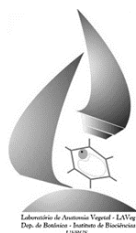




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

VANESSA RUBIO DOS SANTOS

Efeito de alta temperatura sobre a ginosporogênese de *Tillandsia aeranthos* (Loisel.)  
L.B.Sm. (Bromeliaceae).



Porto Alegre

2020



VANESSA RUBIO DOS SANTOS

Efeito de alta temperatura sobre a ginosporogênese de *Tillandsia aeranthos* (Loisel.)  
L.B.Sm. (Bromeliaceae).

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul, como parte  
dos requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Porto Alegre

2020

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, em especial a minha mãe, Aldina, que sempre me deu todo o apoio para seguir os estudos mesmo com as dificuldades da vida. E ainda a minha irmã, Melissa, o maior exemplo de dedicação aos estudos e luta para alcançar os seus sonhos. Às mulheres da minha família, avós e tias, que sempre serviram de exemplo como mulheres fortes que lutam pelos seus direitos de estudar e ser aquilo que desejam. E claro ao pai José e irmão Taylor, que sempre apoiaram, acreditaram e desejaram o melhor para o meu futuro.

Aos Professores do PPG Botânica que contribuíram para a minha formação. Principalmente os do grupo Laveg, por sempre ajudar na construção e execução do projeto.

A todos os colegas de Laveg que foram amigos e presentes nos momentos difíceis. Em especial para Juliana, Carolina, José, Maria, Valéria, Keyla e Tamara.

Agradeço profundamente ao Orientador Professor Jorge E. A. Mariath, por sua ajuda e compreensão em todos os momentos de dúvidas e contratempos, dando força para seguir em frente ter sido possível concluir este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul abriram as portas para o desenvolvimento do projeto. E ao Laboratório de Fisiologia coordenado pelo Professor Arthur G. Fett-Neto que concedeu uma incubadora para o desenvolvimento das Tillandsia.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa de Mestrado.

E por último agradeço a eles, os seres que fazem a mínima ideia de que se trata tudo isso, mas que foram os mais importantes para hoje eu estar aqui. Todos os meus, em especial ao Green e Neguinha.

## RESUMO

A plantas são sensíveis as mudanças do ambiente, sendo a temperatura um dos fatores que mais afetam seu desenvolvimento. A temperatura média mundial tem registrado aumentos nos últimos anos, para o final do século a previsão é de um aumento de 0,3-4,8°C. Até mesmo pequenas alterações na temperatura podem gerar respostas que podem afetar a morfologia, fenologia e reprodução de uma planta. *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. é sensível as variações do ambiente, possui potencial para ser usada como indicador de estresse, e sua utilidade como bioindicador de poluição já foi apontada em estudos. Os objetivos deste trabalho foram analisar os efeitos do estresse térmico sobre o desenvolvimento floral de *T. aeranthos* submetidas a quatro tratamentos de alta temperatura, temperatura constante de 32°C dia/ 32°C noite (TC32); 38°C dia/ 38°C noite ou 35°C dia/ 35°C noite (TC38/35) e temperatura alternada 28°C dia/ 22°C noite (TA28); 32°C dia/ 22°C noite (TA32). Durante a esporogênese foi analisado a morfologia floral, as fases de desenvolvimento do rudimento seminal e ainda a deposição de calose nos ginósporos. Os indivíduos submetidos aos tratamentos TC32, TA28 e TA32 apresentaram resposta específica à temperatura com termomorfogênese, o crescimento e desenvolvimento foi acelerado, a morfologia das folhas não foi afetada, o pedúnculo da inflorescência teve alongamento e ainda antese precoce das flores, em relação aos indivíduos do ambiente. O tratamento TC38/35, em relação ao ambiente e demais tratamentos, teve seu crescimento e desenvolvimento acelerado, demonstrou sinais de estresse na morfologia das folhas e inflorescências, como baixa pigmentação e ressecamento e ainda os sinais de necrose nas bases das flores, posteriormente sofreram aborto. O desenvolvimento acelerado foi visto também nos rudimentos seminais dos tratamentos TC32, TA28 e TA32 apresentando padronização das fases ontogenéticas e avanço em relação ao ambiente, enquanto no TC38/35 houve estagnação do desenvolvimento. A deposição de calose durante a ginosporogênese foi anormal nos tratamentos TA32 e TC32. Deste modo, todos os tratamentos apresentaram algum sinal de morte celular programada como vacuolação anormal, baixa densidade citoplasmática ou degeneração do nucelo e de rudimentos seminais inteiros.

**Palavras-chave:** *Tillandsia aeranthos*, rudimento seminal, ginosporogênese, estresse térmico, morte celular programada, calose.

## ABSTRACT

Plants are sensitive to changes in the environment, temperature being one of the factors that most affect their development. The average world temperature has registered increases in recent years, by the end of the century the forecast is for an increase of 0.3-4.8° C. Even small changes in temperature can generate responses that can affect the morphology, phenology and reproduction of a plant. *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. it is sensitive to variations in the environment, has the potential to be used as a stress indicator, and its usefulness as a bioindicator of pollution has already been pointed out in studies. The objectives of this work were to analyze the effects of thermal stress on the floral development of *T. aeranthos* submitted to four high temperature treatments, constant temperature of 32° C day / 32° C night (TC32); 38°C day/ 38°C night or 35°C day/ 35°C night (TC38/35) and alternating temperature 28° C day / 22° C night (TA28); 32° C day / 22° C night (TA32). During sporogenesis, floral morphology, the stages of development of seminal rudiment and the deposition of callose in megaspores were analyzed. The individuals submitted to the TC32, TA28 and TA32 treatments showed specific temperature response with thermomorphogenesis, growth and development was accelerated, the leaf morphology was not affected, the inflorescence stalk had elongation and even early anthesis of the flowers, in relation to the individuals of the environment. The TC38/35 treatment, in relation to the environment and other treatments, had its growth and development accelerated, showed signs of stress in the morphology of the leaves and inflorescences, such as low pigmentation and dryness and also the signs of necrosis at the bases of the flowers, later suffered abortion. The accelerated development was also seen in the seminal rudiments of the TC32, TA28 and TA32 treatments, showing standardization of the ontogenetic phases and progress in relation to the environment, while in the TC38/35 there was developmental stagnation. Callose deposition during ginosporogenesis was abnormal in the TA32 and TC32 treatments. Therefore, all treatments showed some sign of programmed cell death such as abnormal vacuolation, low cytoplasmic density or degeneration of the nucleus and entire seminal rudiments.

**Keywords:** *Tillandsia aeranthos*, seminal rudiment, megasporogenesis, heat stress, programmed cell death, callose.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapa de Temperatura Máxima Absoluta (°C) para a região sul do Brasil nos meses de junho, julho e agosto (início da floração da espécie).....	13
Tabela 1: Tratamentos e regimes de temperatura. ....	16
Figura 2: Morfologia dos indivíduos de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura constante no 13° dia de experimento.....	19
Figura 3: Inflorescências de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura constante. ....	22
Tabela 2: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal em temperatura constante. 23	
Figura 4: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura constante.....	24
Figura 5: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura constante.....	25
Figura 6: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura constante.....	26
Figura 7: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura constante.....	27
Figura 8: Morfologia dos indivíduos de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura alternada no 11° dia de experimento.....	28
Figura 9: Inflorescências de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura alternada.....	30
Figura 10: Inflorescências de <i>Tillandsia aeranthos</i> do tratamento em temperatura alternada. ....	31
Tabela 3: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal em temperatura alternada. 32	
Figura 11: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura alternada. ....	33
Figura 12: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura alternada. ....	34
Figura 13: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de <i>Tillandsia aeranthos</i> em temperatura alternada. ....	35
Figura 14: Deposição de calose no rudimento seminal de <i>Tillandsia aeranthos</i> durante a esporogênese.....	37

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. OBJETIVOS .....	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos .....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Coleta e Tratamentos .....	15
3.2. Processamento do material para estereomicroscopia.....	17
3.3. Processamento do material para microscopia de luz transmitida.....	17
4. RESULTADOS .....	18
<b>4.1 Temperatura Constante (Coleta de 2015)</b> .....	18
4.1.1 Morfologia das folhas e inflorescências .....	18
4.1.2 Fases de desenvolvimento do rudimento seminal.....	20
<b>4.2 Temperatura alternada (Coleta de 2018)</b> .....	28
4.2.1 Morfologia das folhas e inflorescências .....	28
4.2.2 Fases de desenvolvimento do rudimento seminal.....	29
<b>4.3 Deposição de Calose na Ginosporogênese</b> .....	36
5. DISCUSSÃO .....	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	47

## 1. INTRODUÇÃO

A distribuição e a composição da vegetação natural variam muito conforme o clima de uma região do planeta (Buriol *et al.*, 2007). O planeta Terra apresentou durante toda sua história mudanças climáticas, passando por eras glaciais e interglaciais que moldavam a geografia e as formas de vida terrestre. As mudanças climáticas são comuns e inerentes a história do planeta e ainda vão persistir no futuro. Apesar da mudança climática ser um padrão recorrente não há registros de alterações anormais no padrão climático nas eras passadas (Grotzinger e Jordan, 2013). O aumento de temperatura anormal passou a ser observado com o começo da Revolução industrial do século XIX e esses dados coincidem com o aumento da emissão de gases de efeito estufa (IPCC, 2014; Wang *et al.*, 2018). As plantas são sensíveis às mudanças climáticas e podem sofrer estresse justamente por haver essa alteração no ambiente. Os fatores temperatura e disponibilidade de água em conjunto são fundamentais para o desenvolvimento das plantas e formação de comunidades vegetais (Menezes-Silva, 2019). No entanto, a temperatura é um fator que merece maior atenção pois, além de poder ter o efeito mais estressante por si só, também pode intensificar o efeito do déficit de água (Will *et al.*, 2013).

As previsões de aumento da temperatura média global preocupam especialistas das mais diversas áreas, tanto que o *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) foi criado em 1988, para reunir dados de publicações mundiais na perspectiva de ampliar a compreensão dos padrões climáticos observados e as possíveis consequências para o futuro. Os relatórios do IPCC apresentam dados que justificam a preocupação de especialistas no que se refere ao aquecimento global. A projeção para o final do século, no período de 2081-2100 em relação a 1986-2005, é de um aumento de 0,3-1,7 graus centígrados (°C) em um cenário mais otimista (baixa emissão de gases de efeito estufa). O cenário pessimista, quando a emissão de gases de efeito estufa seria alta, o aumento da temperatura média mundial previsto é de 2,6-4,8°C. Ao se analisar um futuro menos distante, no período de 2016-2035 espera-se um aumento de 0,3°C a 0,7°C bem mais ameno do que o esperado para o final do século (IPCC, 2014).

A previsão para o final do século pode variar conforme a região do globo. Para o extremo sul do Brasil a projeção é de aumento de 1-1,5°C na temperatura no cenário otimista, enquanto no cenário pessimista, aumento de 3,5-4,5°C na temperatura média da região. Para a região tropical do Brasil o aumento de temperatura previsto será maior,



num cenário otimista, o aumento na temperatura média será de 1,5°C, enquanto o cenário pessimista pode chegar a 5,5°C (Magrin *et al.*, 2014). Dentre as mudanças para o estado do Rio Grande do Sul a redução da amplitude térmica, nas últimas décadas tem-se registrado uma tendência de aumento na média anual da temperatura mínima (Berlato e Cordeiro, 2017). Registros para estações do ano mostram aumento significativo de 0,89 °C no verão, 1,08 °C no outono e 0,97 °C na primavera, somente para o inverno o aumento de 0,52, °C não foi significativo (Cordeiro *et al.*, 2016).

A resposta das plantas a temperaturas quentes do ambiente pode ser de três tipos comum, específica e estresse. Quando temperaturas mais altas do que a média no ambiente aceleram o crescimento e o desenvolvimento, mas a estrutura morfológica não sofre alteração, essa é uma resposta comum das plantas. Quando há alteração na estrutura morfológica da planta se trata de respostas específicas, e este conjunto de mudanças morfológicas são denominadas de termomorfogênese. As mudanças morfológicas observadas na termomorfogênese são alongamento do hipocótilo de plântulas, dos pecíolos das folhas e do pedúnculo da inflorescência e ainda floração precoce. O terceiro tipo de resposta é o estresse, sendo considerado estresse quando além de alterações morfológicas a temperatura mais alta atinge um valor crítico e assim causa danos ao crescimento e desenvolvimento do indivíduo (Casal e Balasubramanian, 2019).

Da mesma maneira que o desenvolvimento das plantas responde às mudanças do ambiente, o ciclo de vida também sofre sua influência. A fenologia das plantas é uma resposta às forças bióticas e abióticas a que estas são submetidas. Dentre estas forças está a temperatura, que apresenta um efeito direto sobre as fases de vida de uma planta (Richardson, 2013; Woldearegay, 2020). Como resposta pode ocorrer adiantamento ou atraso do período natural de desenvolvimento de uma planta desde seu crescimento vegetativo até o reprodutivo (Hossain *et al.*, 2012). Essa alteração na fenologia afeta também a velocidade de crescimento do tubo polínico, mas também afeta o desenvolvimento e degeneração do pistilo, interferindo na sincronia do processo reprodutivo, podendo diminuir ou suprimir a fecundação (Herrero, 2003; Snider e Oosterhuis, 2011).

As plantas são mais sensíveis a alta temperatura em dois períodos específicos do desenvolvimento reprodutivo, o primeiro antes da antese, durante o desenvolvimento do botão floral que normalmente coincide com a androsporogênese e a ginosporogênese e o

segundo quando ocorre a antese (Prasad e Djanaguiraman, 2014). Os danos observados pela exposição a temperaturas altas mais comuns de se observar são aborto de flores, infertilidade de pólen e rudimentos seminiais, queda no número de sementes produzidas (Sita *et al.*, 2017).

Os danos causados pelo estresse, sejam por altas ou baixas temperaturas, podem ser detectados na observação dos órgãos reprodutores em microscopia de luz transmitida, método que analisa a integridade dos tecidos. Entre os danos mais relatados estão condensação nuclear e alta vacuolação celular, sendo estes indicadores de iminente morte celular (Papini *et al.*, 2011). Outro meio que pode ser promissor para detectar os danos causados pelo estresse térmico é pela observação da deposição de calose, uma vez que a formação de calose está associada a situações de estresse e pequenas mudanças de temperatura podem ser suficientes para alterar sua deposição em ápice de caule e raiz (Smith e McCully, 1977), e principalmente associada perda de viabilidade de rudimentos seminiais maduros ou não fecundados (Rosellini *et al.*, 1998). Calose é um polissacarídeo que se deposita entre a membrana plasmática e a parede celular, presente em algumas células e depositada em certas ocasiões (Ünal *et al.*, 2013). Durante a meiose, a calose circunda as células do ginósporo, com isso a célula recebe uma barreira de isolamento das demais células, a barreira cria um filtro molecular que desempenha em seguida um papel importante no desenvolvimento do ginófito (Rodkiewicz, 1970).

Breitsameter (2014) ao avaliar a ontogenia da espécie *Vriesea gigantea* Gaudich. (Tillandsioideae - Bromeliaceae) verificou quatro rotas meióticas com diferentes padrões de deposição de calose. Estas rotas diferentes foram observadas em indivíduos coletados em casa de vegetação, onde temperaturas máximas registradas chegaram a 38,6°C, enquanto o ambiente natural registrou no máximo 34°C. Os indivíduos coletados em ambiente natural apresentam a rota meiótica comum para a família, onde a ginosporogênese tem como resultante o padrão de tétrade linear, com um ginósporo funcional calazal e três não funcionais micropilares. O esporo funcional forma um gametófito de origem monospórica. Enquanto os indivíduos coletados em casa de vegetação apresentaram um ginósporo funcional calazal e um ou dois ginósporos não funcionais micropilares. A alta temperatura foi apontada como a principal causa para estas rotas diferenciadas, uma vez que foi observado apenas em indivíduos que foram submetidos a temperaturas acima do observado no ambiente natural.

Todas as respostas ao estresse são consequência da alteração dos diversos processos bioquímicos celulares que acontecem nas plantas. A produtividade das plantas pode diminuir com a queda da eficiência da fotossíntese, quando em altas temperaturas a capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub> diminui, a relação O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> dentro do cloroplasto se altera, e com isso se observa um aumento de fotorrespiração (Brooks e Farquhar, 1985; Pastenes e Horton, 1996). Observou-se também que quando em condições de elevado CO<sub>2</sub> associado a elevação de temperatura há queda da qualidade de frutos, resultando em frutos menores e com menos teor de antioxidantes (Sun *et al.*, 2012). A produtividade pode ser comprometida ainda em espécies ornamentais e cultivadas pela redução no número e tamanho das flores. (Morrison e Stewart, 2002; Warner e Erwin, 2005).

