

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

ASPECTOS REPRODUTIVOS DO PINHEIRO BRASILEIRO
Araucaria angustifolia (BERT.) O. KTZE. – ARAUCARIACEAE

Dissertação de Mestrado

Sofia Aumond Kuhn

Porto Alegre
2012

Sofia Aumond Kuhn

ASPECTOS REPRODUTIVOS DO PINHEIRO BRASILEIRO -
Araucaria angustifolia (BERT.) O. KTZE. (ARAUCARIACEAE)

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

2012

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Jorge Ernesto de Araujo Mariath, pela motivação, confiança e incansável dedicação.

Aos professores e colegas do Laboratório de Anatomia vegetal, pelo incentivo, apoio e auxílio imediato.

À bibliotecária Andréia Postal pelo auxílio na busca do material bibliográfico.

À Prefeitura e ao Corpo de Bombeiros Voluntários de Nova Petrópolis, pela colaboração na coleta do material.

À Colina Verde, pela disponibilização do local de coleta.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Às minhas irmãs e à Cleufe Aumond da Silva, que sempre estiveram disponíveis, colaborando todos os dias na construção desse estudo.

Aos meus pais e ao Tiago, pela companhia nas inesgotáveis idas e vindas à Nova Petrópolis.

Resumo

Estudos referentes à reprodução de Gimnospermas são escassos, sendo a maioria desses baseados em modelos com espécies de *Pinus*, havendo poucos estudos sobre a família Araucariaceae. O detalhamento dos aspectos reprodutivos de *Araucaria angustifolia* é de grande importância tanto econômica como ecológica, com aplicação direta na coleta de sementes destinada à conservação do germoplasma, na obtenção de sementes para fins comerciais e no entendimento da dinâmica e regeneração de populações naturais. Neste estudo foi analisado a androsporogênese, a androgametogênese e o padrão de desenvolvimento do tubo polínico associado ao desenvolvimento do ginófito em exemplares de *A. angustifolia*. As coletas dos estróbilos da Araucária foram realizadas na cidade de Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul, Brasil, durante os anos de 2010 e 2011. O material foi analisado através de técnicas usuais de microscopia de campo claro e microscopia eletrônica de varredura. Com relação à fenologia da espécie, o desenvolvimento das estruturas reprodutivas de árvores androsporangiadas leva cerca de 22 meses para ser concluído. No primeiro ano, grande parte dos eventos ocorre nas árvores androsporangiadas, incluindo a formação dos estróbilos e seus esporângios, o desenvolvimento dos esporos e dos grãos de pólen. Após a polinização, as etapas subsequentes se dão nas árvores ginospangiadas. Também no primeiro ano do ciclo, ocorre a germinação do tubo polínico. No segundo ano, após a espera de vários meses, ocorre a formação dos gametas no andrófito e se inicia o processo da fecundação. Os esporângios de *A. angustifolia* possuem origem dérmica e quando maduros apresentam diversas camadas celulares isolando as células esporogênicas, enquanto na deiscência a única camada que resta é o exotécio. A meiose apresenta citocinese simultânea, é assincrônica e forma tétrades do tipo tetraédrica e isobilateral. Durante a gametogênese, o andrófito passa por cinco ciclos mitóticos até a formação dos gametas, sendo que no momento da dispersão apresenta uma forte polarização interna de seus constituintes. O pólen de *A. angustifolia* não possui aberturas, não possui sacos aéreos e é suboblato, sua germinação é extra rudimento seminal e o tubo polínico apresenta inúmeras ramificações. No interior do nucelo se desenvolve o ginófito, que quando maduro apresenta cerca de quatorze arquegônios dispostos na região micropilar. Durante a penetração do tubo polínico nos arquegônios, ocorre a descarga de dois núcleos gaméticos de iguais dimensões na célula oosférica. O estudo embriológico de *A. angustifolia* demonstrou diversas características de extrema relevância para a compreensão da biologia reprodutiva dessa espécie. No entanto, certos aspectos merecem detalhamento específico visando à compreensão mais profunda sobre a sua reprodução, como: a determinação da origem de cada estrato parietal nos esporângios; o detalhamento citológico do andrófito maduro, dos constituintes do tubo polínico, das células do pescoço de arquegônios e da cariogamia.

Palavras-chave: 1. androsporogênese. 2. androgametogênese. 3. *Araucaria angustifolia*. 4. gimnosperma.

Abstract

Studies on the reproduction of Gymnosperms are scarce and most of them are based on models using the *Pinus* species, with few studies on the family Araucariaceae. It is both economically and ecologically important to detail the reproductive aspects of *Araucaria angustifolia*, with a direct application to the collection of seeds for the conservation of germoplasm in order to obtain seeds for commercial purposes and to understand the dynamics and regeneration of natural populations. This study examined androsporogenesis, androgametogenesis and the development pattern of the pollen tube associated with the development of the gynophyte in exemplars of *A. angustifolia*. Araucaria strobils were collected in the city of Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul, Brazil, in 2010 and 2011. The material was analyzed using the usual bright field microscopy and scanning electron microscopy techniques. As to the phenology of the species, the development of the reproductive structures of androsporangium trees takes about 22 months to complete, including the formation of strobils and their sporangia, the development of spores and pollen grains. After pollination, the subsequent stages occur in the gynosporangium trees. Also in the first year of the cycle, the pollen tube germinates. In the second year, after a wait of several months, the gametes form in the androphyte and the fertilization process begins. The sporangia of *A. angustifolia* are of dermal origin and, when mature, present several cell layers isolating the sporogenic cells, while in dehiscence the only layer remaining is the exothecium. Meiosis present simultaneous cytokinesis, it is asynchronous and forms tetrads of the tetrahedric and isobilateral type. During gametogenesis, the androphyte undergoes five mitotic cycles until the gametes are formed, and at the time of dispersion its constituents present strong internal polarization. The pollen of *A. angustifolia* does not have any apertures, no air sacs and it is suboblate, its germination occurs extra-seminal rudiment, and the pollen tube has many ramifications. The gynophyte develops inside the nucellus. When it is mature the gynophyte presents approximately fourteen archegonia distributed in the micropylar region. During the penetration of the pollen tube into the archegonia, two equal-sized gametic nuclei are discharged into the oospheric cell. The embryological study of *A. angustifolia* demonstrated several extremely relevant characteristics for the understanding of the reproductive biology of this species. However, certain aspects deserve specific detailing with a view to further understanding its reproduction, such as: determining the origin of each parietal stratum in the sporangia; cytological detailing of the mature androphyte, of the pollen tube constituents, of the neck cells of the archegonium and of karyogamy.

Key words: 1.androsporogenesis. 2.androgametogenesis. 3. *Araucaria angustifolia*. 4. gymnosperms.

Sumário

1	Introdução	8
1.1	As plantas com sementes e as Coníferas.....	8
1.2	A Família Araucariaceae e o Gênero <i>Araucaria</i>	12
1.3	<i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze.	15
1.4	Estudos embriológicos	18
2	Objetivos.....	21
2.1	Objetivos gerais.....	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	Justificativa do projeto.....	22
4	Material e métodos.....	23
4.1	Coleta, fixação e registro fotográfico do material botânico.....	23
4.2	Microscopia fotônica.....	28
4.3	Análise tridimensional	31
5	Resultados.....	32
5.1	Os estróbilos androsporangiados de <i>Araucaria angustifolia</i>	32
5.2	O desenvolvimento do androsporângio.....	32
5.2.1	Desenvolvimento Inicial.....	32
5.2.2	Desenvolvimento final.....	33
5.2.3	Deiscência.....	34
5.3	O desenvolvimento dos andrósporos	36
5.4	O desenvolvimento do andrófito.....	38
5.5	O pólen maduro.....	40
5.6	O pólen no estróbilo ginosporgiado e o ginófito.....	40
6	Discussão	57
6.1	Fenologia de <i>Araucaria angustifolia</i>	57
6.2	O desenvolvimento do androsporângio.....	59

6.3	O desenvolvimento dos andrósporos	61
6.4	O desenvolvimento do andrófito	63
6.5	O pólen maduro	66
6.6	A polinização	70
6.7	O pólen no estróbilo ginosporangiados e o ginófito	73
7	Considerações finais	77
8	Referências bibliográficas.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 AS PLANTAS COM SEMENTES E AS CONÍFERAS

Segundo Chase e Reveal (2009), todas as plantas terrestres pertencem à Classe Equisetopsida, incluídas neste grupo estão as plantas com sementes, as quais compreendem cicas, ginkgo, coníferas, gnetófitas e angiospermas (JUDD, 2009). As plantas com sementes formam um grupo extremamente grande e diversificado, no entanto, as relações entre elas ainda não estão totalmente claras. Tal problema se deve ao fato de que os representantes atuais correspondem a menos da metade das linhagens extintas (MATHEWS, 2009).

As filogenias, encontradas a partir de sequências de DNA, sustentam diversas hipóteses conflitantes, evidenciando a necessidade de análises morfológicas rigorosas para responder questões fundamentais como a identidade do grupo irmão das angiospermas e o ancestral das plantas com sementes.

Diversos estudos têm se focado na posição de Gnetales dentro do grupo de plantas com sementes. Doyle e Donoghue (1986) e Doyle (1996) propuseram a hipótese do antófito no qual Gnetales seria o grupo irmão das angiospermas. Para Rai, O'Brien e Reeves (2003), Gnetales seria um grupo basal das plantas com sementes. Segundo Schimdt e Schneider-Poetsch (2002), Gnetales seria um grupo basal das gimnospermas, e para Chaw, Parkinson e Cheng (2000); Soltis, Soltis e Wolf (1999); Magallón e Sanderson (2002) e Hajibabaei, Xia e Drouin (2006), Gnetales seria o grupo irmão de Coníferas ou Pinaceae.

Atualmente a hipótese de Gnetales, como grupo irmão das Coníferas ou Pinaceae, tem sido apoiada pela maioria das análises filogenéticas moleculares. No entanto, a monofilia das coníferas continua controversa, devido a conflitos entre diversos estudos moleculares, especialmente com respeito às relações entre Gnetales e Pinaceae.

Recentemente o estudo de Ran, Gao e Wang (2010), baseado em caracteres moleculares, sugere a monofilia do grupo coníferas II (Figura 1). Esses autores sugerem também que Gnetales seja o grupo irmão das Coníferas (Figura 1) que inclui também Pinaceae. Neste estudo, Ran, Gao e Wang (2010), analisam os diferentes padrões do gene *rps3* de todas as famílias de coníferas, exceto Phyllocladaceae.

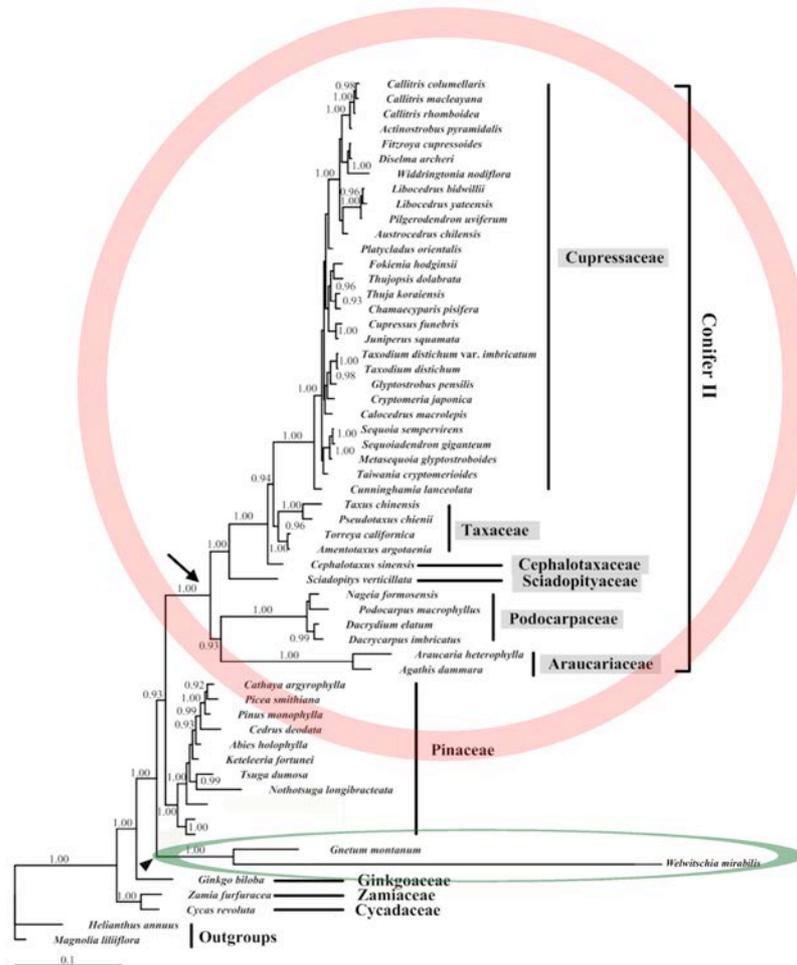


Figura 1 – Análise filogenética evidenciando a monofilia do grupo coníferas II (seta - círculo rosa) e posição de Gnetales como grupo irmão de Coníferas (cabeça de seta - elipse verde), (adaptado de Ran, Gao e Wang, 2010).

As coníferas compreendem um grupo ancestral de gimnospermas lenhosas que atualmente compreendem oito famílias, 69 gêneros, 630 espécies e diversas variedades e cultivares. O grupo inclui as famílias Araucariaceae (três gêneros), Cephalotaxaceae (um gênero), Cupressaceae (29 gêneros), Phyllocladaceae (um gênero), Pinaceae (11 gêneros), Podocarpaceae (18 gêneros), Sciadopityaceae (um gênero) e Taxaceae (5 gêneros) (FARJON, 2001).

As relações taxonômicas e filogenéticas em Coníferas também não estão totalmente esclarecidas. Por exemplo, a união de certas famílias e divisão de outras ainda não é um

consenso entre pesquisadores, como se pode observar em Taxodiaceae e Cupressaceae, que tradicionalmente eram separadas em duas famílias distintas, porém mais recentemente são agrupadas formando um grupo monofilético (BRUNSFELD *et al.*, 1994; STEFANOVIC, JAGER, DEUTSCH, 1998; TSUMURA *et al.*, 1995). Outra modificação também ocorreu no gênero *Sciadopitys* que era tradicionalmente associado à Taxodiaceae. Kusumi *et al.* (2000) observaram que *Sciadopitys* é significativamente divergente em muitos aspectos morfológicos de Taxodiaceae e Cupressaceae, assim o gênero *Sciadopitys* foi considerado uma família distinta, Sciadopityaceae (BRUNSFELD *et al.*, 1994; STEFANOVIC, JAGER, DEUTSCH, 1998; TSUMURA *et al.*, 1995). Em Cupressaceae a maioria dos gêneros são bem aceitos, embora nem sempre com base em evidências conclusivas (FARJON, 2001).

Keng (1973), baseado em características morfológicas, propôs a separação de *Phyllocladus* de Podocarpaceae formando uma família distinta, Phyllocladaceae. Quinn (1987) critica tal divisão, entretanto, diversas análises morfológicas mantêm Phyllocladaceae separada de Podocarpaceae (PAGE, 1990; TOMLINSON *et al.*, 1997; FARJON 2001; FARJON 2008). Com relação à Podocarpaceae, acredita-se que novas modificações ainda irão ocorrer, devido à dificuldades na delimitação de gêneros (FARJON, 2001).

A transferência de *Amentotaxus* e *Torreya* de Taxaceae para Cephalotaxaceae, proposta em alguns trabalhos não parece ser convincente e carece de estudos mais detalhados, dessa forma a tendência atual é considerar Cephalotaxaceae como monotípica com apenas *Cephalotaxus*. Pinaceae encontra-se em situação mais estável, sendo atualmente reconhecidos 11 gêneros (FARJON, 2001).

Da mesma forma que nas famílias de coníferas, a diversidade atual dos gêneros também possui distribuição bastante desigual. Enquanto alguns gêneros apresentam mais de cem espécies, outros apresentam poucas espécies ou são monotípicos. Esta variação pode ser explicada pelo status relictual de diversas coníferas, demonstrada também por seu padrão de distribuição em nichos ecológicos. Em diversos gêneros mais diversificados, ainda se observa abundantes evidências de divergência e irradiação associada à busca de novos habitats (FARJON, 2001).

Com relação à distribuição, as coníferas podem ser encontradas em todos os continentes, exceto na Antártica (Figura 2). Ao norte do Equador sua distribuição é abundante, mas ao sul a distribuição das coníferas é escassa. O limite geográfico norte de ocorrência desse grupo

vegetal é determinado pela fronteira entre Florestas Boreais e a Tundra Ártica (FARJON, 2001).

Em direção ao Equador, no hemisfério norte, a distribuição se torna disjunta com diversos hiatos. Na África e Ásia, devido ao clima árido, a ocorrência de coníferas é restrita a montanhas isoladas onde a precipitação é maior. Ao sul do Equador a disjunção desse grupo de plantas está relacionada aos desertos encontrados na Austrália e Sul da África. Na África subsaariana e América do Sul, no entanto, tal fator não explica a escassez de coníferas. Aparentemente poucas coníferas ocorrem em terras baixas de florestas pluviais, fato que explica o grande hiato de coníferas na Amazônia (FARJON, 2001; SINGH, 2006).

A distribuição das três maiores famílias de coníferas é bastante equilibrada. Pinaceae se encontra distribuída amplamente no hemisfério norte apresentando poucas espécies tropicais; Podocarpaceae se distribui no hemisfério sul, apresentando espécies pantropicais e temperadas e Cupressaceae pode ser encontrada em ambos os hemisférios (FARJON, 2008; WILLIAMS, 2009). Em coníferas existem 34 gêneros restritos ao hemisfério norte, 24 existem apenas ao sul do Equador, e 11 ocorrem em ambos os hemisférios (FARJON, 2001).

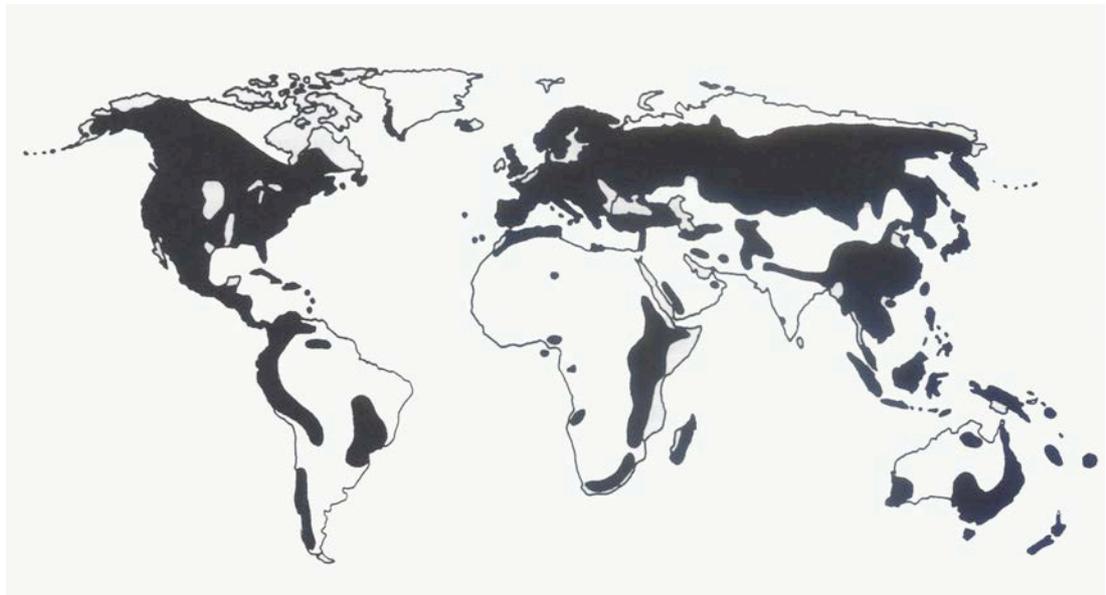


Figura 2 – Distribuição mundial das coníferas (FARJON, 2001).

1.2 A FAMÍLIA ARAUCARIACEAE E O GÊNERO *Araucaria*

Na classificação atual, a família Araucariaceae pertence à Classe Equisetopsida, Subclasse Pinidae (CHASE; REVEAL, 2009), Ordem Coniferales (JUDD, 2009) sendo *Araucaria angustifolia* pertencente ao gênero *Araucaria* Juss. e seção *Araucaria* (WILDE; EAMES, 1952).

Os registros fósseis encontrados sugerem que Araucariaceae surgiu no Triássico Superior, difundindo-se e diversificando-se durante o Jurássico. Embora existam registros fósseis classificados como pertencentes a essa família no Paleozoico, esses se apresentam mal preservados, gerando dúvidas quanto sua classificação (STOKEY, 1982). Durante o Cretáceo Inferior, a família possuía uma presença significativa, no entanto tais registros decaem de forma acentuada no Cretáceo Superior (MILLER, 1977). Assim, a família se originou no Triássico Superior, chegou a um pico de diversidade durante o Jurássico, onde se expandiu por ambos os hemisférios, até o início do Cretáceo, no qual permaneceu como um importante componente da vegetação do Gondwana até o Cenozoico superior (Figura 3). A separação continental, associada a um clima mais seco e frio, reduziu progressivamente o aumento da variabilidade das coníferas. Entretanto, a atividade tectônica e vulcânica parcialmente associada com a colisão da Austrália com o sudeste da África, proporcionou para alguns componentes relacionados à família, novos habitats nas ilhas da Ásia-Pacífico (KERSHAW; WAGSTAFF, 2001).

Paleozoico		Mesozoico			Cenozoico
Pensilvaniano	Permiano	Triássico	Jurássico	Cretáceo	Paleógeno + Neógeno
				Cephalotaxaceae	
				Pinaceae	
		-----		Taxaceae	
		--		Taxodiaceae	
		-----		Cupressaceae	
		-----		Araucariaceae	
		-----		Podocarpaceae	

Figura 3 - Ocorrência dos maiores táxons de coníferas no tempo geológico (Adaptado de Stokey, 1977).

Atualmente, a família está amplamente distribuída no hemisfério sul, ocorrendo na América do Sul, Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné, Nova Caledônia e em outras ilhas do

Pacífico Sul. Os integrantes dessa família crescem em regiões tropicais e subtropicais, bem como em regiões temperadas. No entanto, a maior diversidade da família se encontra na Nova Caledônia, onde existe uma flora bastante rica e diversificada (SETOGUCHI *et al.*, 1998).

Araucariaceae é composta por três gêneros: *Araucaria* Juss., *Agathis* Salisbury e *Wollemia* Jones, Hill & Allen. Todas as espécies da família demonstram ter origem no hemisfério sul, todavia pode-se encontrar espécies do gênero *Agathis*, na Malásia, localizadas ao norte do Equador. Tal fenômeno é resultado de um evento de migração do Hemisfério Sul para o noroeste durante o Plio-Pleistoceno (FLORIN, 1963).

De acordo com Setoguchi *et al.* (1998), a monofilia do grupo foi comprovada por análises moleculares, envolvendo sequência *rbcL*. Dados morfológicos demonstram que *Araucaria* e *Agathis* possuem características diferentes com relação à folha e aos elementos dos estróbilos (brácteas, escamas seminíferas e tectrizes) e que *Wollemia* compartilha características morfológicas com ambos os gêneros. Dessa forma, esses autores sugerem que *Wollemia* foi o gênero que divergiu mais cedo na família, seguido de *Agathis* e, posteriormente, *Araucaria*. No entanto, Knapp *et al.* (2007) e Liu *et al.* (2009), utilizando diferentes marcadores moleculares, discordam de tais resultados sugerindo que *Agathis* e *Wollemia* são grupos irmãos e que *Araucaria* é uma linhagem basal da família.

A família Araucariaceae é composta por árvores de até 65 metros de comprimento e 6 metros de diâmetro, cujas espécies podem ser monóicas ou dióicas e são normalmente resinosas. Suas folhas são inteiras e simples, com formatos variados (aciculares, escamosas, lineares, oblongas ou elípticas), podendo, em alguns casos, coexistirem diferentes tipos de folhas no mesmo indivíduo. As folhas são persistentes e pontiagudas em algumas espécies de *Araucaria* e podem ser de filotaxia helicoidal ou oposta (JUDD, 2009). Os estróbilos androsporangiados possuem esporófilos com cinco a vinte androsporângios. Os grãos de pólen formados são desprovidos de sacos aéreos (GIFFORD; FOSTER, 1989). Nos estróbilos ginoporangiados, a escama seminífera se encontra fusionada com a escama tectriz, a qual porta um único rudimento seminal em seu interior (ANSELMINI, 2005).

Até 1995, o gênero era dividido em quatro seções: *Araucaria* (= *Columbea*), *Bunya*, *Eutacta* e *Intermedia* (WILDE; EAMES, 1952). Em 1995 foi incluída a seção *Yezonia* para agrupar os exemplares extintos (OHSAWA *et al.*, 1995).

Setoguchi *et al.*, (1998), baseado em caracteres morfológicos, propõe a divisão do gênero em dois clados: um deles constituído pela seção *Eutacta*; e o outro constituído pelas seções *Araucaria*, *Bunya* e *Intermedia*. De acordo com esse trabalho as características morfológicas que separam esses dois grupos são os números de cotilédones (quatro na seção *Eutacta* e dois nas demais seções), a posição do cone masculino (terminal em *Eutacta* e axilar em outras seções), orientação estomática ao longo do eixo da folha (geralmente oblíquo ou perpendicular em *Eutacta* e paralela nas outras seções) e estômatos (geralmente em duas faixas ou agrupados na seção *Eutacta* e em linhas descontínuas em outras seções).

As seções propostas por Setogushi *et al.* (1998) não foram consideradas por Farjon (2001). Entretanto, Stefenon, Gailing e Finkeldey (2006), utilizando marcadores moleculares polimórficos (AFLP), sugerem a existência de três seções inseridas em dois clados, um deles compreende as seções *Bunya* e *Araucaria* e outro a seção *Eutacta*. De acordo com Stokey (1982), as seções *Araucaria* e *Bunya* compartilham importantes características taxonômicas como folhas grandes e lisas, germinação hipógea, brotos carnudos e dois cotilédones que ficam retidos na casca da semente. As espécies da seção *Eutacta* apresentam folhas pequenas, germinação epígea, quatro cotilédones subsésseis que se tornam livres da semente na germinação e não possuem brotos carnudos (STOCKEY, 1982).

