicellular secretory trichomes, capitate, with the nucleus at the base and a large vacuole at the apex (Fig 2G).

During seminal rudiment development, a single gynophyte is formed by a meiotic pathway. No apomixes was detected and no adventitious embryos were observed. For these conclusions, 43 seminal rudiment were observed: 4 at archesporial cell stage, at 5 ginospore mother cell stage, 4 at ginospore tetrad stage, 1 at binucleate gynophyte stage, 2 at tetranucleate gynophyte stage and 27 at mature gynophyte stage.

## Discussion

The South American population of *V. scandens* studied presents a seminal rudiment development similar to Northern Hemisphere species of *Valeriana*. The single integument presents an endothelium at the inner epidermis (Asplund 1920; Cheng 2005; Duarte-Silva 2006), and integumentary cells situated outside the endothelium secrete mucilaginous substances (Batygina 2002). An obturator is present in the funiculus epidermis near the micropyle, their cells have similar structure to nectary cells at the corolla spur (Asplund 1920). The *Valeriana* gynophyte is monosporic in origin and of *Polygonum* type, except for *Valeriana nitida*, with a tetrasporic origin and *Adoxa* type (Asplund 1920).

In sporophytic apomixis or adventitious embryony, the embryo is formed directly from unreduced cells of nucellus or inner integument, while the developmental pathway of the meiotic embryo sac is maintained (Lakshmanan & Ambegaokar 1984; Koltunow and Grossniklaus 2003). In *V. scandens*, only one gynophyte was observed during rudiment and seed development. The *V. scandens* seminal rudiment at anthesis stage is composed by integumentary cells with no embryonic structure, few nucellar cells and the mature sexual gynophyte,.

Gametophytic apomixis is characterized by apomeiosis – absence of meiosis (Nogler 1984). In the apospory type, a nucellar cell undergoes mitosis directly and unreduced gynophyte is formed, side by side the gynophyte of meiosis origin (Nogler 1984; Koltunow and Grossniklaus 2003). In *V. scandens* seminal primordium, no nucellar cells undergo mitosis to form an apomictic embryo sac directly. In the diplospory type of gametophytic apomixis, the gynospore mother cells fail to achieve meiosis, but form a gynophyte through mitosis, with all unreduced cells distributed as in the gynophyte of

meiotic origin (Nogler 1984; Koltunow and Grossniklaus 2003). The *V. scandens* gynospore mother cell undergoes meiosis, rejecting the possibility of diplospory.

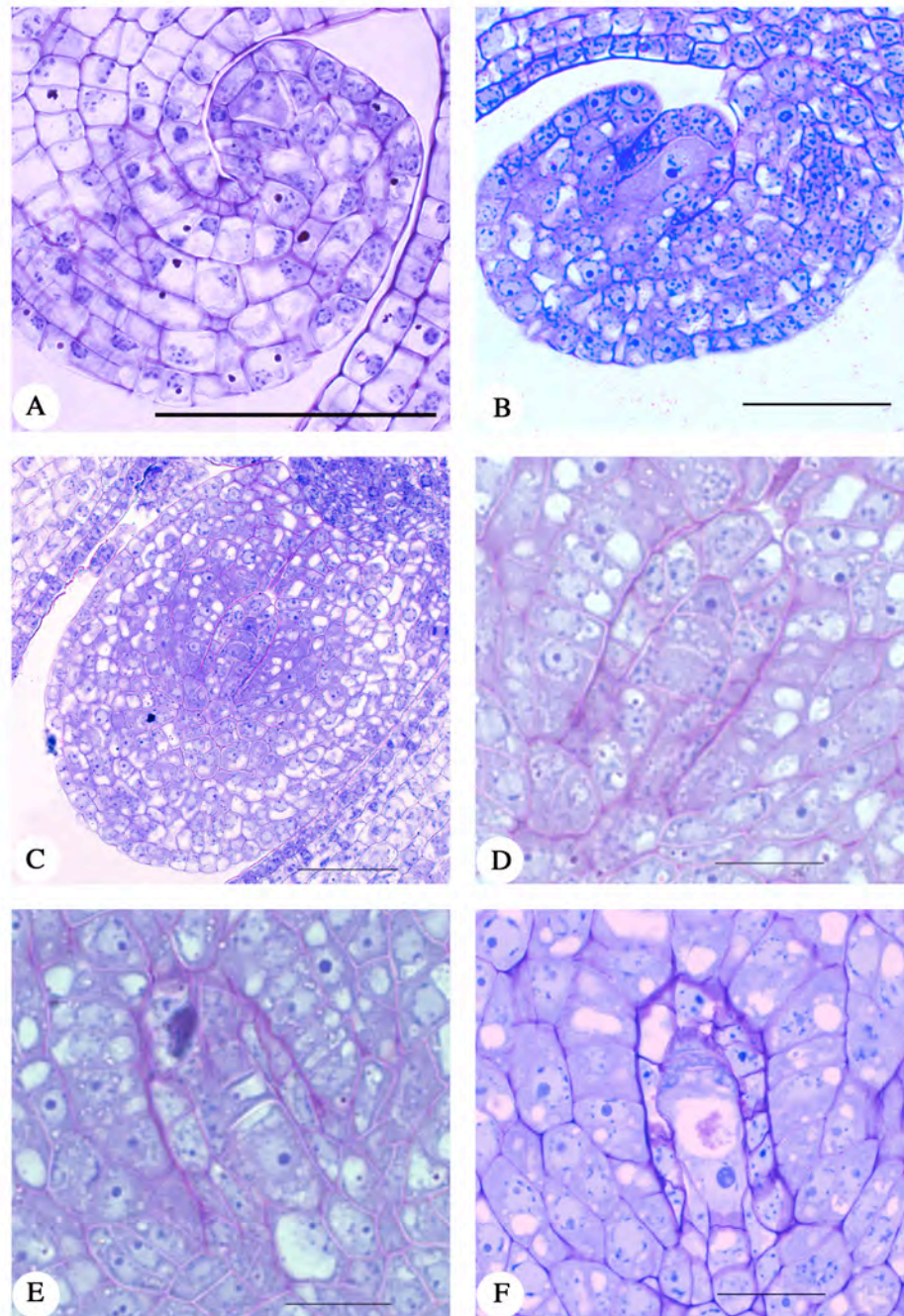
Once there is no apomitic event on *V. scandens* flowers, reproductive biology investigations are necessary to confirm the hypothesis of reproduction by cross-pollination in pistillate flowers and self- or cross-pollination in perfect flowers.

**Acknowledgments** This research is part of the first author's Doctoral thesis, developed in the Post Graduate Program of Botany at UFRGS, Brazil, and it was supported by Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES). We also thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the research grant to the latter author.