Com intuito de analisar o efeito da alta temperatura, em uma espécie de Bromeliaceae para realização deste trabalho procurou-se uma espécie pertencente a subfamília Tillandsioideae e que fosse viável realizar experimento em ambiente controlado. As plantas epífitas da família Bromeliaceae adaptadas ao ambiente méxico tem a presença de fitotelma (tanque), área de sobreposição das bainhas foliares imbricadas que armazenam água das chuvas e detritos e de tricomas peltados responsáveis pela absorção de água (Smith e Down, 1977; Versieux e Wanderley, 2015). No caso de plantas da família adaptadas ao ambiente xérico não há presença de fitotelma e a absorção de água e nutrientes ocorre exclusivamente nos tricomas que se encontram em grande número nas folhas (Benzing *et al.*, 1976). Os tricomas ao absorverem a água acabam absorvendo outros elementos, como cádmio (Cd), cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn) e, por essa capacidade, são bioindicadores de qualidade do ar, pois através das folhas é possível medir a poluição de um ambiente (Tadiello *et al.*, 2014, Becker *et al.*, 2017).

Uma vez que essa subfamília é sensível à variação ambiental, inclusive no âmbito reprodutivo (Brighigna *et al.*, 2006), tais plantas poderiam ser bioindicadores de estresse. Assim a espécie selecionada foi *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. (Tillandsioideae-Bromeliaceae) devido ao seu potencial bioindicador e o porte pequeno dos indivíduos durante a fase reprodutiva, suas dimensões são de 15 a 20 cm de altura (Reitz, 1983), e o seu hábito epifítico de fácil implementação de experimento em ambiente controlado.

A espécie *T. aeranthos* está distribuída principalmente no estado do Rio Grande do Sul, se restringindo à região subtropical do continente americano (Figura 1). Na cidade

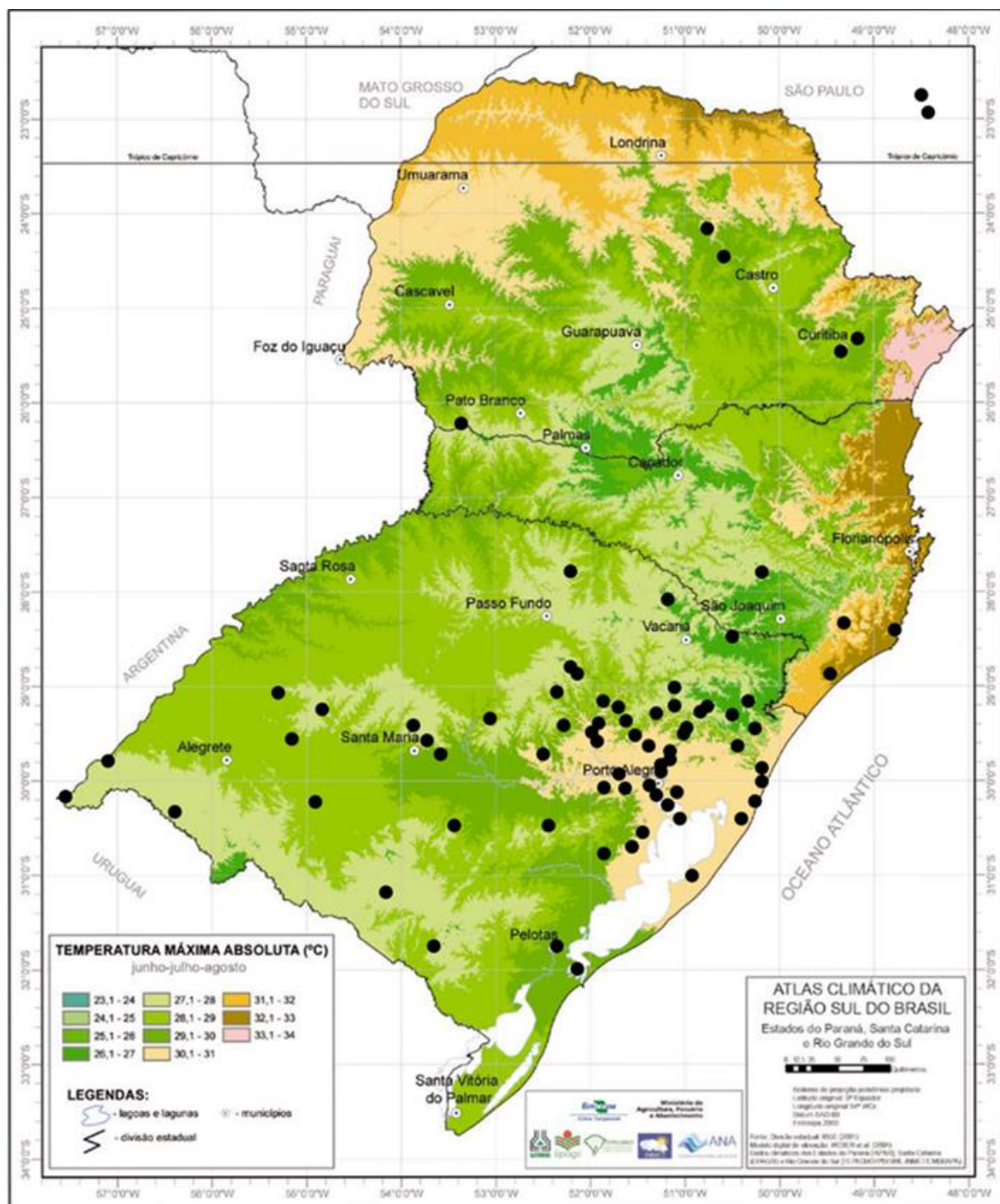
de Porto Alegre é encontrada nos Morros Graníticos das Abertas, da Grota, Santana, Tapera e Teresópolis (Aguiar *et al.*, 1986). O subgênero *Anoplophytum*, no qual a espécie está inserida, tem distribuição geográfica desde o Peru, ao norte da América do Sul até o extremo sul na Argentina (Benzing, 2000). O subgênero se divide em dois centros de distribuição: os Andes representado pelas espécies fortemente xeromórficas e o Brasil representado pelas espécies xerófitas e mesófitas. A espécie *T. aeranthes* pertence ao segundo grupo, sendo encontrada no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e no sudeste da Argentina (Smith e Downs, 1977).

*T. aeranthes* tem hábito epifítico e utiliza espécies arbustivas e arbóreas apenas como substrato, sendo consideradas comensalistas, porém podem causar danos por competição quando em elevado número de indivíduos na população (Caldiz e Beltrano, 1989).

Quanto as suas características morfológicas, *T. aeranthes* apresenta folhas espiraladas que cobrem o caule devido ao seu grande número. A floração ocorre de julho a janeiro. Com inflorescência ornamentada com brácteas róseas ou purpúreas, possui de 5 a 20 flores, estas com sépalas róseas ou avermelhadas e pétalas violáceas (Reitz, 1983).

O androceu apresenta seis estames com anteras tetrasporangiadas, amarelas, três maiores e três menores. O gineceu apresenta ovário súpero, gamocarpelar, tricarpelar e trilobular, (Spat, 2012), tem em média  $\approx 252$  rudimentos seminais por ovário (Bianchi e Vesprini, 2014). Espécie protândrica, anteras deiscentes na pré-antese e gineceu receptivo na antese, com fecundação cruzada, apresentando alta auto-incompatibilidade (Bianchi e Vesprini, 2014), tendo como registro de polinizadores beija-flores (Snow e Teixeira, 1982; Ono *et al.*, 2020).

O padrão de desenvolvimento do rudimento seminal de *T. aeranthes* foi descrito por Spat (2012). O primórdio do rudimento seminal começa seu desenvolvimento na placenta axial e é constituído de três camadas meristemáticas (dérmica, subdérmica e central). A camada subepidérmica inicia o processo de diferenciação e dá origem a célula inicial arqueosporial. Esta célula inicial se divide periclinalmente dando origem a uma célula parietal primária e a uma célula mãe de ginósporo, caracterizando um rudimento seminal do tipo crassinucelado. Percebe-se nesse estágio a formação do tegumento interno, em seguida célula mãe de ginósporo começa a se alongar. A formação do tegumento externo se inicia de forma assimétrica, enquanto a célula mãe continua se alongando e o



**Figura 1:** Mapa de Temperatura Máxima Absoluta (°C) para a região sul do Brasil nos meses de junho, julho e agosto (início da floração da espécie). ● ocorrência de *Tillandsia aeranthis* (dados obtidos na rede speciesLink). Adaptado de WREGÉ *et al.*, 2011.

rudimento seminal se curva, característico do tipo anátropo. A célula mãe de ginósporo entra em processo de ginosporogênese, ocorre então uma polarização micropilar do núcleo que se prepara para a meiose. O processo de meiose se inicia e no primeiro ciclo mitótico se observa a metáfase seguida da formação de uma díade de ginósporos. Essa díade então passa por mais uma divisão formando uma tríade de ginósporo e outra logo após formando a tétrade de ginósporos. Após formada a tétrade apenas um desses ginósporos seguirá seu desenvolvimento e os outros dois ou três serão degenerados. No nucelo a deposição de calose ocorre no espaço entre a díade, tríade e tétrade de ginósporos, fazendo uma separação entre elas nas paredes transversais, depois quando o ginósporo funcional se estabelece o mesmo é circundado pela deposição de calose em todos os limites da célula preparando para o processo de ginogametogênese.

Diversos estudos sobre o efeito da temperatura são encontrados na literatura sobre o efeito do estresse térmico em plantas, porém ainda são poucos os que avaliam ao nível anatômico os aspectos reprodutivos. Pouco se sabe também dos efeitos da alta temperatura sobre o gineceu, uma vez que a maioria dos trabalhos já realizados detalham os efeitos sobre o androceu (Gross e Kigel, 1994; Porch e Jahn, 2001). As espécies mais estudadas são na maioria cultivadas, ou seja, espécies que geralmente possuem ampla distribuição geográfica ou amplitude ecológica, devido ao melhoramento (Zinn *et al.*, 2010). A espécie usada neste trabalho possui uma distribuição restrita, sendo mais abundante na região subtropical do que na região tropical, e pode assim apresentar menor tolerância ao aumento da temperatura média mundial, podendo agregar dados aos estudos sobre mudanças climáticas e os efeitos sobre a diversidade biológica. As hipóteses é de que a temperatura elevada terá algum efeito sobre o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da espécie estudada, afetando sua fenologia e o desenvolvimento do rudimento seminal seja por degeneração dos seus esporos ou do ginófito.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Observar os efeitos do estresse térmico sobre o desenvolvimento inflorescência de *Tillandsia aeranthos* submetidas a alta temperatura.

## 2.2. Objetivos Específicos

- Observar o efeito de alta temperatura sobre a morfologia das flores;
- Observar se a temperatura alta afetará as fases iniciais de desenvolvimento do rudimento seminal;
- Observar o efeito de alta temperatura na síntese e deposição de calose durante a fase da esporogênese.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Coleta e Tratamentos

Os indivíduos de *T. aeranthos* foram coletados no Morro Santana em Porto Alegre-RS (30°04'16.6"S, 51°07'04.3"W). A área de coleta está situada na zona antropizada do Morro Santana, onde se localiza o Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para implemento do experimento estimou-se um número de indivíduos suficientes para coleta das inflorescências levando em consideração a possibilidade de algumas inflorescências cessarem o desenvolvimento após a implantação do experimento. Coletou-se então 50 indivíduos para cada tratamento, e todos apresentavam a inflorescência no início do seu desenvolvimento, quando ainda estavam inclusas na roseta. Foi obtido uma inflorescência por dia de cada tratamento e do ambiente, e a excisão das inflorescências se deu até se observar a formação de fruto. Com intuito de observar desde as suas fases iniciais de desenvolvimento, todas as inflorescências coletadas, seja dos tratamentos ou do ambiente, foram as menos desenvolvidas de todas as disponíveis naquele dia de coleta, ou seja, as inflorescências que se apresentavam mais inclusas na roseta e nas brácteas, ou com menor número de flores em antese.

Foi realizado dois experimentos um no ano de 2015 com temperatura constante, regime mais extremo de temperatura e outro em 2018 com temperatura alternada, regime menos extremo com temperatura mais amena durante a noite (Tabela 1).

**Tabela 1: Tratamentos e regimes de temperatura.**

Tratamento	Regime de temperatura	Ano	Período do experimento	Temperaturas
TC32	Constante	2015	25/junho a 10/julho	32°C dia/ 32°C noite
TC38/35				38°C dia/ 38°C noite ou 35°C dia/ 35°C noite
TA28	Alternada	2018	27/agosto a 04/setembro	28°C dia/ 22°C noite
TA32				32°C dia/ 22°C noite
Ambiente	-	2015	25/junho a 10/julho	Ambiente natural
		2018	27/agosto a 04/setembro	

O intervalo entre os experimentos se deu pela disponibilidade de incubadoras, não sendo possível realiza-los concomitantemente. As datas de coletas do ano de 2018 ocorreram dois meses após a data de coleta do ano de 2015, por dois motivos, primeiro as inflorescências no ano de 2018 começaram seu desenvolvimento no ambiente natural posteriormente ao início do ano de 2015, ainda devido a problemas técnicos com a incubadora o experimento sofreu atraso na sua implementação. No ano de 2015 os indivíduos coletados foram submetidos a temperatura constante de 32°C dia/ 32°C noite (TC32) e 38°C dia/ 38°C noite - do 1º dia ao 5º dia - ou 35°C dia/ 35°C noite –do 6º dia em diante- (TC38/35). Devido a sinais de possível fenecimento dos indivíduos a temperatura foi alterada para de 38°C para 35°C ao 6º dia do experimento (25/06/2015), sendo mantida até o final do experimento. No ano de 2018 novos indivíduos foram coletados e submetidos a temperatura alternada 28°C dia/ 22°C noite (TA28) e 32°C dia/ 22°C noite (TA32). A temperatura de 38°C foi a maior máxima observada no trabalho de Breitsameter (2014), a de 32°C com base na temperatura mais alta no mês de maio (anterior ao início do experimento) e a de 28°C por ser o maior valor da temperatura mínima entre os meses de junho a setembro, todos baseados na série histórica de 1961-2014. (INMET, 2014). Para o experimento com temperatura alternada a temperatura da noite foi escolhida com base no clima da região, Cfa, em que a temperatura média do mês



mais quente é superior a 22°C (Moreno, 1961). No intuito de comparar os indivíduos submetidos aos tratamentos com os indivíduos do mesmo local de coleta e que se desenvolviam em ambiente natural. Como controle então foram coletadas e processadas inflorescências do ambiente natural (Ambiente) nos mesmos dias de processamento das inflorescências nos tratamentos.

Os indivíduos dos tratamentos foram acondicionados em incubadora (ELETROLAB EL212/3) com controle de fotoperíodo e temperatura. As temperaturas ainda foram aferidas para registro através de datalogger (AKSO AK174 e Elitech GSP-6). O controle de umidade foi feito por lâmina d'água em bandejas e borrifos diários de água. O fotoperíodo adotado teve duração de 12h, representando uma média aproximada do fotoperíodo durante a floração da espécie (Borges, 2013).

### **3.2. Processamento do material para estereomicroscopia**

O padrão usado para escolha das inflorescências para processamento foi coletar sempre a inflorescência menos desenvolvida, ou seja, com a fase mais precoce encontrada entre os indivíduos dos tratamentos e do ambiente. Foi feito registro fotomacrográfico dos indivíduos e das inflorescências com o microscópio Leica M165FC com câmera digital DF500 (programa LAS versão 4.1) e com câmera do dispositivo celular LG-K220 (programa Android 6.0.1.). Os dados foram analisados através de observação, apenas a título de comparação qualitativa de características como tamanho e coloração dos tratamentos com o Ambiente.

### **3.3. Processamento do material para microscopia de luz transmitida**

Os botões florais excisados, tanto do controle como dos tratamentos, foram fixados à vácuo e preservados no ano de 2015 em FAA 50% (formaldeído, ácido acético e álcool 50%) (Johansen, 1940). As amostras, fixadas com FAA 50%, não preservaram bem o conteúdo citoplasmático, optando assim pela troca de fixador. Por isso, no ano de 2018, os botões florais foram fixados em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7.2 (Mcdowell e Trump, 1976). Com intuito de preparar as

peças para a desidratação foram feitas lavagens com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Gabriel,1982) seguida por desidratação alcoólica ascendente (Johansen, 1940), passagens por clorofórmio e por fim o material foi infiltrado em hidroxietilmetacrilato (Gerrits e Smid, 1983).

Os blocos produzidos dos ovários de *T. aeranthos* foram seccionados transversal e/ou longitudinalmente, de 3 e 4  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo Leica 1400 (coleta de 2015) e em micrótomo Leica 2265 (coleta de 2018), equipados com navalha descartável e corados em Azul de Toluidina O 0.05% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 4,4 (O'Brien e McCully, 1981). Para detecção de calose foi utilizado Azul de Anilina, sob excitação com luz ultravioleta, com auxílio de filtro UV de 340-380 nm (Eschrich e Currier, 1964).