O gênero *Araucaria* possui uma distribuição fragmentada por todo o Hemisfério Sul, sendo encontrado no Chile, Argentina, sul do Brasil, Nova Caledônia, Ilhas Norfolk, Austrália e Nova Guiné. No entanto, tal gênero foi um dos principais componentes das florestas durante o Mesozóico e a distribuição atual das Araucárias poderia ser considerada como um relictos de tempos passados (KUNZMANN, 2007).

Apenas duas espécies do gênero possuem distribuição natural na América do Sul. A espécie *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch, conhecida também como Pinheiro Chileno, é originária do Sul do Chile e da Província Argentina de Neuquén (Marchiori, 1996). A espécie *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, conhecida como Pinheiro Brasileiro, é originária do Sul do Brasil (HUECK, 1972), e ocorre como núcleos esparsos sobre a Serra do Mar e província de *Misiones*; no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul se apresenta em áreas maiores e mais contínuas chegando à borda meridional do Planalto Sul-Brasileiro, até seu verdadeiro limite sul, os núcleos da Serra do Sudeste no Rio Grande do Sul (CARLUCCI *et al.*, 2011).

Os exemplares do gênero *Araucaria* são normalmente dióicos, apresentam ramos dispostos regularmente em verticilos e folhas geralmente coriáceas com filotaxia helicoidal. Os estróbilos androsporangeados são cilíndricos ou ovóides, e os estróbilos ginosporangeados possuem escamas férteis e estéreis (BARSALI, 1909).

1.3 *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE.

A espécie foi descrita pela primeira vez em 1819 por Bertolini com o nome de *Colymbea angustifolia*. *Araucaria angustifolia* é uma espécie dióica de porte arbóreo que apresenta cerca de 20-50 metros de altura, seu tronco é retilíneo e possui 90-180 cm de diâmetro (LORENZI, 1992). As ramificações se apresentam em pseudo-verticilos, sua copa é alta, estratificada e múltipla, tais características proporcionam o formato caliciforme em árvores maduras (CARVALHO, 1994). Com relação às folhas, essas são coriáceas, glabras e agudíssimo pungentes com 3-6 cm de comprimento (LORENZI, 1992).

As árvores androsporangeadas possuem estróbilos constituídos por cerca de 1000 androsporófilos, que estão dispostos em helicóide ao redor de um eixo central. Cada androsporófilo porta de 10-15 androsporângios, os quais desenvolvem em seu interior 500-1000 esporos, que formarão número correspondente de grãos de pólen (BURLINGAME, 1913). Os estróbilos ginosporangeados são formados por cerca de 1000 brácteas escamiformes em disposição helicoidal, as quais estão inseridas sobre um eixo central cônico. Tais brácteas se diferenciam em escamas seminíferas, que portam um rudimento seminal em seu interior, e escamas tectrizes, que são estéreis. Após a fecundação, as escamas seminíferas soldam suas bordas com a escama tectriz superior (REITZ *et al.*, 1979). De acordo com Burlingame (1914), apenas uma em cada vinte escamas são férteis.

O pinheiro ocorre naturalmente, formando agrupamentos densos, sobretudo na parte leste e central do planalto central brasileiro, nos estados do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina, e do Paraná. Ocorre também, como ilhas esparsas, no sul e nordeste do estado de São Paulo e, mais raramente, em algumas regiões de Minas Gerais e Rio de Janeiro, além de sua presença na Província de Misiones, na Argentina (HUECK, 1972).

O limite meridional da espécie é o estado do Rio Grande do Sul, onde o pinheiro é encontrado em toda região montanhosa no norte do estado. A presença mais setentrional está registrada no Vale do Rio doce em Minas Gerais. O limite leste de ocorrência da espécie é a Serra do Mar, e em nenhum dos três estados do sul esta se aproxima mais que 20 Km da

costa. A oeste *A. angustifolia* se limita à região da Província de Misiones na Argentina (MACHADO; SIQUEIRA, 1980). Assim, *A. angustifolia* se distribui no espaço geográfico, compreendido entre os extremos de latitude 19°15' Sul (MOURA, 1975) à 30° Sul (OLIVEIRA, 1948) e longitude de 41°20' à 50°, a oeste de Greenwich (MACHADO; SIQUEIRA, 1980).

De acordo com Backes (1988), o pinheiro alcança a latitude 20° Sul, ocupando sempre a parte superior do planalto meridional e os pontos mais altos da Serra da Mantiqueira, com altitudes que variam de 200m.s.n.m no extremo sul (31°) até mais de 1500m.s.n.m. na Serra da Mantiqueira (22°), observando-se uma relação inversa entre latitude e altitude.

A mata com araucária se encontra dentro de uma zona de clima mesotermal de clima tipo C, segundo a classificação de Köppen (1900). Segundo Machado e Siqueira (1980) o pinheiro pode ocorrer tanto no clima tipo Cfa (clima subtropical úmido sem estação seca e com verão quente) como no tipo Cfb (clima subtropical úmido sem estação seca e com verão fresco). Dessa forma, se observa a presença do pinheiro brasileiro em locais com médias mensais inferiores à 18°C durante o solstício de verão e inferior à 15°C durante o solstício de inverno. Médias superiores limitam a presença do mesmo.

Logo, a presença da floresta com araucária está limitada ao norte pelo clima tropical e ocorre somente onde são mantidas as condições mesotérmicas em decorrência do relevo. Com relação à zona costeira, o clima dominante até a latitude 28° Sul é o tropical. Essa condição de tropicalidade, somada à forte influência marítima da região, são fatores que impedem a ocorrência de Araucária na faixa litorânea.

De acordo com o Radam Brasil (1984), as formações florestais do planalto Sul-riograndense, que apresentam elevada densidade de indivíduos de *A. angustifolia*, recebem a denominação de Floresta Ombrófila Mista, conhecida também como floresta de araucária ou pinhal. Machado e Siqueira (1980) afirmam que tal mata é uma porção especial da Floresta Ombrófila a qual está intimamente relacionada com a latitude. Segundo Rambo (1956), o planalto riograndense apresenta três formações vegetais típicas: os pinhais (Floresta Ombrófila mista), a mata pluvial latifoliada (floresta Ombrófila) e o campo, sendo que as duas primeiras se diferenciariam, uma da outra, apenas pela presença de espécies de origem australantártica (temperadas) na primeira. O mesmo autor descreve que a floresta de Araucária se apresenta de

maneira bastante descontínua, pois forma mosaicos que intercalam áreas de mata com áreas de campo.

Rambo (1956) sugere que além do predomínio de *A. angustifolia* no estrato superior da mata, destacam-se outras espécies arbóreas de origem temperada, tais como *Podocarpus lambertii* (Podocarpaceae), *Drimys sp.* (Winteraceae), *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae); espécies arbustivas, como *Berberis laurina* (Berberidaceae); lianas, como *Fuchsia regia* (Onagraceae) e herbáceas como *Acaena eupatoria* (Rosaceae). No entanto, apesar da ocorrência de espécies de origem temperada, a composição florística predominante nos pinhais, consiste de espécies de origem tropical.

Com relação à composição da mata de araucária, um estudo feito na Floresta Nacional de São Francisco de Paula (NARVAES, 2005), demonstra que a família mais representativa é Myrtaceae, com 21 espécies, seguida de Solanaceae (11 espécies), Lauraceae (10 espécies), Asteraceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae e Rutaceae (5 espécies). Na mata de araucária situada no Município de Vale do Sol, as famílias com maior riqueza específica são Fabaceae e Myrtaceae, sendo as espécies mais importantes *Gymnanthes concolor* Spreng., *Euterpe edulis* Mart., *Sorocea bonplandii* (Baill.) Burger, Lanj. & Boer, *Pachystroma longifolium* (Nees) I.M. Johnst. e *Trichilia claussenii* C.DC. (JARENKOW; WAECHTER 2001).

Trabalhos feitos sobre a mata de Araucária indicam que dos três estados do sul do Brasil, restam cerca de 10% de florestas fortemente manejadas e apenas 1 a 2% das suas áreas originais (KOCH; CORRÊA, 2002). Essa intensa devastação teve início no final do século XIX, com a exploração desordenada do pinheiro devido à madeira de excelente qualidade (MACHADO; SIQUEIRA, 1980). Dessa forma, a maior parte das matas atuais são secundárias, havendo poucas áreas protegidas ambientalmente (MEDEIROS; SAVI; BRITO, 2005). Essa situação cria ambientes muito fragmentados, provocando alterações na dinâmica de sua regeneração e reprodução, além da redução da diversidade genética nas populações. Devido a esse quadro, a espécie está classificada como vulnerável com risco de extinção (Decreto Nº 42.099, 2002), exigindo emprego de tecnologias imediatas visando à sua recuperação.

Além da utilização da madeira, a Araucária apresenta importância econômica devido à comercialização de suas sementes comestíveis e também serve de matéria prima para a produção de diversos subprodutos derivados de sua resina que, quando destilada, pode

fornecer alcatrão, óleos diversos, terebintina e breu com diversas aplicações industriais (MATTOS, 1972; CARVALHO, 1994).

Com relação ao papel ecológico do pinheiro, na Floresta Ombrófila Mista, esse fornece alimento através de suas sementes, que possuem elevado valor energético para diversos mamíferos e aves da região como a ave *Cyanocorax caeruleus*, conhecida popularmente como gralha-azul, que utiliza os ramos da *A. angustifolia* para a construção de seus ninhos e, no inverno, tem como principal fonte nutricional o pinhão; o conhecido papagaio-de-peito-roxo, *Amazona vinacea*, que migra para a mata de Araucária na época de maturação dos pinhões; o mamífero *Sciurus ingrami*, conhecido como serelepe, que atua como importante dispersor das sementes do pinheiro brasileiro; o bugio, *Alouata fusca*, e outras diversas espécies. A Araucária é caracterizada também por criar um ambiente propício ao desenvolvimento de dezenas de espécies vegetais em seus caules e ramos plagiótropos, além de favorecer o desenvolvimento do estrato inferior da mata, pelo sombreado produzido por sua copa (KOCK; CORRÊA, 2002).

1.4 ESTUDOS EMBRIOLÓGICOS

Estudos sobre embriologia de gimnospermas são bastante escassos quando comparados aos trabalhos feitos em angiospermas. Tal fato pode ser explicado pelo longo ciclo reprodutivo dessas plantas e também pelas grandes dimensões que muitas delas alcançam. Assim, a maioria dos estudos existentes é baseada em espécies com importância econômica como espécies do gênero *Pinus* para produção de papel e celulose.

Ainda, além da carência de literatura sobre o tema, observa-se que os trabalhos existentes não possuem um padrão de nomenclatura, ocorrendo uma variação ampla no que diz respeito as terminologias utilizadas na androgametogênese em coníferas. Tais diferenças resultam de interpretações errôneas sobre homologias entre estruturas reprodutivas de gimnospermas (STERLING, 1962) tornando o tema cada vez mais confuso.

Singh (1978) fez a compilação de toda a obra referente à embriologia de gimnospermas existente até o ano de 1976. A primeira referência que se tem notícia é o trabalho de Mirbel e Spach (1843), onde demonstram a natureza do proembrião de *Pinus*. O estudo com proembriões em coníferas foi também um trabalho pioneiro, realizado por Brown no ano de 1844.

Hofmeister, em 1851 e 1862, descreve o desenvolvimento de rudimentos seminiais em coníferas e faz observações sobre outras estruturas como os gametófitos femininos múltiplos em *Taxus*, o tecido esponjoso no nucelo, o desenvolvimento dos estratos parietais dos androsporângios, o desenvolvimento e estrutura dos gametófitos femininos e o desenvolvimento de embriões.

Strasburger, em 1872, descreve o mecanismo de polinização, estrutura e desenvolvimento de tubos polínicos, fecundação e desenvolvimento do embrião em gimnospermas.

Nomes como Hirase (1895, 1898), Chamberlain (1919, 1935), Pohl (1928), Goebel (1933) e Schnarf (1933) foram também muito importantes para o desenvolvimento dos estudos embriológicos em gimnospermas, estando entre esses a descoberta de gametas móveis em *Ginkgo*, o estudo da embriologia em *Cycas*, a descoberta de um sulco germinal em grãos de pólen de certas gimnospermas e a compilações sobre a biologia reprodutiva em gimnospermas.

Com relação aos trabalhos feitos com *Araucaria*, é imprescindível citar a obra de Burlingame, intitulada “The morphology of *Araucaria brasiliensis*” (atualmente sinônimo de *A. angustifolia*) realizada entre 1913 e 1915, composta por três trabalhos consecutivos: “The staminate cone and male gametophyte”, “The ovulate cone and female gametophyte” e “Fertilization, the embryo and the seed”. Nesses trabalhos a autora descreve o ciclo reprodutivo de *A. angustifolia* com os conhecimentos existentes até essa data.

Alencar (1941) estuda a androsporangênese em *A. angustifolia* dando ênfase a compreensão da redução cromossômica.

Wilde e Eames (1952) publicam a obra “The Ovule and 'Seed' of *Araucaria bidwilli* with discussion of the taxonomy of the genus II. Taxonomy”

Hodcent (1963, 1965, 1968) analisa a formação dos grãos de pólen de *Araucaria araucana* e *Araucaria columnaris*, a partir das células-mãe de andrósporos, sua citologia e formação da parede do grão de pólen.

Shimoya (1958, 1962) analisa o desenvolvimento do cone ginosporangiado, sua estrutura e a formação do proembrião.

Haines (1980, 1983, 1983, 1984) desenvolve estudos sobre o mecanismo de polinização, o desenvolvimento do proembrião, o alongamento do suspensor, e o desenvolvimento do embrião e da semente no gênero *Araucaria*.

Owens *et al.* (1995) descrevem a biologia reprodutiva de *Aghatis australis*, dentre outros trabalhos, desenvolvidos com famílias próximas.

Fernando, Lazzaro e Owens (2005) analisam o crescimento e desenvolvimento de tubos polínicos em Coníferas e Fueyo, Caccavari e Dome (2008) desenvolve um estudo sobre a esporoderme de *Araucaria araucana* e *Araucaria angustifolia*.

Os estudos realizados até o momento auxiliam na compreensão dos mecanismos reprodutivos em gimnospermas, no entanto alguns aspectos sobre tal processo continuam sem esclarecimentos. Além disso, os trabalhos realizados por Burlingame (1913, 1914, 1915), Alencar (1941) e Shimoya (1958, 1962) carecem de técnicas mais aprimoradas para uma melhor qualidade da análise.

Assim, algumas questões ainda persistem: como se formam os andrósporos e quais são seus constituintes celulares nas diferentes fases de desenvolvimento?

Também pouca informação se tem sobre as características histológicas do tubo polínico durante sua fase trófica, antes da liberação dos gametas na micrópila. Como se organiza essa estrutura nesse nível de detalhamento morfológico? Em que fase do desenvolvimento os gametas são formados? Quais as modificações estruturais sofridas pelo rudimento seminal na época de polinização, germinação e formação dos gametas?

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem, como objetivo geral, analisar a androsporogênese, a androgametogênese e o padrão de desenvolvimento do tubo polínico associado ao desenvolvimento do ginófito em exemplares de *Araucaria angustifolia*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o processo inicial de formação dos androsporângios;
- Analisar o processo de formação dos andrósporos;
- caracterizar a estrutura histológica e histoquímica do andrósporo e do grão de pólen;
- analisar a estrutura histológica dos gametas;
- analisar a organização histológica e histoquímica do tubo polínico e de suas células constituintes.
- determinar as fases que se encontram os rudimentos seminais durante o evento de polinização e germinação.

3 JUSTIFICATIVA DO PROJETO

Trabalhos anteriores de reprodução em *Araucaria angustifolia* detalham características morfológicas e embriológicas ao longo de toda a biologia da espécie. No entanto, tais estudos se caracterizam por apresentar diversas lacunas em seus resultados, causadas por técnicas metodológicas defasadas, o que resulta perda de informações dos detalhes celulares. Ainda, particularmente, no caso dos trabalhos realizados por Burlingame, os espécimes estudados fora de seu habitat natural poderiam apresentar um desenvolvimento atípico. Assim, o presente trabalho busca esclarecer os questionamentos mencionados anteriormente e as lacunas do conhecimento do processo reprodutivo como um todo.

O detalhamento dos aspectos reprodutivos em *Araucaria angustifolia* tem implicações tanto ecológicas como econômicas. Além da madeira de ótima qualidade, utilizada pela indústria moveleira, sua resina gera diversos subprodutos, com diferentes aplicações industriais. As sementes comestíveis dessa espécie são tipicamente comercializadas para a alimentação humana, e sua coleta também deveria ser destinada à conservação de germoplasma. Por fim, estudos embriológicos fornecem dados morfoanatômicos importantes para futuros estudos de classificação do grupo e ainda o conhecimento dos aspectos reprodutivos de *A. angustifolia* pode auxiliar na compreensão do processo de regeneração de populações naturais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA, FIXAÇÃO E REGISTRO FOTOGRÁFICO DO MATERIAL BOTÂNICO

Os estróbilos de *Araucaria angustifolia* foram obtidos a partir de indivíduos situados em duas áreas distintas da Cidade de Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul, Brasil. Tais áreas correspondem à uma região dentro do Perímetro urbano e à uma região fora do Perímetro urbano.

Foi coletado o material de (7) indivíduos, sendo três (3) ginospórangios e quatro (4) androspórangios. As coletas foram realizadas semanalmente durante os meses de janeiro e fevereiro, diariamente entre os meses de agosto e início de setembro e bissemanal entre setembro e outubro durante os anos de 2010 e 2011, nos demais meses do ano a coleta foi realizada mensalmente.

A observação e obtenção dos estróbilos foram feitas com o auxílio de um podão de coleta e o uso de escada articulada de um veículo Magirus-Deutz, cedidos através da parceria com a Prefeitura de Nova Petrópolis, Secretaria da Agricultura e Meio Ambiente e Corpo de Bombeiros Voluntários Nova Petrópolis (Figura 4, Figura 5, Figura 6).



Figura 4 – Coleta do material botânico feita com o auxílio de um podão.



Figura 5 - Coleta e observação do material botânico feitas com o auxílio de escada articulada de um veículo Magirus-Deutz.



Figura 6 - Coleta e observação do material botânico feitas com o auxílio de escada articulada de um veículo Magirus-Deutz.

O material botânico foi fixado a campo em glutaraldeído 1% e formaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (McDOWELL; TRUMP, 1976) mantido em temperaturas inferiores à 25° C (Figura 7).

O registro fotográfico dos espécimes foi realizado com câmera fotográfica digital Nikon D200, com lente Sigma 150mm 1:2.8 APO MACRO DG HSM, durante as saídas a campo (Figura 8).

O material botânico testemunho desses exemplares foi depositado no herbário ICN da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob os números 171957 e 171958.



Figura 7 – Fixação do material botânico a campo.



Figura 8 – Registro fotográfico de espécimes coletados.

4.2 MICROSCOPIA FOTÔNICA

Em laboratório, o material foi lavado em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,2) (GABRIEL, 1982), desidratado em série etílica (10-100%) e incluído em resina hidroxietilmetacrilato (GERRITS; SMID, 1983).

Foram confeccionados cortes com 2-4 μm de espessura, utilizando micrótomo de rotação Zeiss, modelo Micron e de guias Leitz, modelo 1400. Esses cortes foram depositados sobre lâminas histológicas e afixados em placa aquecedora à 50° C.

Para visualização em microscopia fotônica, o material foi corado com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,4 (O'BRIEN; McCULLY, 1981).

Para a análise do estágio reprodutivo do material foi realizado a dissecação dos esporângios para observação das diferentes fases em lâminas com os grãos de pólen e uma gota de carmim acético 2% (GUERRA; SOUZA, 2002).

A detecção de compostos químicos nos tecidos foi feita a partir de diferentes testes histoquímicos (Tabela 1), os quais foram executados diretamente nos cortes histológicos ou

por meio de cortes à mão livre do material fixado. Especialmente para a confirmação do tipo de composto pécico, presente nos grãos de pólen, utilizou-se enzimas pectinase 20% e hemicelulases 2% (GUERRA; SOUZA, 2002) com a posterior reação com Azul de Astra 1% em solução aquosa (GERLACH, D. 1984), Azul de Alcão 8GX (LILLIE, 1965) e Vermelho de Rutênio (JOHANSEN, 1940).

Para a análise dos espessamentos das células do exotécio, os esporângios foram macerados pelo método de Jeffrey (SASS, 1951) por 1h e confeccionadas lâminas semi-permanentes com gelatina glicerinada (SASS, 1951) para análise em microscopia de luz polarizada.

As análises e as fotomicrografias do material histológico foram realizadas sob microscopia de luz de campo claro ou epifluorescência, utilizando um microscópio Leica DM R com câmera fotográfica digital Leica DFC 500, acoplada e programa de captura de imagens LAS Leica. Para a observação em epifluorescência, utilizou-se um filtro de excitação de BP340-380 nm e BP450-490nm.

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.), o material foi desidratado em acetona e, a seguir, submetido à secagem pelo método do ponto crítico (GERSTERBERGER; LEINS 1978), com o uso do equipamento BAL-TEC, CPD 030. Após, as amostras foram montadas em suportes de alumínio e recobertas com ouro durante 60s no aparelho metalizador BAL-TEC, SCD 050. As observações e o registro eletromicrográfico digital foram realizados em microscópio JEOL 6060, sob 10kV.

Para a análise da morfologia polínica foi realizada acetólise (ERDTMAN, 1960) e confeccionadas lâminas semipermanentes com gelatina glicerinada (SASS, 1951), sendo calculadas as médias aritméticas das medidas do eixo polar e do eixo distal a partir de uma amostra de 30 grãos de pólen.

Tabela 1 - Testes histoquímicos utilizados para detecção de compostos químicos e estruturas.

Componente químico e/ou Estrutura	Teste histoquímico
-----------------------------------	--------------------

Amido	IKI - Solução lugol (JOHANSEN, 1940)
Proteínas totais	Azul Brilhante de Comassie (SOUTHWORTH, 1973)
Lipídios	Sudan III (SASS, 1951)
Ácidos polissacarídicos e ácidos pécnicos	Vermelho de Rutênio (JOHANSEN, 1940)
Celulose*	Calcofluor White (HUGHES; McCULLY, 1975)
Calose*	Azul de anilina (MARTIN, 1959)
Substâncias fenólicas	Cloreto Férrico 10% (JOHANSEN, 1940)
Polissacarídeos totais	Ácido periódico-Reativo de Schiff - PAS (O'BRIEN; McCULLY, 1981)
Mucopolissacarídeos	Azul de Alciano 8GX (LILLIE, 1965)
Compostos lipídicos*	Auramina O 0,01% (NEPI; FRANCHI, 2000)
Identificação de núcleos*	DAPI (KUROIWA; SUZUKI, 1980)
Identificação da ectexina e endexina	Fucsina Básica (FAEGRI; IVERSEN, 1964)
Taninos	Vanilina/HCl 1% (GUERIN <i>et al.</i> , 1971)
Ligninas	Floroglucinol/ HCl (SASS, 1951)

* Compostos observados em epifluorescência

4.3 ANÁLISE TRIDIMENSIONAL

A análise tridimensional do pólen foi realizada através da digitalização de cortes seriados em formato TIFF, com espessura de 2 μ m, utilizando microscópio Leica DM R com câmera fotográfica digital Leica DFC 500 acoplada e programa de captura de imagens LAS Leica, alinhadas e importadas no programa Rhinoceros 4.0 com referência de escala. Essas imagens foram aplicadas em planos paralelos para delineamento dos contornos das estruturas (vetorização) e geradas as superfícies tridimensionais das mesmas.

5 RESULTADOS

5.1 OS ESTRÓBILOS ANDROSPORANGIADOS DE *Araucaria angustifolia*.

Os estróbilos androsporangeados de *Araucaria angustifolia* se desenvolvem nos ápices dos galhos, nos ramos mais jovens da árvore e, normalmente encontram-se aos pares e estão orientados verticalmente (Figura 9A-B). Essa estrutura é composta por um eixo central que porta centenas de androsporófilos que são organizados em helicóide ao longo do eixo (Figura 9C-D). Os androsporófilos se fixam ao eixo do estróbilo por um pedúnculo disposto na porção ventral da escama, nessa mesma face estão inseridos os androsporângios (Figura 9E-F). Cada androsporófilo possui cerca de doze a quatorze androsporângios organizados em duas fileiras paralelas (Figura 9G).

5.2 O DESENVOLVIMENTO DO ANDROSPORÂNGIO

5.2.1 Desenvolvimento Inicial

Os estróbilos androsporangeados de *A. angustifolia* iniciam seu desenvolvimento nos primeiros meses do ano, entre janeiro e fevereiro. A partir do mês de fevereiro, observa-se a presença dos estróbilos androsporangeados, projetados verticalmente nas extremidades dos galhos mais jovens das árvores.

Em um mesmo ramo, pode-se encontrar estróbilos em diferentes estádios de desenvolvimento e, por consequência, apresentando diversas dimensões, que variaram de 0,8 mm a 3,9 cm de comprimento.

Os estróbilos com comprimento entre 0,8 mm e 1,4 cm não apresentam nenhuma estrutura reprodutiva evidente. Estróbilos com comprimento entre 1,5 e 1,7 cm possuem esporângios em início de formação. A região dorsal do esporófilo apresenta um conjunto de células meristemáticas nas quais se evidenciam divisões anticlinais e periclinais na protoderme desse órgão. O citoplasma dessas células é denso e o núcleo ocupa praticamente quase todo o conteúdo celular (Figura 10A-B).

A partir de 1,9 cm de comprimento, os estróbilos já apresentam esporófilos com esporângios mais desenvolvidos. Observa-se ainda que os androsporófilos do ápice do estróbilo encontram-se menos desenvolvidos do que os da base. Nos esporófilos da região

apical do estróbilo evidencia-se o meristema fundamental e uma camada celular externa, a protoderme (Figura 10C).

Os esporófilos da região mediana do estróbilo apresentam esporângios mais desenvolvidos em relação ao ápice. O meristema fundamental encontra-se em intensa atividade mitótica, ocorrendo divisões celulares periclinais e anticlinal, que darão origem aos estratos parietais, externo e interno, ao tapete e às células esporogênicas (Figura 10D).

Nos esporófilos da base, os esporângios já apresentam células esporogênicas diferenciadas, as quais apresentam citoplasma denso e bastante corado pelo Azul de Toluidina O. Os estratos parietais apresentam um maior número de camadas e suas células com citoplasma vacuolado. Nessa mesma fase evidencia-se o início do processo de impregnação de compostos fenólicos nas células epidérmicas. Apesar dos esporângios apresentarem epiderme diferenciada, os estratos parietais não completaram sua diferenciação, sendo difícil distinguir as células tapetais (Figura 10E).