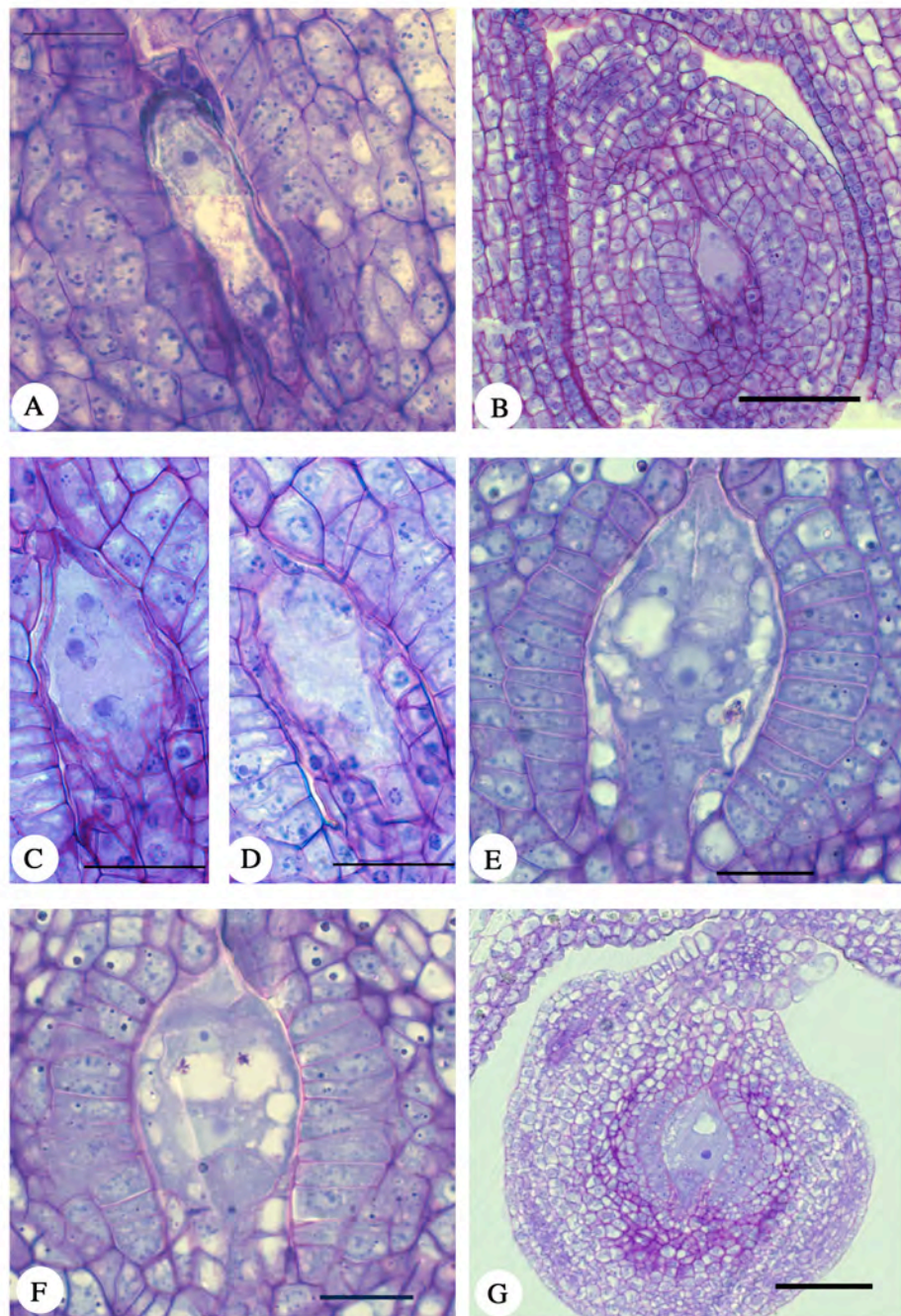
## References

- Asplund E (1920). Studien über die Entwicklungsgeschichte der Blüten einiger Valerianaceen. Kungl Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar 61:1- 66.
- Batygina TB (2002). Embryology of flowering plants, terminology and concepts I: Generative organs of flowers. Science Publishers, Enfield, NH.
- Bell CD, Donoghue MJ (2005) Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Org Divers Evol* 5:147-159.
- Cheng Q, Wang YJ, Wang YW (2005) Study on the reproductive biological characteristics of *Valeriana officinalis* L. var. *latifolia* Miq. *JWBR* 23: 169-173.
- Cocucci AE, Mariath JEA (1996). Sexualidade das plantas. *Ciência Hoje* 18 (106): 50-61.
- Doyle J (1953) Gynospore or Megaspore – A restatement. *Ann Bot* 17: 465-476.
- Duarte-Silva E (2006) Morfologia floral e expressão sexual em *Valeriana scandens* L. Magister Science Thesis. Federal University of Viçosa, MG, Brazil.
- Duarte-Silva E, Vanzela ALL, Mariath JEA (2010) Developmental and cytogenetic analyses of pollen sterility in *Valeriana scandens* L. Doctoral thesis. Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.
- Feder N, O'Brien TP (1968) Plant Microtechnique, some principles and new methods. *Am J Bot* 55:123-142.
- Gabriel BL (1982) Biological electron microscopy. Princeton N.J.: Van Nostrand Reinhold.
- Gerrits PO, Smid L (1983) A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J Microsc* 132:81-85.
- Koltunow A (1993) Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5: 1425-1437.
- Koltunow A; Grossniklaus U (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* 54: 547-574.
- Lakshmanan KK, Ambegaokar KK (1984) Polyembryony. In: Johri BM. Embryology of Angiosperms. Berlin: Springer pp. 445-474.
- Reiser L, Fisher RL (1993) The ovule and the embryo sac. *Plant Cell* 5: 1291-1301.

- Nogler (1984) Gametophytic apomixis. In: Johri BM. Embryology of Angiosperms. Berlin: Springer pp.475-518.
- Pozner R (2001) Approach to the early sporangial development in angiosperms considering meiosis control and cellular differentiation. Plant Syst Evol 230: 25-42.
- Shulz V, Hänsel R, Tyler VE. (2002) Fitoterapia Racional – Um guia de Fitoterapia para as Ciências da Saúde. Brazil, São Paulo: Mandole.
- von Poser GL, Rech SB, Silva AL, Sobral M. (2004) Valerianas brasileiras: potencial terapêutico de espécies do sul do país. Ciência Hoje 32: 35-38.
- Xena de Enrech, N (1993) Contribución al estudio del género *Valeriana* en Venezuela: distribución geográfica, caracteres morfoanatomicos, cariologicos y palinologicos de interes taxonomico y evolutivo. Acta Bot Venez 16:105-136.