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas com o microscópio Leica DMR HC, com câmera digital Zeiss AxioCam HRC Zeiss (programa AxioVision v.4.9.1 SE 64). O registro foi realizado somente até que todos os tratamentos estivessem na fase de ginófito.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Temperatura Constante (Coleta de 2015)

#### 4.1.1 Morfologia das folhas e inflorescências

O tratamento TC32 não apresentou alterações na coloração das folhas nos primeiros dias do experimento. Contudo, os danos passaram a aparecer no 20º dia, as folhas começaram a apresentar baixa pigmentação e algumas dessecamento. No 28º dia, último dia do experimento, a maioria das folhas estavam ressecadas. O efeito da temperatura alta no tratamento TC38/35 nas folhas foi mais intenso. Em apenas 5 dias de experimento as folhas já apresentavam baixa pigmentação. Os danos foram tão severos que foi necessário diminuir a temperatura de 38°C para 35°C; com a temperatura mais baixa (35°C) a progressão dos danos foi mais lenta. No entanto, no 16º dia a maioria das

folhas estavam ressecadas, este dia foi a última coleta de inflorescência do TC38/35. A figura 2 nos mostra a morfologia dos indivíduos no 13° dia de experimento. A morfologia das folhas do tratamento TC32 ainda estavam semelhantes ao ambiente nesse dia, sem sinais de danos enquanto no tratamento TC38/35 as folhas apresentavam baixa pigmentação e ressecadas.



**Figura 2: Morfologia dos indivíduos de *Tillandsia aeranthos* em temperatura constante no 13° dia de experimento. A.** Indivíduo do Ambiente. **B.** Indivíduo do tratamento TC32. **C.** Indivíduo do tratamento TC38/35. Barras= 2cm.

O crescimento das inflorescências foi afetado pela alta temperatura em ambos os tratamentos. A raque da inflorescência do tratamento TC32 (Figura 2B) se apresentou mais desenvolvida e com maior do as do Ambiente, sendo visível acima da roseta. Essa diferença foi perceptível desde o 5° dia, quando algumas inflorescências não estavam mais inclusas na roseta, esse número foi aumentando com o passar dos dias até que todas não estavam mais inclusas na roseta, enquanto nos indivíduos do ambiente a inflorescência se encontrava inclusa na roseta e por isso não visível (Figura 2A). Já no tratamento TC38/35, não foi observado esse crescimento, todas as inflorescências permaneceram inclusas na roseta (Figura 2C), sem crescimento da raque até o fim do experimento.

Outro efeito evidente observado foi a baixa pigmentação das inflorescências em ambos os tratamentos. A raque e as brácteas apresentaram um tom de rosa mais claro em relação ao Ambiente (Figuras 3A-C), sendo mais visível no 6° dia no tratamento TC38/35.

A alta temperatura acelerou o desenvolvimento das inflorescências no tratamento TC32, mas estagnou o desenvolvimento no TC38/35. No TC32 além do crescimento da raque, as flores também estavam maiores quando comparada as do Ambiente. Assim no 6º dia do experimento as inflorescências do TC32 estavam maiores em relação ao Ambiente (Figuras 3A-C). O desenvolvimento também foi mais acelerado, as flores do TC32 começaram a antese a partir do 9º dia e na sua totalidade em antese no 16º dia (Figura 3E), enquanto o Ambiente não chegou a entrar em antese até o fim do experimento (Figura 3I). Apesar do desenvolvimento acelerado, as inflorescências mostraram sinais de dessecação a partir do 20º dia (Figura 3H), e no último dia do experimento, última coleta deste tratamento, a inflorescência estava completamente ressecada e sem coloração (Figura 3J). Por outro lado, as inflorescências do tratamento TC38/35 no 6º dia de experimento estavam inclusas nas rosetas e se mantiveram assim durante todo o experimento. As inflorescências já apresentavam sinais de estresse, pois as bases das flores estavam necrosadas (Figura 3C), nos dias seguintes os danos foram aumentando, e no 16º dia a inflorescências se encontrava totalmente ressecada e necrosada (Figura 3F). No último dia de experimento as inflorescências do Ambiente, em sua maioria, não estavam em antese (Figura 3I), com raras exceções.

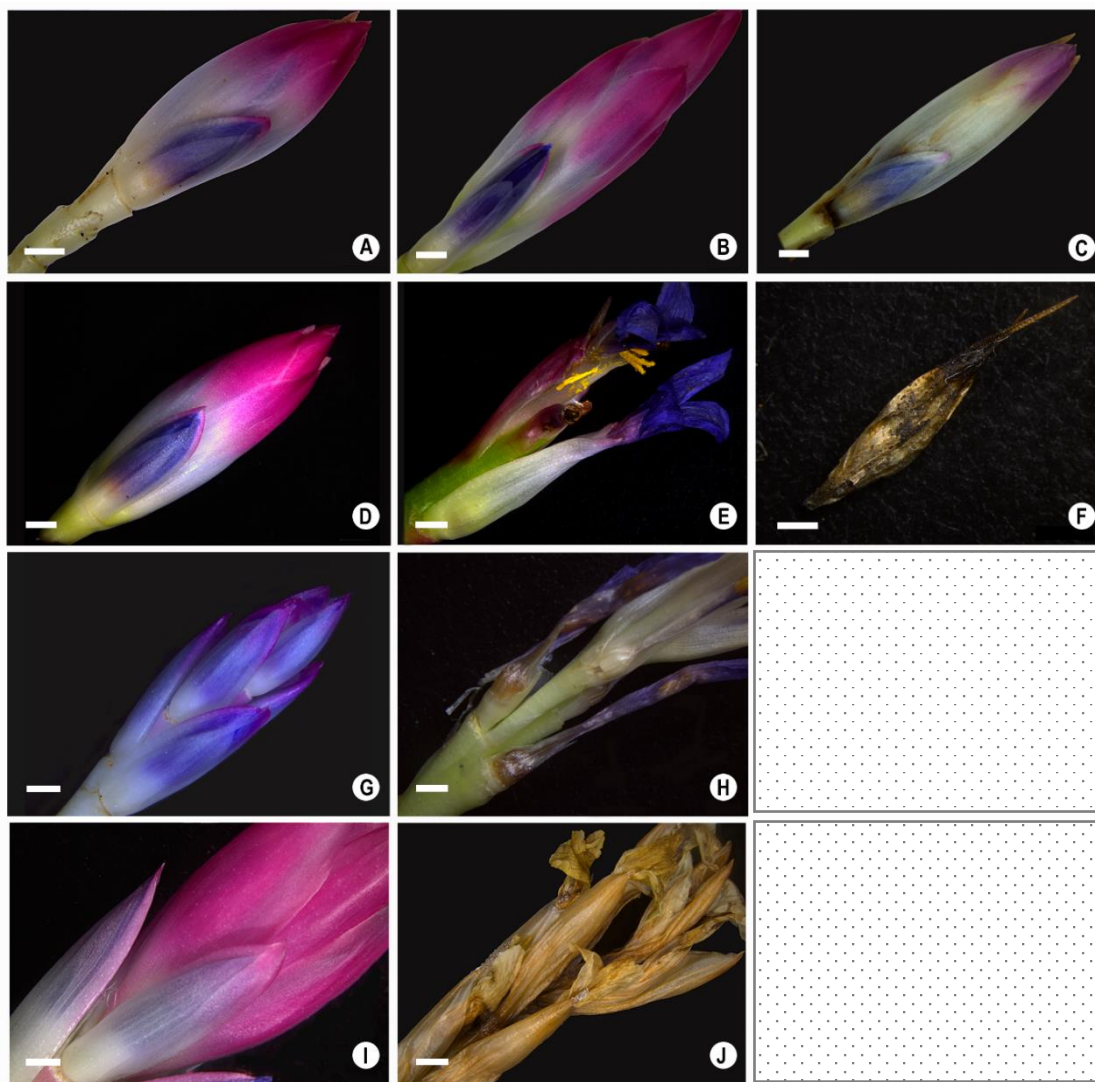
#### 4.1.2 Fases de desenvolvimento do rudimento seminal

As fases de desenvolvimento do rudimento seminal que foram encontradas no Ambiente e nos tratamentos podem ser observadas na Tabela 1. As figuras 4-7 mostram os cortes histológicos da fase menos avançada e da mais avançada encontrada em cada dia de uma mesma inflorescência, por tratamento.

A tendência de aceleração do desenvolvimento evidenciada na morfologia também foi constatada nas fases de desenvolvimento do rudimento seminal no tratamento TC32. Nos primeiros dias de experimento (até o 7º dia) as fases nos tratamentos estavam semelhantes as observadas nas plantas do Ambiente. Apenas a partir do 8º dia a fase de desenvolvimento estava mais avançada nos tratamentos, enquanto nos rudimentos em condições do Ambiente a fase mais avançada observada foi a de célula mãe de ginósporo, com tegumento externo (Figura 5P), no tratamento TC32 já se observou a fase de ginósporo funcional (Figura 5Q). Nos dias 14 e 15 essa tendência de diferenças nas fases ontogenéticas não foi observada, sendo que as fases do tratamento estavam muito

similares as fases do Ambiente, todavia os rudimentos seminais, amostrados nestes dias, apresentavam sinais de degeneração. Foi mais evidente no 14º dia, onde tanto a fase menos, como a mais avançada encontrada as células, apresentaram uma mudança no aspecto citológico, não se evidenciando a densidade protoplasmática comum nestas fases, reduzindo-se apenas a visão das paredes celulares (Figuras 7B, E). Ainda na fase mais avançada encontrada em TC32 no 14º dia a célula mãe de ginósporo estava degradada. O 15º dia apresentou sinais menos evidentes de degradação, mas se observou vacuolação anormal, incomum de se observar vacúolos destas dimensões e número nestas fases, tanto na fase menos avançada (Figuras 7H, I) como na mais avançada (Figuras 7L, M). No dia seguinte, 16º dia e último de coleta, a única fase encontrada foi a de ginófito (Figura 7O), rudimentos seminais íntegros, e, no entanto, também degenerados.

O tratamento TC38/35 não apresentou diferença nas fases observadas nos primeiros dias (Tabela 1). A partir do segundo dia o desenvolvimento dos rudimentos seminais foi suprimido, a fase mais avançada encontrada foi a de célula mãe de ginósporo, enquanto o Ambiente apresentou fase mais avançada, a fase de célula mãe de ginósporo com polarização. Entretanto, a partir do 5º dia os rudimentos seminais no TC38/35 já apresentaram sinais de degradação (Figuras 4O, R), novamente vemos mudança no aspecto citológico com baixa densidade citoplasmática, e na fase menos avançada células com colapso de protoplasto e da parede celular. Apesar de que no 9º dia ser possível reconhecer a célula mãe de ginósporo (Figura 6F) e no 14º dia a célula inicial arqueosporial (Figura 7F), o estado citológico em que os rudimentos seminais se encontram é indicativo de que o desenvolvimento não seguirá mais além. No último dia de coleta do tratamento TC38/35 todos os tecidos das flores estavam degradados (Figura 7P).



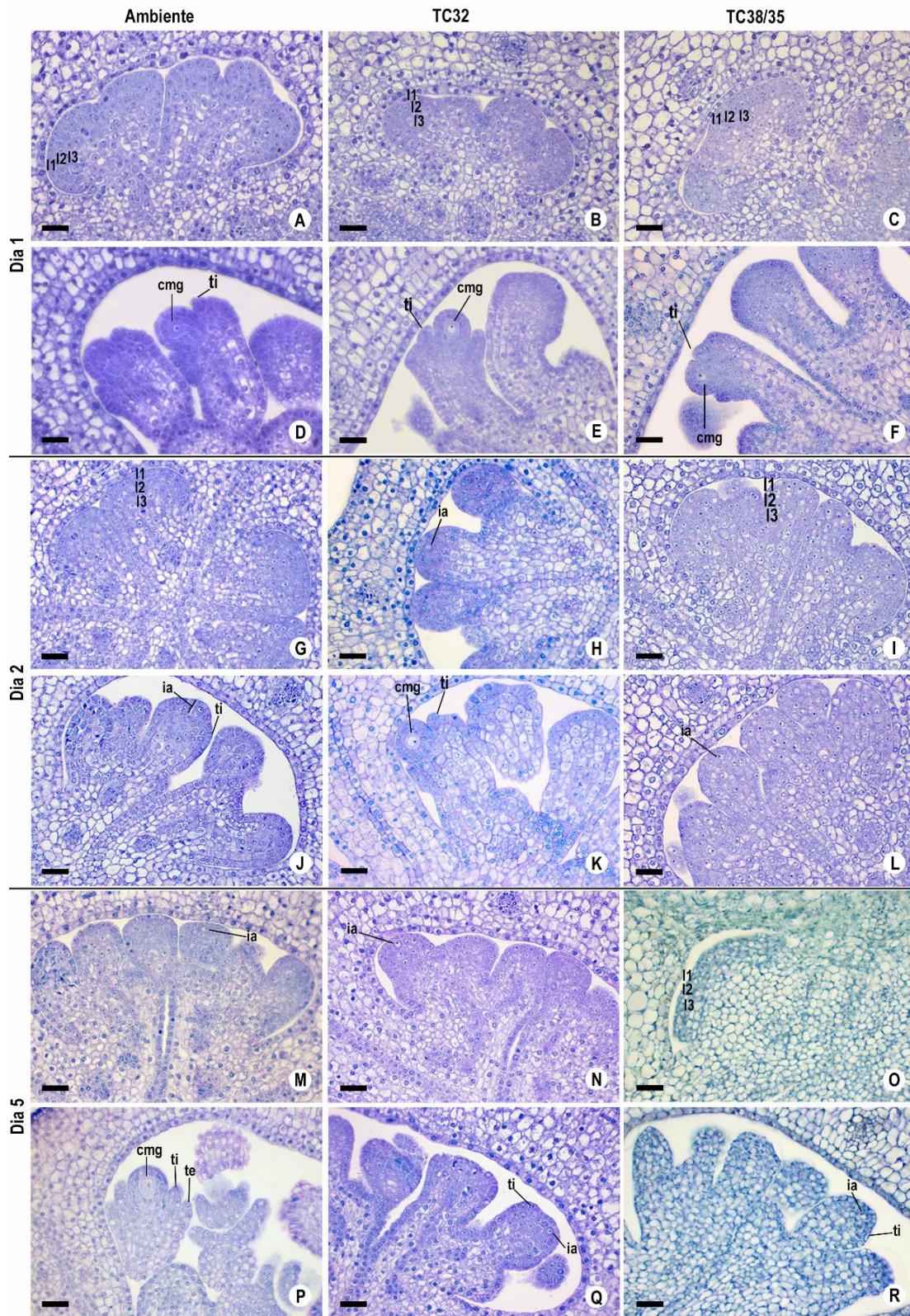
**Figura 3: Inflorescências de *Tillandsia aeranthos* em temperatura constante.** A. Dia 6, Ambiente. B. Dia 6, TC32. C. Dia 6, TC38/35. D. Dia 16, Ambiente. E. Dia 16, TC32. F. Dia 16, TC38/35. G. Dia 20, Ambiente. H. Dia 20, TC32. I. Dia 28, Ambiente. J. Dia 28, TC32. Retângulo pontilhado= inflorescências pereceram, sem coleta. Barras= 2mm.

Tabela 2: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal em temperatura constante.