5.2.2 Desenvolvimento final

A partir de março os androsporângios de *A. angustifolia* apresentam todos os estratos parietais bem desenvolvidos e completamente diferenciados (Figura 11A).

O estróbilo androsporangiado maduro apresenta epiderme impregnada por compostos fenólicos, exceto na região de abertura (Figura 11B) e uma cutícula fina (Figura 11C). Tal camada não apresenta ligninas nem taninos.

Os androsporângios apresentam dois estratos parietais, um externo, composto por cerca de duas a cinco camadas celulares e, um interno, composto por cerca de três à quatro camadas. O número de camadas do estrato parietal externo está relacionado com a região do esporângio, já que esse possui formato quadrangular em seção transversal, ocorrendo maior número de camadas nos vértices. Algumas células desse estrato se encontram impregnadas por compostos fenólicos, e entremeando essas células também observa-se a presença de dutos resiníferos. O estrato parietal interno apresenta menor variação com relação ao número de camadas, já que envolve o lóculo do esporângio que se apresenta em forma circular em seção transversal.

Quanto à disposição celular, a epiderme e o estrato parietal externo estão orientados longitudinalmente no sentido do eixo maior do esporângio. De maneira contrária, o estrato

parietal interno está orientado no sentido transversal do órgão. Nas zonas de abertura, as células da epiderme e dos estratos parietais, externo e interno, apresentam menor diâmetro em seção transversal. As células epidérmicas da região de deiscência se mostram distintas das demais por não apresentar compostos fenólicos.

O tapete se diferencia entre o estrato parietal interno e as células esporogênicas e está constituído por uma a duas camadas celulares. As células são poliédricas possuem parede celular delgada de composição celulósica e mucopolissacarídica. No citoplasma, ocorrem diversos e pequenos vacúolos e o núcleo de posição central.

As células esporogênicas, localizadas no interior do esporângio, possuem formato poligonal e são notavelmente maiores que as células tapetais. A parede celular das células esporogênicas é composta por celulose e mucopolissacarídeos e são mais espessas que as células do tecido tapetal. O citoplasma dessas células é denso com grande quantidade de grãos de amido localizados ao redor do núcleo, que é grande, granuloso com dois nucléolos bem evidentes. A presença de grãos de amido ocorre desde o momento da diferenciação dos estratos parietais. Não foi observada a presença de calose nas células esporogênicas nessa etapa de desenvolvimento.

Os estróbilos androsporangiados de *A. angustifolia* não apresentam variações morfométricas e os androsporângios permanecem sem qualquer tipo de modificação até julho. A partir dessa época o esporângio começa a sofrer modificações relacionadas ao evento de polinização.

5.2.3 Deiscência

Em agosto, percebe-se a primeira transformação no androsporângio com o surgimento de espaços intercelulares no estrato parietal externo (Figura 11D).

Entre o final de agosto e setembro, ocorre o evento meiótico das células esporogênicas, que será descrito detalhadamente no próximo item. Nessa etapa do desenvolvimento, o estrato parietal interno começa a sofrer esmagamento pela expansão locular e as células tapetais se dividem, tornando-se binucleadas (Figura 11E).

Na terceira semana de setembro, inicia-se a formação dos espessamentos secundários da epiderme, fazendo com que esse tecido passe a se chamar de exotécio (Figura 11F). Esse espessamento segue um padrão em helicóide, com maior espessura de parede secundária na

sua face periclinal interna, voltada para o interior do esporângio (Figura 11G). O espessamento secundário é constituído por celulose (Figura 11H) e mucopolissacarídicos. Os espaços intercelulares do estrato parietal externo seguem se expandindo e ocorre uma maior compressão do estrato parietal interno. Nessa etapa de desenvolvimento, o tapete ainda é perceptível, porém de aspecto mais frouxo e no lóculo estão presentes andrósporos livres.

Na última semana de setembro, os espessamentos secundários do exotécio estão bem desenvolvidos. As células do estrato parietal externo estão comprimidas e não se observa mais espaços intercelulares nessa camada, pois estes foram reduzidos pela expansão locular. O estrato parietal interno também apresenta-se comprimido. As células do tapete demonstram sinais de degeneração e, no lóculo, a gametogênese está instalada, ocorrendo gametófitos constituídos de duas a quatro células (Figura 11I).

Na primeira semana de outubro, um mesmo estróbilo possui esporófilos em diferentes etapas de diferenciação. Os androsporângios, localizados nos androsporófilos da base do estróbilo, possuem exotécio com espessamento pronunciado (Figura 11J). O estrato parietal externo se encontra comprimido e o estrato parietal interno é composto apenas por fragmentos celulares. Devido à redução dessas camadas celulares a única camada existente na zona de abertura é a epidérmica que, nessa fase, está bastante fragilizada, tendendo a romper-se, expondo o lóculo. Nessa etapa de desenvolvimento as células do tapete não estão mais presentes e os grãos de pólen encontram-se com mais de vinte núcleos sem uma definição clara de compartimentalização interna. Os androsporângios, localizados nos androsporófilos do ápice do estróbilo, apresentam-se completamente secos e abertos (Figura 11K). O exotécio é a única camada celular restante do esporângio e não evidencia-se mais compostos fenólicos. A maioria dos grãos de pólen já foi liberada, restando apenas alguns desses dentro do lóculo.

Durante os eventos de esporogênese e gametogênese, os estróbilos androsporangiados de *A. angustifolia* aumentam progressivamente seu comprimento. A seguir pode-se observar os comprimentos dos estróbilos androsporangiados de *A. angustifolia* coletados em cada mês durante o ano de 2010 (Gráfico 1).

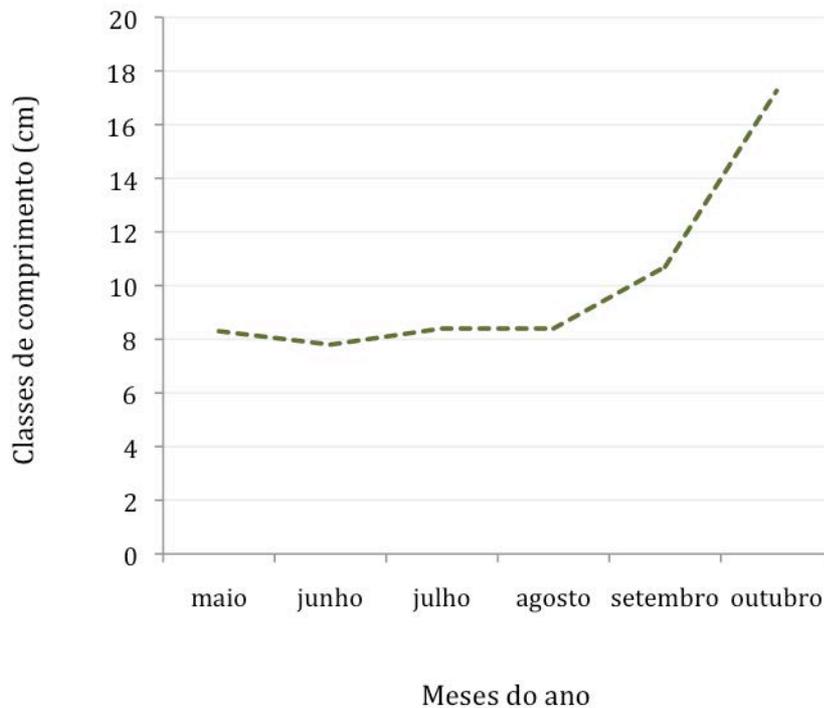


Gráfico 1 - Comprimentos dos estróbilos androsporangiados de *A. angustifolia* coletados ao longo dos meses do ano.

5.3 O DESENVOLVIMENTO DOS ANDRÓSPOROS

O evento meiótico nas células esporogênicas, em *A. angustifolia*, ocorre entre os meses de agosto e setembro. Em um mesmo estróbilo podem ser encontradas diferentes etapas da esporogênese, desde células-mãe, evidenciadas nos androsporângios dos androsporófilos da base do estróbilo até andrósporos livres, presentes no ápice do estróbilo. Assim, o sentido de maturação dos estróbilos androsporangiados ocorre do ápice para a base, portanto basípeta.

Em um mesmo esporângio ocorre mais de uma fase da redução cromossômica. Nos androsporófilos da base do estróbilo, o tecido esporogênico, em estágio de células-mãe de andrósporos, possui expressivo aumento de volume celular, tornando-se esféricas (Figura 12A). Estas células encontram-se em prófase I, sendo evidente sua condensação cromossômica (Figura 12B). No citoplasma, acumulam-se grãos de amido (Figura 12C), a

parede celular dessa célula é delgada, de composição celulósica (Figura 12D), polissacarídica (Figura 12E-F) e protéica (Figura 12G). Nessa fase, não ocorre calose nas células-mãe de andrósporos nem o grupo de pectinas identificadas por Vermelho de Rutênio.

As células do tapete também apresentam modificações expressivas quando comparadas à morfologia do mês anterior (julho - Figura 11D), como endomitose, surgimento de amido no seu citoplasma (Figura 12C) e vacúolos de maiores dimensões. A parede celular das células tapetais possuem composição celulósica e mucopolissacarídicas. A reação para o grupo de pectinas identificadas por Vermelho de Rutênio foi negativa.

Nos androsporófilos, próximo ao ápice do estróbilo, se observa a ocorrência do tecido esporogênico em anáfase I (Figura 13A), telófase I (Figura 13B) e metáfase I (Figura 13C). A telófase II pode ser observada por corte histológico (Figura 13D) e esmagamento manual demonstrando a presença de quatro andrósporos (Figura 13E). A parede calósica interna à parede celular da antiga célula-mãe de andrósporos se desenvolve durante a telófase I, e no citoplasma os grãos de amido se posicionam entre os dois novos núcleos.

Durante a telófase II cada novo núcleo é individualizados por paredes calósicas que se formam centripetamente (Figura 13F). Os núcleos formados são periféricos, equidistantes, possuem forma lenticular, e são circundados pelos grãos de amido presentes no citoplasma. Durante a meiose, as células do tapete se encontram binucleadas com núcleos interfásicos e seu citoplasma continua apresentando grãos de amido (Figura 13H). A meiose de *A. angustifolia* é caracterizada como simultânea por não apresentar citocinese até que ocorra a segunda fase da divisão.

As tétrades formadas são do tipo tetraédricas e isobilateral, sendo mais freqüente a primeira conformação descrita (Figura 14A-B). Essas, quando maduras, possuem paredes calósicas individualizando cada núcleo (Figura 14C) que, nessa etapa de desenvolvimento, são grandes, esféricos, de disposição central e com dois nucléolos bastante evidentes. O citoplasma é granuloso, não possui vacúolos, e os grãos de amido se distribuem ao redor dos núcleos (Figura 14D). Na fase de tétrade, surge a primexina, que possui constituição polissacarídica (Figura 14E-F) e protéica (Figura 14G).

O início da degeneração do tapete ocorre durante a fase de tétrade. Pequenas porções de protoplasma avançam para a interior da cavidade locular, embora os núcleos ainda se

encontrem em posição parietal com nucléolos evidentes (Figura 14A). A parede celular tapetal apresenta fraca reação para celulose, evidenciando sua degeneração (Figura 14H).

Próximo à fase de liberação dos andrósporos da tétrade ocorre a dissolução da calose de forma centrípeta (Figura 14I).

Logo após a liberação dos andrósporos da tétrade, esses ainda apresentam a conformação que apresentavam em tétrade, onde o polo proximal apresenta três faces planas e o polo distal convexo (Figura 15A-B). O núcleo é de posição central, possui nucléolo evidente e permanecem circundados por grãos de amido (Figura 15C).

Os andrósporos demonstram a ectexina desenvolvida, evidenciada pela reação com Fucsina Básica (Figura 15D) e são compostos por esporopolenina (Figura 15E), proteínas (Figura 15-F) e polissacarídios (Figura 15G-H). Em etapa posterior de desenvolvimento, os andrósporos apresentam ectexina, localizada externamente, e endexina, localizada internamente, esta última também é composta por esporopolenina (Figura 15I).

As células tapetais permanecem em sua posição original e binucleadas. Os dois núcleos se estabelecem no centro da célula, posicionados lado a lado, o citoplasma tem aspecto homogêneo, não apresenta mais vacúolos, mas ainda observa-se a ocorrência de grãos de amido, embora esses estejam em menor quantidade que nas fases anteriores. Nessa etapa, evidencia-se a presença de resíduos de parede celular celulósica nas células tapetais e orbículos de Ubisch próximo à parede periclinal interna das células do tapete (Figura 15I).

5.4 O DESENVOLVIMENTO DO ANDRÓFITO

O evento da gametogênese tem início no final de setembro e se desenvolve até o final do mês seguinte. Esse processo ocorre após uma breve pausa dos andrósporos que permanecem nesse estágio cerca de duas a três semanas. Durante esta fase os diversos estróbilos de um mesmo indivíduo se encontram em diferentes fases da gametogênese, apresentando maturação do ápice para a base.

A primeira mitose do andrósporos ocorre, perpendicularmente, ao eixo polar do andrófito, forma a célula central e a primeira célula protálica (Figura 16A). A célula protálica se estabelece no polo proximal junto à parede do gametófito e é delimitada por uma parede polissacarídica. A célula central possui um núcleo que ocupa posição central do gametófito. Nessa etapa do desenvolvimento já se pode observar uma espessa camada esporodérmica

interna, a intina. Dessa forma, quando ocorrem as primeiras divisões mitóticas no gametófito, esse já possui a esporoderme completamente desenvolvida.

A segunda divisão mitótica ocorre na célula central e também é perpendicular ao eixo polar do andrófito (Figura 16B) formando a célula anteridial inicial, que se estabelece próximo ao polo distal e a segunda célula protálica, que se posiciona entre a primeira célula protálica e a célula anteridial inicial.

A partir desse momento as células protálicas sofrem sucessivas divisões, paralelas, ao eixo polar do gametófito, como demonstrado nas figuras (Figura 16C-G). Simultaneamente, a célula anteridial inicial se divide, perpendicularmente, ao eixo polar, formando a célula do tubo que se posiciona próximo ao polo distal, possui um núcleo volumoso e esférico, e a célula anteridial, que se estabelece acima das células protálicas e é menor que a célula do tubo (Figura 16E-F).

As células protálicas seguem realizando divisões e formam um grande concentrado celular no polo proximal do andrófito, tais células apresentam um núcleo denso e coram intensamente com Azul de Toluidina O (Figura 16G).

Em seguimento, a célula anteridial se divide, paralelamente, ao eixo polar do andrófito, formando a célula generativa e a célula estéril. A célula generativa dispõe-se entre a célula do tubo e as demais células protálicas, e a célula estéril se posiciona ao seu lado. A célula generativa possui aspecto bastante característico por apresentar parede polissacarídica, evidenciada pela reação com PAS, e os demais núcleos encontram-se livres no grão de pólen (Figura 16H).

As paredes, que individualizam as células protálicas durante a gametogênese, possuem composição calósica, são efêmeras e isolam as células vegetativas das células generativas. Assim se observa o surgimento de tais paredes, acompanhando o progressivo aumento das células protálicas (Figura 17A-E). No pólen maduro, ocorre a dissolução das paredes calósicas, estando presente apenas a parede polissacarídica na célula generativa. A disposição dos núcleos evidenciada pela reação com DAPI não permite identificar uma polarização no gametófito (Figura 18A). No entanto, pela reconstrução tridimensional percebe-se que embora não ocorra mais a presença de paredes individualizando cada célula protálica, o andrófito apresenta polarização interna. O núcleo do tubo posicionado junto ao polo distal, a célula generativa de posição central, muitas vezes rodeada por núcleos protálicos que se localizam

na região proximal do pólen. Ainda percebe-se que a "célula estéril" (núcleo) ocorre sempre próxima à célula generativa (Figura 18B-C). Nessa etapa de desenvolvimento, o grão de pólen já está pronto para ser liberado.

5.5 O PÓLEN MADURO

O grão de pólen de *A. angustifolia* não possui sacos aéreos nem aberturas e é suboblato (subesferoidal), apresentando dimensões de 50 à 77 μ m ($x=66\mu$ m) no eixo polar por 62 à 87 μ m ($x=74,8$) no eixo equatorial. A ectexina apresenta superfície escabrada e possui cerca de 1 μ m de espessura. A endexina é biestratificada e possui 0,5 μ m de espessura, e a intina apresenta cerca de 3 μ m de espessura, sendo composta por diversas lamelas. Apesar dessas camadas possuírem espessura homogênea no polo distal e proximal, a ectexina apresenta um descolamento anelar da endexina na região subequatorial (Figura 19A).

A ectexina e a endexina são compostas por esporopolenina (Figura 19B), no entanto, tais camadas apresentam uma resposta distinta ao mesmo corante, devido à diferenças estruturais, a ectexina é alveolar e a endexina é homogênea. Essas camadas ainda podem ser vistas pela coloração positiva com Fucsina Básica (Figura 19C). No grão de pólen de *A. angustifolia*, também se observa a ocorrência de proteínas na ectexina e na endexina (Figura 19D). A intina é composta por celulose (Figura 19E), pectinas (Figura 19F) e polissacarídeos totais (Figura 19G). A reação para o grupo de pectinas identificadas por Vermelho de Rutênio foi negativa.

A combinação de colorações realizadas no pólen maduro (Fucsina Básica e Azul de Astra) permite distinguir a estratificação da parede do grão de pólen (Figura 19H). A camada mais externa, ectexina, é corada apenas por Fucsina Básica; a camada interna, a endexina, biestratificada é corada na sua porção externa apenas por Fucsina Básica e em sua porção interna por ambas colorações. Essa estratificação da endexina permite a distinção de duas camadas denominadas endexina I e endexina II, respectivamente. A intina, por seu caráter polissacarídico apresenta reação positiva apenas ao Azul de Astra.

5.6 O PÓLEN NO ESTRÓBILO GINOSPORANGIADO E O GINÓFITO

A polinização em *A. angustifolia* ocorre entre outubro e novembro, momento em que os grãos de pólen são levados pelo vento até os estróbilos ginospórangidos. Chegando nas

escamas dos estróbilos dessas árvores, o pólen não germina diretamente, levando algum tempo para tal processo se realizar.

No final de novembro, os tubos polínicos germinam sob as escamas em direção a micrópila dos rudimentos seminiais (Figura 20A), esses são unitegumentados, apresentam nucelo protuberante e, nesse período, encontra-se no início da gametogênese, em fase de núcleos livres (Figura 20B). Na região micropilar do nucelo, as células epidérmicas possuem formato alongado para recepção dos tubos polínicos (Figura 20B), sendo evidente a presença de grãos de amido na região micropilar e nas células ao redor do ginófito em formação (Figura 20C).

Na segunda semana de dezembro, os tubos polínicos crescem através da região micropilar (Figura 20D) apresentando inúmeras ramificações e, no eixo principal, ou seja, naquela ramificação que está mais profundamente inserida no nucelo, percebe-se uma grande quantidade de núcleos, evidenciando a presença da maioria dos componentes celulares e nucleares que ocorriam no pólen maduro. Nesse período, os rudimentos seminiais apresentam um aumento de volume significativo com relação ao mês anterior. O ginófito exibe um maior número de núcleos cenocíticos e a célula que os contém também demonstra expansão (Figura 20E). O gradiente progressivo de amido no nucelo se dá no mesmo sentido da penetração do tubo polínico (Figura 20F).

O ginófito e o andrófito permanecem sem modificações significativas entre fevereiro e início de junho, momento em que o ginófito inicia sua celularização (Figura 20G) e que as células nucelares apresentam-se com grande quantidade de grãos de amido (Figura 20H).

Os tubos polínicos encontram-se muito próximo ao ginófito, sendo evidente a célula do tubo, célula generativa e células protálicas. O núcleo do tubo apresenta um formato mais alongado, enquanto a célula generativa possui dimensões nitidamente maiores que os demais núcleos protálicos (Figura 20I). A partir de testes histoquímicos foi evidenciada a composição celulósica e polissacarídica das paredes do andrófito (Figura 20J-L). As paredes do tubo polínico não apresentam reação positiva para calose nem para o grupo de pectinas que reagem com Vermelho de Rutênio.

Na segunda semana de setembro, os tubos polínicos encontram-se muito próximos ao ginófito que, nessa etapa, possuem arquegônios maduros (Figura 21A). As células nucelares adjacentes ao ginófito possuem grande quantidade de grãos de amido (Figura 21B) e cada

ginófito possui cerca de doze arquegônios dispostos na região micropilar de forma circular. Os arquegônios maduros apresentam um epitélio que reveste todos os seus componentes (“jacket cells”). Na porção micropilar dos arquegônios, se estabelecem as células do pescoço, organizadas de maneira radial e em número de dez células. O núcleo da oosfera se posiciona logo abaixo das células do pescoço (Figura 21C). Para alcançar a oosfera, o tubo polínico penetra no arquegônio por entre as células do pescoço, que apresentam uma grande quantidade de grãos de amido em seu citoplasma (Figura 21D). Normalmente, os arquegônios são isolados, porém, em alguns casos, dois arquegônios compartilham a mesma camada epitelial (Figura 21D).

Na terceira semana de outubro, ocorre a descarga do tubo polínico nos arquegônios como evidenciado na sequência de figuras (Figura 21E-I). Os gametas possuem iguais dimensões, 12 μm , e possuem núcleos muito condensados. Esses foram apenas visualizados após a descarga do tubo, no interior do arquegônio. Entretanto, no momento da descarga do tubo polínico na célula oosférica, o núcleo dessa não é evidente, observando-se apenas uma região citoplasmática densa e muito vacuolada na região calazal.

Dessa forma, no primeiro ano, grande parte dos eventos ocorrem nas árvores androsporangeadas, incluindo a formação dos estróbilos e seus esporângios e o desenvolvimento dos esporos e grãos de pólen. Após a polinização, as etapas subsequentes se dão nas árvores ginosporangeadas, também, no primeiro ano do ciclo, ocorre a germinação do tubo polínico. No segundo ano, após a espera de vários meses até o desenvolvimento do ginófito e seus arquegônios, ocorre a formação dos gametas no andrófito e se inicia o processo da fecundação. Os períodos de ocorrência de cada evento estão resumidos na tabela 2:

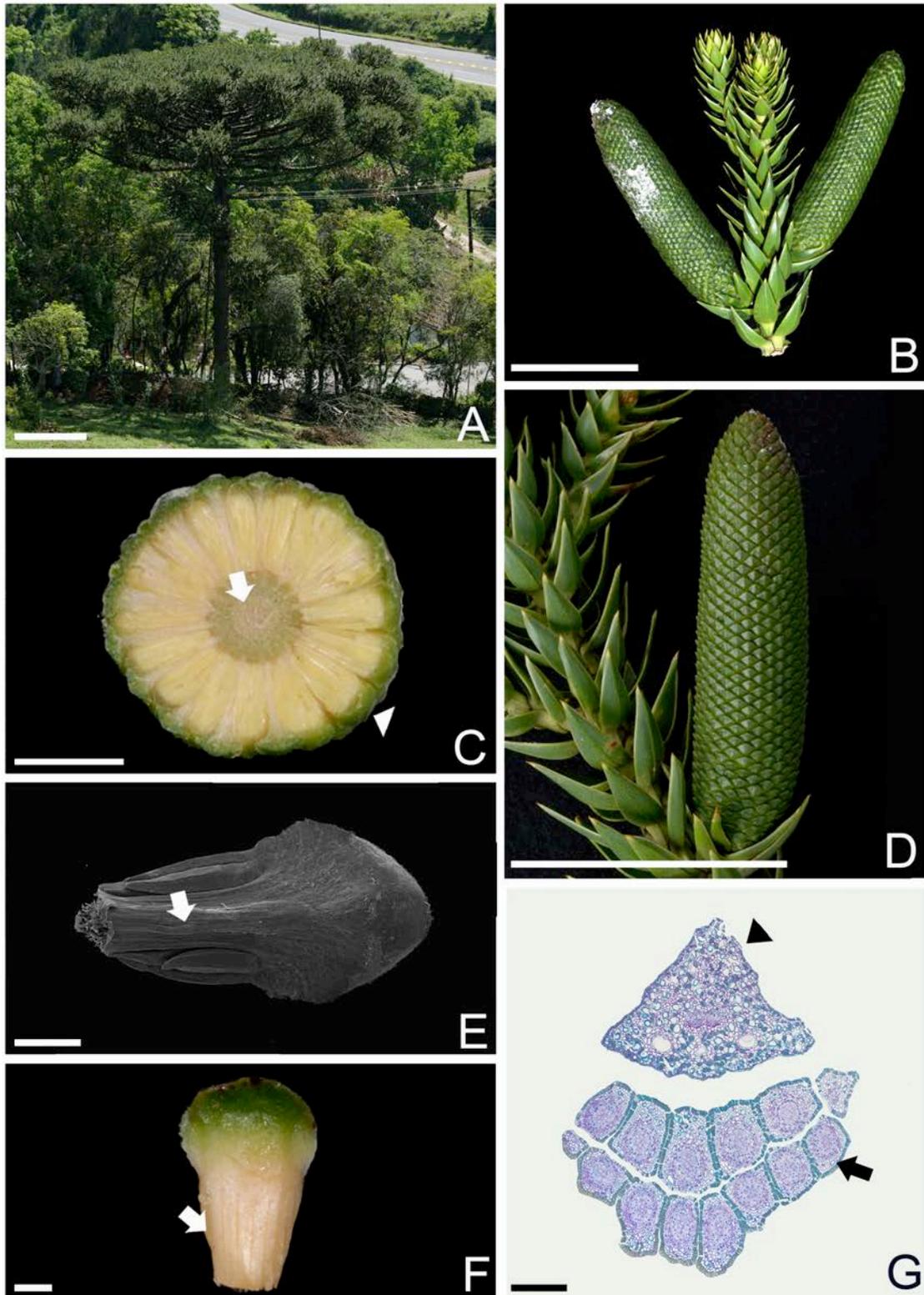


Figura 9 – Aspecto geral de *Araucaria angustifolia* e estróbilos androsporangiados. A. Aspecto do indivíduo. B. Estróbilos androsporangiados. C. Estróbilos. Eixo do cone (seta) e esporófilo (cabeça de seta). D. Esporófilos dispostos de forma helicoidal ao longo do eixo. E. Porção ventral do esporófilo. Pedúnculo (seta). F. Porção dorsal do esporófilo. Androspórângios (seta). G. Corte em microscopia óptica do esporófilo. Androspórângios (seta) e pedúnculo (cabeça de seta). C e G: Seção transversal. E: Microscopia eletrônica de varredura. G: Microscopia de campo claro. Escalas: A 3,5m; B e D 5cm, C 1cm, E-G 1mm.