**Fig 1** Seminal rudiment development and gynosporogenesis of *Valeriana scandens* **a** Single archesporium cell. **b** Gynospore mother cell at pachytene phase of meiosis prophase I. **c** Three gynospores from gynospore linear tetrad. Integument development forming the micropyle and endothelium. **d** Detail of the three gynospores and endothelium. **e** The fourth gynospore in chalazal position. **F** Enlargement of chalazal gynospore, the functional gynospore. Bars = 20 $\mu$ m (except for Fig 3c = 50 $\mu$ m)



**Fig 2** Seminal rudiment development and gynogametogenesis of *Valeriana scandens* **a** Editing image containing the two nuclei of binucleate gynophyte. **b** Ovule at tetranucleate gynophyte stage. The image shows two of four gynophyte nuclei. **c** Editing image containing three of four nuclei from tetranucleate gynophyte. **d** Fourth nucleus of tetranucleate gynophyte. **e** Octonucleate gynophyte with one synergid, egg cell and the three antipods, one of them, binucleate. **F** Octonucleate gynophyte with the two synergids and middle cell with secondary nucleus. **g** Mature ovule, at anthesis stage with obturator, in micropyle region and mature gynophyte. Bars = 20μm (Fig a,c,d,e,f). Bars= 50μm (Fig b,g)

**Capítulo V – Aspectos de biología reproductiva de *Valeriana scandens* L. (Caprifoliaceae *sensu lato*)**



## Introdução

Abordagens de biologia reprodutiva incluem, em geral, estudos de morfologia e morfometria floral; fenologia da floração e frutificação; biologia floral (ex. comportamento de antese, viabilidade do pólen, receptividade estigmática, crescimento do tubo polínico e secreção do nectar); observações de visitantes florais; sistemas de cruzamento, e germinação de sementes (veja Dafni 1992; Kearns e Inoyue 1993; Newstrom *et al.* 1994; Endress 1994; Geber *et al.* 1999; Lloyd e Barrett 1996; Richards 1997; Dafni e Firmage 2000; Nicolson *et al.* 2007; Harder e Barrett 2006). Alguns itens citados acima são comumente investigados através de métodos quantitativos.

A biologia reprodutiva de *Valeriana scandens* já foi investigada em relação a alguns aspectos citados acima como: fenologia da floração e frutificação; morfometria floral das flores perfeitas e pistiladas; análise histológica do nectário (Duarte-Silva 2006), e viabilidade polínica (mostrado na presente tese).

Duarte-Silva (2006) mostrou que: a floração de *V. scandens* ocorre de agosto a janeiro em zonas tropicais do território brasileiro; indivíduos desenvolvem cerca de 8 inflorescências; cada inflorescência dura, em média, 40 dias e desenvolve de 50 a 270 flores; análises morfométricas mostraram que as flores são inconspícuas (3 - 3.5mm); flores perfeitas apresentam corola cor creme, grande, com lobos reflexos na antese; anteras grandes, sub-exertas, férteis, e estigma incluso; enquanto que, as flores pistiladas apresentam uma corola branca, pequena, com lobos radiais na antese, anteras estéreis, reduzidas, e estigma exerto; o nectário é composto por tricomas secretors na epiderme interna da giba da corola, formando uma câmara nectarífera.

Nessa tese foi mostrado que as flores perfeitas de *V. scandens* possuem 46.9% dos grãos de pólen metabolicamente ativos e 30.1% de grãos de polen capazes de germinar em meio de cultura. Além disso, tubos polínicos foram observados germinando precocemente no lóculo da antera, no estágio de antese (Duarte-Silva *et al.* 2010).

Estudos de ginosporogênese e ginogametogênese, de flores perfeitas e pistiladas de *V. scandens*, indicam que ambos os fenótipos desenvolvem um único ginófito por meiose, deste modo, não ocorre apomixia gametofítica, tão pouco embriões adventícios são formados (mostrado na presente tese).

Uma vez que eventos apomíticos não ocorrem em flores de *V. scandens*, investigações de biologia reprodutiva são necessárias para confirmar a hipótese de reprodução por autopolinização, nas flores pistiladas, e autopolinização ou polinização cruzada, nas flores perfeitas.

Este trabalho consiste de análises preliminares do sistema reprodutivo de *V. scandens*, baseado em dados qualitativos do comportamento de antese; observação de visitantes florais; crescimento do tubo polínico; auto-polinização artificial; análises histológicas do desenvolvimento embrionário e germinação de sementes.

Considerando que *V. scandens* pertence a um gênero de plantas medicinais, a investigação de processos de biologia reprodutiva são importantes para subsidiar técnicas agrícolas de melhoramento vegetal.

## **Material and métodos**

**Trabalho de campo:** a população de *V. scandens*, localizada na Reserva do Morro Santana, Porto Alegre, Sul do Brasil, (30 04'22''S, 51 07'32''W). O clima

é sub-tropical úmido (Cfa), de acordo com a classificação climática de Köppen. A população foi visitada no período de floração, de setembro a novembro, dos seguintes anos: 2006 até 2009. Todos os indivíduos floridos foram marcados. Espécimes foram depositados no Herbário ICN do Instituto de Biociências da UFRGS, Brasil (ICN 153433, 153434, 153435, 153436).

Dois diferentes fenótipos estão presentes na população estudada. O primeiro desenvolve apenas flores perfeitas com anteras férteis, e o segundo exibe flores perfeitas e pistiladas (Duarte-Silva *et al.* 2010).

**Estudo da antese:** A antese floral foi investigada em laboratório, sob microscópio estereoscópio (ME) por duas razões: o pequeno tamanho da flor e a possibilidade de antese noturna. A base dos ramos da inflorescência contendo botões foram mantidos em meio de cultura MS (Murashige and Skoog 1962), em temperatura ambiente até o início da antese floral quando as flores foram observadas até a senescência, e registradas sob ME Wild M7A com câmera fotográfica Coolpix 990. A manutenção das flores em meio de cultura previne contra a alta desidratação durante o transporte do campo até o laboratório. As flores perfeitas e pistiladas de *V. scandens* foram registradas no campo com uma câmera Nikon D200 com lente Sigma 150mm 1:2.8 APO MACRO DG HSMD.

Para observações das flores em microscopia eletrônica de varredura (MEV), o material foi desidratado em etanol (Gersterberger and Leins 1978), e ponto crítico, e metalizado com ouro. Observações e eletromicrografias foram realizadas no MEV JEOL 6060 sob 20kV.

**Visitantes florais:** Para verificar presença ou ausência de visitantes florais, 10 indivíduos marcados tiveram suas flores observadas durante a floração de 2008. Flores foram observadas de 9:30 da manhã até 17:00 da tarde, em diferentes dias,

totalizando 32 horas e 30 minutos de observação. Visitantes florais foram fotografados durante o trabalho de campo.

**Sistema reprodutivo:** A presença ou ausência de produção de sementes por autopolinização foi determinada através de 10 indivíduos marcados na floração de 2008. Flores perfeitas (n=50), em estágio de antese, foram ensacadas com um tecido com lacunas inferiores a 15 $\mu$ m, para excluir autopolinização. Flores foram mantidas ensacadas até o desenvolvimento final do desenvolvimento do fruto e da semente. Além disso, como controle, 50 outras flores foram marcadas, e observada a formação de frutos por polinização natural.