Data	Tratamento	11 12 13	ia	par/esp	ia ti	cmg	cmg te	cmg pol	mei	dia	tri	tetra	gf	gin
25/6	Dia 1 Amb													
	Dia 1 TC32													
	Dia 1 TC38/35													
26/6	Dia 2 Amb													
	Dia 2 TC32													
	Dia 2 TC38/35													
29/6	Dia 5 Amb													
	Dia 5 TC32													
	Dia 5 TC38/35													
30/6	Dia 6 Amb													
	Dia 6 TC32													
	Dia 6 TC38/35													
1/7	Dia 7 Amb													
	Dia 7 TC32													
	Dia 7 TC38/35													
2/7	Dia 8 Amb													
	Dia 8 TC32													
	Dia 8 TC38/35													
3/7	Dia 9 Amb													
	Dia 9 TC32													
	Dia 9 TC38/35													
6/7	Dia 12 Amb													
	Dia 12 TC32													
	Dia 12 TC38/35													
7/7	Dia 13 Amb													
	Dia 13 TC32													
	Dia 13 TC38/35													
8/7	Dia 14 Amb													
	Dia 14 TC32													
	Dia 14 TC38/35													
9/7	Dia 15 Amb													
	Dia 15 TC32													
	Dia 15 TC38/35													
10/7	Dia 16 Amb													
	Dia 16 TC32													
	Dia 16 TC38/35													

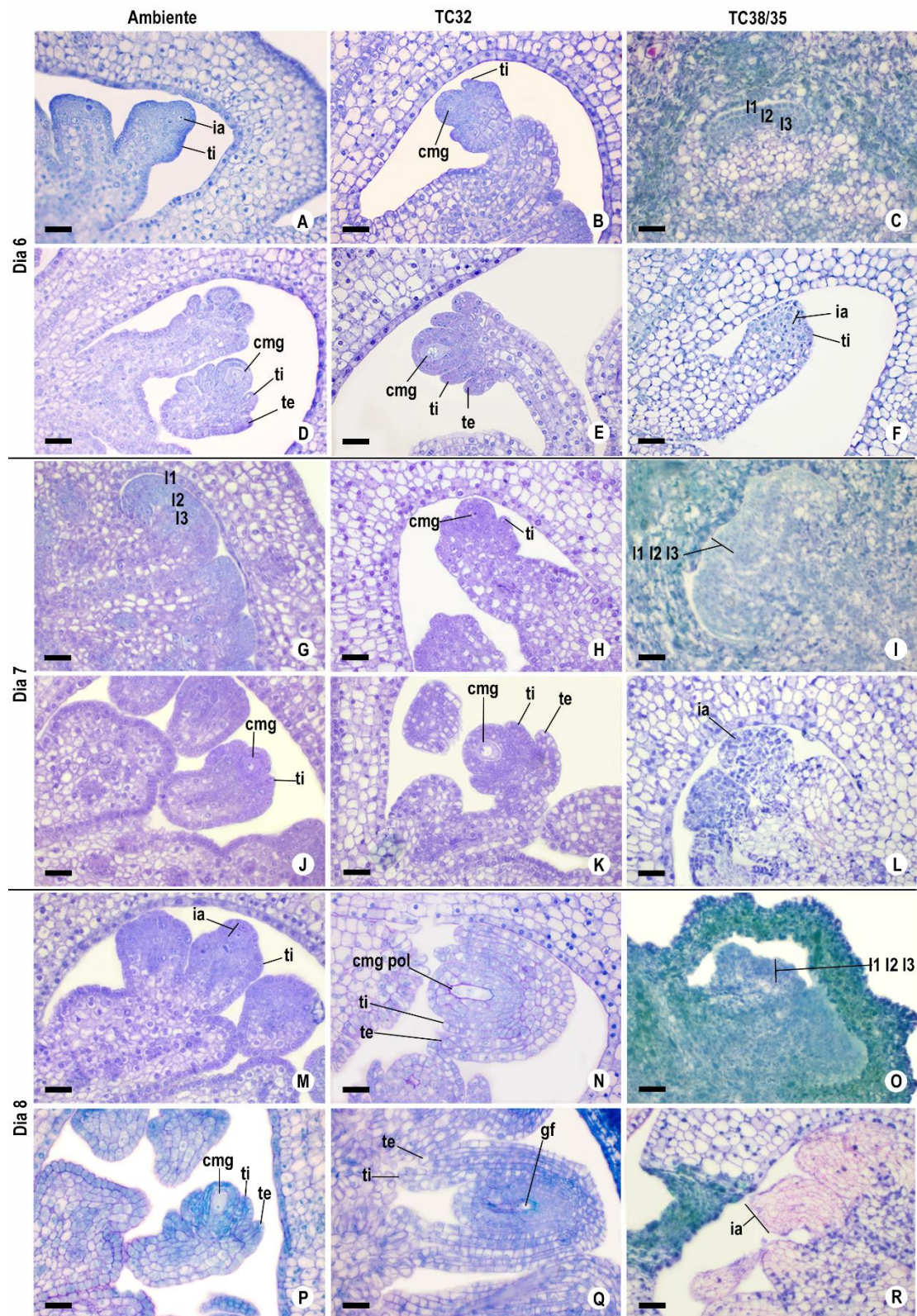
Amb= Ambiente, TC32= temperatura constante de 32°C, TC38/35= temperatura constante de 38/35°C. 11 12 13= placenta trizonada, ia= célula inicial arquesporial, par/esp= divisão da célula arquesporial em parietal e esporogênica, ia ti= célula inicial arquesporial com formação do tegumento interno, cmg= célula mãe de ginósporo, cmg te= célula mãe de ginósporo com formação do tegumento externo, cmg pol= célula mãe de ginósporo com polarização, mei= primeiro ciclo meiótico, dia= díade de ginósporo, tri= tríade de ginósporo, tet= tétrade de ginósporo, gf= ginósporo funcional, gin= ginófito.





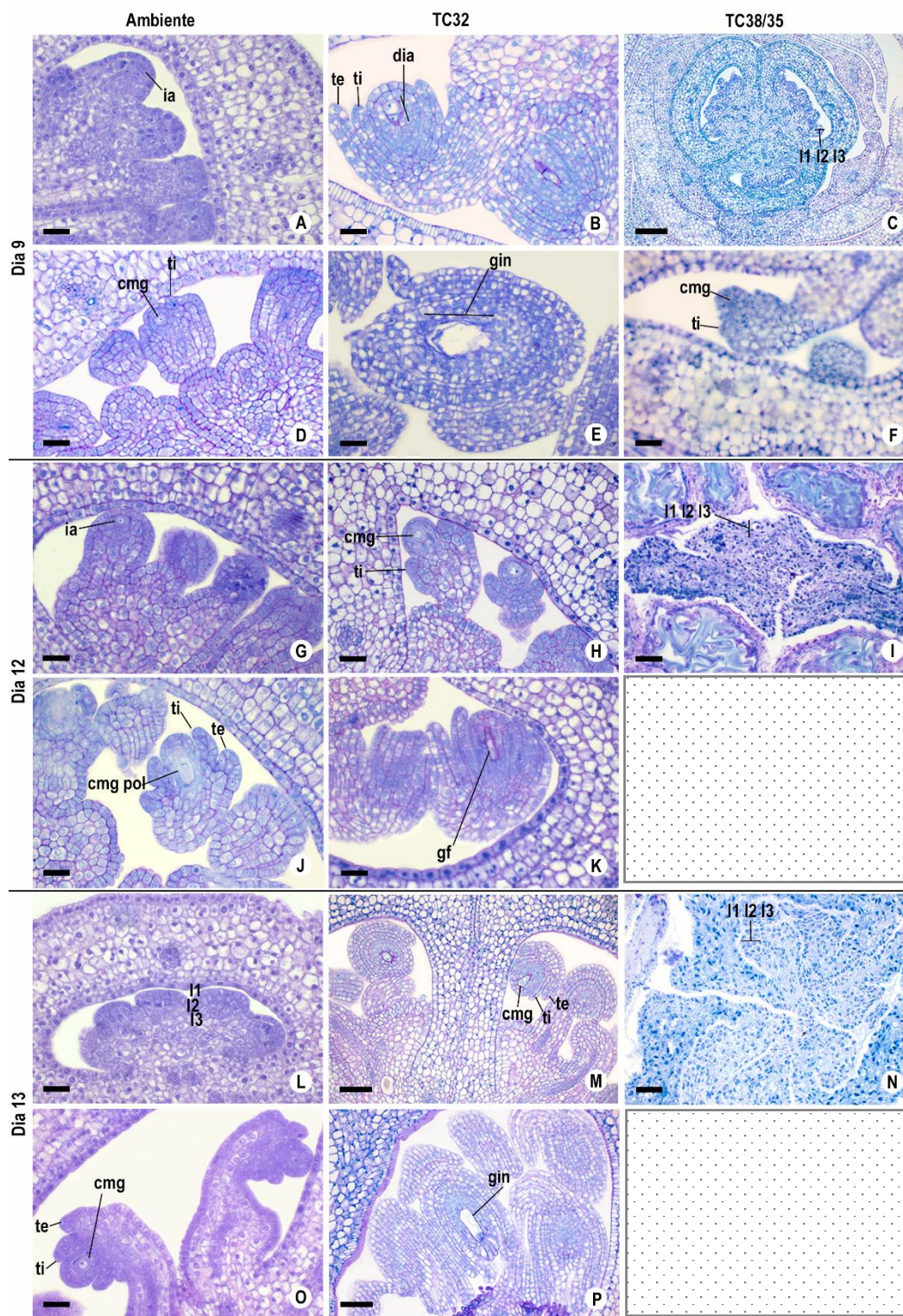
**Figura 4: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de *Tillandsia aeranthos* em temperatura constante. A-F. Dia 1. G-L. Dia 2. M-R. Dia 5. Primeira coluna- Ambiente. Segunda coluna- Tratamento TC32. Terceira coluna- Tratamento TC38/35. 11 12 13= placenta trizonada, ia= célula inicial arqueosporial, ti= tegumento interno, cmg= célula mãe de ginósporo, te= tegumento externo. Barras= 20  $\mu$ m. Corado com Azul de Toluidina O.**





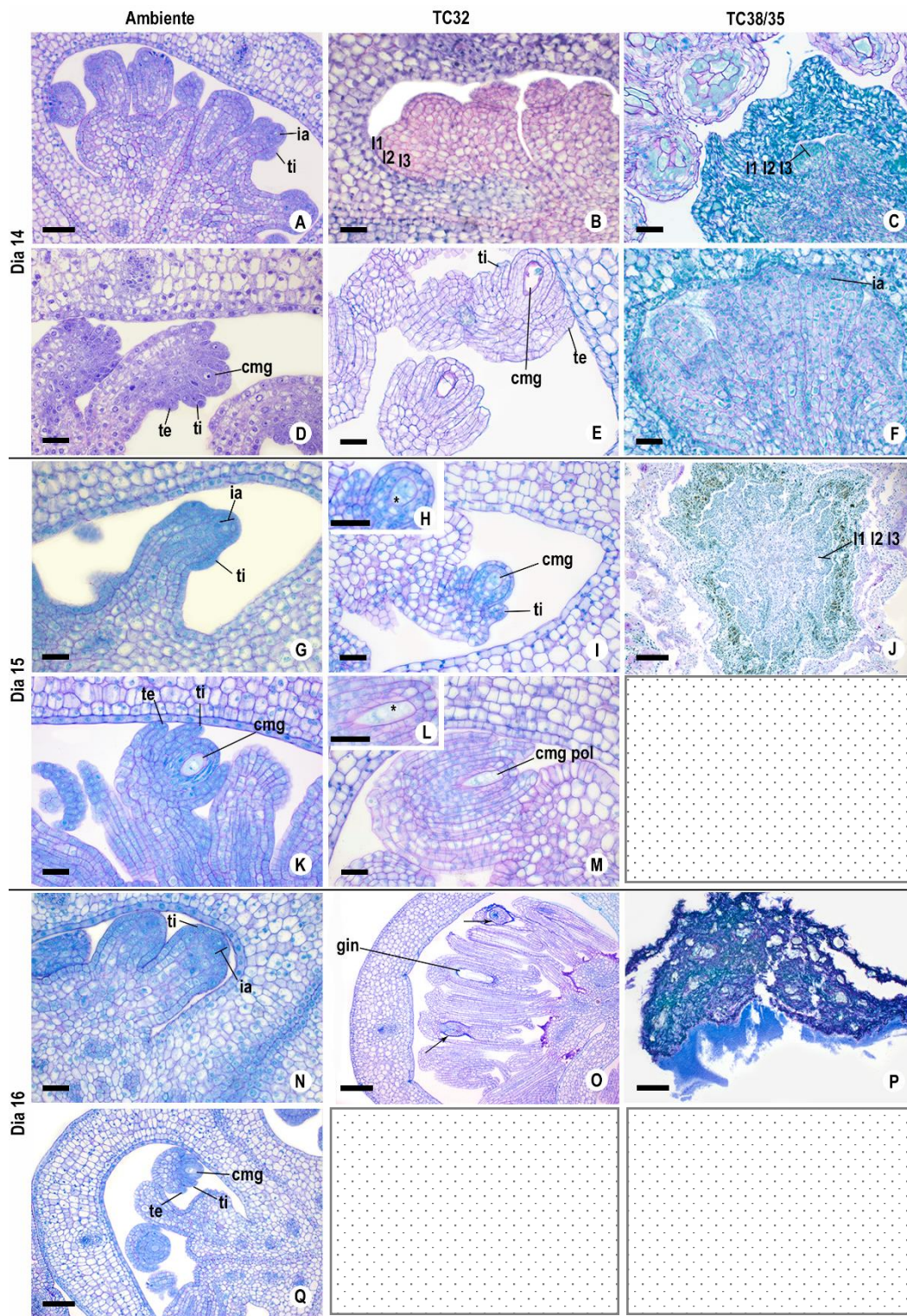
**Figura 5: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de *Tillandsia aeranthos* em temperatura constante.** A-F. Dia 6. G-L. Dia 7. M-R. Dia 8. Primeira coluna- Ambiente. Segunda coluna- Tratamento TC32. Terceira coluna- Tratamento TC38/35. I1 I2 I3= placenta trizonada, ia= célula inicial arquesporial, ti= tegumento interno, cmg= célula mãe de ginósporo, te= tegumento externo, cmg pol= célula mãe de ginósporo com polarização, gf= ginósporo funcional. Barras= 20  $\mu$ m. Corado com Azul de Toluidina O.





**Figura 6: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de *Tillandsia aeranthos* em temperatura constante. A-F. Dia 9. G-K. Dia 12. L-P. Dia 13. Primeira coluna- Ambiente. Segunda coluna- Tratamento TC32. Terceira coluna- Tratamento TC38/35. l1 l2 l3= placenta trizonada, ia= célula inicial arquesporial, ti= tegumento interno, cmg= célula mãe de ginósporo, te= tegumento externo, cmg pol= célula mãe de ginósporo com polarização, dia= díade de ginósporo, gf= ginósporo funcional, gin= ginófito. Barras= 20 µm. (Figura A, B, D-L, N, O), 50 µm (Figura M, P), 100 µm (Figura C). Corado com Azul de Toluidina O. Retângulo pontilhado= inflorescências pereceram, sem coleta.**



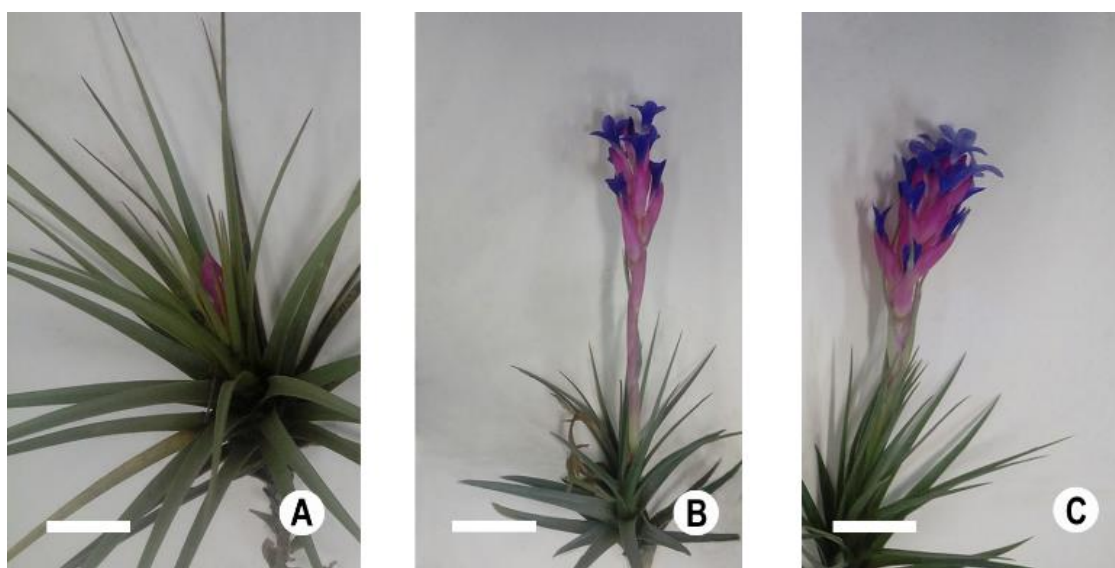


**Figura 7: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de *Tillandsia aeranthos* em temperatura constante. A-F. Dia 14. G-M. Dia 15. N-Q. Dia 16. Primeira coluna- Ambiente. Segunda coluna- Tratamento TC32. Terceira coluna- Tratamento TC38/35. I1 I2 I3= placenta trizonada, ia= célula inicial arqueesporial, ti= tegumento interno, cmg= célula mãe de ginósporo, te= tegumento externo, cmg pol= célula mãe de ginósporo com polarização, gin= ginófito, asterisco= vacuolação anormal. Barras= 20  $\mu$ m (Figura B- I, K-N), 50  $\mu$ m (Figura A, J, P, Q), 100  $\mu$ m (Figura O). Retângulo pontilhado= inflorescências pereceram, sem coleta.**

## 4.2 Temperatura alternada (Coleta de 2018)

### 4.2.1 Morfologia das folhas e inflorescências

O aspecto do corpo vegetativo não apresentou diferenças em relação ao Ambiente em ambos os tratamentos. Nas inflorescências também se observou um pedúnculo mais desenvolvido em relação ao Ambiente (Figuras 8A-C). A baixa pigmentação pode ser percebida a partir do 7º dia (Figuras 9E, F), mas a diferença entre o Ambiente foi mais sutil quando comparada com a diferença observada nos tratamentos em regime de temperatura constante.