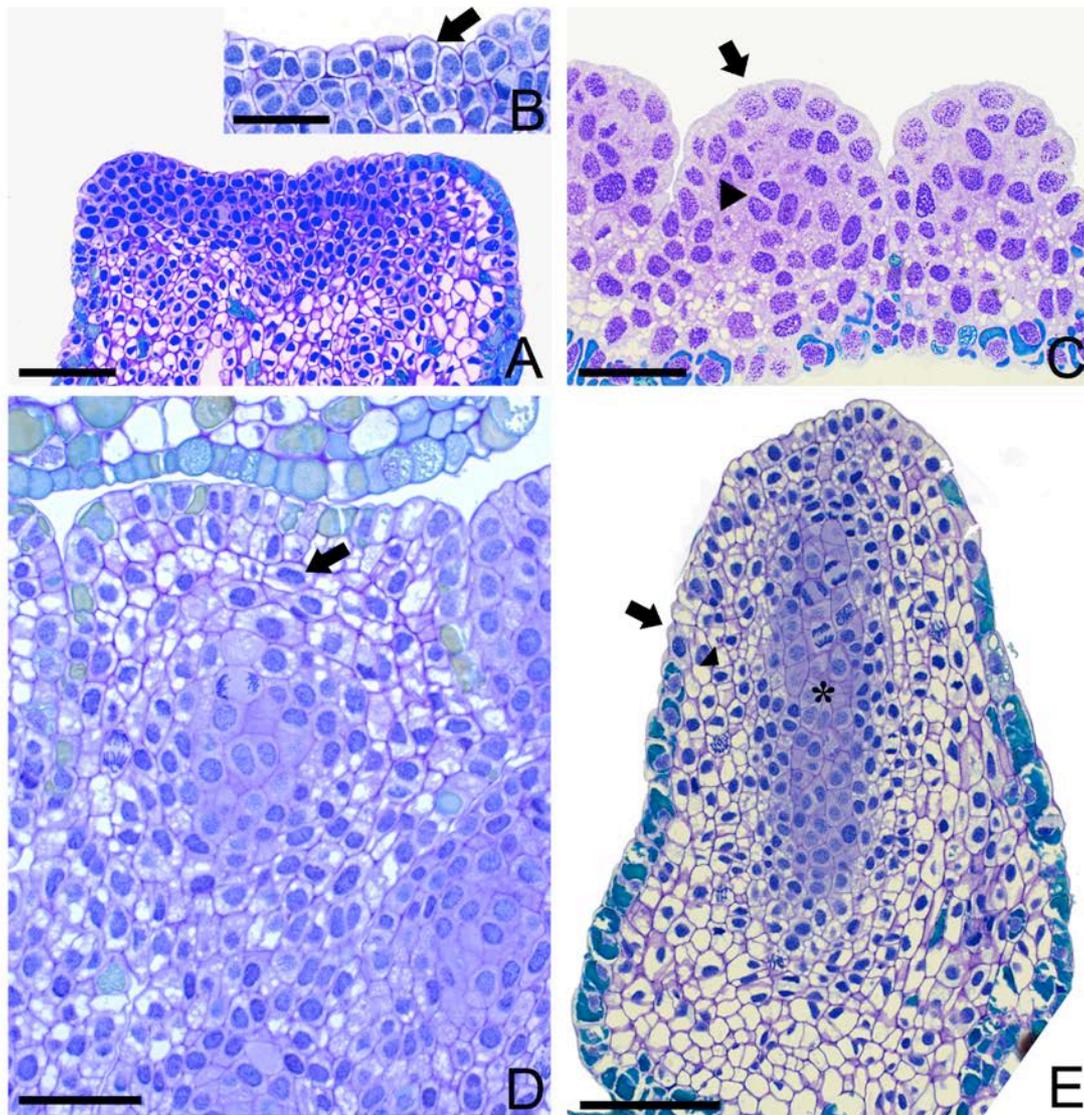


Figura 10 - Seções longitudinais de meristemas reprodutivos. A. Conjunto de células meristemáticas. B. Maior aumento da figura A mostrando divisões periclinais e anticlinais na camada superficial (seta). C. Protoderme (seta) e meristema fundamental (cabeça de seta). D. Formação dos esporângios. Meristema fundamental em divisões periclinais e anticlinais (seta). E. Formação dos esporângios. Epiderme diferenciada (seta), estratos parietais (cabeça de seta) e células esporogênicas (*). A-E: Microscopia de campo claro. Escalas: A e E 100 μ m; B e D 50 μ m.

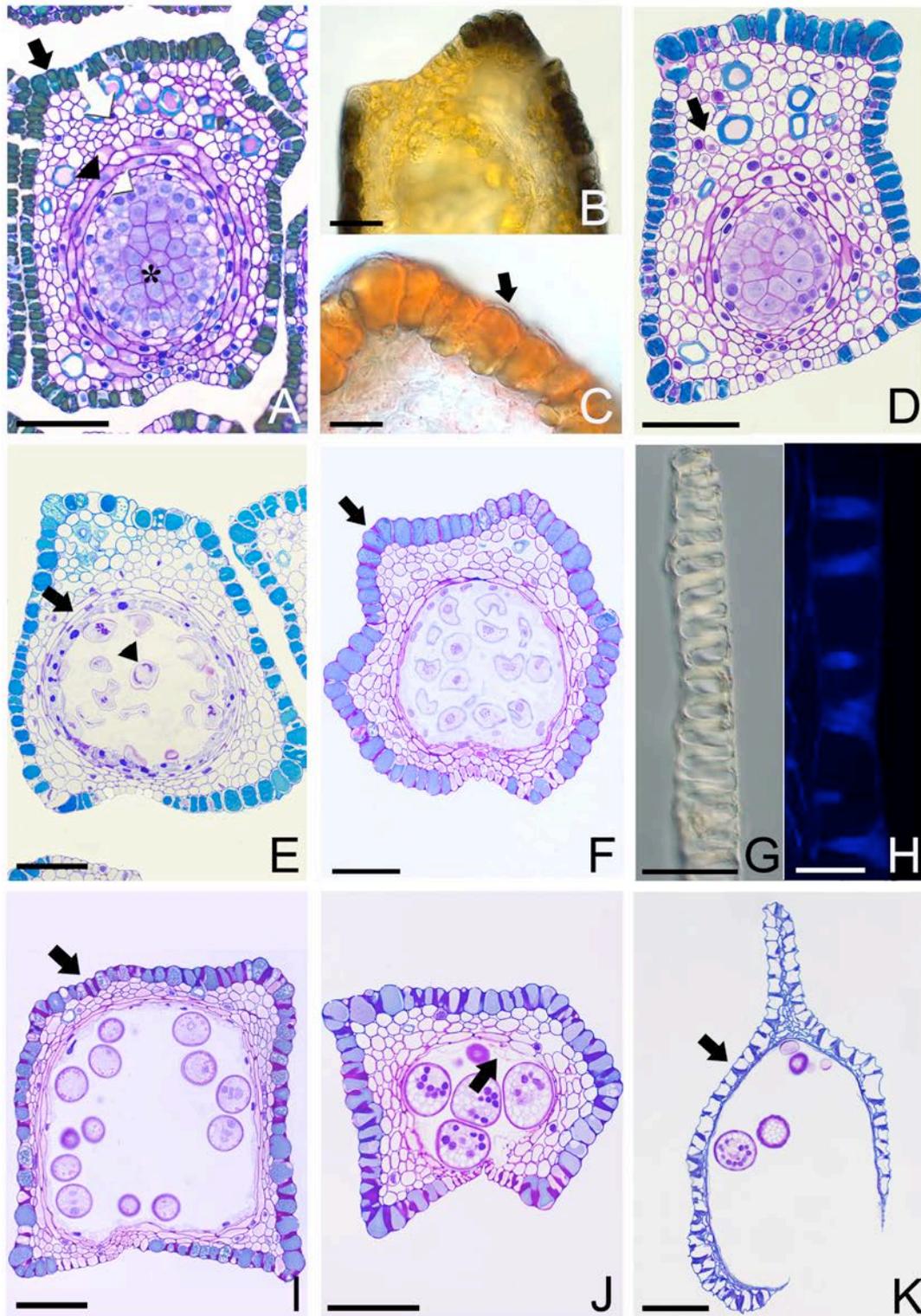


Figura 11 – Diferentes estádios do desenvolvimento dos androsporângios. A. Esporângio diferenciado. Epiderme (seta preta), estrato parietal externo (seta branca), estrato parietal interno (cabeça de seta preta), tapete (cabeça de seta branca), células esporogênicas (*). B. Epiderme com compostos fenólicos evidenciados pela reação com Cloreto Férrico. C. Cutícula (seta) corada com Sudan III. D. Surgimento de espaços intercelulares no estrato parietal externo (seta). E. Compressão do estrato parietal interno (seta) e meiose nas células esporogênicas (cabeça de seta). F, G, H e I. Espessamento secundário da epiderme. F. Em coloração convencional com azul de toluidina O (seta), G. em material dissociado, H. em Calcofluor White e em I. exotécio diferenciado (seta). J. Estrato parietal externo comprimido e o estrato parietal interno fragmentado (seta). K. Esporângio na deiscência. Exotécio (seta). A-F e I-J: Seção transversal. A- F e I-L: Microscopia de campo claro. G: Contraste interferencial diferencial. H: Seção longitudinal em microscopia de epifluorescência. Escalas: A, D-F 100µm; B, G e H 50µm; C 20µm.

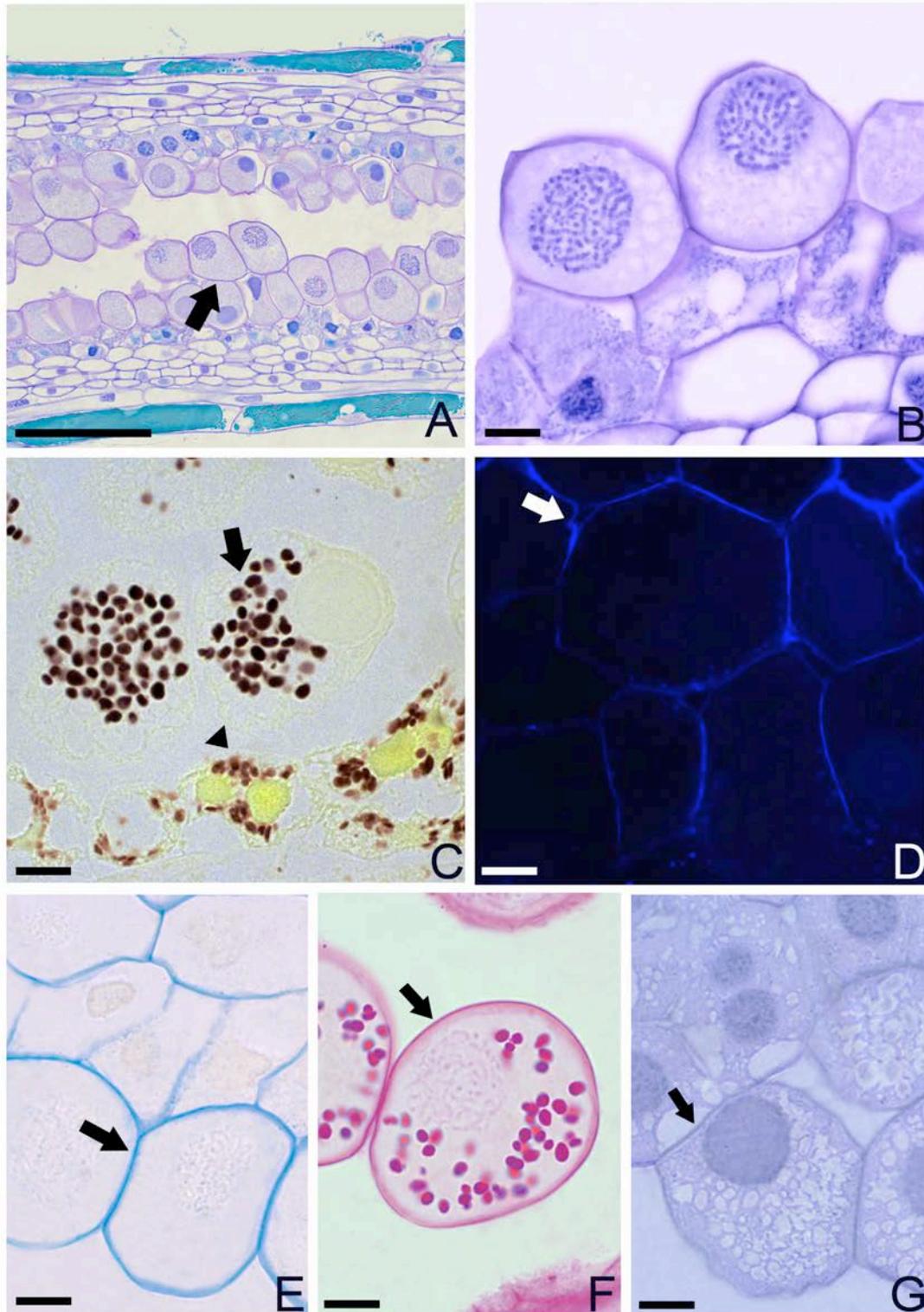


Figura 12 – Esporângio em estágio inicial da meiose. A. Aspecto geral do esporângio com células-mãe de andrósporos (seta). B. Células-mãe de andrósporos em Prófase I. C. Detecção de amido em células-mãe de andrósporos (seta) e células do tapete (cabeça de seta) com solução Lugol. D. Detecção de celulose nas paredes das células-mãe de andrósporos (seta) com Calcofluor White. E. Detecção de mucopolissacarídeos nas paredes das células-mãe de andrósporos (seta) com Azul de Alcian. F. Detecção de polissacarídeos totais nas paredes das células-mãe de andrósporos (seta) pela reação de PAS. G. Detecção de proteínas nas paredes das células-mãe de andrósporos (seta) através da reação com Azul Brilhante de Comassie. A: Seção longitudinal. B-G: Seção transversal ao esporângio. A-C e E-F: Microscopia de campo claro. D: Microscopia de epifluorescência. Escalas: A 50 μ m; B-G 20 μ m.

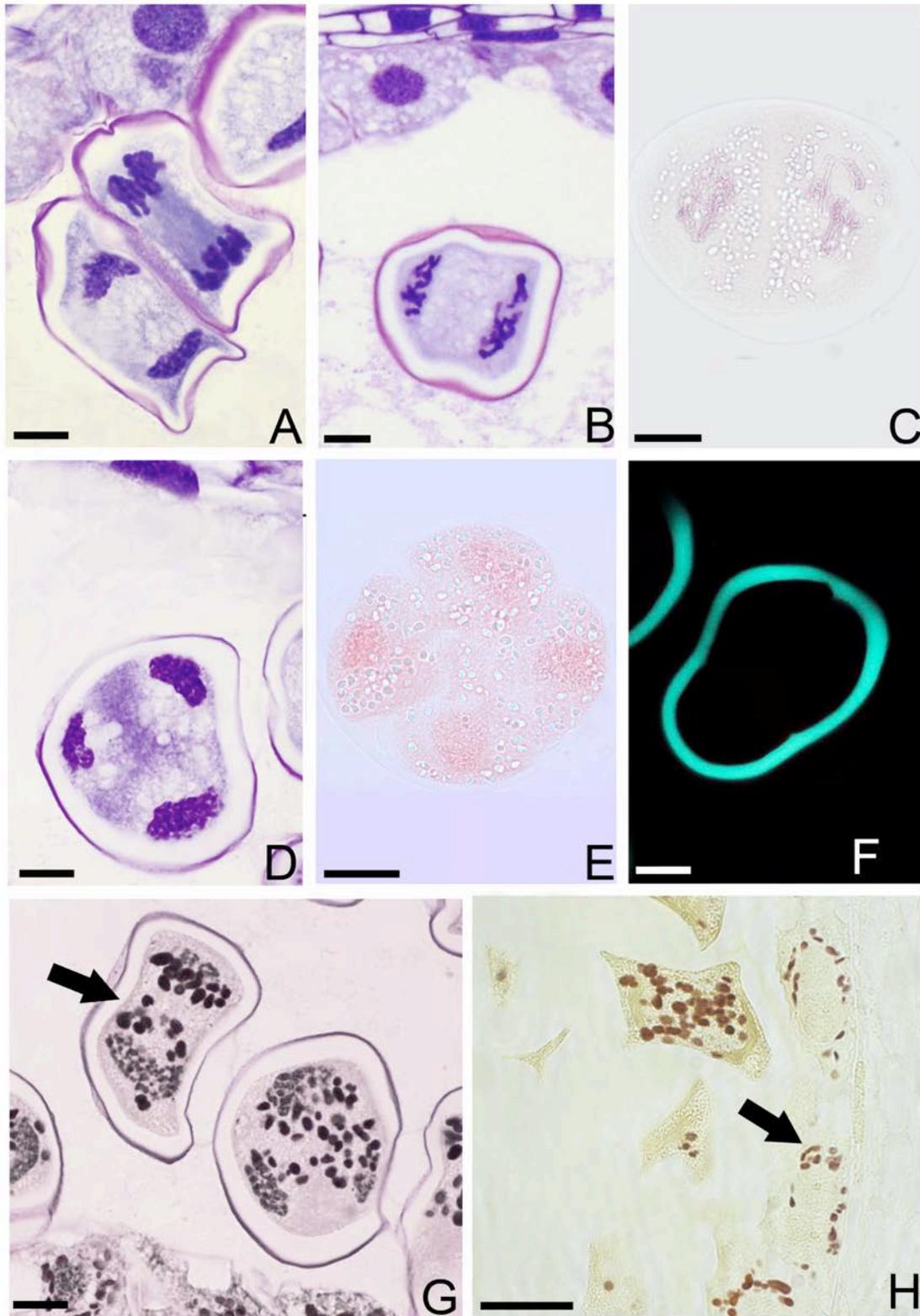


Figura 13 – Células-mãe de andrósporos em diferentes fases da meiose. A. Anáfase I. B. Telófase I. C. Metáfase II em Carmim acético. D. Telófase II. E. Telófase II em Carmim acético mostrando a presença de quatro andrósporos. F. Detecção de paredes calósicas na telófase II com Azul de Anilina. G. Grãos de amido (seta) durante a meiose, com Azul de Toluidina O e solução Lugol. H. Grãos de amido (seta) nas células do tapete durante a meiose do tecido esporogênico com solução Lugol. A, B, D, F, G e H: Seção transversal ao esporângio. C e E: Esmagamento. A-E e G-H: Microscopia de campo claro. F: Microscopia de epifluorescência. Escalas: A-H 20 μ m.

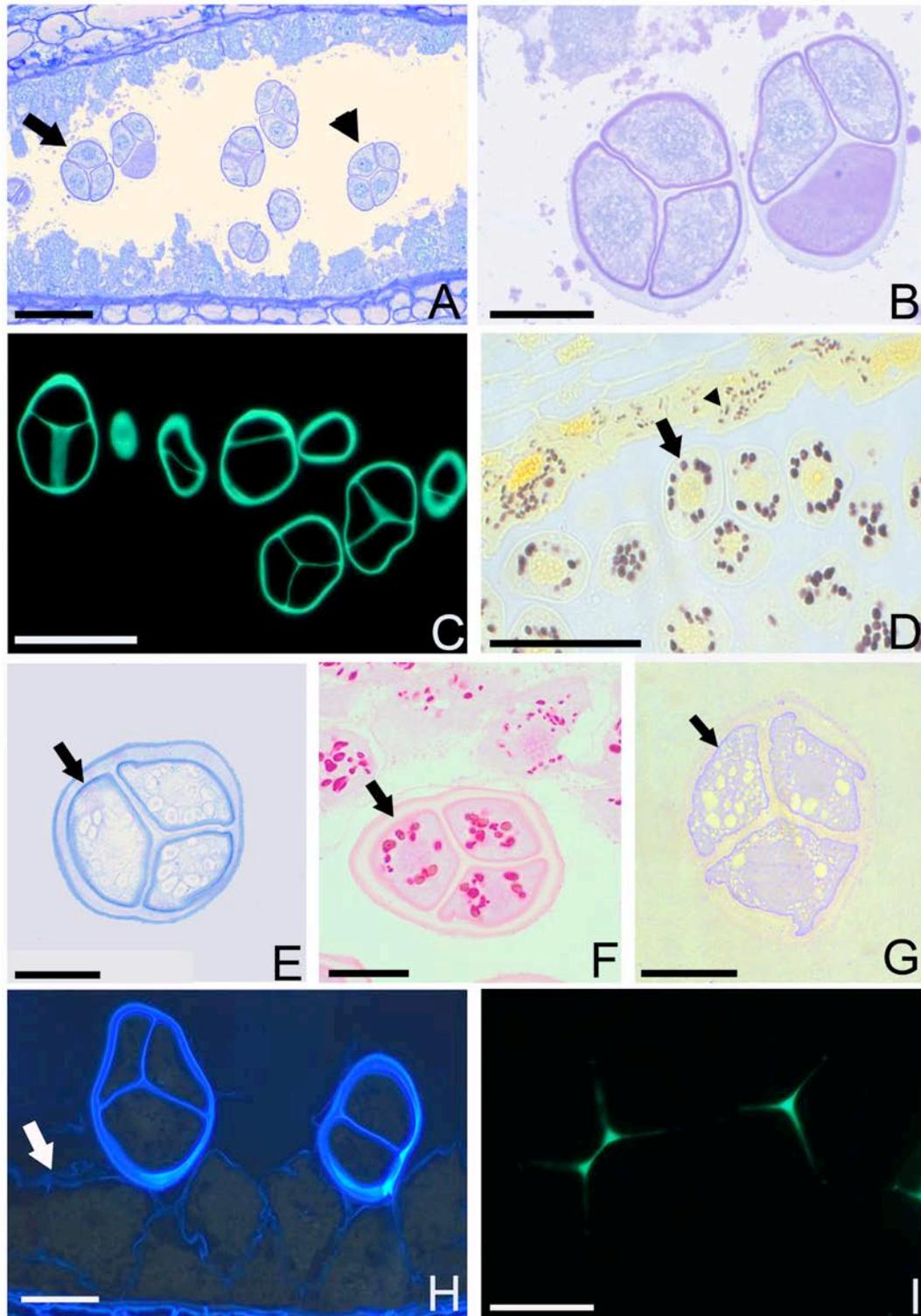


Figura 14 – Esporângio em estágio de tetrade. A. Arranjo tetraédrico (seta) e isobilateral (cabeça de seta) das tetrades. B. Maior aumento das tetrades em arranjo tetraédrico. C. Detecção de calose nas paredes da tetrade com Azul de Anilina. D. Detecção de grãos de amido na tetrade (seta) e células do tapete (cabeça de seta) com solução Lugol. E. Detecção de mucopolissacarídeos nas paredes celulares da tetrade (seta) através da reação de Azul de Alciano. F. Detecção de polissacarídeos totais nas paredes da tetrade (seta) pela reação de PAS. G. Detecção de proteínas nas paredes da tetrade (seta) com Azul Brillhante de Comassie. H. Detecção de celulose nas paredes das células do tapete (seta) com Calcofluor White. I. Detecção da dissolução da parede calósica da tetrade com Azul de Anilina. A-I: Seção transversal ao esporângio. A e B, e D-G: Microscopia de campo claro. C, H e I: Microscopia de epifluorescência. Escalas: A e C 50 μ m; B, D-I 20 μ m.

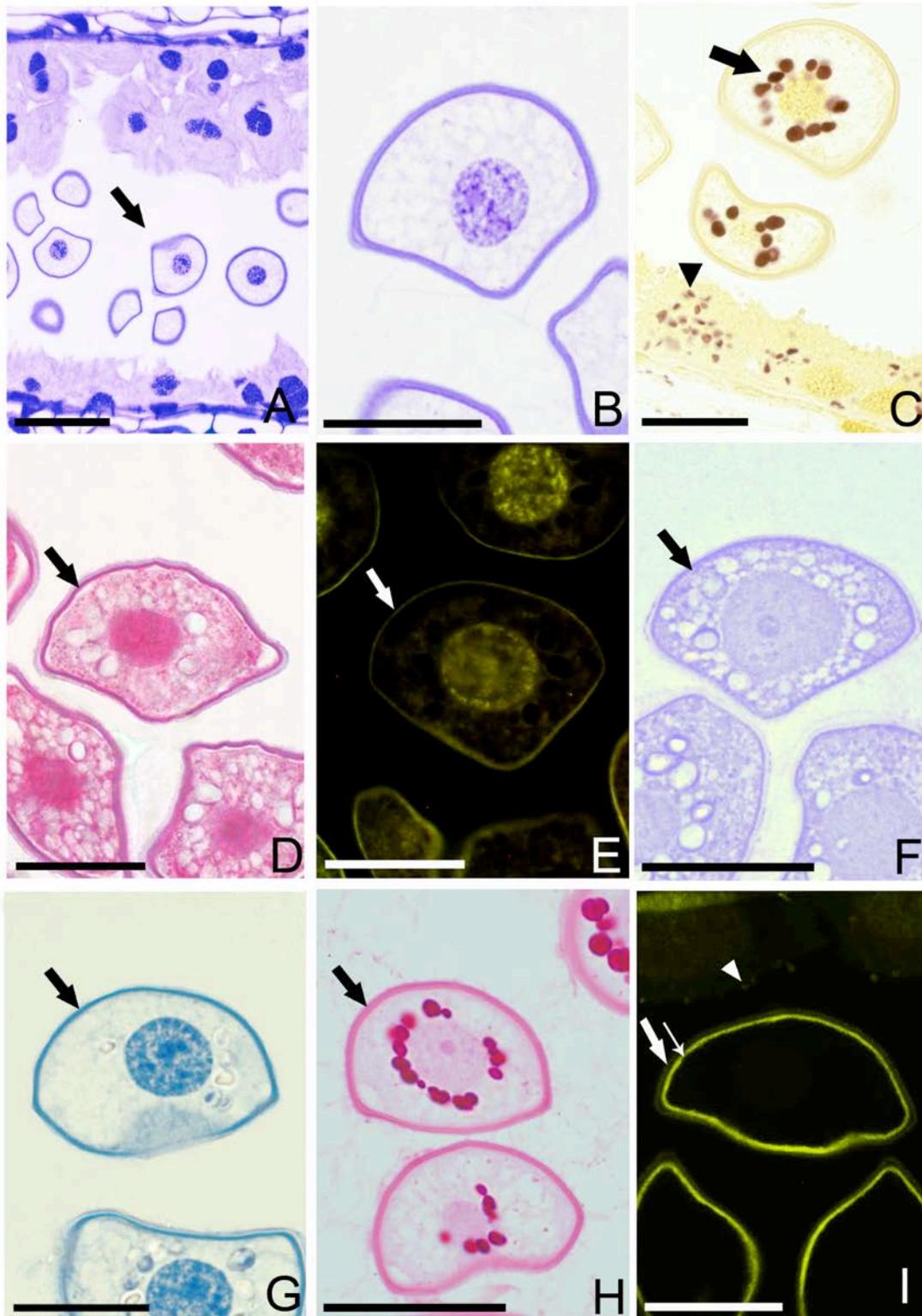


Figura 15 – Esporângio em estágio de andrósporo. A. Aspecto geral do esporângio com andrósporos livres (seta). B. Maior aumento da figura A mostrando detalhes do andrósporo. C. Detecção de grãos de amido no citoplasma dos andrósporos (seta) e das células do tapete (cabeça de seta) com solução de Lugol. D e E. Detecção da ectexina (seta) com Fucsina Básica e com Auramina O respectivamente. F. Detecção de proteínas na ectexina (seta) pela reação de Azul Brillante de Comassie. G. Detecção de mucopolissacarídeos na primexina (seta) com Azul de Alciano. H. Detecção de polissacarídeos totais na primexina (seta) pela reação de PAS. I. Detecção da ectexina (seta grossa) e da endexina (seta fina), e de corpúsculos de Ubsich (cabeça de seta) com Auramina O. A: Seção longitudinal. B-I: Seção transversal ao esporângio. A-D e F-H: Microscopia de campo claro. E e I: Microscopia de epifluorescência. Escalas: A 50µm, B-I 20µm.