**Germinação e crescimento do tubo polínico:** a presença ou ausência de autopolinização em flores perfeitas foi verificada com observações de germinação do tubo polínico, crescimento no estilete e penetração no rudimento seminal. A germinação do tubo polínico no estigma foi observada em MEV (método citado acima, no item 'estudo da antese'). Para verificar presença de tubo polínico crescendo no estilete e penetração do tubo no rudimento seminal, por autopolinização, flores perfeitas mantidas em meio de cultura (Murashige and Skoog 1962), livres de polinização cruzada, tiveram seus pistilos coletados em pré-antese, e 6hs, 24hs e 48hs, após o início da antese. Os pistilos foram amolecidos e uma solução de 9M NaOH em temperatura ambiente por um mínimo de 4h e máximo de 24hs. Foram corados com Azul de Anilina (Martin 1959) por 40 min. e observado em microscopia de fluorescência, usando um filtro UV com 340-380 nm.

**Análise do desenvolvimento da semente:** para analisar o desenvolvimento do embrião e, verificar a possibilidade de embriões adventícios, frutos com sementes, de flores perfeitas e pistiladas, em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados de 25 indivíduos em diferentes anos (2006-2009). O material foi fixado

em glutaraldeído 2% em solução tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8 (Gabriel 1982), desidratado em etanol e embebido em hidroxietilmetacrilato (Gerrits e Smid 1983). Amostras foram seccionadas em micrótomo Zeiss Mikron. As seções foram coradas com Azul de Toluídina O, 0,05%, pH 4,4 (Feder e O'Brien 1968) para observações em microscopia de campo claro.

As observações em microscopia de fluorescência e de campo claro, bem como as fotomicrografias digitais foram realizadas com um microscópio Leica DMR-HC com uma camera DFC500.

**Germinação de sementes:** para verificar quantitativamente a presença ou ausência de mais de uma plântula por semente, um caso comum em embrionia adventícia, frutos indeiscentes contendo sementes de polinização natural forma mantidos em placas de Petri com papel absorvente úmido, em temperatura ambiente. Uma plântula foi considerada germinada após o desenvolvimento de radícula e cotilédones.

## **Resultados e discussão**

A antese das flores de *V. scandens* duraram 54 horas. A antese iniciou-se as 7:30 da manhã. Nas primeiras 6 hs de antese, o tubo da corola está ereto (Fig 1a,b). Nas primeiras 24h., os lobos da corola se tornam radiais tanto nas flores perfeitas quanto nas pistiladas (Fig 1c,d). Os lobos da corola das flores pistiladas permanecem radiais até o final da antese (Fig 1e). Nas últimas 24h da antese, os lobos da corola das flores perfeitas ficam reflexos (Fig 1f,g). As anteras das flores perfeitas estão abertas quando os lobos da corola estão eretos e radiais (Fig 1b,d). Quando os lobos da corolla estão reflexos, os grãos de polen já foram dispersos (Fig 1g). No entanto, grãos de polen são encontrados em tricomas unicelulares situados na epiderme interna do tubo da corola durante toda a antese (Fig 2a-c).

Observações a campo mostraram que as flores de *V. scandens* são visitadas das 10:00 as 17:30 por uma espécie de Diptera (Fig 3a,b). Flores, nas primeiras 6 hs de antese, com os lobos eretos não são visitadas. Moscas visitam as flores apoiando suas patas nos lobos radiais da corola, bem como na superfície do ovário ínfero (Fig 3b). O tubo da corolla de *V. scandens* apresenta tricomas nectaríferos e acúmulo de néctar na giba (Duarte-Silva 2006) que constitui uma recompensa para o polinizador.

Flores perfeitas mantidas em meio de cultura, livres de polinização cruzada, não apresentaram grãos de pólen no estigma e tubo polínico no estilete, no estágio de pré-antese. A autopolinização ocorre em flores perfeitas coletadas 6 horas após o início da antese, que mostraram grãos de pólen germinando no estigma e tubos polínicos crescendo no estilete, do ápice até a base, com penetração no rudimento seminal (Fig 4a-c). Da mesma forma, foram observadas auto-polinizações em flores com 12hs, 24hs e 48hs.

Baseado nesses fatos, as flores perfeitas de *V. scandens* são auto-polinizadas nas primeiras seis horas da antese, com os lobos da corolla eretos, e visitadas por polinizadores no período restante da antese, com os lobos radiais e reflexos. Neste estágio, o único rudimento seminal já foi penetrado, e as flores perfeitas agem como doadoras de pólen, disponíveis tanto nas anteras quanto nos tricomas tectores da epiderme interna da corola. Oitenta por cento das flores perfeitas ensacadas no estágio de pré-antese, formam sementes maduras por autopolinização.

A função ecológica das flores perfeitas como doadoras de pollen foi discutida por Duarte-Silva (2006) baseado na morfologia floral. O saco embrionário das flores perfeitas é geralmente fecundado por um tubo polínico de um grão de pólen da mesma flor, enquanto que o saco embrionário das flores

pistiladas, com pólen estéril, depende de tubos polínicos dos grãos de pólen de flores perfeitas.

Os fatores que levam à auto-polinização nas flores perfeitas são: morfologia floral que permite a auto-polinização, ou seja, anteras sub-exertas e estigma incluso; a rápida germinação do tubo polínico, nas primeiras 6hs da antese; e os lobos da corola eretos nas primeiras 6hs de antese, o que evita a visita de polinizadores e a polinização cruzada, e, por consequência, favorece a autopolinização.

Análises de diferentes estádios do desenvolvimento da semente mostram que a presença de um único embrião zigótico (Fig 5a-d). Embriões adventícios não foram observados durante o desenvolvimento da semente. Endosperma ou embrião xenófito, é também formado.

Foram reconhecidos quatro estádios tardios de desenvolvimento do embrião zigótico: proembrião (Fig 5a), embrião globular (Fig 5b), cordiforme (Fig 5c), e torpedo (Fig 5d).

O endosperma começa a se desenvolver e prolifera consideravelmente antes das mitoses do zigoto (Fig 5a). O endosperma fornece nutrientes para o desenvolvimento do embrião e é totalmente consumido no estágio de semente madura.

A testa imatura é não multiplicativa e parenquimatosa. No estágio de pró-embrião, o endotélio do rudimento seminal se diferencia em endotesta, o parênquima integumentar dá origem a mesotesta e a face externa da epiderme do tegumento dá origem a exotesta (Fig 5a,b). A mesotesta na porção da rafe porta cerca de 15 camadas neste estágio.

A endotesta degenera no estágio de embrião globular (Fig 5b). Baseado nisso, o endotelio do rudimento seminal tem uma participação inferior na nutrição do endosperma e embrião se comparado a nutrição do ginófito.

Até o estágio de embrião cordiforme, a mesotesta acumula compostos pécnicos circundando o endosperma e o embrião (Fig 5c). Após o estágio de embrião torpedo, as antípodas e o endosperma degeneram e a mesotesta fica diretamente em contato com o embrião até a sua maturidade (5d,g). Uma única camada da mesotesta persiste até o estágio de semente madura (Fig 5g).