**Figura 8: Morfologia dos indivíduos de *Tillandsia aeranthos* em temperatura alternada no 11º dia de experimento. A. Indivíduo do Ambiente. B. Indivíduo do tratamento TA28. C. Indivíduo do tratamento TA32. Barras= 2cm.**

Em ambos os tratamentos se observou aceleração no desenvolvimento a partir do 7º dia, muitas inflorescências já estavam não inclusas nas rosetas, e algumas até mesmo em antese. No entanto, o tratamento TA28 apresentou um desenvolvimento mais acelerado; no 7º dia todas as inflorescências já estavam em antese (Figura 9E), enquanto a do TA32 somente no 11º dia (Figura 8C). Ainda por estar mais adiantadas no desenvolvimento, as inflorescências do TA28 começaram a demonstrar sinais de dessecação primeiro (Figura 9K) do que o tratamento TA32 (Figura 9L).

Diferentemente do experimento em temperatura constante, na alternada as inflorescências perduraram sem danos aparente por mais tempo, em ambos tratamentos.

No entanto, a partir do dia 28, ambos os tratamentos apresentaram todas as flores murchas (Figuras 10E, F), enquanto o ambiente mantinha seu desenvolvimento normal.

#### 4.2.2 Fases de desenvolvimento do rudimento seminal

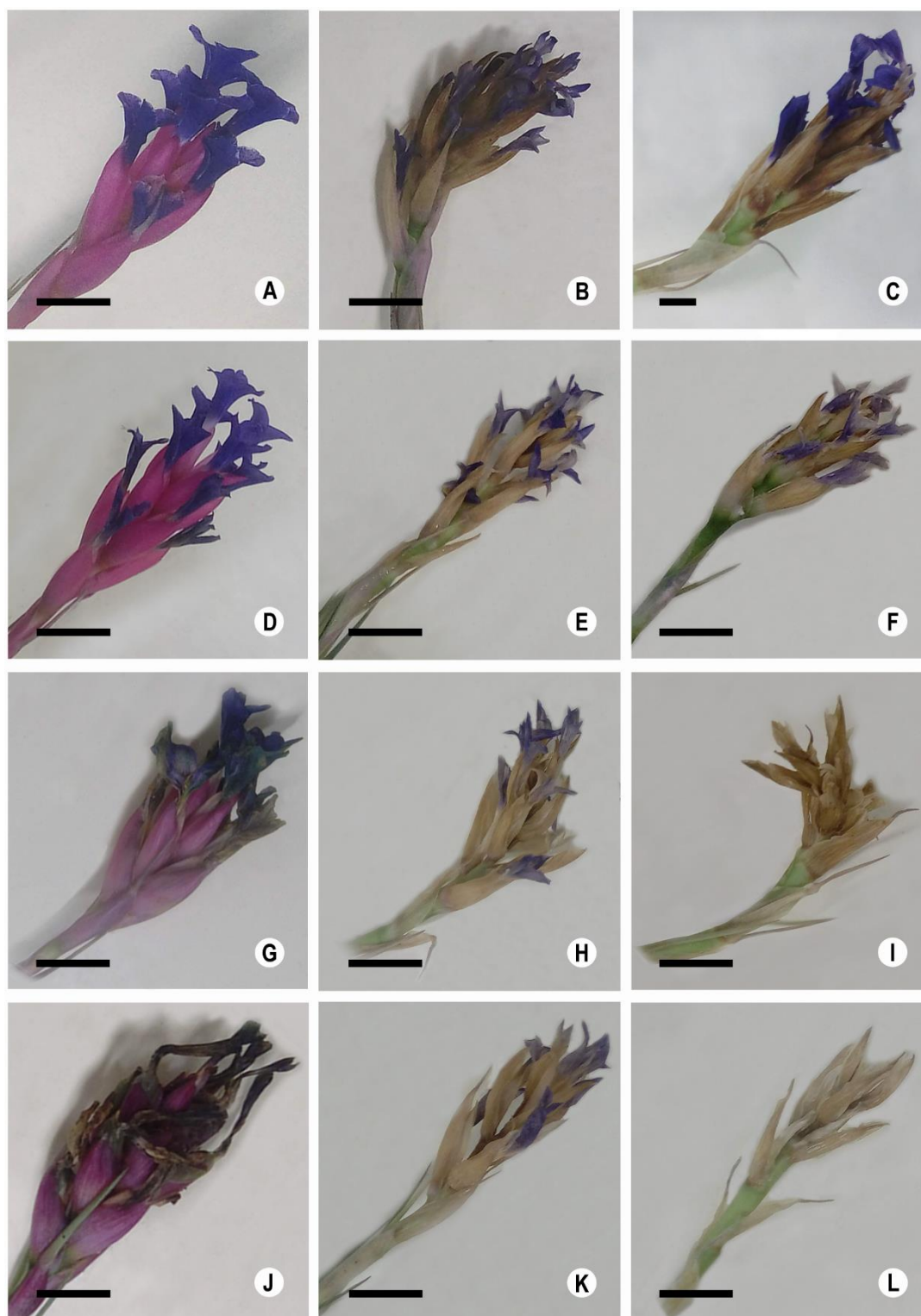
As fases de desenvolvimento do rudimento seminal, observadas no ano de 2018, estavam todas mais avançadas de desenvolvimento do rudimento seminal em relação ao ano de 2015 desde a implantação do experimento, isso porque a coleta de 2015 começou em junho e a de 2018 em final de agosto. Desta forma foi possível observar fases mais avançadas do desenvolvimento do rudimento seminal, da esporogênese e da gametogênese, tendo como ponto de partida a fase de célula mãe de ginósporo nos três tratamentos (Tabela 2).

Os tratamentos não afetaram significativamente as fases de desenvolvimento do rudimento seminal em relação ao Ambiente, sendo muito similares entre si (Figuras 11 e 12). Somente no 10º dia se percebeu diferença significativa, enquanto o Ambiente ainda tinha a fase de célula mãe de ginósporo com tegumento externo, os tratamentos TA28 e TA32 estavam nas fases de ginósporo e/ou ginófito, sem apresentar nenhuma fase anterior a essas (Figura 13).





**Figura 9: Inflorescências de *Tillandsia aeranthos* em temperatura alternada. A. Dia 5, Ambiente. B. Dia 5, TA28. C. Dia 5, TA32. D. Dia 7, Ambiente. E. Dia 7, TA28. F. Dia 7 TA32. G. Dia 17, Ambiente. H. Dia 17, TA28. I. Dia 17, TA32. J. Dia 24, Ambiente. K. Dia 24, TA28. L. Dia 24, TA32. Barras= 1cm.**



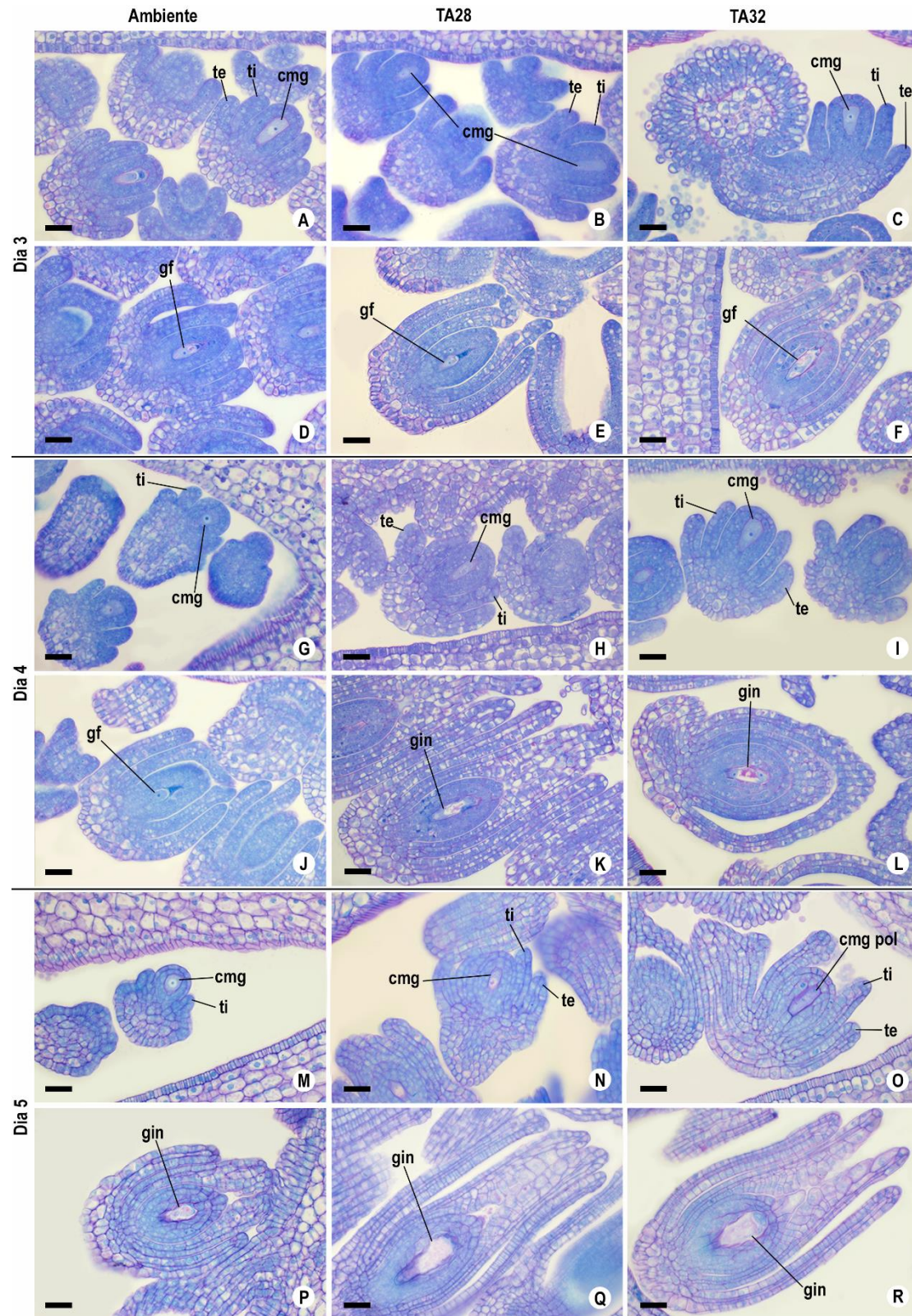
**Figura 10: Inflorescências de *Tillandsia aeranthos* do tratamento em temperatura alternada. A. Dia 25, Ambiente. B. Dia 25, TA28. C. Dia 25, TA32. D. Dia 28, Ambiente. E. Dia 28, TA28. F. Dia 28 TA32. G. Dia 34, Ambiente. H. Dia 34, TA28. I. Dia 34, TA32. J. Dia 38, Ambiente. K. Dia 38, TA28. L. Dia 38, TA32. Barras= 1cm.**

Tabela 3: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal em temperatura alternada.

Data	Tratamento	11 12 13	ia	par/esp	ia ti	cmg	cmg te	cmg pol	mei	dia	tri	tet	gf	gin
27/8	Dia 3 Amb													
	Dia 3 TA28													
	Dia 3 TA32													
28/8	Dia 4 Amb													
	Dia 4 TA28													
	Dia 4 TA32													
29/8	Dia 5 Amb													
	Dia 5 TA28													
	Dia 5 TA32													
30/8	Dia 6 Amb													
	Dia 6 TA28													
	Dia 6 TA32													
31/8	Dia 7 Amb													
	Dia 7 TA28													
	Dia 7 TA32													
3/9	Dia 10 Amb													
	Dia 10 TA28													
	Dia 10 TA32													
4/9	Dia 11 Amb													
	Dia 11 TA28													
	Dia 11 TA32													

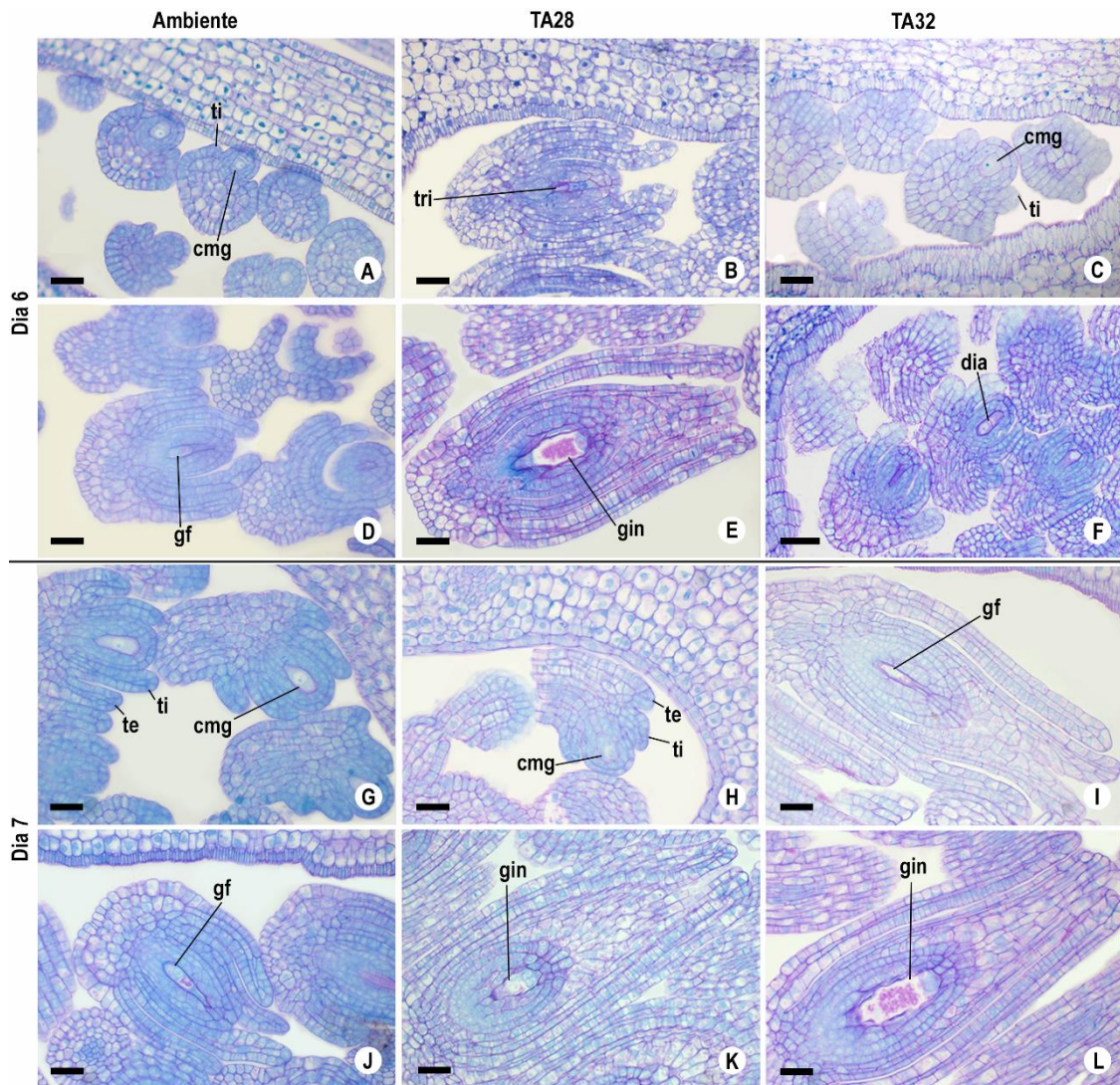
Amb= Ambiente, TA28= temperatura alternada de 28°C, TA32= temperatura alternada de 32°C. 11 12 13= placenta trizonada, ia= célula inicial arquesporial, par/esp= divisão da célula arquesporial em parietal e esporogênica, ia ti= célula inicial arquesporial com formação do tegumento interno, cmg= célula mãe de ginósporo, cmg te= célula mãe de ginósporo com formação do tegumento externo, cmg pol= célula mãe de ginósporo com polarização, mei= primeiro ciclo meiótico, dia= díade de ginósporo, tri= tríade de ginósporo, tet= tétrade de ginósporo, gf= ginósporo funcional, gin= ginófito.