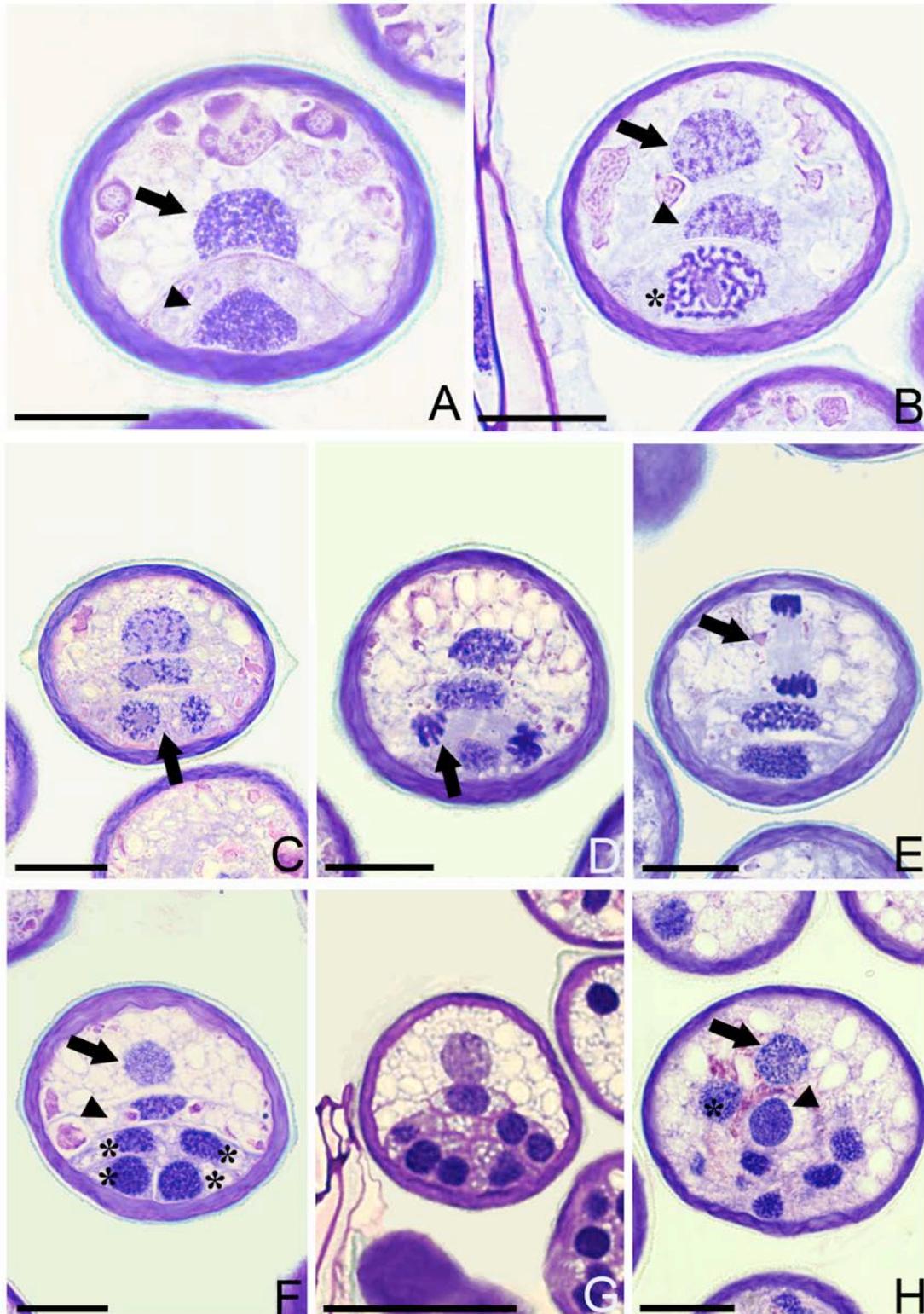


Figura 16 – Diferentes estádios androgametogênese. A. Fase bicelular. Célula central (seta) e primeira célula protálica primária (cabeça de seta). B. Fase tricelular. Célula anteridial inicial (seta), primeira célula protálica primária (cabeça de seta) e segunda célula protálica primária mostrando maior grau de compactação da cromatina (*). C e D. Diferentes fases da mitose das células protálicas (seta). E. Célula anteridial inicial (seta) em anáfase. F. Fase multicelular. Célula do tubo (seta), célula anteridial (cabeça de seta) e células protálicas (*). G: Fase multicelular com grande quantidade de células protálicas. H. Fase cenocítica. Célula do tubo (seta), célula generativa (cabeça de seta) e célula estéril - núcleo (*). A-H: Seção transversal ao esporângio. A-H: Microscopia de campo claro. Escalas: A-F, H 20 μ m; G 40 μ m.

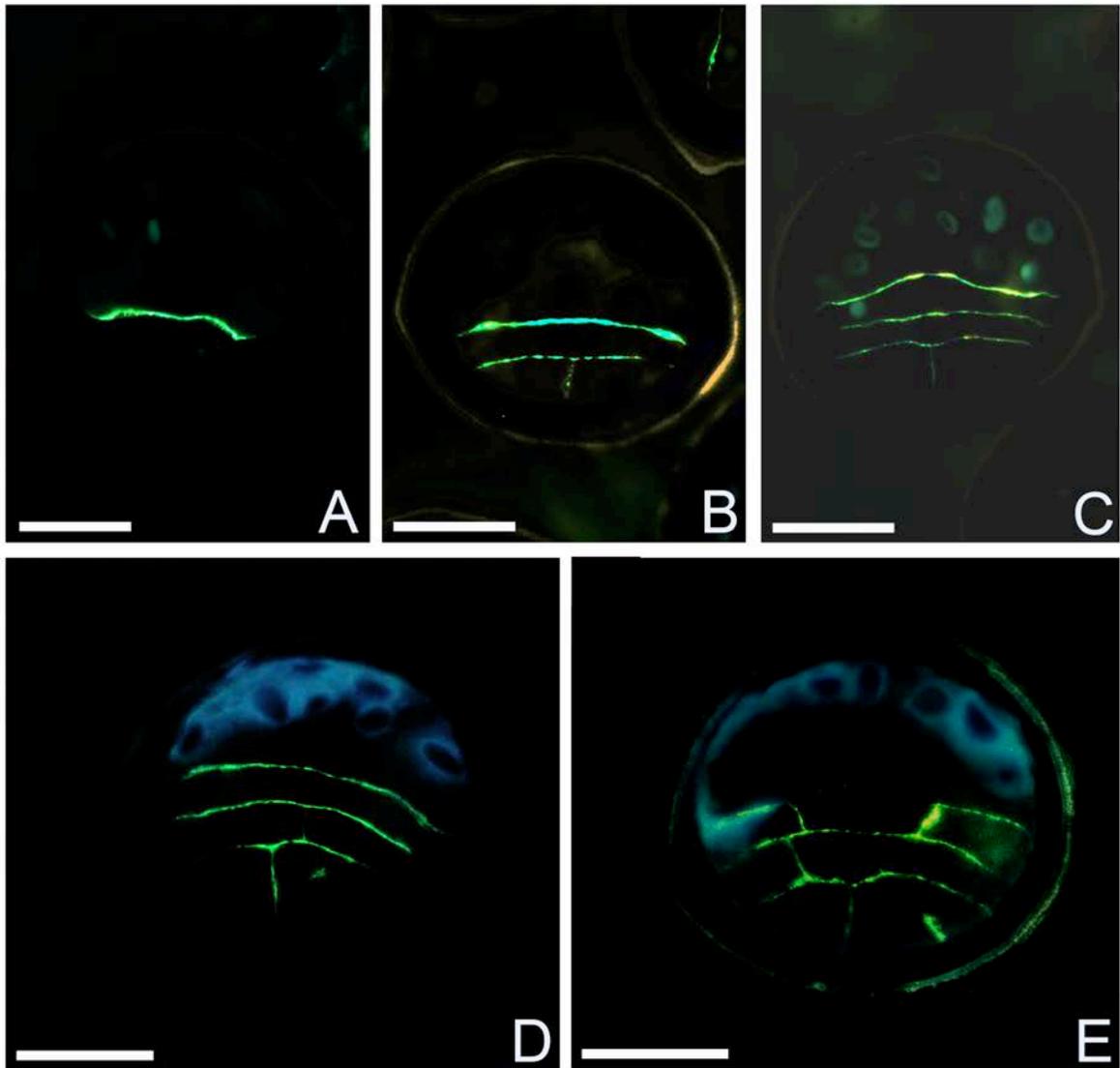


Figura 17 – Etapas da androgametogênese, coradas com Azul de Anilina, evidenciando o aumento de células protálicas delimitadas por paredes de calóse. A-E: Seção transversal ao esporângio em microscopia de epifluorescência. Escalas: A-E 20 μ m.

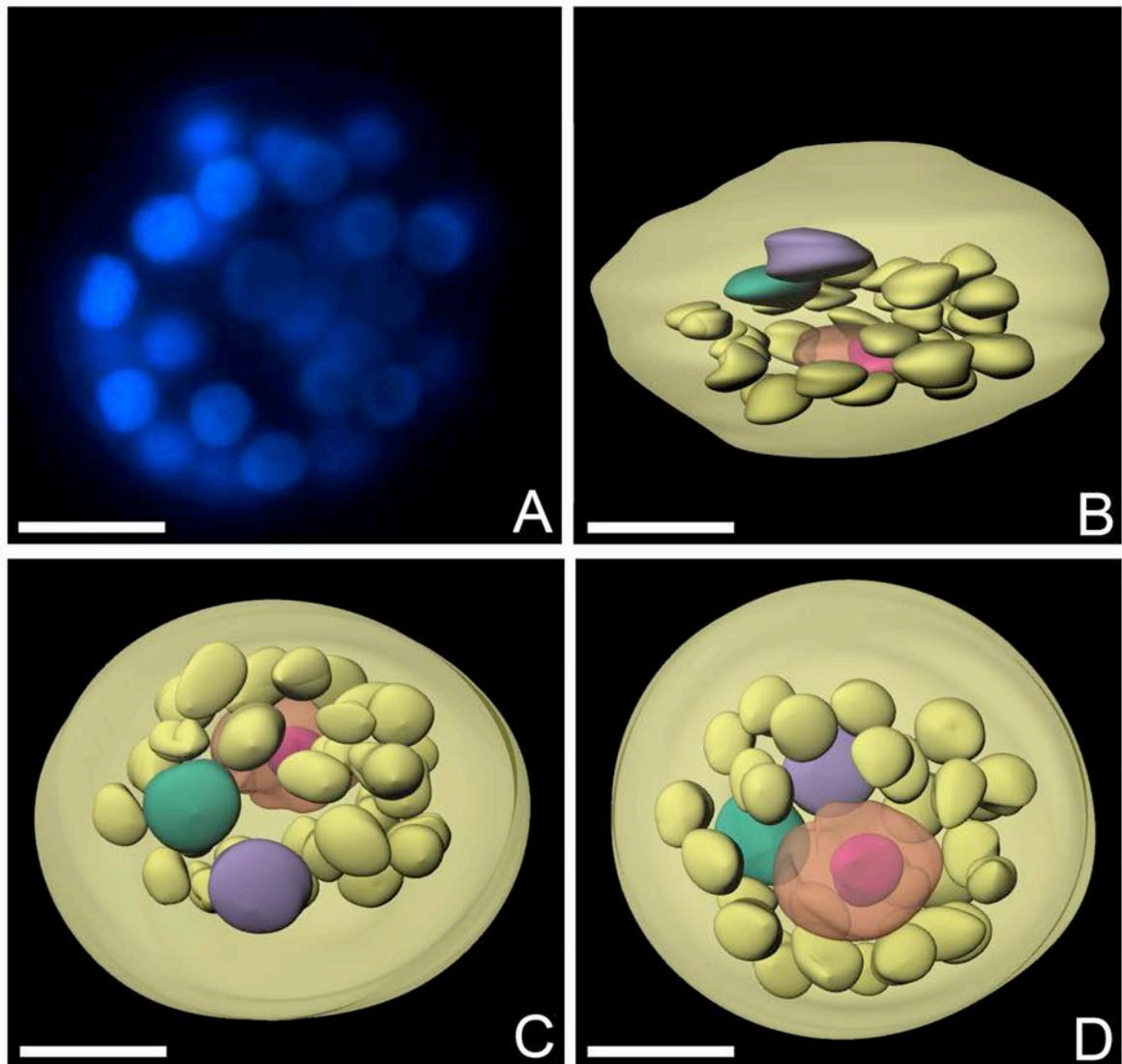


Figura 18 – Análise tridimensional do pólen. A. Núcleos do pólen corados com DAPI. B. Reconstrução tridimensional do pólen em vista equatorial mostrando a célula do tubo (roxo), célula generativa (rosa), célula estéril - núcleo (verde) e células protálicas (amarelo). C. Reconstrução tridimensional do pólen em vista polar distal representando célula do tubo (roxo) e célula estéril - núcleo (verde). D. Reconstrução tridimensional do pólen em vista polar proximal mostrando célula generativa (rosa) e célula estéril - núcleo (verde). A: Microscopia de epifluorescência. Escalas: A-D 20 μ m.

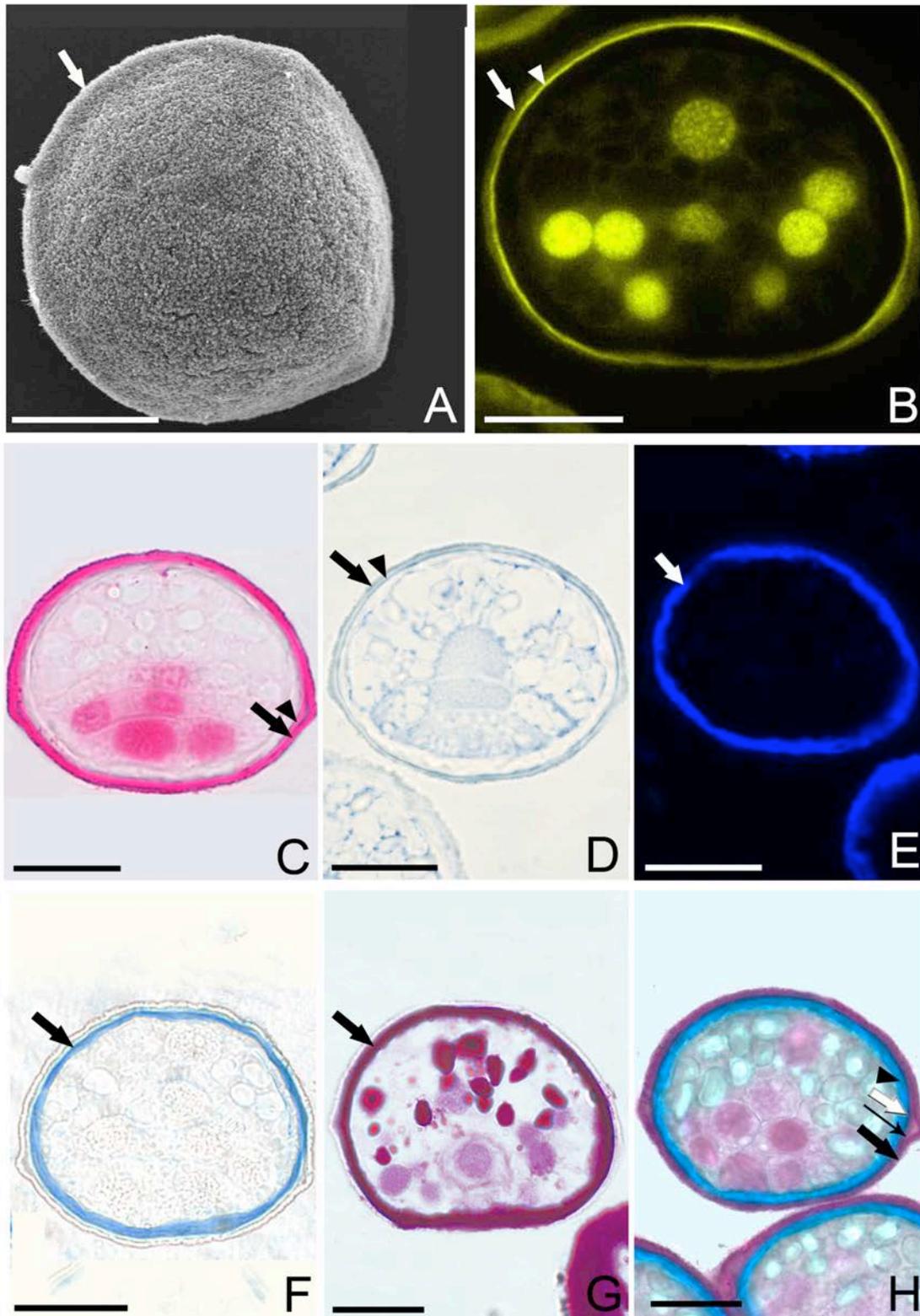


Figura 19 – Pólen maduro. A: Pólen em vista polar. A saliência anelar subequatorial (seta) evidencia o descolamento da ectexina. B e C. ectexina (seta) e endexina (cabeça de seta) coradas com Auramina O e Fucsina Básica respectivamente. D: Detecção de proteínas na ectexina (seta) e na endexina (cabeça de seta) com Azul Brillhante de Comassie. E. Detecção de celulose na intina (seta) com Calcofluor White. F. Detecção de pectinas na intina com Azul de Alcão (seta). G. Detecção de polissacarídeos totais na intina (seta) com PAS. H. Estratificação das camadas da esporoderme. Ectexina (seta grossa), endexina I (seta fina), endexina II (seta branca) e intina (cabeça de seta) coradas com Azul de Astra e Fucsina básica. B-H: Seção transversal ao esporângio. A. Microscopia eletrônica de varredura. C e D, e F-H. Microscopia de campo claro. B, E: Microscopia de epifluorescência Escalas: A-H 20µm.

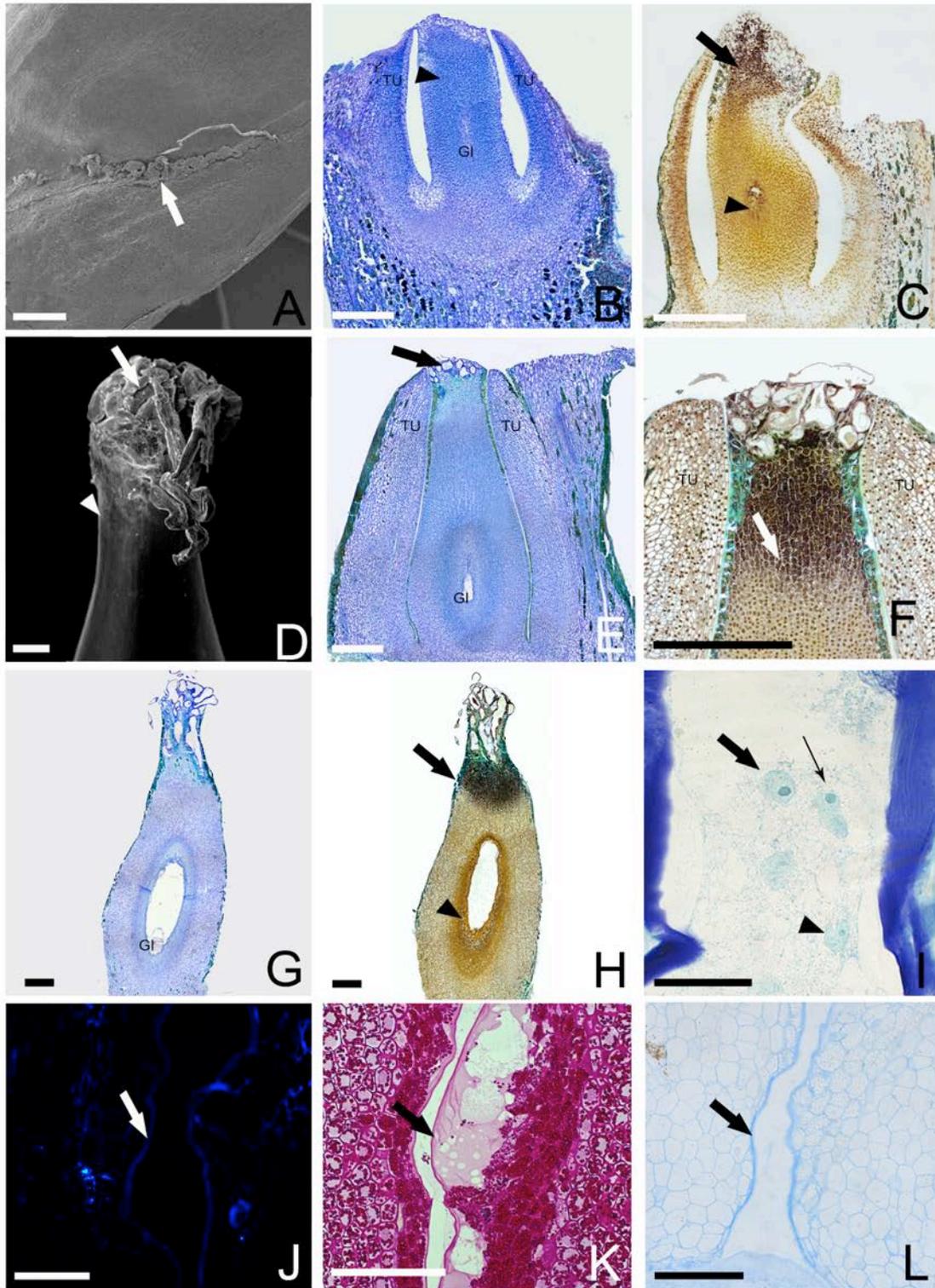


Figura 20 – Crescimento do tubo polínico e desenvolvimento do ginófito. A. Pólen (seta) sobre escama do estróbilo ginospórangiado. B. Início da ginogametogênese. Ginófito (GI), tegumento (TU), nucelo (cabeça de seta). C. Detecção de amido na região micropilar (seta) e ao redor do ginófito (cabeça de seta) com Azul de Toluidina O e solução Lugol. D. Tubos polínicos (seta) na micrópila (cabeça de seta). E. Ginófito (GI) em fase cenocítica, tubo polínico na micrópila (seta) e tegumento (TU). F. Detecção de amido nas células do nucelo (seta) e tegumento (TU) com Azul de Toluidina O e solução Lugol. G. Ginófito (GI) em início de celularização. H. Detecção de amido nas células nucleares (seta) e ao redor do ginófito (cabeça de seta) com Azul de Toluidina O e solução Lugol. I. Ocorrência da célula do tubo (seta grossa), da célula generativa (seta fina) e dos núcleos protuberantes (cabeça de seta) no tubo polínico. J, K e L. Detecção de diferentes compostos no tubo polínico (seta): Celulose com Calcofluor White, polissacarídeos totais com PAS e mucopolissacarídeos com Azul de Alciano. B-C e E-L: Seção longitudinal. A e D: Microscopia eletrônica de varredura. B-C, E-I, e K-L: Microscopia de campo claro. J. Microscopia de epifluorescência. Escalas: A-C,F-H 500µm, D 200µm, I 20µm, J-L 100µm. °

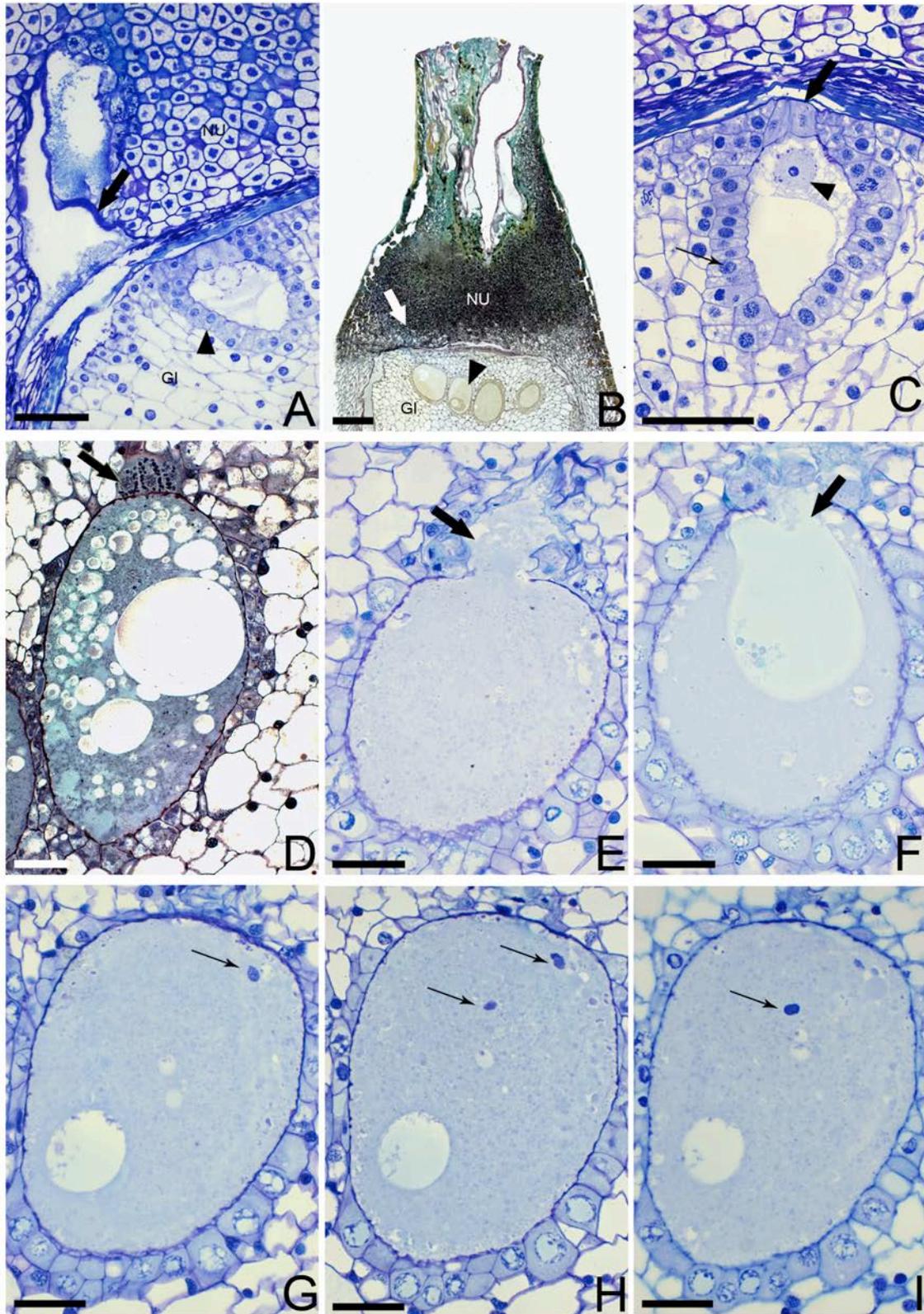


Figura 21 – Detalhe dos arquegônios e gametas. A. Tubo polínico (seta grossa) no nucelo (NU). Ginófito (GI), arquegônio maduro (cabeça de seta). B. Detecção de amido nas células do nucelo (NU) próximo ao ginófito (GI) mostrando a disposição dos arquegônios (cabeça de seta) com Azul de Toluidina O e solução de Lugol. C. Arquegônio maduro. Células do pescoço (seta grossa), células epiteliais (seta fina), e oosfera (cabeça de seta). D. Detecção de amido nas células do pescoço de arquegônio maduro (seta) com Azul de Toluidina O e solução Lugol. E-I: Fotomicrografias sequenciais de arquegônio evidenciando a penetração do tubo polínico (seta grossa) e gametas (seta fina). A-I: Seção longitudinal. A-I: Microscopia de campo claro. Escalas: A, C 100 μ m, B 500 μ m, D-H 50 μ m.