Na semente madura, as células da exotesta, e da mesotesta no lado da rafe se tornam lignificadas (Fig 5g). A semente adquire coloração marrom com formato oval, ocupando todo o loculo do fruto (Fig 5f).

O fruto é indeiscente (Fig 5e) e a radícula da plântula é emitida no ápice do fruto. Em todas as sementes observadas (n=161)

Apenas uma plântula por semente germinou (n=161), rejeitando a hipótese de presença de embriões adventícios (Fig 5h).

Como conclusão, as flores perfeitas são autopolinizadas antes da visita do polinizador, enquanto que as flores pistiladas, com pólen estéril, sofrem polinização cruzada. Nenhum embrião adventício foi detectado durante o desenvolvimento da semente, tão pouco, nas análises de germinação das sementes.

## **Referências**

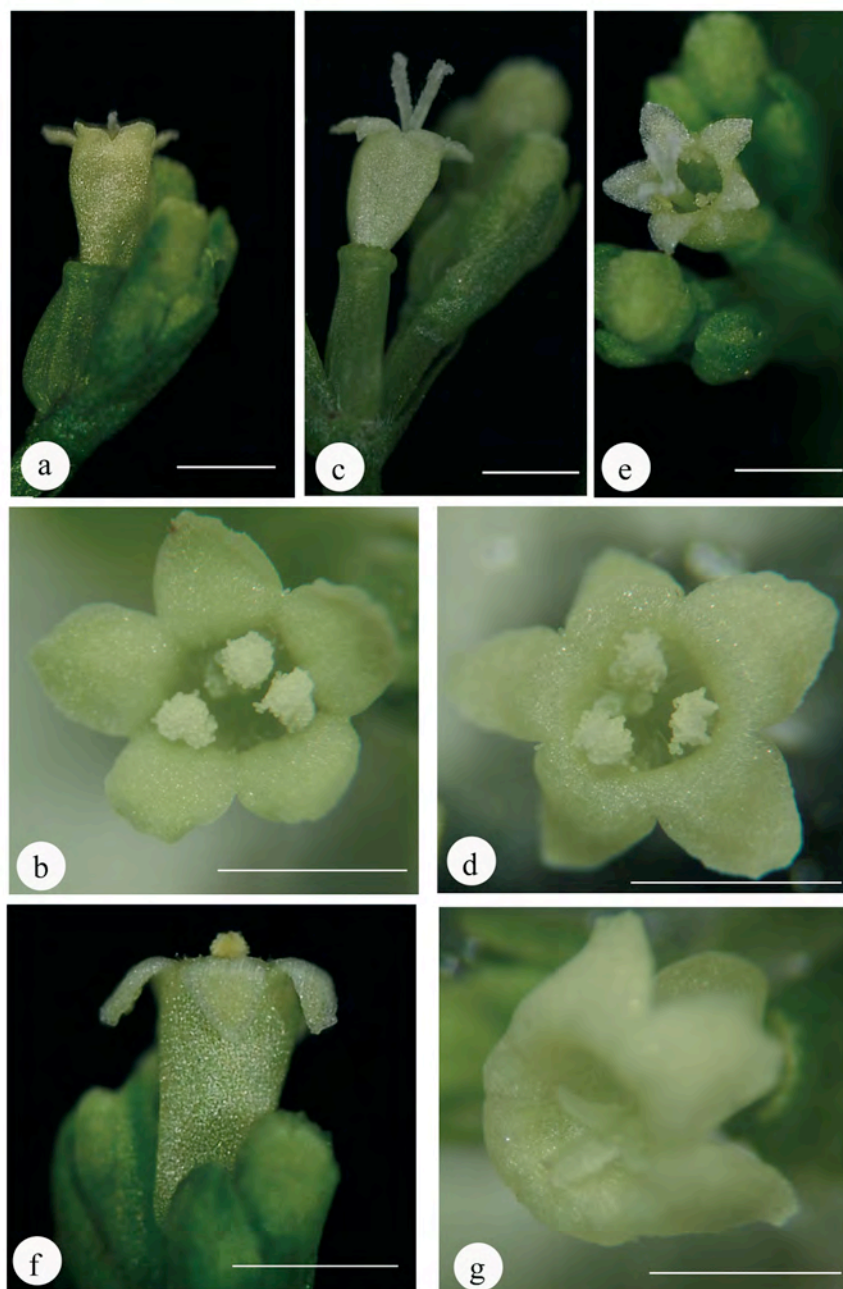
Dafni A (1992) Pollination ecology: a practical approach. Oxford University Press.

Dafni A, Firmage D (2000) Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* 222: 113-132.