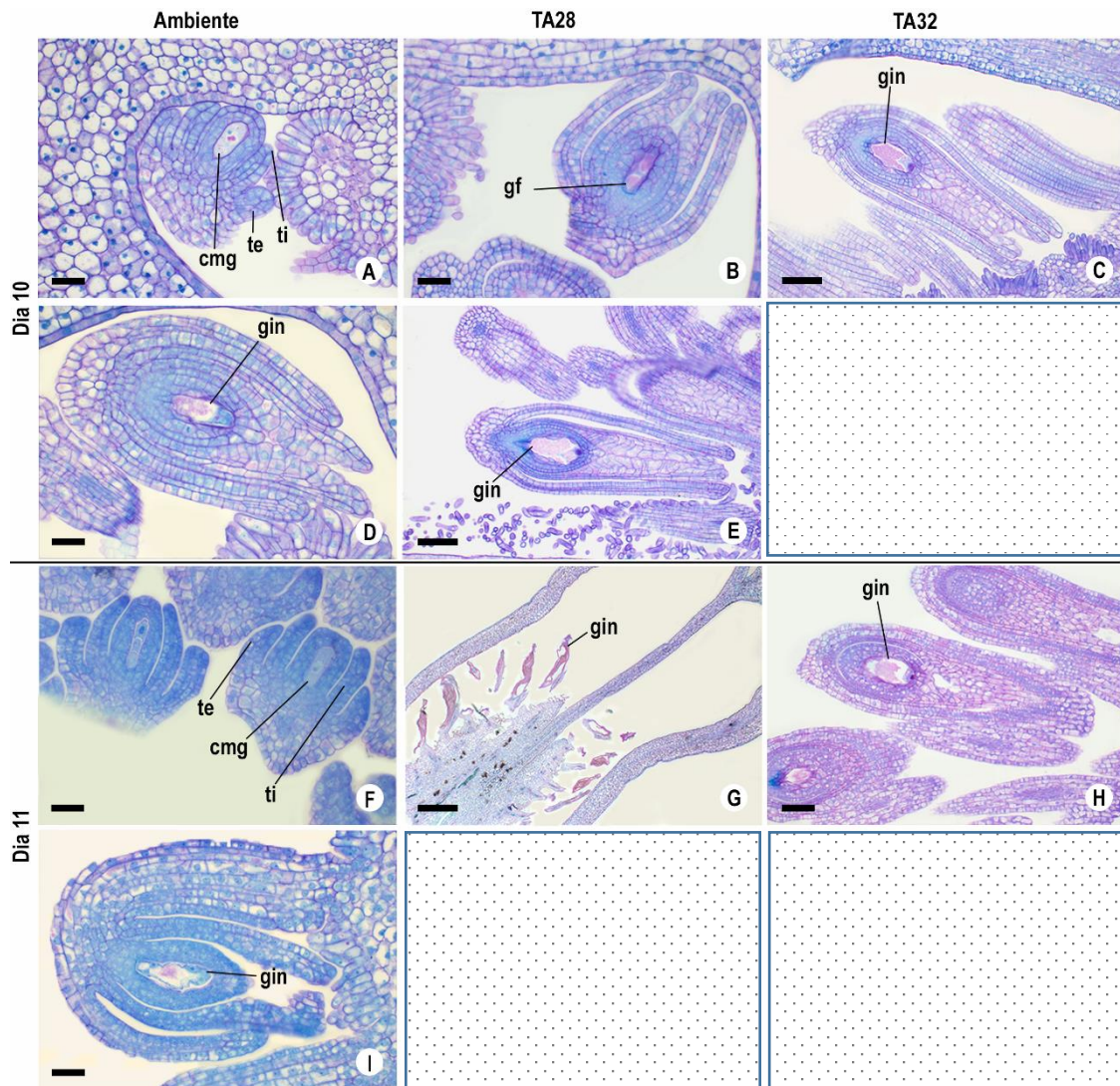


**Figura 11: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de *Tillandsia aeranthos* em temperatura alternada. A-F. Dia 3. G-L. Dia 4. M-R. Dia 5. Primeira coluna- Ambiente. Segunda coluna- Tratamento TA28. Terceira coluna- Tratamento TA32. ti= tegumento interno, cmg= célula mãe de ginósporo, te= tegumento externo, cmg pol= célula mãe de ginósporo com polarização, gf= ginósporo funcional, gin= ginófito. Barras= 20 μm Corado com Azul de Toluidina O.**





**Figura 12: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de *Tillandsia aeranthos* em temperatura alternada. A-F. Dia 6. G-L. Dia 7. Primeira coluna- Ambiente. Segunda coluna- Tratamento TA28. Terceira coluna- Tratamento TA32. ti= tegumento interno, cmg= célula mãe de ginósporo, te= tegumento externo, dia= díade de ginósporo, tri= tríade de ginósporo, gf= ginósporo funcional, gin= ginófito. Barras= 20  $\mu$ m (Figura A-E, G-L), 50  $\mu$ m (Figura F). Corado com Azul de Toluidina O.**

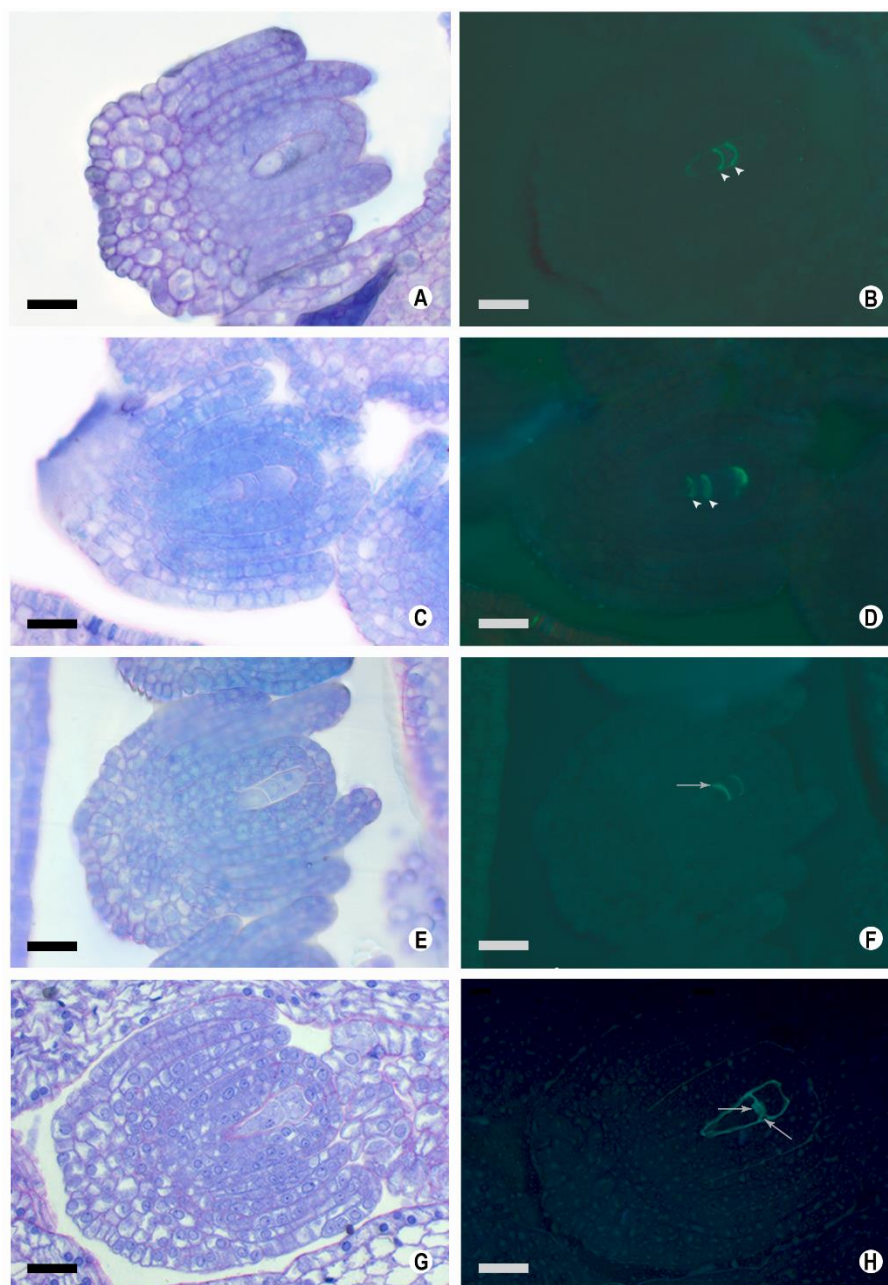


**Figura 13: Fases de desenvolvimento do rudimento seminal de *Tillandsia aeranthos* em temperatura alternada. A-E. Dia 10. F-I. Dia 11. Primeira coluna- Ambiente. Segunda coluna- Tratamento TA28. Terceira coluna- Tratamento TA32. ti= tegumento interno, cmg= célula mãe de ginósporo, te= tegumento externo, gf= ginósporo funcional, gin= ginófito. Barras= 20  $\mu$ m (Figura A, B, D), 50  $\mu$ m (Figura C, E), 200  $\mu$ m (Figura G). Corado com Azul de Toluidina O. Retângulo pontilhado= inflorescências pereceram, sem coleta.**

### 4.3 Deposição de Calose na Ginosporogênese

O tratamento TA28 (Figura 14D) apresentou deposição normal de calose para a fase como visto no ambiente (Figura 14B), durante a ginosporogênese a calose se deposita entre os ginósporos em formação, e apenas uma pequena quantidade ao redor do nucelo. Registrou-se deposição anormal de calose nos tratamentos TA32 (Figura 14F) e TC32 (Figura 14H). No tratamento TA32 a camada de calose entre os ginósporos se depositou diagonalmente (seta), sendo o normal a camada ser transversal como visto no ambiente. Essa divisão desigual de ginósporo é possível de se observar também na microscopia de luz transmitida (Figura 14E). No tratamento TC32 a deposição de calose entre os ginósporos foi irregular (setas), diferente da camada curvo linear do normal. Além disso apresentou deposição excessiva em relação ao normal para a fase ao redor do nucelo.





**Figura 14: Deposição de calose no rudimento seminal de *Tillandsia aeranthos* durante a esporogênese. A-B. Ambiente. C-D. TA28. E-F. TA32. G-H. TC32. A, C, E, G. Microscopia de luz transmitida, corado com Azul de Toluidina O. B, D, F, H. Microscopia de Fluorescência, corado com Azul de Anilina. cabeça de seta= deposição normal; seta= deposição anormal. Barras= 20  $\mu$ m.**

## 5. DISCUSSÃO

A temperatura é considerada um fator que afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas. Quando a temperatura desvia da faixa ótima a planta pode acelerar ou atrasar o seu crescimento ou desenvolvimento (Lippmann *et al.*, 2019). Segundo a classificação de Casal e Balasubramanian (2019) para os tipos de respostas das plantas a temperatura, os resultados observados para a *T. aeranthis* podem nos dizer que houve dois tipos de resposta: específica e estresse. A resposta específica, com termomorfogênese aparente se observou nos tratamentos TC32, TA28 e TA32. A temperatura não afetou a morfologia das folhas nestes tratamentos, no entanto afetou a morfologia das inflorescências, provocando alongamento da raque da inflorescência e antese precoce em relação ao Ambiente. Os resultados observados neste trabalho concordam com Ibañez *et al.* (2017), ao analisar o efeito de diferentes temperaturas, 16°C, 20 °C, 24°C e 28°C, indivíduos de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. tiveram o desenvolvimento precoce da germinação até a frutificação, para as duas temperaturas mais altas em relação as duas mais baixas testadas, resposta típica da termomorfogênese.

No decorrer do experimento estes tratamentos passaram a demonstrar sinais de estresse apresentando como dano o dessecamento dos verticilos florais devido a contínua exposição a temperatura alta. Resultados semelhantes aos do presente trabalho para os tratamentos TC32, TA28 e TA32 foram vistos por Suraweera *et al.* (2016) ao submeterem a espécie *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip. a um regime de estresse térmico moderado (35°C/6h) e um severo (35°C/12h). Ambos os regimes de temperatura tiveram como resposta uniformidade e sincronização da antese e menor duração do período de floração em relação ao controle. No entanto, os autores observaram que o regime severo respondeu antes, 3 dias antes do que o regime moderado, que por sua vez apresentou 14 dias antes do controle.

Os tratamentos TC32, TA28 e TA32 apresentaram respostas (alongamento do pedúnculo da inflorescência e antese) em poucos dias de diferença entre si. Mas por causa da temperatura constante, que torna o tempo de exposição a alta temperatura maior dentre eles, o TC32 foi aquele com o dano mais acentuado. Além das respostas já citadas também apresentou baixa pigmentação das brácteas após a inflorescência emergir da roseta, apresentando um tom rosa pálido enquanto do ambiente apresenta um tom de rosa forte. O tom de rosa visto nas brácteas do ambiente somente começa a ser menos pigmentado

naturalmente no desenvolvimento avançado da flor quando esta está entrando no processo de frutificação. A produção de antocianina diminui em altas temperaturas, e com isso há baixa pigmentação nas flores, o mesmo foi visto em outras espécies como em pétalas de *Rosa hybrida* (Dela *et al.*, 2002), *Chrysanthemum morifolium* Ramat. (Nozaki *et al.*, 2006 e Puangkrit *et al.*, 2018) e inclusive casca de frutos como *Malus domestica* Borkh. (Lin-Wang *et al.*, 2011).

O tratamento TC38/35 não teve seu crescimento e desenvolvimento acelerado, mas demonstrou sinais de estresse na morfologia das folhas, que apresentaram baixa pigmentação, e no decorrer do experimento estavam mais finas e maleáveis em relação ao ambiente e demais tratamentos. Um crescimento reduzido em folhas de bromélias epífitas foi observado por Pellegrini (2012), ao submeter duas espécies (*Tillandsia bulbosa* Hook. e *Vriesea sp.*) a estresse térmico (27°C e 32°C), a taxa de crescimento e a biomassa relativa, para as duas espécies na temperatura mais elevada foi menor. Por fim os indivíduos do TC38/35 apresentaram sinais de dessecação e senescência, devido a temperatura estar muito elevada era esperado tal resposta. Alta temperatura pode aumentar taxa de transpiração, e assim a planta pode sofrer concomitante o estresse hídrico, mesmo que se mantenha a disponibilidade de água necessária. Annisa *et al.* (2013) ao comparar o mesmo genótipo *Brassica juncea* (L.) Czern. nas temperaturas de 23°C e 35°C fornecendo a mesma quantidade de água, percebeu efeito mais adverso na temperatura mais alta. Dentre os efeitos observados pelos autores estavam a maior condutância dos estômatos e alta transpiração o que afeta fotossíntese, justificando a alteração da pigmentação das folhas. Temperatura alta tem efeito em folhas como potencial de água da folha, área foliar reduzida e senescência precoce que afetam negativamente a performance fotossintética da planta (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

As inflorescências de TC38/35 apresentaram sinais de estresse desde o 6º dia, baixa pigmentação de brácteas e sinais de necrose nas bases das flores, até o aborto no 16º dia. Tais manifestações são condizentes com o regime de estresse severo em que os indivíduos foram expostos. Resultado semelhante foi visto para botões florais de *Pisum sativum* L., em estresse severo houve rápida interrupção do desenvolvimento dos órgãos reprodutivos seguido de abscisão (Guillioni *et al.*, 1997). No entanto, se deliberou esta temperatura (38°C) mesmo sabendo que poderia trazer danos severos à planta e esta não prosseguir seu desenvolvimento, para poder observar a resposta dos indivíduos ao estresse nos primeiros dias, principalmente o desenvolvimento dos rudimentos seminais.

A fenologia de uma espécie varia conforme a época da estação da germinação, área geográfica e fenômenos atmosféricos (água, luz e temperatura) (Sita *et al.*, 2017). O momento da mudança entre as fases vegetativa e reprodutiva aliada a floração é crucial para formação de sementes em indivíduos e populações, ainda a variação entre fenologia das espécies é um mecanismo importante para manter a coexistência de espécies em diversas comunidades de plantas, reduzindo a competição por polinizadores e outros recursos (Cleland *et al.*, 2007). O estresse térmico pode causar o aumento da esterilidade de órgãos reprodutivos e também afeta a fenologia de plantas, podendo causar mudanças temporais no desenvolvimento e até mesmo a supressão de um estágio (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Por isso espécies de interesse econômico principalmente as produtoras de grãos são muito estudadas quanto aos efeitos do estresse térmico pois as consequências diminuem o rendimento de culturas agrícolas (Sita *et al.*, 2017). Como um exemplo temos o de Hossain *et al.* (2012), que ao testar o efeito do estresse por alta temperatura em cultivares de alto desempenho de trigo, percebeu alterações fenológicas como início da formação da inflorescência e antese que resultaram em menor rendimento de grãos.