6 DISCUSSÃO

6.1 FENOLOGIA DE *Araucaria angustifolia*

Araucaria angustifolia é dióica, e a ocorrência de indivíduos biesporangiados se dá apenas raramente, sendo tal situação atribuída a agentes patogênicos ou outras injúrias desenvolvidas em árvores maduras (STEFENON; CAPRESTANO, 2009).

Em *A. angustifolia* observa-se que, entre os meses de março a junho, os estróbilos androsporangiados passam por um período de dormência. Tal situação também foi relatada em estróbilos androsporangiados de espécies de *Podocarpus* (FUEYO, 1996; WILSON; OWENS, 1999a) e *Taxus* (ANDERSON; OWENS, 2000). No entanto, em *Taxus yannunensis* o intervalo entre o surgimento dos estróbilos e a esporogênese é cerca de um mês (Wang *et al.*, 2008), não ocorrendo assim um período de dormência.

Owens e Bruns (2000) e Owens *et al.* (1995a, 1995b) também descrevem a ausência de crescimento significativo do ginófito e do tubo polínico em *Pinus monticola* e *Agathis australis*, respectivamente, logo após a penetração dessa estrutura no rudimento seminal, da mesma forma que observado em *A. angustifolia*. A ocorrência de um período de dormência, tanto em estróbilos androsporangiados como em estróbilos ginoporangiados, parece coincidir com os meses frios.

O período observado, entre o início da formação dos estróbilos androsporangiados até o momento de polinização, foi de 9 meses, e o período de formação dos estróbilos androsporangiados até formação dos gametas foi de 22 meses em *A. angustifolia*. A partir desses dados pode se prever que a formação de sementes maduras ocorreriam no meio do ano seguinte, fechando um ciclo de cerca de 30 meses.

Mantovani, Morellato e Reis (2004) encontram o mesmo período de formação de estróbilos androsporangiados, descrito neste trabalho, para *A. angustifolia* em Campos de Jordão, estado de São Paulo, Brasil. No entanto, Anselmini e Zanette (2008) observam a formação dos estróbilos androsporangiados, mais cedo, durante o mês de novembro, no estado de Curitiba, Brasil. Com relação a polinização Mantovani, Morellato e Reis (2004) descrevem a ocorrência desse evento durante os meses de agosto a setembro. Esses mesmos

autores, relatam um ciclo reprodutivo para *A. angustifolia* com duração de 20 a 24 meses, sendo o início do ciclo caracterizado pelo início da formação dos estróbilos e o final caracterizado pela produção de sementes. Shimoya (1962), em estudo realizado em Viçosa, Minas Gerais, Brasil e Anselmini e Zanette (2008) observam a polinização nos meses de setembro e outubro, mesma época descrita para o presente estudo.

O ciclo reprodutivo dos estróbilos ginospórangios dessa espécie é mais longo, ocorrendo a formação dessas estruturas no mês de novembro, e a maturação dos pinhões se dá vinte meses depois da polinização, totalizando um ciclo de 29 a 34 meses (Anselmini Zanette, 2008).

Ainda, no estudo de Shimoya (1962) o período entre a polinização e a fecundação é cerca de 14 meses, coincidindo com o período entre a polinização até a observação dos gametas dentro dos arquegônios, aqui descrito. Para Burlingame (1913) e Alencar (1941), o período entre a polinização e a fecundação é de cerca de um ano, corroborando também nossos dados.

As variações encontradas, entre o período de desenvolvimento das estruturas reprodutivas em *A. angustifolia*, parecem estar diretamente relacionadas com as condições climáticas do local. Segundo Anselmine (2005), a estação quente cria condições ambientais favoráveis, como temperatura e luminosidade, promove aumento na taxa de crescimento e permitem a formação das estruturas reprodutivas. Sousa e Hattemer (2003) também relatam que o momento de polinização em *A. angustifolia* não é constante entre os anos, ocorrendo uma dispersão mais rápida do pólen nos anos mais secos, e, nos anos com alta pluviosidade, o período de liberação do pólen pode se estender por até três meses. Da mesma forma, Fueyo (1996) observa que, em espécies de *Podocarpus*, a fenologia varia em uma mesma espécie de acordo com a área em que ela estiver se desenvolvendo, sendo a temperatura um fator determinante no processo.

6.2 O DESENVOLVIMENTO DO ANDROSPORÂNGIO

O desenvolvimento dos androsporângios em gimnospermas pode seguir dois padrões distintos, apresentando origem dérmica ou subdérmica (SINGH, 1978). De acordo com Singh (1978), a maioria das gimnospermas possui esporângios de origem subdérmica, da mesma forma que descrito para as angiospermas. No entanto, tal desenvolvimento se diferencia do padrão de angiospermas no número de camadas formadas no esporângio, que no caso de gimnospermas são inúmeras.

O padrão de desenvolvimento observado em esporângios de *A. angustifolia* demonstra sua origem dérmica, assim como descrito para *Cedrus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* e *Pseudotsuga* (SINGH, 1978).

Allen (1946) descreve que durante o desenvolvimento dos esporângios em *Pseudotsuga*, diversas divisões periclinais ocorrem nas células superficiais, constatando que nesse gênero não há a presença de uma camada protodérmica, e alega que os androsporângios de *Pseudotsuga* parecem ser homólogos aos de traqueófitas eusporangiadas basais. Esse mesmo autor ainda observa que o crescimento dos esporângios se dá devido á inúmeras divisões periclinais que persistem até o momento em que as células esporogênicas se evidenciam no interior da estrutura, da mesma forma que observado em *A. angustifolia*.

Assim, o padrão de formação dos esporângios de *A. angustifolia* se enquadra no descrito para *Cedrus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* e *Pseudtsuga* no qual o esporângio possui origem superficial. De acordo com Singh (1978), diversas gimnospermas foram descritas como tendo esporângios formados a partir de células subdérmicas, todavia, algumas dessas interpretações foram resultado da falta de observação de estádios de desenvolvimento iniciais.

Burlingame (1913) também ressalta certas características da formação do androsporângios de *A. angustifolia*, como o reconhecimento das células esporogênicas apenas em estádios mais desenvolvidos. Entretanto, essa mesma autora não relata como ocorre o início da formação dessas estruturas, nem determina sua origem. Em *Podocarpus*, no início do desenvolvimento dos androsporângios se reconhece uma massa de células meristemáticas na face abaxial dos androsporófilos, as células localizadas na periferia dessa massa irão se dividir periclinalmente formando três camadas parietais, e mais internamente o tapete

(FUEYO, 1996). As células centrais da massa celular irão se dividir formando uma massa de células arqueporiais centrais com núcleo e nucléolo conspícuos e pequenos e numerosos vacúolos (FUEYO, 1996). Apesar de descrever o modo de formação dos esporângios, sendo este semelhante ao de *A. angustifolia*, Fueyo (1996) não relata o momento de formação da estrutura, não deixando clara sua origem.

Assim, mesmo não estando clara a origem de cada estrato parietal dos esporângios de coníferas, pode-se concluir que o desenvolvimento dessa estrutura não apresenta o mesmo padrão de formação das anteras de angiospermas, sendo observado em coníferas, a formação de inúmeras camadas parietais até que surja o estrato reprodutivo.

Com relação as modificações, associadas à deiscência do esporângio, observadas nos androsporângios de *A. angustifolia* em sua fase final de desenvolvimento, essas ocorrem da mesma forma que descrita para gimnospermas de maneira geral. Nesse estágio, os estratos parietais são comprimidos pela expansão locular (SINGH, 1978) e desenvolvem espessamentos secundários nas células epidérmicas, sendo assim denominado exotécio (SINGH, 1978; FUEYO, 1996). De forma distinta do que observado em *A. angustifolia*, *Cedrus* apresenta duas camadas externas com espessamentos secundários (JOHRI, 1936), e em *Ginkgo*, exceção entre todas as gimnospermas, o espessamento secundários ocorre em duas ou três camadas subepidérmicas, caracterizando um endotécio (SINGH, 1978).

Segundo Singh (1978) a deiscência do esporângio se dá por fendas longitudinais nas faces voltadas ao exterior do conjunto de esporângios em Pinaceae, ou em fendas longitudinais voltadas para o interior do conjunto de esporângios em *Cephalothaxus* e *Ginkgo*. *Cycas* os esporângios de um sorus possuem linha de deiscência que irradia do centro do sorus aos esporângios localizados nas extremidades e em *Ephedra* a deiscência é poricida (SINGH, 1978). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que em *A. angustifolia* a linha de deiscência dos esporângios está voltada para o interior do conjunto de androsporângios da mesma forma que *Cephalothaxus* e *Ginkgo*. Em *Podocarpus* os esporângios também apresentam linhas de deiscência longitudinais, no entanto, a posição desta linha não é descrita por Fueyo (1996).

Com relação à organização dos androsporângios nos esporófilos, estes se dispõem de forma a facilitar o carregamento de uma maior quantidade de pólen. Em *A. angustifolia* estes se posicionam em duas fileiras paralelas. Assim, da mesma maneira que ocorre em estróbilos

ginosporangiados, onde a geometria dessa estrutura criada um fluxo de ar complexo por entre as escama permitindo a captura de uma maior quantidade de pólen (NIKLAS; U, 1982), em estróbilos androsporangiados o fluxo de ar formado, passa por entre os esporângios carregando uma grande quantidade de grãos de pólen. Essa situação poderia explicar a ocorrência das chuvas polínicas, onde observa-se, na época de polinização, grandes massas de pólen se distanciando do pinheiro com as correntes de ar.

6.3 O DESENVOLVIMENTO DOS ANDRÓSPOROS

Fernando, Lazzaro e Owens (2005) descrevem o ciclo reprodutivo das árvores androsporangiadas - androsporogênese e androgametogênese - de coníferas como sendo caracteristicamente longo. As características observadas durante o desenvolvimento dos andrósporos, no presente trabalho, concordam com os demais estudos realizados no mesmo gênero, em *A. angustifolia* (BURLINGAME, 1913) e *A. columnaris* (HODCENT, 1963).

A meiose assíncronica é descrita como típica em coníferas, podendo-se observar em um mesmo esporângio, estádios meióticos distintos desde prófase I até telófase II. Tal fato se deve à ausência de conexões protoplasmáticas entre as células esporogênicas que permitam a sinalização simultânea do processo (SINGH, 1978). Embora Vasil e Aldrich (1970) tenham descrito a ausência de canais citomítico ou canais plasmáticos em células esporogênicas de *Podocarpus macrophyllus*, Fueyo (1996) demonstra a existência de conexões citoplasmáticas em três espécies desse gênero.

Diferentemente da maioria das gimnospermas, a presença de conexões citoplasmáticas é uma característica marcante em angiospermas (BIONE; PAGLIARINI; TOLEDO, 2000). De acordo com Heslop e Harrison (1966), a função dos canais citomíticos é promover a sincronização do fluxo de substâncias entre as células-mãe de andrósporos durante a prófase meiótica. A presença dos canais promovem a sincronia da divisão das células-mãe e também a sensibilidade da antera com relação às injúrias onde danos mecânicos normalmente resultam na esterilização de toda a antera (HESLOP-HARRISON, 1966). Assim, tais conexões conferem unidade em todos os componentes de um esporângio (RISUEÑO *et al*, 1969). Em coníferas, a assincronia do evento meiótico parece favorecer um maior tempo de maturação dos esporos no esporângio, e, por consequência, garante que a produção e liberação dos grãos de pólen ocorra por um período maior.

Ainda com relação a divisão celular, Singh (1978) descreve como o padrão geral de gimnospermas a ocorrência de meiose com citocinese simultânea. Entretanto, em *Podocarpus* (Fueyo, 1996) e *Taxus yunnanensis* (Wang *et al.* 2008) evidencia-se a ocorrência de ambos os tipos de citocinese. Em *A. angustifolia* o padrão observado foi o descrito como típico para o grupo. Furness *et al.* (2002), ainda relatam que a predominância de androsporogênese simultânea em angiospermas basais e gimnospermas indica que esse é um carácter plesiomórfico em angiospermas.

Outra distinção, observada em células - mãe de andrósporos de gimnospermas e angiospermas, é a ausência de paredes calósicas. Em *A. angustifolia* a parede calósica é evidenciada apenas na fase de díade, não sendo observada nas células-mãe de andrósporos. Esse fato vai ao encontro com estudos anteriores em *Araucaria* (HODCENT, 1963) e do que é descrito como padrão geral de coníferas, em que se observa o surgimento de calose no final da telófase II (Singh, 1978).

Com relação à dinâmica das reservas energéticas do tecido esporogênico, em *A. angustifolia*, a presença de grãos de amido é evidenciada assim que os estratos parietais encontram-se diferenciados, permanecendo nessas células durante toda a esporogênese e gametogênese, seu desaparecimento apenas ocorre durante a germinação do tubo polínico. Entretanto, em *Pinus roxburgii* e *Biota occidentalis* os grãos de amido são sintetizados nas células arquesporais de esporângios jovens, logo são consumidos e só reaparecem nas células esporogênicas antes da meiose (MOITRA; BHATNAGAR, 1982). Em *Picea aspartata* a presença de grãos de amido ocorre apenas na meiose I (MOITRA; BHATNAGAR, 1982).

O padrão de organização dos grãos de amido, durante a meiose de *A. angustifolia*, ocorre de tal forma que as quatro novas células parecem conter a mesma quantidade de reserva energética no final da divisão, essa mesma dinâmica foi observada em *Picea aspartata* por Lü, Li e Chen (2003).

Embora o tapete de *Araucaria* seja descrito como periplasmodial devido à natureza ameboidal de certas células (HODCENT, 1965), percebe-se claramente que esse estrato se classifica como secretor, pois as células tapetais permanecem circundando o lóculo, adjacentes aos demais estratos parietais, ainda que ocorra a protrusão eventual de protoplasto para a cavidade locular durante as fases iniciais da gametogênese. Além disso, a presença de

corpúsculos de Ubisch é típica de tapetes do tipo secretor, não havendo descrição da presença dessas estruturas em tapete do tipo ameboidal (PACINI; FRANCHI, 1991).

Pacini e Franchi (1993) relatam que os corpúsculos de Ubisch são o único produto produzido durante a degeneração do tapete de táxons com polinização estritamente anemófila. Segundo esses autores, a exina e os corpúsculos de Ubisch possuem esporopolenina em suas superfícies que são eletricamente carregadas, o que promove a repulsão mútua e a expulsão do pólen. Assim, quando o saco polínico se abre, o grão de pólen é expelido. Tal dado também corrobora a classificação do tapete de *A. angustifolia* como sendo do tipo secretor, onde os produtos produzidos pelo tapete possuem função direta na dispersão do pólen.

6.4 O DESENVOLVIMENTO DO ANDRÓFITO

Diversas propostas foram realizadas no intuito de encontrar homologias entre as células do gametófito de plantas superiores e estruturas específicas de gametófitos de vida livre de plantas inferiores. De acordo com Wang *et al.* (2008), a terminologia utilizada para a androgametogênese de coníferas varia amplamente na literatura, tal confusão é resultado de diferentes interpretações na tentativa de traçar as homologias entre as estruturas reprodutivas do gametófito de gimnospermas e plantas inferiores (STERLING, 1962). Atualmente, ainda percebe-se que não há um padrão na nomenclatura e, que alguns termos utilizados por certos autores, permanecem inconsistentes. Dessa forma a nomenclatura utilizada neste trabalho está de acordo com a proposta mais recente, realizada por (FERNANDO *et al.*, 2010).

Maheshwari (1935) sintetizou os termos utilizados por diversos autores para os componentes do androgametófito de gimnospermas. A tabela a seguir demonstra a dificuldade na compreensão dos constituintes do andrófito e a evolução da nomenclatura utilizada ao longo do tempo (Tabela 3).

Tabela 3 - Evolução da nomenclatura utilizada para as células do andrófito de gimnospermas ao longo do tempo (adaptado de Maheshwari, 1935).

Autor	Nomenclatura utilizada para as células do andrófito de gimnospermas						
Strasburger, 1879	Prothallial cells (células protálicas)		Tube nucleus (núcleo do tubo)	Spermatogenous cell (célula espermatogênica)	Sterile sister cell (célula irmã estéril)	Antheridium mother cell (célula mãe anteridial)	Generative cell (célula generativa)
Coulter e Chamberlain, 1917	Prothallial cells (células protálicas)		Tube nucleus (núcleo do tubo)	Generative cell (célula generativa)	Stalk cell (célula do pé)	Body cell (célula do corpo)	Male nuclei (núcleos masculinos)
Schürhoff, 1926	Prothallial cells (células protálicas)		Tube nucleus (núcleo do tubo)	Spermatogenous cell (célula espermatogênica)	Stalk cell (célula do pé)	Antheridium mother cell (célula mãe anteridial)	Sperm nuclei (núcleos espermáticos)
Herzfeld, 1927	Prothallial cells (células protálicas)		Vegetative nucleus (núcleo vegetativo)	Antheridial cell (célula anteridial)	Wall cell (célula da parede)	Sporogenous cell (célula esporogênica)	Generative nuclei (núcleo generativo)
Maheshwari, 1935	Prothallial cells (células protálicas)		Tube nucleus (núcleo do tubo)	Antheridial cell	Sterile sporogenous cell (célula esporogênica esteril)	Sporogenous cell (célula esporogênica)	Sperm nuclei (núcleos espermáticos)
Sterling, 1963	Prothallial cells (células protálicas)	Antheridial inicial (célula anteridial)	Tube cell (célula do tubo)	Generative cell (célula generativa)	Sterile cell (célula estéril)	Sporogenous cell (célula esporogênica)	Male gamete (gametas masculinos)
Singh, 1978	Prothallial cells (células protálicas)	Antheridial inicial (célula anteridial)	Tube cell (célula do tubo)	Antheridial cell (célula anteridial)	Stalk cell (célula do pé)	Body cell (célula do corpo)	Male gamete (gametas masculinos)
Fernando <i>et al.</i>, 2010	Prothallial cells (células protálicas)	Antheridial inicial (célula anteridial)	Tube cell (célula do tubo)	Antheridial cell (célula anteridial)	Sterile cell (célula estéril)	Generative cell (célula generativa)	Sperm nucleus (núcleos espermáticos)

A presença de células protálicas em gimnospermas é um consenso, no entanto, tratando-se de Podocarpaceae e Araucariaceae, no qual as células protálicas seguem dividindo-se, ocorre a necessidade de diferenciar células primárias de secundárias. De acordo com Fernando *et al.* (2010), a função das células protálicas de fato não é conhecida, todavia tal distinção é importante para determinar a origem de cada uma delas.

Com relação à célula anteridial, a utilização do termo “célula generativa” para essa, utilizada por Coulter e Chamberlain (1917) e Sterling (1962) não seria correta, pois a célula anteridial não forma diretamente os gametas (OWENS; BRUNS, 2000). Ainda, de acordo com Sterling (1962), o termo “célula estéril” é mais apropriado para a célula originária da célula anteridial do que célula do pé, pois esta célula não se dividirá novamente. Além disso, Sterling (1962) relata que para essa célula ter uma relação apropriada com as células pedunculares de pteridófitos, ela deveria estar localizada abaixo da célula generativa, isto de fato não ocorre em diversas gimnospermas inclusive em *A. angustifolia* onde a célula estéril está posicionada ao lado da célula generativa. De acordo com Singh (1978), a origem da célula estéril, advinda da célula anteridial e sua posição próxima às demais células protálicas, sugere que ela seja uma célula protálica secundária. Entretanto, Owens e Bruns (2000) alegam que esse termo já é utilizado em Araucariaceae e Podocarpaceae para as células originadas das células protálicas primárias, sendo o termo inapropriado.

Em coníferas a quantidade de ciclos mitóticos da gametogênese em andrófitos varia amplamente entre as famílias, ocorrendo de dois até cinco ciclos.

A comparação das relações taxonômicas entre as coníferas e seus padrões de gametogênese, especificamente o número de divisões mitóticas do andrófito, permite relacionar diretamente a posição que cada família ocupa no grupo com as dimensões do andrófito. De acordo com Fernando *et al.* (2005), em Cupressaceae, ocorrem dois ciclos mitóticos até a formação dos gametas; em Taxaceae e Cephalotaxaceae ocorrem três ciclos mitóticos; e em Pinaceae, Araucariaceae e Podocarpaceae se observam cinco ciclos mitóticos na linhagem de células generativas até o momento de formação dos gametas. Considerando que a evolução do andrófito nas plantas ocorreu no sentido de reduzir e simplificar estruturas (Fernando *et al.* 2010; Fueyo 1996; Sterling 1963), em gimnospermas as células protálicas se enquadram nesse contexto de redução até sua total eliminação (Fernando *et al.* 2010).

Ran *et al.* (2010), baseados em caracteres moleculares, definem Araucariaceae e Podocarpaceae como famílias de posição basal dentro de coníferas. Com relação à caracteres morfológicos dessas famílias, o número expressivo de células protálicas do andrófito, o qual chega a formar um verdadeiro tecido reforça tal posicionamento (Fernando *et al.* 2010). Entretanto, com relação à Araucariaceae, Podocarpaceae se posiciona como família que divergiu posteriormente e caracteriza-se pela menor quantidade de células protálicas (Fueyo 1996).

O crescimento do tubo polínico e a formação dos gametas em *A. angustifolia*, que ocorre dentro do ginostrobilo, serão tratados respectivamente no item 6.6 e 6.7.

6.5 O PÓLEN MADURO

Os grãos de pólen de *A. angustifolia* possuem tanto uma polarização externa quanto interna, da mesma forma que observado em muitas gimnospermas (Fernando *et al.* 2010; Sterling 1963; Pacini *et al.* 1999). Segundo Pacini *et al.* (1999), ao contrário da polarização externa que distingue a região dos polos e equador, a polarização interna define a região em que o tubo polínico será emitido. Em grãos de pólen que possuem sacos aéreos, o tubo é emitido entre essas duas estruturas, na região oposta aos núcleos protálicos; em grãos de pólen que não possuem sacos aéreos a região de emissão do tubo não é pré-determinada e poderá ocorrer em uma grande área oposta à região em que se encontram os núcleos protálicos.

Ao longo da evolução parece ter ocorrido uma mudança na região de emissão do tubo polínico, passando do polo proximal, em grãos de pólen de *Cycas* e *Ginkgo*, para o polo distal em coníferas e gnetophytas (Fernando *et al.* 2010). Rudall and Batemann (2007) descrevem que a mudança, no polo de emissão do tubo polínico, ocorreu simultaneamente com o estabelecimento do caráter sifonogâmico e embora o crescimento do tubo polínico em coníferas “tenha um papel sifonogâmico”, sua função é também em grande parte direcionada à nutrição, auxiliando no crescimento celular do gametófito masculino (RUDALL; BATEMAN, 2007).

As variáveis morfométricas da exina de *A. angustifolia* são similares às descritas para *Araucaria columnaris*, por Hodcent (1963, 1965b), e *Aghatis australis* por Owens *et al.* (1995b). No entanto, Fueyo, Caccavari e Dome (2008) encontram valores mais elevados, variando 2 a 4µm de espessura para *A. angustifolia*.