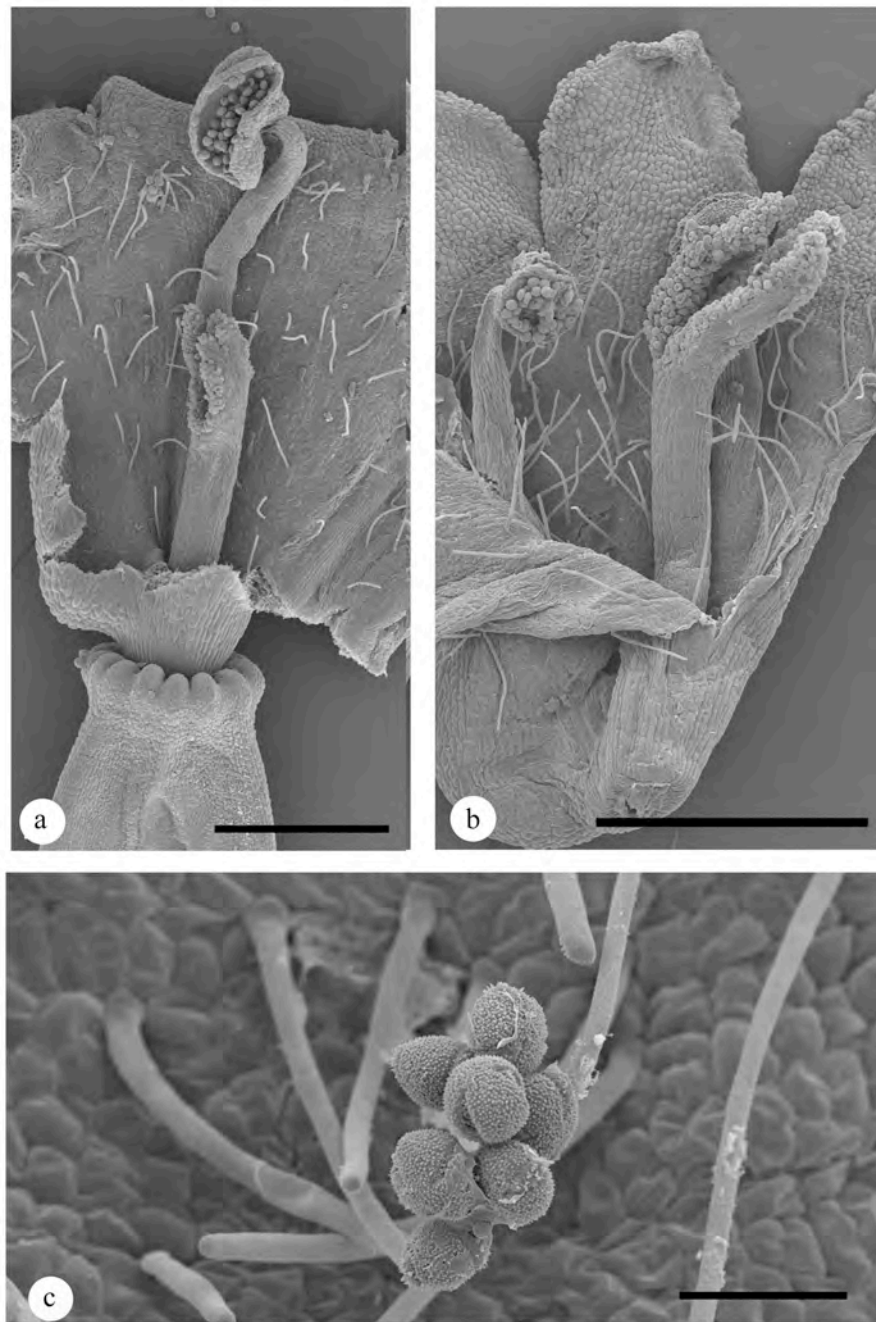


- Duarte-Silva E (2006) Morfologia floral e expressão sexual de *Valeriana scandens* L. Magister Science Thesis. Federal University of Viçosa, MG, Brazil.
- Duarte-Silva E, Vanzela AA, Mariath JEA. (2010) Developmental and cytogenetic analysis of pollen sterility in *Valeriana scandens* L. **Sex Plant Reprod. in press.**
- Endress PK (1994) Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press.
- Feder N, O'Brien TP (1968) Plant Microtechnique, some principles and new methods. Am J Bot 55:123-142.
- Gabriel BL (1982) Biological electron microscopy. Princeton N.J.: Van Nostrand Reinhold.
- Geber MA; Dawson TE; Delph LE (1999) Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Springer Verlag.
- Gerrits PO, Smid L (1983) A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. J Microsc 132:81-85.
- Gersterberger P, Leins P (1978) Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae) Anwendung einer neuen Präparationsmethode. Ber Deutsh Bot Ges 91:381-387.
- Harder LD; Barrett SCH (2006) Ecology and evolution of flowers. Oxford University Press.
- Kearns CA; Inoyue DW (1993) Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado. 583p.
- Lloyd DG; Barrett SCH (1996) Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants. Chapman and Hall.
- Martin, F.N. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. Stain Technology 34:125-128.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiologia Plantarum 15 (3): 473-497.
- Newstrom LE; Frankie GW; Baker HG. (1994). A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. Biotropica 26: 141-159.
- Nicolson SW; Nepi M; Pacini E. (2003). Nectaries and nectar. Springer Verlag.

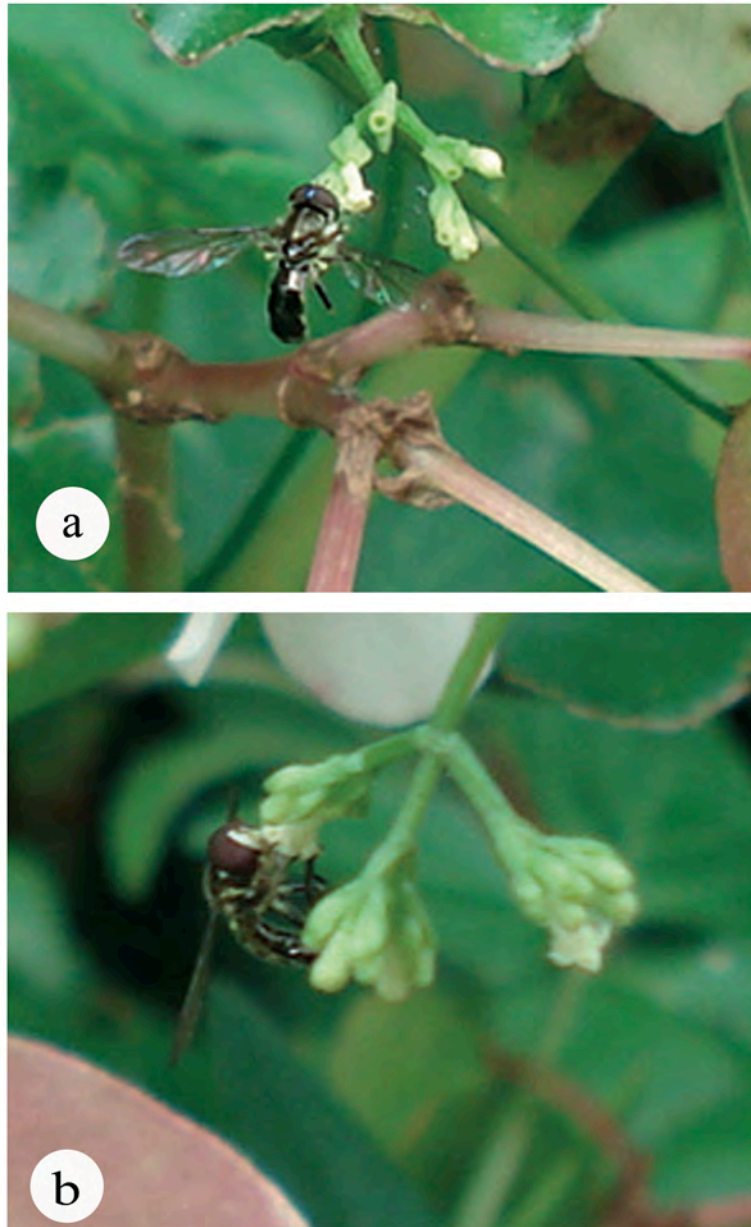
Richards AJ (1997) Plant Breeding. Chapman and Hall. 2ed.