Embora trabalhos que analisam as fases fenológicas em conjunto com as fases de desenvolvimentos do ginófito possam ser importantes para melhor compreensão dos efeitos e consequências da temperatura sobre a reprodução das plantas, devido sua complexidade existem poucos trabalhos realizados, entretanto estes trazem informações concordantes de que a temperatura afeta as fases de desenvolvimento e a formação do ginófito estão associados. Nava *et al.* (2009) avaliou o efeito da temperatura em pêssegos durante o período de brotamento, comparando a fenologia e o desenvolvimento dos gametófitos nas condições de campo e em casa de vegetação. A temperatura na casa de vegetação foi  $\approx 3^{\circ}\text{C}$  em média mais alta na casa de vegetação foi suficiente para adiantar o desenvolvimento das flores. A antese foi observada 10 dias antes na casa de vegetação nos dois anos avaliados. Também se observou atraso no crescimento do ginófito, no terceiro dia após a antese o rudimento seminal ainda se encontrava antes ou no momento da diferenciação da célula mãe do saco embrionário (de célula mãe de ginósporo até ginósporo funcional) enquanto no campo já se observava saco embrionário diferenciado (ginófito).

Um atraso nas fases de desenvolvimento do rudimento seminal também foi observado por Jędrzejuk e Łukaszewska (2008) em arbustos de lilás (*Syringa vulgaris* L.), analisando os estádios fenológicos e comparando o desenvolvimento em condições



naturais (início do desenvolvimento do botão floral em abril) e em quebra de dormência forçada (início do desenvolvimento do botão floral em novembro). A quebra de dormência após o descongelamento dos arbustos foi seguida de estresse térmico, por seis dias foram mantidos a temperatura de 37-35°C em seguida realocados para a temperatura natural de 26°C. O desenvolvimento sofreu atraso em relação ao natural desde a formação do gineceu, enquanto os botões florais em condições naturais já estavam iniciando a diferenciação do primórdio do rudimento seminal os arbustos que sofreram quebra de dormência forçada seguido de estresse térmico estavam começando a diferenciação do gineceu. E quando se observava a fase de tétrade de ginósporos no natural ainda se observava a fase célula mãe de ginósporo no tratamento.

Um experimento realizado por Kozai *et al.* (2015) com botões florais de pessegueiro o desenvolvimento do rudimento seminal foi acelerado por causa da temperatura. As plantas de pessegueiro foram submetidas às temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C por um mês antes da floração natural e após retornaram para o campo. Todas as temperaturas adiantaram e encurtaram o período de florescimento, sendo que quanto mais alta a temperatura maior foi o efeito. Na temperatura de 30 °C a emissão dos botões florais foi de 80% em 3 dias, enquanto no controle levou 18 dias para atingir a mesma porcentagem.

Os trabalhos Nava *et al.* (2009), Jędrzejuk e Łukaszewska (2008), e Kozai *et al.* (2015) têm em comum espécies que necessitam passar por um período de frio para florescer, ou seja, florescem na primavera. A *T. aeranthos* ao contrário passa por um período de calor e depois floresce (outono – início da formação da inflorescência e inverno – ápice da floração), e seu florescimento foi acelerado pela alta temperatura. Mesmo apresentando diferente época de floração, também se observou a formação dos botões florais e a antese acontecer antes nos indivíduos submetidos a regimes de temperatura altas quando se compara aos indivíduos sob as condições naturais ou de controle. Ainda se observou em comum a todos os trabalhos o encurtamento do período de floração e desenvolvimento do rudimento seminal. Este encurtamento do período do desenvolvimento do rudimento seminal reflete um desenvolvimento acelerado, no entanto reflete na maioria dos casos a senescência precoce dos rudimentos e nesses casos se observou alta frequência de ginófitos degenerados ou abortados antes de completarem seu desenvolvimento.

As análises do presente trabalho se focam mais na ginospogênese, apesar da importância de uma análise mais abrangente, optou-se por manter o foco num dos processos menos estudados e com menos informações disponíveis na literatura. O efeito do estresse térmico comumente é analisado no androceu, talvez por ser mais fácil de visualizar (Hedhly *et al.*, 2008). Mesmo sem análise do desenvolvimento do gineceu pode ser uma abordagem muito válida quando se quer avaliar o efeito da temperatura sobre a fertilidade e consequente produtividade, por menos complexo de se executar e trazer resultados pertinentes. A maioria dos trabalhos utilizam análises de crescimento do tubo polínico, rendimento de frutos e rendimento de grãos após a fecundação, e através dessas análises associam a viabilidade do gineceu como consequência da resposta do grão de pólen (Zinn *et al.*, 2010). Outro motivo é que o androceu é mais sensível ao estresse do que o gineceu, em alguns casos o gineceu pode até não sofrer danos. No entanto, trabalhos tem demonstrado evidências de que temperatura elevada no gineceu afeta pré-polinização, desde a esterilidade do androceu e do gineceu e o aborto de flores até a redução na quantidade e qualidade do pólen produzido. Ainda a temperatura altera estruturas do androceu e gineceu durante a polinização resultando em incompatibilidade e queda na fertilidade, indicando assim que os efeitos vistos no gineceu nem sempre são dependentes do androceu, e a importância de se analisar também o gineceu (Hedhly, 2011). Até mesmo pode haver casos em que se observa danos apenas no gineceu, dependendo da fase de desenvolvimento em que a exposição a alta temperatura ocorre, como visto por Plažek *et al.* (2019) em flores de *Fagopyrum esculentum*. Após as plantas serem expostas a alta temperatura foi registrado danos ao gineceu com uma drástica redução no número de sacos embrionários normais, no entanto no androceu não se encontrou nenhum dano, sendo que a viabilidade dos grãos de pólen se manteve intacta. Isso aconteceu porque o androceu já havia passado pela esporogênese e gametogênese quando foi submetido a alta temperatura, não sofrendo dano quando o andrófito já estava formado.

Os resultados do presente trabalho demonstram que danos causados por estresse térmico podem ocorrer antes da fecundação, apresentando alterações na integridade dos tecidos do rudimento seminal e nucelo antes mesmo da esporogênese. Os danos são mais evidentes como esperado no regime de temperatura mais severo, caso do tratamento TC38/35 em que já no 5º dia apresentou baixa densidade citoplasmática na fase de primórdio do rudimento seminal. O tratamento TC32 se demonstrou menos severo do que

o TC38/35, para a morfologia e fenologia e os danos apareceram mais tarde, 14º dia, afetando também desde a fase de primórdio do rudimento seminal com baixa densidade citoplasmática e célula mãe de ginósporo degradada. No 15º dia observou-se um outro tipo de dano, a célula mãe de ginósporo apresentava vacuolação anormal para a fase. O regime mais ameno de temperatura, TA28 e TA32, não demonstrou danos ao nucelo, no entanto apresentou rudimentos seminais degenerados de forma abrupta no 11º dia, sem precedência nos dias anteriores.

A degeneração de rudimentos seminais também foi observada por Saini *et al.* (1983), Jędrzejuk e Łukaszewska (2008) e Plažek *et al.* (2019). Nas observações de Saini *et al.* (1983), um terço dos ovários apresentaram estrutura anormal no nucelo ou no ginófito, os dois maiores danos causados pela alta temperatura na anatomia foram redução do desenvolvimento e degeneração do nucelo e reduzida organização celular. No trabalho de Jędrzejuk e Łukaszewska (2008) a maioria dos rudimentos seminais tiveram ginófito anormais parecendo vazios e quando os ginófito estavam em fase mais avançada as sinérgides apresentaram vacuolação anormal. E no caso de Plažek *et al.* (2019) ao avaliar o efeito da temperatura em trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench.) a vacuolação anormal do ginófito foi observada na oosfera, também ocorreu degeneração de todo o ginófito e de rudimentos seminais por inteiro. Outro dado importante encontrado por de Plažek *et al.* (2019) foi que a formação de embriões parecia muito exuberantes, mas uma análise detalhada revelou uma vacuolação anormal. Tais manifestações como vacuolação anormal, nucelo e ginófito sem conteúdo e tecidos degenerados são condizentes com o processo de morte celular programada.

A morte celular programada (MCP) é um tipo de morte celular causada por uma série de eventos controlados geneticamente que levam a destruição da célula (Lockshin e Zakeri 2004). Floyd *et al.* (2015) classifica a morte celular programada em três classes: apoptose, necrose e autofagia.

A apoptose envolve encolhimento da membrana plasmática se distanciando da parede celular ao mesmo tempo que mantém a integridade da membrana plasmática e da membrana do vacúolo. No presente trabalho não foram observadas células em apoptose. A autofagia pode ser caracterizada pela vacuolação da célula em grande escala, vesículas se acumulam no vacúolo contendo citoplasma e organelas degradadas. A membrana do vacúolo eventualmente se rompe, liberando enzimas líticas no citoplasma e promovendo

a morte celular. Vacuolação excessiva, foi observado no 14º e 15º dia do tratamento TC32, mostram uma fase inicial da autofagia, com pequenas vesículas em grande número no nucleolo. A necrose ocorre como resultado de forte estresse celular e trauma ou através de mecanismos programados. Envolve edema celular e de organela seguido pela ruptura das organelas, membrana plasmática e parede celular. As respostas dos indivíduos quando submetidos ao regime de temperatura alta do tratamento TC35/38 são sinais de estresse ao apresentar baixa densidade citoplasmática, colapso de protoplasto e de parede celular. Estas características estão associadas a necrose, e ocorre quando o processo de autofagia cessa e acontece uma limpeza do conteúdo celular levando a uma morte rápida com o colapso do protoplasto, sinal típico de necrose (Kurusu e Kuchitsu, 2017). Nos tratamentos TA28 e TA32 não se observou vacuolação anormal nem baixa densidade citoplasmática, somente colapso de células do rudimento seminal inteiro, podendo se enquadrar na classe necrose da MCP, mas como não se observou o processo desde o início não foi possível acompanhar as demais. Sabe-se que para melhor diagnóstico o mais adequado é observar a célula em microscopia eletrônica, pois com ela é possível analisar ao nível de organelas menores (Papini *et al.*, 2011). Apesar disso a microscopia de luz pode nos dar um indicativo de que as células estão passando pelo processo de MCP.

A MCP nem sempre está associada ao estresse, este processo ocorre naturalmente em diversos órgãos e momentos da vida da planta podendo ser essencial para o seu desenvolvimento como, por exemplo, no âmbito reprodutivo, durante formação do andrófito e ginófito, durante a fecundação na micrópila, formação da semente e do embrião (van Doorn e Woltering, 2005). Durante a ginosporogênese o processo de MCP ocorre na degeneração de três dos quatro ginósporos. Através de uma investigação ultraestrutural Papini *et al.* (2011), descreveram a morte celular programada durante o processo de esporogênese em *T. aeranthos* e *Tillandsia meridionalis* Baker. A decisão sobre quais dos quatro ginósporos serão os excedentes e, portanto, destinados a sofrer MCP, parece estar ligada à deposição de camada calose ao redor da tétrade, e os eventos que levam a deleção das células não parecem pertencer a uma única classe de MCP. Os primeiros sinais morfológicos são típicos de autofagia, incluindo a formação de autofagossomos. Passando por uma fase de MCP apoptótica, enquanto os remanescentes celulares passam por um processo final que se assemelha a síndromes morfológicas necróticas. Em *Tillandsia* (e em muitas outras angiospermas), o ginósporo sobrevivente tem uma parede sem calose na posição calazal, enquanto os outros três estão

completamente envoltos em calose. Portanto, nutrientes e os sinais podem alcançar mais facilmente o ginósporo funcional do nucelo através do polo calazal em relação aos outros ginósporos.

A presença de calose na ginospogênese promove isolamento e permeabilidade das células, fazendo com que a célula mãe de ginósporo fique isolada dos tecidos esporofíticos. Este isolamento se inicia antes da fase de díade de ginósporos e está associada a MCP dos ginósporos degenerados. A calose forma uma barreira ao redor dos ginósporos excedentes limitando a permeabilidade da parede celular formando um filtro molecular e possivelmente impede que sinais da MCP permeiem pela calose dos ginósporos excedentes para o tecido esporofítico (Ünal *et al.*, 2013). A distribuição de calose ao redor dos ginósporos está associada a degeneração dos ginósporos, em *Tillandsia* a distribuição é mais intensa nos ginósporos não funcionais, enquanto no funcional a intensidade diminui na extremidade calazal, ao contrário a distribuição será menos intensa no ginósporo micropilar em espécies em que este for o funcional. Quando a espécie desenvolve quatro ginósporos e por padrão os quatro se tornam funcionais não degenerando nenhum deles, não se observa calose ao redor dos ginósporos. E até mesmo quando uma espécie durante a androspogênese tem apenas um micrósporo funcional e os três demais se degeneram, nesses casos se observa a deposição de calose (Papini *et al.*, 2011).

Como sugerido por Brighigna *et al.* (2006) o gênero *Tillandsia* tem resposta hipersensível ao estresse abiótico. A MCP vista antes mesmo da fecundação e formação do embrião reforça que a espécie com a estratégia de vida e ecologia de epífita extrema, precisa de respostas rápidas tanto durante a vida vegetativa quanto no processo reprodutivo assexuado e sexuado. O presente trabalho registrou deposição anormal da calose durante a esporogênese, na fase de tríade de ginósporos, e até mesmo na fase de díade de ginósporos. Em ambos os casos o desenvolvimento do rudimento seminal foi prejudicado, principalmente nos casos em que a calose circunda toda a região limítrofe com o nucelo, indicando a MCP.

A deposição de calose no gineceu também pode ser associada a senescência, como se a produção de calose fosse um prenúncio da senescência do gineceu. A presença de calose nas paredes celulares tem sido ligada a presença de proteínas hidrolíticas, responsáveis pelo controle da autólise dos tecidos do gineceu. A detecção de calose pode

ser útil para determinar a receptividade, a viabilidade e a incompatibilidade do gineceu, como um método que diminui custo e tempo em relação ao método com testes de sementes, que frequentemente se faz para determinar estes parâmetros (Dumas e Knox, 1983). Essa deposição de calose em gineceu senescente foi observada por Sun *et. al.* (2004) em *A. thaliana* durante estresse salino por 12h de exposição, calose estava mais abundante 24h após o estresse no rudimento seminal e ginófito em desenvolvimento. O presente trabalho não analisou a deposição de calose em ginófito e o tipo de estresse foi diferente, no entanto ambos têm resultados concordantes; em situação de estresse se observa a vacuolação no nucelo e a deposição de calose seguido de degradação.

Zhou et al. (2016) conseguiram demonstrar o quanto a senescência e esterilidade está associada à calose. *Medicago sativa* L. apresenta mutantes espontâneos para multipistilo (2-3) de maneira natural na população da espécie, os gineceus dos indivíduos mutantes produzem uma quantidade de sementes significativamente menor do que os gineceus de plantas selvagens, indicando que os mutantes são parcialmente estéreis. A deposição de calose foi igual para os selvagens e os mutantes até o final da ginospogênese, quando iniciou a ginogametogênese a calose foi depositada em grande quantidade ao redor das sinérgides dos mutantes. Após essa deposição os ginófito das plantas mutantes ocorreu má formação do ginósporo levando ao aborto do embrião. Assim, apenas após a má formação celular ocorreu a deposição anormal da calose, pode se considerar que a calose está mais para consequência do que a causa da esterilidade.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mudanças climáticas globais podem causar danos as plantas que podem levar a alterações em comunidades vegetais e na produtividade agrícola. Por isso, estudos sobre o efeito da temperatura em plantas vêm sendo realizados no intuito de compreender as respostas da planta a mudanças de temperatura e de encontrar meios para minimizar o efeito negativo que esta pode causar no crescimento, desenvolvimento e rendimento da planta. A maneira que as plantas respondem ao estresse abiótico é complexa, necessitando estudos nos diferentes órgãos de um indivíduo, fases de vida e diversas espécies de planta.

Assim este estudo buscou observar o efeito de alta temperatura em *T. aeranthos*, desde o aspecto mais geral até o mais detalhado, ainda que de forma qualitativa, para poder relacionar os sintomas da morfologia com os da ontogenia do rudimento seminal. As respostas foram compatíveis, quando houve sinal de estresse nas folhas e inflorescências os rudimentos seminais sofreram aborto. E quando o desenvolvimento foi acelerado para as inflorescências e as flores entraram em antese no mesmo momento, as fases ontogenéticas dos rudimentos seminais também estavam aceleradas e padronizadas. Também se notou que quanto maior o acúmulo de estresse maiores os danos, como foi visto que na temperatura constante os danos apareceram logo no começo da formação do primórdio do rudimento seminal e na alternada apareceu somente no começo da ginogametogênese.

Apesar dos resultados serem contundentes e concordarem com a literatura, ainda se faz necessário analisar os efeitos durante a gametogênese, assim como os efeitos sobre a androsporogênese e androgametogênese, para avaliar o período do desenvolvimento mais sensível e também a sincronia do androceu com o gineceu. Além de testar outros regimes de temperatura para relacionar os efeitos a diferentes condições climáticas para ajudar a elucidar as questões de tolerância ao estresse a alta temperatura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AGUIAR, L. W.; MARTAU, L.; SOARES, Z. F.; BUENO, O. L.; MARIATH, J. E. & KLEIN, R. M. Estudo preliminar da flora e vegetação de morros graníticos da Região da Grande Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 34, p. 3-38. 1986.