A estratificação da esporoderme de *A. angustifolia* analisada neste trabalho concorda com o padrão descrito por Fueyo *et al.* (2008) e Kurmann (1991), bem como a continuidade dos constituintes da parede observado por Fueyo *et al.* (2008). Segundo Fueyo *et al.* (2008), o descolamento da ectexina parece ser uma característica compartilhada pela maioria dos grãos de pólen de *Araucaria*, sendo provavelmente causado pela fraca conexão dos elementos granulares da ectexina com a endexina, cuja origem e função ainda geram opiniões controversas.

De acordo com Kurmann (1991), três padrões básicos de exina ocorrem em gimnospermas. O primeiro tipo, é descrito para Cycadales, Ginkgoales e Coniferales que apresentam sacos aéreos; observa-se nesses grupos uma ectexina tectada e alveolar. O segundo tipo, estaria presente em coníferas sem sacos aéreos, nas quais a ectexina é atectada e granular. O terceiro tipo, seria composto por ectexinas tectadas e granulares, presentes em Gnetales. Todas as formas possuem nexina lamelada podendo variar em espessura e número de lamelas. No caso de *A. angustifolia*, o padrão da exina se enquadraria no segundo tipo descrito.

A intina de *A. angustifolia* apresenta características similares às descritas por Hodcent (1963) em *Araucaria columnaris* e também concorda com Singh (1978), que relata que, em polens sem sacos aéreos, a intina é normalmente homogênea e espessa. Esse mesmo autor descreve que em polens com sacos aéreos, e em *Cycas*, a intina possui espessura variável.

Em *Pinus sylvestris*, Derksen, Knuiman e Geurts (1999) afirmam que a intina é dividida em duas camadas: a camada externa, que se estende parcialmente sobre a parede do tubo polínico na região de germinação; e a camada interna, que é contínua à parede do tubo.

Pacini, Franchi e Ripaccioli (1999) fizeram um estudo mais abrangente, abordando alguns aspectos citológicos do pólen de 12 espécies de gimnospermas durante a dispersão. Assim, constataram que o número de camadas da intina varia de uma a três em gimnospermas, observando-se (i) uma única camada em *Encephalartos horridus* (Zamiaceae), *Macrozamia spiralis* (Zamiaceae), *Torreya nucifera* (Cephalotaxaceae), *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) e *Ephedra american* (Ephedraceae); (ii) duas camadas em *Taxus baccata* (Taxaceae) e *Calocedrus decurrens* (Cupressaceae); (iii) três camadas em *Sequoia sempervirens* (Cupressaceae), *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae), *Cupressus guadalupensis* (Cupressaceae), *Cryptomeria japonica* (Cupressaceae) e *Pinus pinaster* (Pinaceae). Ainda,

Chichiricò e Pacini (2007) descrevem que a intina em *Cupressus arizonica* é composta por três camadas. De acordo com esses autores, a esporoderme de *C. arizonica* é muito especializada e possui diferentes funções quando comparada com polens de demais coníferas e angiospermas.

Com relação à composição química da intina de coníferas, Singh (1978) descreve como típico em gimnospermas sua natureza pecto-celulósica. Esses mesmos compostos foram identificados na intina de *A. angustifolia*, entretanto a natureza química da parcela péctica difere do estudo Yatomi *et al.* (2002) que descrevem a reação positiva para Vermelho de Rutênio na intina de 13 espécies de 8 gêneros pertencentes a 6 famílias de gimnospermas. A discordância da resposta química poderia ser explicada pelas modificações das propriedades das pectinas dos grãos de pólen ao longo de seu desenvolvimento (Hasegawa *et al.* 2000) ou por *A. angustifolia* apresentar pectinas distintas dos demais grupos.

Além da composição pecto-celulósica da intina, a presença de calose em diversas gimnospermas é bastante freqüente, ocorrendo em 14 espécies estudadas por Yatomi *et al.* (2002), em *Pinus sylvestris* (DERKSEN *et al.* 1999), e em *Pinus pinaster* (PACINI *et al.* 1999). Esse composto pode apresentar distintos padrões de distribuição, podendo ser homogênea na camada, restrito a um polo, ou pode estar isolando as células do gametófito. A presença de paredes calósicas, no gametófito de *A. angustifolia*, difere nas espécies já analisadas. Em *A. angustifolia* a intina não possui composição calósica, no entanto é evidenciada a presença de paredes calósicas delimitando as células protálicas, enquanto em *Pinus sylvestris* (DERKSEN; KNUIMAN; GEURTS, 1999) e em *Cupressus arizonica* (CHICHIRICÒ *et al.*, 2009), a parede celular calósica separa a célula anteridial da célula do tubo. A presença de calose nas células do gametófito esta provavelmente envolvida com a filtragem de substâncias para o interior do pólen e, no caso de estarem presentes nas células protálicas, essa substância provocaria um isolamento bioquímico, mantendo as reservas localizadas no polo distal, onde se encontram a linhagem de células generativas e a célula vegetativa. Logo após o surgimento da célula generativa se observa a dissolução das paredes calósicas, evidenciando que tal bloqueio não é mais necessário.

Com relação à composição química do tubo polínico, em *Picea aspartata*, esse apresenta celulose em todas suas paredes, entretanto, no ápice do tubo, a densidade de microfibrilas de celulose é menor (LAZZARO; DONOHUE; SOODAVAR, 2003). Sheng, Hu e Lü. (2006) e Derksen, Knuiman e Geurts (1999) também descrevem a mesma distribuição de celulose na

parede do tubo polínico descrita para *Picea aspartata* e *Picea wilsonii* e para *Pinus sylvestris*, respectivamente. Em *A. angustifolia* foi observada a presença de celulose em todas as paredes do tubo polínico, todavia não foram observados distintos padrões de concentração.

Com relação à presença de pectinas, o tubo polínico de *A. angustifolia* difere de *Cycas revoluta*, *Ginkgo biloba*, *Podocarpus macrophyllus*, *Podocarpus nagi*, *Abies veitchii*, *Cedrus deodara*, *Cryptomeria japonica*, *Chamaecyparis obtusa*, *Pinus pumila*, *Pinus densiflora*, *Pinus elliotii*, *Pinus rigida* e *Pinus Thunbergii*, pois nessas espécies ocorre a presença do grupo de pectinas, identificadas com Vermelho de Rutênio (YATOMI *et al.*, 2002).

A ausência de calose no tubo polínico de *A. angustifolia* também contrasta com diversas espécies de gimnosperma. Em *Cupressus arizonica* (CHICHIRICCÒ; PACINI, 2007) e *Pinus sylvestris* (DERKSEN; KNUIMAN; GEURTS, 1999) foi descrita a presença de calose na parede do tubo polínico pela reação positiva com Azul de Anilina, assim como em *Podocarpus nagi*, *Chamaecyparis obtusa* (YATOMI; NAKAMURA; NAKAMURA, 2002). Em *Ginkgo biloba*, *Podocarpus macrophyllus*, *Abies veitchii*, *Cedrus deodara* e *Cryptomeria japonica* a reação com Azul de Anilina no tubo polínico foi muito fraca, no entanto *Cryptomeria japonica* apresenta reação positiva para calose quando utilizado anticorpos monoclonais para calose (YATOMI; NAKAMURA; NAKAMURA, 2002).

De acordo com Johri (1984), embora a estrutura e a composição química das camadas esporodérmicas de gimnospermas seja complexa, elas se assemelham muito, em diversos aspectos a angiospermas. Segundo Heslop-Harrison e Heslop-Harrison (1991), a intina de angiospermas é geralmente organizada em três camadas, sendo observadas variações dessa estrutura entre famílias e até mesmo entre espécies, devido à necessidade da intina de se adaptar a conformação da exina e a adaptações relativas à regulação hídrica no pólen e controle da germinação. Esses autores ainda discutem as principais características estruturais da intina de angiospermas, evidenciando diferentes escalas de complexidade as quais delimitam grupos taxonômicos.

Assim, pode-se afirmar que a intina de *A. angustifolia* difere da maioria das espécies de coníferas por possuir apenas uma camada, não apresentam reação positiva para calose nem para o grupo de pectinas que reagem com Vermelho de Rutênio. A ausência dessas duas reações nas paredes do tubo polínico também distinguem *A. angustifolia* de muitas espécies de coníferas. Embora algumas famílias de coníferas apresentem intina semelhante à descrita para

angiospermas, *A. angustifolia* demonstra possuir tal estrutura pouco complexa, diferindo extremamente de famílias que divergiram posteriormente.

6.6 A POLINIZAÇÃO

Durante a dispersão, o pólen de *A. angustifolia* apresenta uma expressiva quantidade de amido. Pacini, Guarnieri e Nepi (2006) relatam que ao longo do desenvolvimento do pólen, os carboidratos são consumidos para seu crescimento, e nos estágios finais de sua formação esses compostos se modificam para preparar o pólen para dispersão. Esses autores ainda ressaltam a importância do papel dos carboidratos para manter a pressão de turgor em polens que necessitam regular a quantidade de água com o ambiente.

Da mesma forma, Franchi *et al.* (1996) descrevem que polens, que fazem uma longa viagem até chegar em seu destino, requerem uma forte proteção quanto à desidratação, dessa forma os carboidratos presentes podem ser despolimerizados protegendo assim as membranas do pólen contra a dessecação. Pacini (1996) ainda afirma que a reserva de carboidratos em grãos de pólen aumentam a sua vida média. Todos esses dados vão ao encontro dos mecanismos observados em *A. angustifolia* demonstrando que a grande quantidade de grãos de amido evidenciados em seus polens é uma estratégia para que esses cheguem intactos aos estróbilos ginospórangios.

Baker e Baker (1979) diferenciam polens com amido e sem amido em angiospermas, fazendo inferências evolutivas e ecológicas sobre essa característica. Esses autores relatam que uma característica forte de famílias basais é a presença de polens com amido, enquanto que, em derivadas, geralmente estão ausentes. Além disso, geralmente o tamanho dos grãos de pólen e a presença/ausência de amido demonstram uma correlação direta, polens grandes apresentam amido e polens pequenos, não.

Apesar das coníferas constituírem um grupo pequeno de gimnospermas essas apresentam características bastante diversificadas com relação à polinização. No entanto por ser um grupo de plantas que derivou cedo, as coníferas já viveram diversas mudanças climáticas que provavelmente restringiu e isolou espécies por um longo período de tempo, levando a diversidade, em estruturas como pólen e estróbilos ginospórangios, e, em mecanismos de polinização, não apenas entre gêneros mas também entre famílias e até entre espécies de um mesmo gênero (OWENS; TAKASO; RUNIONS, 1998).

A polinização, em todas as famílias de coníferas, é anemófila (FERNANDO; LAZZARO; OWENS, 2005; SINGH, 1978). De acordo com Fernando, Lazzaro e Owens (2005) e Singh (1978), todas as coníferas são sifonogâmicas, todavia a maneira como o tubo se forma e o seu comprimento estão relacionados com o modo como o pólen entra no rudimento seminal. Owens, Takaso e Runions (1998) descrevem os mecanismos de polinização reconhecidos em coníferas, relacionando a presença ou ausência de sacos polínicos, presença ou ausência de gota de polinização e do comprimento do tubo polínico.

Em Araucariaceae, assim como em algumas espécies de *Tsuga* (Pinaceae) e *Saxegothaea* (Podocarpaceae), a polinização é extrarudimento seminal (FERNANDO; LAZZARO; OWENS, 2005; OWENS; BRUNS, 2000; OWENS; TAKASO; RUNIONS, 1998; SINGH, 1978). Tal descrição está de acordo com o que foi observado em *A. angustifolia*. No entanto, Haines (1984) descreve que após a deposição do pólen nas escamas, esses se ramificam e perfuram a epiderme se direcionando para a região nucelar. A penetração do tubo polínico, na epiderme, não foi observada neste trabalho, sendo observado apenas seu crescimento em direção à região nucelar, sendo necessário um estudo mais detalhado com respeito à polinização para melhor descrever o trajeto percorrido pelo tubo polínico até chegar na região micropilar. Owens *et al.* (1995a) relatam também algumas discordâncias sobre a germinação do tubo polínico em *Aghatis australis*, observados em seus estudos e demais trabalhos, sugerindo uma reavaliação para toda a família. Em *A. australis* o ápice do nucelo ultrapassa o tegumento até alcançar o eixo do estróbilo onde os polens estão localizados (Owens *et al.*, 1995a). O tempo de germinação do pólen em *A. australis*, desde sua deposição nos estróbilos, assemelha-se ao observado para *A. angustifolia* levando cerca dois meses (Owens *et al.*, 1995a).

Em Araucariaceae a hidratação do pólen não ocorre no nucelo, mas nas escamas do estróbilo ginospangiado. Tal hidratação permite que o pólen aumente de volume, causando o rompimento da exina, possibilitando a projeção da intina para formar o tubo polínico (FERNANDO *et al.*, 2010; OWENS *et al.*, 1998; SINGH, 1978). Por outro lado, na maioria das coníferas, o tubo polínico germina no rudimento, cresce e se direciona ao ginófito, mais precisamente aos arquegônios (OWENS *et al.*, 1995a). Rudall e Bateman (2007) ainda descrevem que, em gimnospermas, o mecanismo usual de polinização é a entrada do pólen no nucelo através da gota de polinização, para então germinar até alcançar os arquegônios. No entanto, relatam que em *Cycas* e *Ginkgo* o tubo é zooidogâmico, agindo apenas como um

órgão haustorial, não sendo responsável pela liberação dos gametas na oosfera. Segundo Hiratsuka e Terasaka (2010), o tubo polínico de *Pinus densiflora* possui duas funções distintas: a primeira seria uma função haustorial associada com as múltiplas ramificações desse no nucelo; e a segunda seria a função reprodutiva onde uma única ramificação levaria os gametas até as oosferas. Dessa forma, o tubo polínico de coníferas representa um dos maiores avanços evolutivos no desenvolvimento dos andrófitos, pois são uma forma intermediária entre o tubo polínico haustorial de *Cycas* e *Ginkgo* e o tubo polínico simplificado e de rápido desenvolvimento das plantas com flores (FERNANDO; LAZZARO; OWENS, 2005).

A ramificação do tubo polínico, no nucelo, também foi observada por Haines *et al.* (1984), Owens *et al.* (1995a), Hodcent (1963, 1965b) e Burlingame (1915) em espécies de Araucariaceae. Em *A. angustifolia* a presença de diversas células no tubo polínico evidencia que, além da célula do tubo e da célula generativa, os núcleos protálicos também são liberados do corpo do pólen, avançando pelo tubo polínico, todavia em nosso estudo a célula estéril (núcleo) não foi identificada. Em *Agathis australis* a célula estéril não foi observada no tubo polínico (OWENS *et al.*, 1995b). Provavelmente tal fato se deve a sua morfologia muito similar aos núcleos protálicos.

Como observado em diversos estudos, o tubo polínico parece apresentar uma ramificação principal, na qual estão presentes a célula do tubo e a célula generativa, podendo haver também alguns núcleos protálicos, responsáveis pelo transporte dos gametas até a oosfera (RUDALL; BATEMAN, 2007; OWENS; BRUNS, 2000). As ramificações do tubo, as quais comportam essencialmente núcleos protálicos, possuem a função de nutrição do tubo durante o longo tempo em que esse permanece dentro do nucelo. Assim, a grande quantidade de núcleos protálicos no pólen, provavelmente, desempenha um papel importante durante a germinação do tubo polínico, coordenando suas ramificações (OWENS *et al.*, 1995b). De maneira contrária ao pólen de Araucariaceae e Podocarpaceae, o pólen de *Pinus monticola* possui apenas dois núcleos protálicos e o tubo polínico não se ramifica durante a germinação. Nessa espécie, os núcleos protálicos permanecem no interior do grão de pólen durante a germinação (OWENS; BRUNS, 2000) já que esses não desempenham a função de coordenação no tubo polínico.

De acordo com Owens *et al.* (1995b) os núcleos protálicos que avançam o tubo polínico em *Agathis australis* não são na realidade núcleos livres, como descritos por Singh (1978),

mas sim células protálicas, pois esses permanecem apresentando um denso citoplasma ao seu redor. Em Pinaceae não ocorre a presença de paredes celulares envolvendo as núcleos protálicos, apenas membranas, que, depois de um tempo, são perdidas, ficando inseridas no citoplasma da célula do tubo (FERNANDO; LAZZARO; OWENS, 2005). Em *A. angustifolia* a única evidencia de paredes celulares envolvendo as células protálicas foi a observação de paredes calósicas no início da gametogênese. No entanto, para o detalhamento dessa estrutura é necessário seu estudo a partir de técnicas específicas.

Wang, Su e Fernando (2008) descrevem que em *Taxus yunnanensis*, a célula anteridial e a célula do tubo se mantêm ligadas por conexões citoplasmáticas. Esses autores ainda descrevem que depois da divisão da célula anteridial, a célula generativa ocupa posição central entre a célula estéril e o núcleo do tubo, observando-se que, ao longo do desenvolvimento, a célula generativa apresenta expressivo aumento de volume, e a célula estéril e o núcleo do tubo apresentam decréscimos consideráveis em seus volumes. Wang, Su e Fernando (2008) sugerem que constituintes do núcleo estéril e do núcleo do tubo são utilizados pelo núcleo generativo.

Embora a existência do grande número de núcleos protálicos no pólen de *A. angustifolia* a coloque em uma posição basal dentro do grupo, a ausência da gota de polinização, caráter considerado derivado, pode estar associada a um caso extremo de sifonogamia em gimnospermas (OWENS; TAKASO; RUNIONS, 1998). Além disso, a ausência de sacos aéreos não diminui a eficiência da dispersão do pólen de Araucariaceae, já que a principal função dessas estruturas é fazer flutuar o pólen na gota de polinização, de rudimentos seminiais invertidos, visando alcançar o nucelo (OWENS; TAKASO; RUNIONS, 1998).

6.7 O PÓLEN NO ESTRÓBILO GINOSPORANGIADO E O GINÓFITO

Da mesma forma que evidenciado em *A. angustifolia*, em *Aghatis australis* se observa que o ginófito permanece em fase de núcleos livres cerca de 5 à 8 meses e cerca de 10 meses depois da polinização essa estrutura já está completamente formada (OWENS *et al.*, 1995a).

Owens e Bruns (2000) também relatam o fato do tubo polínico avançar a cavidade nucelar antes da maturidade do ginófito, assim como em *Podocarpus totara* em que os arquegônios se encontram maduros apenas em dezembro do ano seguinte à polinização. (WILSON; OWENS, 1999b). Segundo Haines *et al.* (1984), *A. angustifolia* se diferencia de outras espécies do mesmo gênero por não apresentar rudimentos seminiais no momento da

polinização. Entretanto, como foi observado em nosso estudo, no momento da polinização os rudimentos seminiais já estão presentes, embora o ginófito não se encontre totalmente desenvolvido. A falha de interpretação desses autores se deve ao fato de não ter sido realizado um estudo anatômico, e as observações terem sido apenas da morfologia externa do estróbilo, cujas dimensões são extremamente reduzidas no momento da polinização.

As células do nucelo de *A. angustifolia* possuem reservas em seu citoplasma que são utilizadas pelo tubo polínico à medida que esse avança em seu interior. Dessa forma, a região, com amido no nucelo, determina a rota que o tubo polínico vai tomar para alcançar os arquegônios de forma análoga ao tecido de transmissão em angiospermas.

Em *Pinus densiflora* o nucelo atua como um tecido de transmissão sendo tal processo desenvolvido por morte celular programada (PCD) em células desse tecido. Nessa espécie uma grande quantidade de vesículas e materiais amorfos são liberados das células em PCD e se direcionando ao tubo polínico onde são absorvidas por endocitose (OWENS *et al.*, 2010). De acordo com Owens *et al.* (2010), a síntese de amido em uma extensa região do nucelo ocorre estimulada pela polinização, mas assim que o tubo polínico penetra no nucelo, os grãos de amido vão sendo degradados nessas células.

Outra região nucelar, que apresenta quantidade de amido expressiva, é a zona ao redor do ginófito. Singh (1978) chama essa região de tecido esponjoso ou tapete e o descreve como um tecido composto por uma ou muitas camadas celulares que se desenvolvem a partir das células esporogênicas que não originaram células-mãe de ginósporos. Esse tecido possui função nutritiva e se torna cada vez mais conspícuo. Burlingame (1914) também observa a presença desse tecido em *A. angustifolia*, descrevendo que à medida que o ginófito se desenvolve, as células do tecido esponjoso iniciam o processo de degradação para suprir nutricionalmente o ginófito.

A presença de arquegônios é uma característica constante em todas as gimnospermas (SINGH, 1978). Entretanto, o número de arquegônios varia amplamente entre os grupos, apresentando um, dois, ou vários arquegônios, como é o caso de Araucariaceae e Podocarpaceae, sendo que nessas pode chegar a vinte e cinco arquegônios.

Segundo Burlingame (1914), a grande dimensão do ginófito de *A. angustifolia* a coloca em posição basal com relação às demais gimnospermas, já que estruturas com dimensões similares ocorrem apenas em Cycales e Ginkgoales. Todavia, a descoberta da presença de

dois arquegônios em ginófito de coníferas no Paleozóico indica que o aumento no número de arquegônios em coníferas é uma condição derivada (FLORIN, 1953).

Da mesma forma que observado neste trabalho, Burlingame (1914) relata a presença de uma grande quantidade de arquegônios em *A. angustifolia*, descrevendo de seis a quinze arquegônios por rudimento seminal. A autora ainda observa que normalmente esses não se encontram na mesma fase de desenvolvimento. Entretanto, no presente estudo, foi constatado que arquegônios de um mesmo rudimento seminal encontravam-se sempre no mesmo estágio de desenvolvimento, diferindo apenas quando comparados a outros rudimentos seminais de um mesmo estróbilo.

Certos estudos ainda relatam as relações entre desenvolvimento do tubo polínico com o desenvolvimento dos arquegônios. Segundo Owens *et al.* (1995a), a formação de arquegônios nos ginófitos ocorre mesmo sem a presença de tubo polínico no rudimento seminal, no entanto os arquegônios param o seu desenvolvimento na etapa de célula central, célula que forma, posteriormente, a célula média e a oosfera. Esses autores descrevem também que não ocorre a divisão da célula generativa até que essa esteja muito próxima aos arquegônios. Assim, tais dados evidenciam que há uma interação entre os tubos polínicos e os arquegônios com um mecanismo de resposta para o completo desenvolvimento das estruturas reprodutivas.

Owens e Bruns (2000) ainda demonstram a que as células do pescoço de arquegônios em *Pinus monticola* liberam secreções citoplasmáticas ao longo da interface, entre protoplasto e parede celular distal, e também na câmara arquegonial, sugerindo que existam substâncias de atração do tubo. Em *Pseudotsuga menziesii*, se observa a ocorrência de secreções produzidas pela oosfera que causam a dissolução da intina externa dos grãos de pólen e, simultaneamente, o desenvolvimento do tubo polínico (TAKASO; OWENS, 1994). Embora não tenha sido analisada uma possível presença de substâncias para atração do tubo polínico em *A. angustifolia*, observa-se a existência de uma expressiva quantidade de amido nas células do pescoço de arquegônios maduros, podendo estar envolvidos com a penetração do tubo nos arquegônios.

Corroborando nossos dados, Burlingame (1915) descreve que os gametas de *A. angustifolia* não são organizados em células definidas. Hodcent (1968) descreve a ocorrência de dois gametas de iguais dimensões, cerca de 35 µm, e formato piriforme em *Araucaria araucana*. No entanto, Owens *et al.* (1995b) relatam que os gametas de *A. australis* são

grandes, cerca de 20 μm , e que no processo de sua formação acabam por incorporar grande parte do citoplasma da antiga célula generativa. Esse autor também descreve que os gametas de *Araucariaceae* possuem iguais dimensões e que não foi observada a presença de membrana delimitando os dois gametas.

Singh (1978) relata que a célula generativa pode dar origem a três tipos de gametas em gimnospermas: gametas ciliados, células gaméticas e núcleos gaméticos. De acordo com esse autor o núcleo dos gametas são sempre pequenos no início de seu desenvolvimento, mas, ao longo do amadurecimento, eles se tornam grandes e proeminentes. Dessa forma o fato dos gametas encontrados em nosso estudo possuírem dimensões significativamente menores que a encontrada em *A. australis* pode estar relacionado a diferenças no tempo de maturação.

No momento da descarga do tubo polínico no arquegônio, não se identifica a oosfera, observando-se apenas uma grande quantidade de vacúolos, rodeando uma região de “fragmentos nucleares”. Tal fato pode estar relacionado com alguns aspectos observados nos estudos descritos a seguir. Burlingame (1915) descreve que a descarga dos gametas no arquegônio, em *A. angustifolia*, ocorre de maneira violenta, de tal sorte que acaba deslocando o núcleo oosférico para a posição calazal do arquegônio. Owens *et al.* (1995b) relatam que, em arquegônios não-fecundados, a oosfera se estabelece no polo calazal e apresenta uma grande quantidade de vacúolos de diversas dimensões ao seu redor. É possível que cada grupo de autores tenha percebido o evento da fecundação em momentos distintos.

Até o momento, nenhum trabalho efetivamente comprova a cariogamia e como se dá esse processo. Em tese, os "fragmentos nucleares" poderiam constituir uma fase desse processo, merecendo um detalhamento citológico e histoquímico para comprovação.

Portanto, a análise dos gametófitos de *Araucaria* no detalhamento de *A. angustifolia* demonstra diversas características primitivas dentro de coníferas, como a natureza multicelular do andrófito, a existência de um tubo polínico ramificado, a ocorrência de um longo tempo entre polinização e fecundação, e ainda a grande dimensão do ginófito.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo embriológico de *A. angustifolia* demonstrou diversas características inéditas. Ainda, o detalhamento de alguns processos, apresenta extrema relevância para a compreensão da biologia reprodutiva dessa espécie e de coníferas de maneira geral. Essas características são destacadas a seguir.

- Os esporângios de *A. angustifolia* possuem origem dérmica, diferentemente da maioria das gimnospermas;
- os esporângios apresentam inúmeras camadas parietais;
- nos esporângios, o exotécio é responsável pela deiscência;
- as células esporogênicas apresentam reservas energéticas em seu citoplasma desde sua diferenciação. Tais reservas persistem no citoplasma das células-mãe de andrósporos, nos andrósporos e no pólen maduro;
- durante o início da gametogênese as células protálicas são individualizadas por paredes calósicas;
- o gametófito multicelular apresenta-se polarizado mesmo na ausência de paredes celulares calósicas;
- o tubo polínico apresenta inúmeras ramificações. O eixo principal possui “papel sifonogâmico” e as demais ramificações apresentam função haustorial;
- a intina é homogênea, e é constituída por péctinas esterificadas, celulose e polissacarídeos totais;
- os tubos polínicos germinam nas escamas do estróbilos ginospangiados e se direcionam ao eixo do cone para alcançar a região micropilar;
- a presença de grãos de amido nas células do pescoço de arquegônios pode estar envolvida com a atração do grão de pólen para a célula oosférica;
- os gametas masculinos são constituídos por dois núcleos de iguais dimensões.