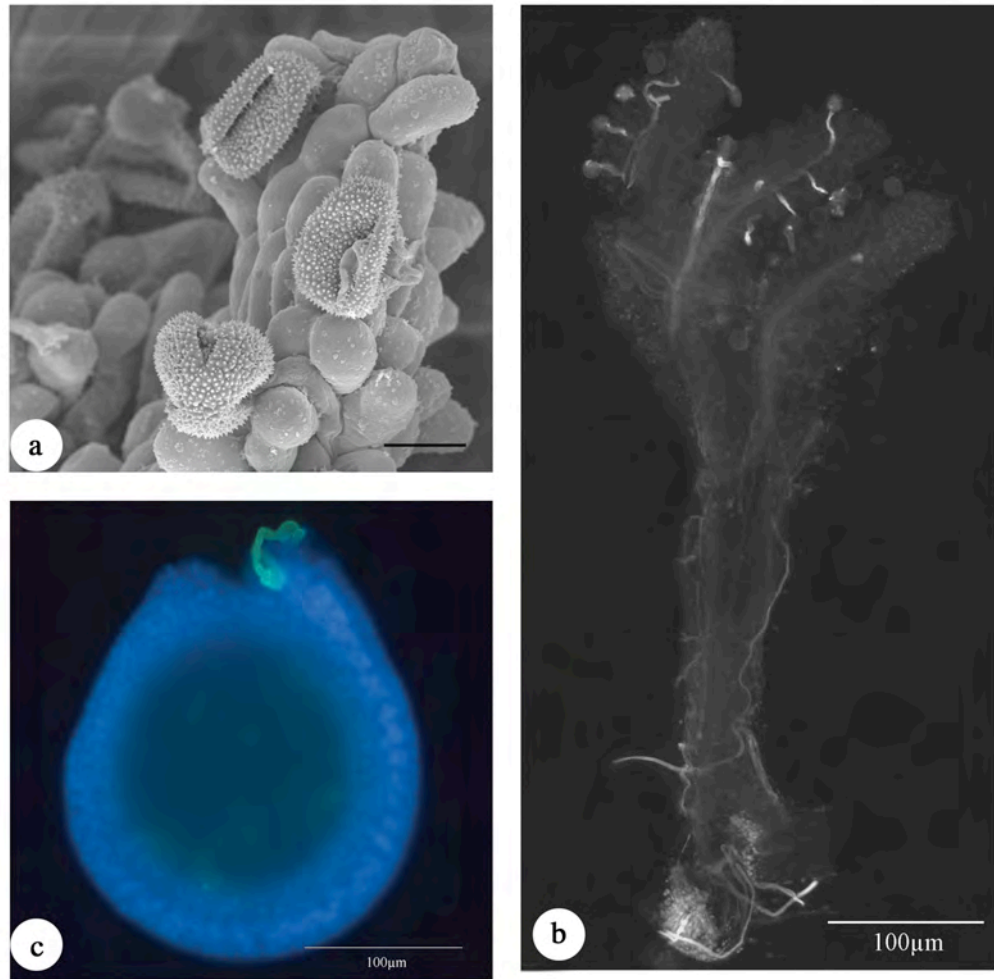
**Fig 1** Flores de *Valeriana scandens* em diferentes estádios da antese. **a** Flor pistilada com lobos da corola eretos, no início da antese. **b** Flor perfeita com lobos eretos, no início da antese. **c** Flor pistilada com lobos radiais, na metade da antese. **d** Flor perfeita com lobos radiais, se tornando reflexos, na metade da antese. **e** Flor pistilada com lobos radiais no final da antese, os três estaminódios são mostrados no ápice do tubo da corola. **f** Flor perfeita com lobos reflexos e estame no ápice do tubo da corola. **g** Flor perfeita com lobos reflexos no final da antese. As anteras já se desprenderam do tubo do corola.



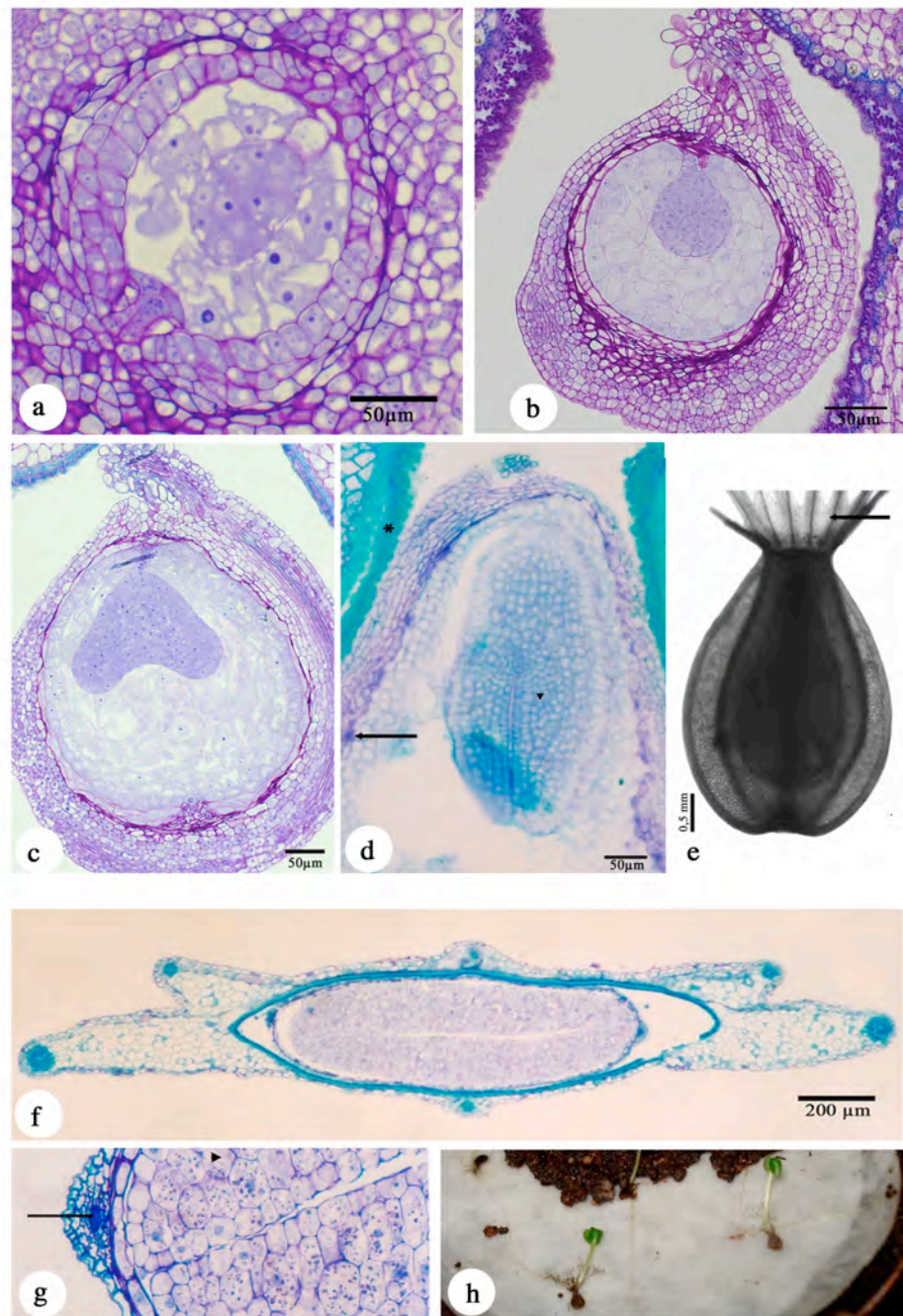
**Fig 2** Morfologia floral de *V. scandens*. **a** Flores perfeitas com anteras sub-exertas e estigma incluso. **b** Flor pistilada com anteras e estigma sub-exertos. **c** Detalhe do tricomas da corola da flor perfeita com grãos de pólen aderidos.