ANNISA; CHEN, S.; TURNER, N. C.; COWLING, W. A. Genetic variation for heat tolerance during the reproductive phase in *Brassica rapa*. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 199, n. 6, p. 424-435. 2013.

BECKER, D. F. P.; LINDEN, R.; SCHMITT, J. L. Richness, coverage and concentration of heavy metals in vascular epiphytes along an urbanization gradient. **Science of The Total Environment**, v. 584-585, p. 48-54. 2017.

BENZING, D. H.; HENDERSON, K.; KESSEL, B.; SULAK, J. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. **American Journal of Botany**, v. 63, n. 7, p. 1009-1014. 1976.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press. 655 p. 2000.

BERLATO, M. A.; CORDEIRO, A. P. A. Sinais de mudanças climáticas globais e regionais, projeções para o século XXI e as tendências observadas no Rio Grande do Sul: uma revisão. **Agrometeoros**, v. 25, n. 2, p. 273-302. 2017.

BIANCHI, M. B.; VESPRINI, J. L. Contrasting breeding systems in six species of *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) from woody areas of Santa Fe Province: Argentina. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 148, n. 5, p. 956-964. 2014.

BORGES, R. C. de M. 2013. **Cálculo do nascer e Por do Sol**. Disponível em: <<https://www.inf.ufrgs.br/~cabral/NascerPorSolAno.html>>. Acesso em: 11 de jun. de 2020.

BREITSAMETER C. J. 2014. **Ontogenia do Rudimento Seminal em *Vriesea gigantea* Gaudich (Tillandsioideae – Bromeliaceae)**, 2014. 39p. Trabalho de Conclusão de Graduação: Curso de bacharel em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BRIGHIGNA, L.; PAPINI, A.; MILOCANI, E.; VESPRINI, J. L. Programmed cell death in the nucellus of *Tillandsia* (Bromeliaceae). **Caryologia**, v. 59, n. 4, p. 334-339. 2006.



BROOKS A; FARQUHAR G. D. Effect of temperature on the CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. **Planta**, v. 165, n. 3, p.397-406, 1985.

BURIOL, G. A.; ESTEFANEL, B; CHAGAS, A. C. D.; EBERHARDT, D. Clima e vegetação natural do estado do Rio Grande do Sul segundo o diagrama climático de Walter e Lieth. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 2, p. 91-100. 2007.

CALDIZ, D. O.; BELTRANO, J. Control of the epiphytic weeds *Tillandsia recurvata* and *T. aëranthos* with simazine. **Forest Ecology and Management**, v. 28, n. 2, p. 153-159. 1989.

CASAL, J. J., BALASUBRAMANIAN, S. Thermomorphogenesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, p.321-346. 2019.

CLELAND, E. E.; CHUINE, I.; MENZE, A.; MOONEY, A. H.; SCHWARTZ, M. D. Shifting plant phenology in response to global change. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 7, p. 357-365. 2007.

CORDEIRO, A. P. A.; BERLATO, M. A.; FONTANA, D. C.; ALVES, R. de C. M. Tendências climáticas das temperaturas do ar no estado do Rio Grande do Sul, Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 9, n. 3, p. 868-880, 2016.

DELA, G.; OR, E.; OVADIA, R; NISSIM-LEVI, A; WEISS, D; OREN-SHAMIR, M. Changes in anthocyanin concentration and composition in ‘Jaguar’ rose flowers due to transient high-temperature conditions. **Plant Science**, v. 164, n. 3, p. 333-340. 2003.

DJANAGUIRAMAN M.; PERUMAL, R.; JAGADISH S. V. K.; CIAMPITTI, I. A.; WELTI, R.; PRASAD, P. V. V. Sensitivity of sorghum pollen and pistil to high-temperature stress. **Plant Cell Environment**, v. 41, n. 5, p. 1065-1082. 2017.

DUMAS, C.; KNOX, R. B. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, p. 1-10. 1983.

ESCHRICH W.; CURRIER M. B. Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. **Stain Technology**, v. 39, n. 5, p. 303-307. 1964.

FLOYD, B. E.; SOTO-BURGOS, J.; BASSHAM, D. C. To live or die: autophagy in plants. In: GUNAWARDENA, A. H.; MCCABE, P. F. (Eds.) **Plant programmed cell death**. Basel: Springer, p. 269-300. 2015.

GABRIEL, B. L. **Biological electron microscopy**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, p.26. 1982.

GERRITS, P. O.; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v. 132, n 1, p. 81-85. 1983.

GROSS, Y.; KIGEL, J. Differential sensitivity to high temperature of stages in the reproductive development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, v. 36, p. 201-212. 1994.

GROTZINGER, J.; JORDAN, T. H. **Para entender a terra**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 738p. 2013.

GUILIONI L.; WERY J.; TARDIEU F. Heat stress-induced abortion of buds and flowers in pea: is sensitivity linked to organ age or to relations between reproductive organs. **Annals of Botany**, v. 80, p. 159-168. 1997.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ALAM, MD. M.; ROYCHOWDHURY, R.; FUJITA, M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 9643-9684. 2013.

HEDHLY, A. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, p. 9-16. 2011.

HEDHLY, A.; HORMAZA, J. I.; HERRERO, M. Global warming and sexual plant reproduction. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 30-36. 2008.

HERRERO, M. Male and female synchrony and the regulation of mating in flowering plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 358, n. 1434, p. 1019-1024. 2003.

HOSSAIN, A.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; LOZOVSKAYA, M. V.; ZVOLINSKY, V. P. The effect of high temperature stress on the phenology, growth and yield of five wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 14-23. 2012.

IBAÑEZ, C.; POESCHL, Y.; PETERSON, T.; BELLSTEADT, J.; DENK, K.; GOGOLDO RING; A., QUINT, M.; DELKER, C. Ambient temperature and genotype differentially affect developmental and phenotypic plasticity in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v. 17, a. 114. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA- INMET. Banco de Dados para Pesquisa e Ensino (BDMEP). 2014. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. Acesso em: 11 jun. 2014.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE- IPCC. **Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. CORE WRITING TEAM; PACHAURI, R. K.; MEYER, L. A. (Eds.), Geneva: IPCC, 151 p. 2014.

JĘDRZEJUK, A.; ŁUKASZEWSKA, A. J. High temperatures applied at fall forcing disturb ovule development in *Syringa vulgaris* L. “Mme Florent Stepman”. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 673-67. 2008.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc. 523p. 1940.

KOZAI, N.; BEPPU, K.; MOCHIOKA, R.; BOONPRAKOB, U.; SUBHADRABANDHU, S.; KATAOKA, I. Adverse effects of high temperature on the development of reproductive organs in ‘Hakuho’ peach trees. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 79, p. 533-537. 2004.

KURUSU, T.; KUCHITSU, K. Autophagy, programmed cell death and reactive oxygen species in sexual reproduction in plants. **Journal of Plant Research**, v. 130, p. 491-499. 2017.

LIN-WANG, K.; MICHELETTI, D.; PALMER, J.; VOLZ, R.; LOZANO, L.; ESPLEY, R.; HELLENS, R. P.; CHAGNÈ, D.; ROWAN, D. D.; TROGGIO, M.; IGLESIAS, I.; ALLAN, A.C. High temperature reduces apple fruit colour via modulation of the anthocyanin regulatory complex. **Plant, Cell & Environment**, v. 34, p. 1176-1190. 2011.

LIPPMANN, R.; BABBEN, S.; MENGER, A.; DELKER, C.; QUINT, M. Development of wild and cultivated plants under global warming conditions. **Current Biology**, v. 17, n. 114, p. R1326-R1338. 2019.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, K. Apoptosis, autophagy, and more. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2405-2419. 2004

MAGRIN, G. O.; MARENGO, J. A.; BOULANGER, J. P.; BUCKERIDGE, M. S.; CASTELLANOS, E.; POVEDA, G.; SCARANO, F. R.; VICUÑA, S. Central and South America. In: **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.** BARROS, V. R., *et al.* (Eds.). Cambridge University Press, p. 1499-1566. 2014.

MCDOWELL, E.M; TRUMP, B.R. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 1000, n. 8, p. 405-414. 1976.

MENEZES-SILVA, P. E.; LORAM-LOURENCO, L.; ALVES, R. D. F. B.; SOUSA, L. F.; ALMEIDA, S. E. D.; FARNESE, F. S. Different ways to die in a changing world: consequences of climate change for tree species performance and survival through an ecophysiological perspective. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 20, p. 11979-11999. 2019.

MORENO, J. A. Clima do Rio Grande do Sul. **Boletim Geográfico do Rio Grande do Sul**, v. 11, 1961. Disponível em: <<https://revistas.fee.tche.br/index.php/boletim-geografico-rs/article/view/3236/3310>>. Acesso em: 16 set. 2014.

MORRISON, M. J.; STEWART, D. W. Heat Stress during Flowering in Summer *Brassica*. **Crop Science**, v. 42, n. 3, p. 797-803. 2002.

NAVA, G. A.; DALMAGO, G. A.; BERGAMASCHI, H.; PANIZ, R.; DOS SANTOS, R. P.; MARODIN, G. A. B. Effect of high temperatures in the pre-blooming and blooming periods on ovule formation, pollen grains and yield of 'Granada' peach. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p.37-44. 2009

NOZAKI, K.; TAKAMURA, T.; FUKAI, S. Effects of high temperature on flower colour and anthocyanin content in pink flower genotypes of greenhouse chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 728-734. 2006.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. The study of plant structure: principles and selected methods. Melbourne, Termacarphi Pty. Ltd. 357p. 1981.

ONO, E. R.; 1, VALENTIN-SILVA, A.; GUIMARÃES, E. Spatial and temporal distribution of floral resources used by pollinators in a semi-deciduous seasonal forest. **The International Journal of Plant Reproductive Biology**, v. 12, n. 1, p.11-24. 2020.

PAPINI, A.; MOSTI, S.; MILOCANI, E.; TANI, G.; DI FALCO, P.;BRIGHINA, L. Megasporogenesis and programmed cell death in *Tillandsia* (Bromeliaceae). **Protoplasma**, v. 248, n. 4, p. 651-662. 2011.

PASTENES, C.; HORTON, P. Effect of high temperature on photosynthesis in beans II. CO<sub>2</sub> assimilation and metabolite contents. **Plant Physiology**, v. 112, n. 3, p. 1245-1251. 1996.

PELLEGRINI, A. Temperature and nutrient change and their evolutionary consequences. **Colgate Academic Review**, v. 6, a. 3. 2012.

PLAŽEK, A.; SŁOMKA, A.; KOPEĆ, P.; DZIURKA M.; HORNYÁK, M.; SYCHTA, K.; PASTUSZAK, J.; DUBERT, F. Effects of high temperature on embryological development and hormone profile in flowers and leaves of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **International Journal of Molecular Science**, v. 20, n. 7, a. 1705. 2019.

PORCH, T. G.; JAHN M. Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 7, p. 723-731. 2001.

PRASAD, P. V. V. A; DJANAGUIRAMAN, M. Response of floret fertility and individual grain weight of wheat to high temperature stress: sensitive stages and thresholds for temperature and duration. **Functional Plant Biology**, v. 41, p. 1261–1269. 2014.

PUANGKRIT, T.; NARUMI-KAWASAKI, T.; TAKAMURA, T.; FUKAI, S. Inflorescence developmental stage-specific high temperature effect on petal pigmentation in *Chrysanthemum*. **Environmental Control in Biology**, v. 56, n. 3, p. 99-106. 2018

REITZ, R. Bromeliáceas e a Malária - Bromélia endêmica. In: **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 559 p. 1983.

RICHARDSON, A. D.; KEENA, T. F.; MIGLIAVACCA, M.; RYU, Y.; SONNENTAG, O.; TOOMEY, M. Climate change, phenology, and phenological control of vegetation feedbacks to the climate system. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 169, p. 156-173. 2013.

RODKIEWICZ, B. Callose in cell walls during megasporogenesis in Angiosperms. **Planta**, v. 93, p. 39-47. 1970.

ROSELLINI D.; LORENZETTI F.; BINGHAM E. T. Quantitative ovule sterility in *Medicago sativa*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 8, p. 1289-1295, 1998.

SAINI, H. S.; SEDGLEY, M.; ASPINALL, D. Effect of heat stress during floral development on pollen tube growth and ovary anatomy in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 10, n. 2, p. 137-144. 1983.

SITA, K.; SEHGAL, A.; HANUMANTHARAO, B.; NAIR, R. M.; PRASAD, P. V. V.; KUMAR, S.; GAUR, P. M.; FAROOP, M.; SIDDIQUE, K. H. M.; VARSHNEY, R. K.; NAYYAR, H. Food legumes and rising temperatures: effects, adaptive functional mechanisms specific to reproductive growth stage and strategies to improve heat tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, a. 1658. 2017.

SMITH, L. B.; DOWNS R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica**, v. 14, n. 2. 1977.

SMITH, M. M.; MCCULLY, M. E. Mild temperature "stress" and callose synthesis. **Plant**, v. 136, p. 65-70. 1977.

SNIDER J. L., OOSTERHUIS D. M. How does timing, duration and severity of heat stress influence pollen-pistil interactions in Angiosperms? **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 7, p. 930-933, 2011.

SNOW, D. W.; TEIXEIRA, D. L. Hummingbirds and their flowers in the coastal mountains of southeastern Brazil. **Journal für Ornithologie**, v. 123, p. 446-450. 1982.

SPAT, C. **Embriologia de *Tillandsia aeranthos* (Lois.) L. B. SM. (Tillandsioideae – Bromeliaceae)**. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2012.

Specieslink. Sistema de informação distribuído para coleções biológicas. 2020. Disponível em: <http://slink.cria.org.br>. Acesso em 16 set 2014.

SUN, K.; HUNT, K.; HAUSER, B. A. Ovule abortion in Arabidopsis triggered by stress. **Plant Physiology**, v. 135, p. 2358-2367. 2004.

SUN, P.; MANTRI, N; LOU, H.; HU, Y.; SUN, D.; ZHU, Y.; DONG, T.; LU, H. Effects of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on yield and fruit quality of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) at two levels of nitrogen application. **Plos One**, v. 7, n. 7, e. 41000. 2012

SURAWEERA, D. D.; NICOLAS, M. E.; GROOM, T. Effect of short periods of heat stress during early flowering period on flower development and pyrethrin accumulation in Pyrethrum. **Acta Horticulturae**, v. 1125, p. 121-128. 2016.

TADIELLO, R. B.; COSTA, A. B.; LOBO, E. A.; SCHUCH, M.; PUTZKE, J. Utilização da *Tillandsia aeranthos* como bioindicador de poluição atmosférica, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. **Revista Tecnológica**, v. 23, n. 1, p. 85-98. 2014.



ÜNAL, M.; VARDAR, F.; AYTÜRK, Ö. Callose in plant sexual reproduction. In: SILVA-OPPS M, (Ed.). **Current Progress in Biological Research**. InTech, p. 319-343, 2013.

VAN DOORN, W. G.; WOLTERING, E. J. Many ways to exit? Cell death categories in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 3, p. 117-122. 2005.

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. Bromélias - gigantes do Brasil. Natal: Offset Editora. 200p. 2015.

WANG, Y.; MOMOHARA, A.; ITO, A.; FUKUSHIMA, T.;HUANG, Y., Warm climate under high CO<sub>2</sub> level in the early Pleistocene based on a leaf fossil assemblage in central Japan. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 258, p. 146-153. 2018.

WARNER, R. M., & ERWIN, J. E. Prolonged high temperature exposure and daily light integral impact growth and flowering of five herbaceous ornamental species. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 130, n. 3, p. 319-325. 2005.

WILL, R. E., WILSON, S. M., ZOU, C.B., HENNESSEY, T. C. Increased vapor pressure deficit due to higher temperature leads to greater transpiration and faster mortality during drought for tree seedlings common to the forest-grassland ecotone. **New Phytologist**, v. 200, n. 2, p. 366-374. 2013.

WOLDEAREGAY, M. Climate change impacts on the distribution and phenology of plants: A review. **Tropical Plant Research**, v. 7, n. 1, p. 196–204. 2020.

WREGGE, M.S.; STEINMETZ, S.; REISSER JUNIOR, C.; ALMEIDA, I. R. de. **Atlas climático da Região Sul do Brasil: estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul**. 2ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Colombo: Embrapa Florestas. 336p. 2011 Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1045852/atlas-climatico-da-regiao-sul-do-brasil-estados-do-parana-santa-catarina-e-rio-grande-do-sul>. Acesso em: 05 ago. 2020.

YOUNG, L. W.; WILEN, R. W.; BONHAM-SMITH, P. C. High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 485-495. 2004.

ZHOU, H. C.; JIN, L.; LI, J.; WANG, X. J. Altered callose deposition during embryo sac formation of multi-pistil mutant (mp1) in *Medicago sativa*. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, p. 1-12. 2016.

ZINN, K. E.; TUNC-OZDEMIR, M.; HARPER, J. F. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 7, p. 1959-1968. 2010.