**Fig 3** Visitante floral de *Valeriana scandens*. **a-b** Diptera visitando a flor de *V. scandens*.



**Fig 4** Autopolinização e crescimento do tubo polínico em flores perfeitas de *V. scandens*. **a** Grãos de pólen germinando no estigma visto em MEV. **b** Tubos polínicos crescendo nas porções apical e basal do estilete. **c** Tubo polínico penetrando o rudimento seminal.



**Fig 5** Desenvolvimento da semente e germinação de plântulas de *Valeriana scandens* **a** Estádio de pro-embrião. **b** Estádio de embrião globular. **c** Estádio de embrião cordiforme. **d** Estádio de embrião torpedo. **e** Fruto clarificado com fluido de Herr. **f** Detalhe da semente madura, dentro do lóculo do fruto. **g** Detalhe da testa madura e dos cotilédones do embrião. **h** Plântulas germinando.

## Capítulo VI – Considerações finais

O polimorfismo floral de *Valeriana scandens* quando analisado sob uma perspectiva embriológica fornece dados a respeito da complexidade da estrutura floral, que abarca as gerações esporofítica e gametofítica, do ciclo de vida desta planta.

Nesta abordagem realizada, todas as flores de *V. scandens*, não obstante o fenótipo floral, completam a androsporogênese e a ginosporogênese, desenvolvendo, respectivamente andrósporos e ginósporos. Todos os fenótipos florais também apresentam ginogametogênese regular e formam ginófitos maduros. O que diferencia, quanto ao desenvolvimento, a flor perfeita da flor pistilada é a incapacidade, da última, de formar andrófitos maduros, viáveis.

A esterilidade do pólen na espécie é governada pelo genoma esporofítico, uma vez que são falhas na androsporogênese que levam a morte do grão de pólen imaturo: o retardo na dissolução da calose e conseqüente má-formação da esporoderme, como visto no mutante *msd11* de *Brassica* (Wang *et al.* 2000; Lou *et al.* 2007). Entretanto, a esterilidade do pólen pode ser expressa na totalidade, em parte, ou não ser expressa nas flores de um esporófito, uma vez que as populações já estudadas de *V. scandens* apresentaram esporófitos contendo, tanto flores pistiladas, quanto flores pistiladas e perfeitas, ou, somente, flores perfeitas.

A população estudada de *V. scandens* é diplóide e apresenta meiose regular tanto na androsporogênese quanto na ginosporogênese. A ausência de distúrbios meióticos, bem como números cromossômicos poliplóides, na população estudada, são fatos que corroboram a detectada existência de meiose regular na ginosporogênese, e conseqüente formação de um ginófito de origem meiótica, que se



reproduz sexuadamente. A hipótese inicial, da presença de apomixia na espécie, estava relacionada a possíveis distúrbios meióticos, ou números cromossômicos poliplóides, que facilitariam a formação mitótica de ginófitos e embriões zigóticos de origem apomítica.

Dados parciais sugerem que as flores perfeitas são auto-compatíveis e desenvolvem sementes por auto-polinização enquanto que as flores pistiladas desenvolvem sementes por polinização cruzada. Os fatores que levam à auto-polinização nas flores perfeitas são: (1) morfologia floral que permite a auto-polinização, ou seja, anteras sub-exertas e estigma incluso; (2) a rápida germinação do tubo polínico, comprovada em termos experimentais *in vitro* e *in vivo* (4) os lobos da corola eretos nas primeiras 6 hs de antese, o que evita a visita de polinizadores e a polinização cruzada, e, por consequência, favorece a autopolinização.

Como mencionado no cap. 1 Referencial Teórico, várias espécies de *Valeriana* são utilizadas na produção de fitoterápicos, como *Valeriana officinalis*. Espécies brasileiras, como *Valeriana glechomifolia*, também estão sendo estudadas para produção de fármacos. Essas espécies apresentam flores perfeitas e pistiladas tal como *Valeriana scandens*. O presente estudo, embora tenha sido realizado com uma espécie sem perspectivas de comercialização até o momento, fornece dados, e principalmente métodos, que podem ser testados em outras espécies para auxiliar em estudos de melhoramento vegetal, sendo descritos os métodos utilizados em *Valeriana scandens* para: (1) correta identificação dos fenótipos florais, uma vez que as flores são inconspícuas, (2) confecção de análises histológicas, (3) confecção de análises citogenéticas, (4) germinação de grão de pólen *in vitro* e *in vivo*, e (5) germinação de sementes. Estudos de reprodução de diferentes espécies de um gênero necessitam de adequação de protocolos, uma vez que nem todas as espécies

filogeneticamente relacionadas apresentam padrões biológicos idênticos, ou em muitos casos, similares. Entretanto, um estudo de uma espécie de um gênero, potencialmente medicinal, pode constituir um ponto de partida para testes e adequações posteriores de protocolos.

## Capítulo VII - PERSPECTIVAS

1. Dando continuidade aos estudos citogenéticos de *V. scandens*, a análise convencional da meiose em microscopia de campo claro poderia ser complementada com análise de bandeamento cromossômico, hibridização *in situ* em microscopia de fluorescência (FISH), das três variedades, e de indivíduos com diferentes esporidades (com flores perfeitas e pistiladas, e somente com flores perfeitas). A hibridização *in situ* é capaz de identificar sítios ribossômicos distintos que marcam diferenças entre espécies e variedades. Testes preliminares de hibridização *in situ* em *V. scandens* foram realizados, durante o trabalho de tese, no LaBRE, UEL(PR), necessitando uma melhor adequação de protocolos para alcançarmos esse objetivo.
2. Não há estudos citogenéticos da variedade *V. scandens* var. *subcordata*, muito pelo fato, de sua distribuição geográfica no Brasil, estar restrita à região norte e noroeste da Amazônia Legal. Esforços de coleta dessa variedade são necessários para o prosseguimento das pesquisas nesta área.
3. Tendo em vista que a *V. scandens* é auto-compatível, obtendo sucesso reprodutivo através da auto-polinização, sugere-se um estudo mais sistemático e aprofundado da frequência de polinizadores e coleta dos visitantes florais.
4. Nos quatro anos do presente trabalho, a população de *V. scandens* da Reserva do Morro Santana é limitada a uma área restrita, com menos de 20 indivíduos, em estágio reprodutivo, observados a cada ano. A área de estudo é uma

floresta urbana porém sujeita a impacto antrópico. Para o prosseguimento de pesquisas sobre o sistema reprodutivo da espécie, e, principalmente, a conservação dessa população, uma solução seria a conservação *ex-situ*, em casa de vegetação, oriundas de mudas jovens. O estabelecimento de mudas e a germinação de sementes já foram obtidas com sucesso pela autora durante o trabalho de mestrado realizado no Herbário VIC e Horto Florestal anexo ao herbário, da Universidade Federal de Viçosa-MG, sob orientação da Prof. Dra. Milene Faria Vieira, e do responsável técnico do herbário Gilmar Valente.