A partir da análise realizada torna-se evidente a abertura de novas áreas a serem exploradas no intuito de compreender mais profundamente a embriologia de *A. angustifolia*. Os tópicos que merecem um maior detalhamento estão destacados a seguir:

- Determinação da origem de cada estrato parietal dos esporângios de *A.angustifolia*;
- detalhar em microscopia eletrônica de transmissão a natureza dos constituintes do andrófito;
- verificar, em microscopia eletrônica de transmissão, a existência de secreções nas células do pescoço de arquegônios;
- detalhar o processo da cariogamia em microscopia eletrônica de transmissão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, E. Microsporogênese em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **CERES**, v.2, n.12, p. 445-458. 1941.
- ALLEN, G.S. The origin of the microsporangium of *Pseudotsuga*. **Bull. Torrey Bot**, v.73, p. 547-556. 1946.
- ANDERSON, E. D.; OWENS, J. N. Microsporogenesis, Pollination, Pollen Germination and Male Gametophyte Development in *Taxus brevifolia*. **Annals of Botany**, v. 86, n. 5, p. 1033 -1042. 2000.
- ANSELMINI, J.I. **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba - PR**. Tese de dissertação de mestrado em Agronomia, UFPR, Curitiba, Brasil. 2005.
- ANSELMINI, J.I.; ZANETTE, F. Development and Growth Curve of the Pine Cones of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, in the Region of Curitiba – PR. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 665-669. 2008.
- BARSALI, E. Studio Sul Gênero *Araucaria* Juss. **Atti Società Toscana Scienze**, v. 25, p.145-184. 1909.
- BACKES, A. Condicionamento climático e distribuição geográfica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no Brasil. **Pesquisa Botânica**, v. 0, n.39, p. 5-40. 1988.
- BAKER, H.G.; BAKER, Starch in angiosperm pollen grain and its evolutionary significance. **Amer. J. Bot**, v. 66, n. 5, p. 591-600. 1979.
- BIONE, N. C. P.; PAGLIARINI, M. S.; TOLEDO, J. F. F. DE. Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 3, p. 623-631. 2000.

- BRUNSFELD, S. J.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. *et al.* Phylogenetic Relationships Among the Genera of Taxodiaceae and Cupressaceae: Evidence from rbcL Sequences. **Systematic Botany**, v. 19, n. 2, p. 253-262. 1994.
- BURLINGAME, L. L. The Morphology of Araucaria brasiliensis. I. The Staminate Cone and Male Gametophyte. **Botanical Gazette**, v. 55, n. 2, p. 97-114. 1913.
- BURLINGAME, L. L. The Morphology of Araucaria Brasiliensis. II. The Ovulate Cone and Female Gametophyte. **Botanical Gazette**, v. 57, n. 6, p. 490-508. 1915.
- BURLINGAME, L. L. The Morphology of Araucaria brasiliensis. III. Fertilization, the Embryo, and the Seed. **Botanical Gazette**, v. 59, n. 1, p. 1-39.1915.
- CARLUCCI, M. B.; JARENKOW, J. A.; DUARTE, L. S.; PILLAR, V. P. Conservação da Floresta com Araucaria no Extremo Sul do Brasil. **Natureza & Conservação**, v.9, n. 1, p. 111-114. 2011.
- CARVALHO, P. E. R.. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira**. Brasília: EMBRAPA, CNPF.1994
- CHASE, M. W.; REVEAL, J. L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 122-127. 2009.
- CHAW, S.-M.; PARKINSON, C. L.; CHENG, Y. Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 8, p. 4086 - 4091. 2000.
- CHICHIRICCÒ, G.; PACINI, E. Cupressus arizonica pollen wall zonation and in vitro hydration. **Plant Systematics and Evolution**, v. 270, n. 3-4, p. 231-242. 2007.

- CHICHIRICCÒ, G.; SPANÒ, L.; TORRACA, G.; TARTARINI, A. Hydration, sporoderm breaking and germination of *Cupressus arizonica* pollen. **Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 359-368. 2009.
- DERKSEN, J.; LI, Y.; KNUIMAN, B.; GEURTS, H. The wall of *Pinus sylvestris* L. pollen tubes. **Protoplasma**, v. 208, n. 1-4, p. 26-36. 1999.
- DICKINSON, H. G.; BELL, P. R. The Changes in the Tapetum of *Pinus banksiana* Accompanying Formation and Maturation of the Pollen. **Annals of Botany**, v. 40, n. 5, p. 1101 -1109. 1976.
- DOYLE, J. A. Seed Plant Phylogeny and the Relationships of Gnetales. **International Journal of Plant Sciences**, v. 157, n. 6, p. S3-S39. 1996.
- DOYLE, J. A.; DONOGHUE, M. J. Seed plant phylogeny and the origin of angiosperms: An experimental cladistic approach. **The Botanical Review**, v. 52, n. 4, p. 321-431. 1986.
- ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift** v.39, p.561-564. 1960.
- FARJON, A. **World check list and Bibliography of conifers**.2 ed. England:The Royal Botanic Garden, Kew. 2001.
- FARJON, A. **A natural history of Conifers**. United States of America: Timber Press. 2008.
- FAEGRI, K.; J. IVERSEN. Textbook of pollen analysis. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1964.
- FERNANDO, D. D.; LAZZARO, M. D.; OWENS, J. N. Growth and development of conifer pollen tubes. **Sexual Plant Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 149-162. 2005.

- FERNADO, D.D.; QUINN, C.R.; BRENNER, E.D.; OWENS, J.N. Male Gametophyte Development and Evolution in Extant Gymnosperms. **International Journal of Plant Development Biology**, v.4, n.1, p. 47-63. 2010
- FLORIN, R. The female reproductive organs of Conifers and Taxads. **Hortus Botanicus Bergianus**, p. 367-385. 1953.
- FLORIN, R. The distribution of conifer and taxad genera in time and space. **Acta Horti Bergiana**, v.20, p.121-312. 1963.
- FRANCHI,G.G.; BELLANI, L.; NEPI, M.; PACINI, E. Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution an ecophysiological significance. **Flora**, v.191, p. 143-159.1996.
- FUEYO, G. M. D. Microsporogenesis and microgametogenesis of the Argentinian species of *Podocarpus* (Podocarpaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 122, n. 2, p. 171-182. 1996.
- FUEYO, G.M; CACCAVARI, M.A.; DOME, E.A. Morphology and structure of the pollen cone and pollen grain of the *Araucaria* species from Argentina. **Biocell** 32 (1): 49-60. 2008.
- FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J.; SAMPSON, F. B. Evolution of Microsporogenesis in Angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, v. 163, n. 2, p. 235-260. 2002.
- GABRIEL, B. L. **Biological electron microscopy**. New York : Van Nostrand Reinhold Company. 1982.
- GAHAN, P. B. **Plant Histochemistry and Cytochemistry, An Introduction**, 1st ed. London: U.K. Academic Press.p. 190, 204. 1984.

- GERLACH, D. **Botanische Mikrotechnik: eine Einführung**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 1984.
- GERRITS, P. O.; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v.13, n.2, p.81-85. 1983.
- GERSTERBERGER, P.; LEINS, P. Rasterelektronmikroskopische Untersuchungen an Blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae). Anwendung einer neuen Präparationsmethode. **Berichte der Deutsche Botanische Gesellschaft**. v.91, p. 381-387. 1978.
- GIFFORD, E.M.; FOSTER, A.S. **Morphology and evolution of vascular plants**. 3rded. New York: W. H. Freeman and Company. 1989.
- GUERIN, H. P.; DELAVEAU, P. G.; PARIS, R. R. Localisations histochimiques. II: Procédés de pigments flavoniques. Application à quelques Phanérogames. **Bulletin de la Societe Botanique de France**, v.118, p. 29-36. 1971.
- GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: Um guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana**. Ribeirão Preto, SP : Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto. 2002.
- HAINES, R.J.; PRAKASH, N. Proembryo Development and Suspensor Elongation in *Araucaria* Juss. **Australian Journal of Botany**, v.28, p. 511-22. 1980.
- HAINES, R.J. Embryo development and Anatomy in *Araucaria* Juss. **Australian Journal of Botany**, v.31, p.125-40. 1983.
- HAINES, R.J. Seed Development in *Araucaria* Juss. **Australian Journal of Botany**, v.31, p.255-67. 1983.

- HAINES, R.J.; PRAKASH, N.; NIKLES, D.G. Pollination in *Araucaria* Juss. **Australian Journal of Botany**, v. 32, p. 583-94. 1984.
- HAJIBABAEI, M.; XIA, J.; DROUIN, G. Seed plant phylogeny: Gnetophytes are derived conifers and a sister group to Pinaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 1, p. 208-217. 2006.
- HAYAT, M. A. **Stains and cytochemical methods**. New York: Springer, 1993.
- HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y. **Structural and functional variation in pollen intine**. In: Blackmore S., Barnes S. H. (eds.) Pollen and spores. Patterns of diversification. Clarendon Press, Oxford, p. 331-343. 1991.
- HESLOP-HARRISON, J. Cytoplasmic Connexions between Angiosperm Meiocytes. **Annals of Botany**, v. 30, n. 2, p. 221 -222. 1966.
- HIRATSUKA, R.; TERASAKA, O. Pollen tube reuses intracellular components of nucellar cells undergoing programmed cell death in *Pinus densiflora*. **Protoplasma**, v. 248, n. 2, p. 339-351. 2010.
- HODCENT, E. Étude cytologique de la formation des grains de pollen a partir de leurs cellules meres chez *Araucaria columnaris* (Forster). **C. R. Acad. Sc. Paris**, v. 257, p. 489- 492. 1963.
- HODCENT, E. Recherches cytologiques sur les grains de pollen de *Podocarpus nagi*, *Araucaria columnaris* et *A. araucana*. **Ann. Univ. A.R.E.R.S. (Reims)**, v.3, p. 14-23. 1965a.
- HODCENT, E. Les envelope polliniques chez *Araucaria columnaris*. **Bull. Soc. Bot. France**, v.112, p.121-127. 1965b.

- HODCENT, E. Evolution du tube pollinique jusqu` à la formation des deux noyaux spermatiques chez l' *Araucaria araucana*. **C. R. Acad. Sci. (Paris)**, v. 266, p. 878-881. 1968.
- HUECK, K. **As florestas da América do Sul**. São Paulo: Polígono. 1972.
- HUGHES, I.; MCCULY, M, E. Use of an optical brightener in study of plant structure. **Stain Technology**, v.50, n. 5, p. 319-329. 1975.
- JARENKOW, J. A. & WAECHTER, J. L. 2001. Composição, estrutura e relações florísticas do componente arbóreo de uma floresta estacional no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista brasileira de Botânica**, v. 24, n. 3, p. 263-272.
- JENSEN, W. A. **Botanical Histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman. 1962.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill. 1940.
- JOHRI, B. M. **Embryology of angiosperms**. Springer-Verlag, 1984.
- JOHRI, B. M. 1936. Contribution to the life history of *Cedrus deodara* LOUD. In. The development of the pollen grains. **Plant sciences**. 3 (3): 246-257.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2009. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed.
- KENG, H. On the family Phyllocladaceae. **Taiwania**, v.18, p. 142-145. 1973.
- KERSHAW, P.; WAGSTAFF, B. The southern conifer family Araucariaceae: History, Status, and Value for Paleoenvironmental Reconstruction. **Annu. Rev. Ecol. Syst**, v. 32, p.397-414. 2001.

- KNAPP, M.; MUDALIAR, R.; HAVELL, D.; WAGSTAFF, S.J.; LOCKHART, P.J. The Drowning of New Zealand and the Problem of Agathis. **Syst. Biol.**, v. 56, n.5, p.862-870. 2007.
- KOCH, Z. & CORRÊA, M. C. **Araucária: A Floresta do Brasil Meridional**. Curitiba: Olhar Brasileiro. 2002.
- KÖPPEL, W. Versuch einer Klassifikation der Klimate, vorzugsweise nach ihren Beziehungen zur Pflanzenwelt. **Geogr. Zeitschr**, v. 6, p. 593–611, 657–679. 1900.
- KUNZMANN, L. Araucariaceae (Pinopsida): Aspects in palaeobiogeography and palaeobiodiversity in the Mesozoic. **Zoologischer Anzeiger**, v. 246, p. 257–277. 2007.
- KURMANN, M.H. Exine stratification in extant gymnosperms: a review of published transmission electron micrographs. *Kew bulletin*, v. 47, n. 1, p. 25-39. 1991.
- KUROIWA, T.; SUZUKI. An improved method for the demonstration of the in situ chloroplast nuclei in higher plants. **Cell Struct Funct**, v. 5, p. 195-197. 1980.
- KUSUMI, J.; TSUMURA, Y.; YOSHIMARU, H.; TACHIDA, H. Phylogenetic Relationships in Taxodiaceae and Cupressaceae Sensu Stricto Based on matK Gene, chlL Gene, trnL-trnF IGS Region, and trnL Intron Sequences. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 10, p. 1480-1488. 2000.
- LAZZARO, M. D.; DONOHUE, J. M.; SOODAVAR, F. M. Disruption of cellulose synthesis by isoxaben causes tip swelling and disorganizes cortical microtubules in elongating conifer pollen tubes. **Protoplasma**, v. 220, n. 3-4, p. 201-207. 2003.
- LILLIE, R. D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3^a ed. New York: McGraw-Hill Co. 1965.

- LIU, N.; ZHU, Y.; WEI, ZX., CHEN, J.; WANG, QB.; JIAN, SG.; ZHOU, DW.; SHI, J.; YANG, Y.; ZHONG, Y. Phylogenetic relationships and divergence times of the family Araucariaceae based on the DNA sequences of eight genes. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, n.15, p.2648—2655. 2009.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa – SP: Editora Plantarum. 1992.
- LÜ, S.; LI, Y.; CHEN, Z.; LIN, J. Pollen development in *Picea asperata* MAST. **Flora**, v.198, p.112-117. 2003.
- MACHADO, S.A.; SIQUEIRA, J.D.P. Distribuição natural de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE. In: **Problemas Florestais do gênero Araucaria**. Curitiba: Public. Fundação de Pesquisa Florestais do Paraná (FUPGF). 1980.
- MAGALLÓN, S.; SANDERSON, M. J. Relationships among seed plants inferred from highly conserved genes: sorting conflicting phylogenetic signals among ancient lineages. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 12, p. 1991 -2006. 2002.
- MAHASHWARI, K. Contribution to the morphology of *Ephedra foliata*. BOISS. I. The developments of the male and female gametophytes. **Proc. Indian Acad. Sci.**,v. 1b. p. 586-606. 1935.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n. 4, p. 787-796. 2004.
- MARCHIORI, J.R. **Dendrologia das Gimnospermas**. Santa Maria: Ed. UFSM. 1996.
- MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technol**, v. 34, p. 125-128. 1959.

- MATTOS, J.R. **O pinheiro brasileiro**. São Paulo: Grêmio Politécnico. 1972.
- MATHEWS, S. Phylogenetic relationships among seed plants: Persistent questions and the limits of molecular data. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 1, p. 228 -236. 2009.
- McDOWELL, E. M.; TRUMP, B. R. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory of Medicine**, v. 1000, p. 405-414. 1976.
- MEDEIROS, J.D.; SAVI, M. ;BRITO, F.A. Seleção de áreas para criação de Unidades de Conservação na Floresta Ombrófila Mista. **Biotemas**, v.18, n. 2, p33-50. 2005.
- MILLER, C. N. Mesozoic conifers. **Botanical Review**, v. 43, p. 217–280. 1977.
- MOGAMI, N.; NAKAMURA, S.; NAKAMURA, N. Immunolocalization of the cell wall components in *Pinus densiflora* pollen. **Protoplasma**, v. 206, n. 1-3, p. 1-10. 1999.
- MOITRA, A.; BHATNAGAR, S. P. Ultrastructure, cytochemical, and histochemical studies on pollen and male gamete development in gymnosperms. **Gamete Research**, v. 5, n. 1, p. 71-112. 1982.
- MOURA, V.P.G. Capões remanescentes de *Araucária angustifolia* (Bert.) O. Ktze, entre 19° e 20° de latitude nas proximidades do Rio Doce, MG. **Brasil Florestal**, v. 23, p.22-28. 1975.
- NARVAES, S.I.; LONGHI, S.J.; BRENA, D.A. Estrutura da regeneração natural em Floresta Ombrófila Mista na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS. **Ciência Florestal**, v.5, n. 4, p.331-342. 2005.
- NEPI, M.; G.G. FRANCHI. Cytochemistry of mature angiosperm pollen. **Plant Systematic and Evolution**, v. 222, p. 45-62. 2000.

- NIKLAS, K. J.; U, K.T.P. Pollination and Airflow Patterns Around Conifer Ovulate Cones. **Science**, v. 217, p. 442-444. 1982.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termacarphi Pty. 1981.
- OHSAWA, T.; NISHIDA, H.; NISHIDA M. *Yezonia*, a new section of *Araucaria* (Araucariaceae) based on permineralized vegetative and reproductive organs of *A. vulgaris* comb. nov. from the upper cretaceous of Hokkaido, Japan. **Journal of plant research**, v. 108, n. 1, p.25-39. 1995.
- OLIVEIRA, B. As regiões de ocorrência normal de *Araucaria aungustifolia*. **An. Bras Econ. Flor**, v.1, n.1, p. 185-199. 1948.
- OWENS, J. N.; BRUNS, D. Western white pine (*Pinus monticola* Dougl.) reproduction: I. Gametophyte development. **Sexual Plant Reproduction**, v. 13, n. 2, p. 61-74. 2000.
- OWENS, J. N.; CATALANO, G. L.; MORRIS, S. J.; AITKEN-CHRISTIE, J. The Reproductive Biology of Kauri (*Agathis australis*). I. Pollination and Prefertilization Development. **International Journal of Plant Sciences**, v. 156, n. 3, p. 257-269. 1995.
- OWENS, J. N.; CATALANO, G. L.; MORRIS, S. J.; AITKEN-CHRISTIE, J. The Reproductive Biology of Kauri (*Agathis australis*). II. Male Gametes, Fertilization, and Cytoplasmic Inheritance. **International Journal of Plant Sciences**, v. 156, n. 4, p. 404-416. 1995.
- OWENS, J. N.; TAKASO, T.; RUNIONS, C. J. Pollination in conifers. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 12, p. 479-485. 1998.
- PACINI, E. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. **Sexual Plant Reproduction**, v. 9, p. 362-366. 1996.

- PACINI, E.; FRANCHI, G.G.; HESSE, M. The tapetum: Its form, function, and Possible Phylogeny in *Embryophyta*. **Plant Systematic and Evolution**, v. 149, p. 155-185. 1984.
- PACINI, E.; FRANCHI, G.G. Diversification and evolution of the tapetum. In BLACKMORE, S., BARNES, S.H. **Polen and Spore - Patterns of diversification**. Oxford: Systematic Association, Clarendon Press. p.301-316. 1991.
- PACINI, E.; FRANCHI, G.G. Role of tapetum in pollen and spore dispersal. **Pl. Syst. Evol.**, v.7, n.1, p. 1-11. 1993.
- PACINI, E.; FRANCHI, G. G.; RIPACCIOLI, M. Ripe pollen structure and histochemistry of some gymnosperms. **Plant Systematics and Evolution**, v. 217, n. 1-2, p. 81-99. 1999.
- PACINI, E.; GUARNIERI, M.; NEPI, M. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. **Protoplasma**, v. 228, n. 1-3, p. 73-77. 2006.
- PAGE, C. N. Gymnosperms: Coniferophytina (Conifers e Gokgoids). In: K.U. KRAMER, K.U.; GREEN, P.S. **The families and genera of vascular plants. Vol.1: Pteridophytes and Gymnosperms**. Berlin, Heidelberg: KUBITZKI, K. 1990.
- PENNELL, R. I.; BELL, P. R. Microsporogenesis in *Taxus baccata* L.: The Formation of the Tetrad and Development of the Microspores. **Annals of Botany**, v. 57, n. 4, p. 545 - 555. 1986.
- QUINN, C.J. The Phyllocladaceae Keng. A Critique. **Taxon**, v. 36, n.3, p.559-565. 1987.
- RADAMBRASIL – MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA/ DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. Projeto Radambrasil: Levantamento de Recursos Naturais. Folha Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: DNPM/ Projeto RADAMBRASIL, 1984.

- RAI, H. S.; O'BRIEN, H. E.; REEVES, P. A. Inference of higher-order relationships in the cycads from a large chloroplast data set. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 2, p. 350-359. 2003.
- RAMBO, B. **A fisionomia do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Selbach. 1956.
- RAN, J.-H.; GAO, H.; WANG, X.-Q. Fast evolution of the retroprocessed mitochondrial rps3 gene in Conifer II and further evidence for the phylogeny of gymnosperms. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 1, p. 136-149. 2010.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Madeiras do Brasil: Santa Catarina**. Florianópolis: Editora Lunardelli. 1979.
- RIO GRANDE DO SUL. 2003. **Decreto Estadual N° 42. 099, de 31 de dezembro de 2002**. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 01 de janeiro de 2003.
- RISUEÑO, M.C.; GIMENEZ-MARTIN, G.; LOPEZ-SÁEZ, J.F.; R-GARCIA, M.I. Connection Between Meicytes in Plant. **Cytologia**, v. 34, p. 262-272. 1969.
- RUDALL, P. J.; BATEMAN, R. M. Developmental bases for key innovations in the seed-plant microgametophyte. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 7, p. 317-326. 2007.
- SASS, J. E. **Botanical Microtechnique**. Iowa: State University Press. 1951.
- SCHMIDT, M.; SCHNEIDER-POETSCH, H. A. W. The Evolution of Gymnosperms Redrawn by Phytochrome Genes: The Gnetatae Appear at the Base of the Gymnosperms. **Journal of Molecular Evolution**, v. 54, n. 6, p. 715-724. 2002.
- SETOGUCHI, H.; ASAKAWA OSAWA, T.; PINTAUD, J.-C. *et al.* Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. **American Journal of Botany**, v. 85, n. 11, p. 1507 -1516. 1998.

- SHENG, X.; HU, Z.; LÜ, H. Roles of the Ubiquitin/Proteasome Pathway in Pollen Tube Growth with Emphasis on MG132-Induced Alterations in Ultrastructure, Cytoskeleton, and Cell Wall Components. **Plant Physiology**, v. 141, n. 4, p. 1578 -1590. 2006.
- SHIMOYA, C. Nota prévia sobre a formação do arquegônio, fertilização e desenvolvimento do proembrião em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. KTZE. **CERES**, v. 10, p. 286-287. 1958.
- SHIMOYA, C. Contribuição ao estudo do ciclo biológico *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE. **Experientiae, Órgão de Serviço de experimentação e Pesquisa**, v. 2, n. 2, p.516-540. 1962.
- SINGH, V.P. **Gymnosperm (Naked Seeds Plant): Structure and development**. New Dheli, India: Sarup & Sons. 2006.
- SINGH, H. **Embryology of gymnosperms**. Berlin - Stutgard: Gerbrüder Borntraeger, 1978.
- SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; WOLF, P. G. The phylogeny of land plants inferred from 18S rDNA sequences: pushing the limits of rDNA signal? **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 12, p. 1774 -1784.1999.
- SOUTHWORTH, D. Cytochemical reactivity of pollen walls. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 21, n. 1, p. 73-80. 1973.
- SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H. Pollen dispensal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, v.51, p.309-317. 2003.
- STEFANOVIC, S.; JAGER, M.; DEUTSCH, J. Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. **American Journal of Botany**, v. 85, n. 5, p. 688. 1998.

- STEFENON, V.M., NODARI, R.O. AFLP Protocol standardization and its informative capacity to genetic diversity analysis in *Araucaria angustifolia*. **Scientia Florestalis**, v. 64, p. 163-171. 2003.
- STEFENON, V. M.; CAPRESTANO, C. A. Monoicy in *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae): I. Morphological aspects of the reproductive structures. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 4, p. 701-705. 2009.
- STERLING, C. Structure of the male gametophyte in Gymnosperms. **Biology Reviews**, v.38, p.167-203. 1963.
- STOKEY, R.A. The Araucariaceae: an evolutionary perspective. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 37, p. 133–154. 1982.
- TAKASO, T.; OWENS, J. N. Effects of Ovular Secretions on Pollen in *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae). **American Journal of Botany**, v. 81, n. 4, p. 504-513. 1994.
- TOMLINSON, P. B.; BRAGGINS, J. E.; RATTENBURY, J. A. Contrasted pollen capture mechanisms in Phyllocladaceae and certain Podocarpaceae (Coniferales). **American Journal of Botany**, v. 84, n. 2, p. 214-214. 1997.
- TSUMURA, Y.; YOSHIMURA, K.; TOMARU, N.; OHBA, K. Molecular phytoeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 8. 1995.
- VASIL, I. K.; ALDRICH, H. C. A histochemical and ultrastructural study of the ontogeny and differentiation of pollen in *Podocarpus macrophyllus* D. Don. **Protoplasma**, v. 71, n. 1-2, p. 1-37. 1970.
- WANG, B.-Y.; SU, J.-R.; FERNANDO, D. D. Development of the male reproductive structures in *Taxus yunnanensis*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 276, n. 1-2, p. 51-58. 2008.

- WILDE, M.H.; EAMES, A.J. The Ovule and 'Seed' of *Araucaria Bidwilli* with Discussion of the Taxonomy of the Genus II. Taxonomy. **Annals of botany**, v. 16, n.1, p. 28-49. 1952.
- WILLIAMS, C. G. **Conifers Reproductive biology**. London - New York: Springer. 2009.
- WILSON, V. R.; OWENS, J. N. The Reproductive Biology of Totara (*Podocarpus totara*)(Podocarpaceae). **Annals of Botany**, v. 83, n. 4, p. 401 -411. 1999.
- YATOMI, R.; NAKAMURA, S.; NAKAMURA, N. Immunochemical and cytochemical detection of wall components of germinated pollen of gymnosperms. **Grana**, v. 41, n. 1, p. 21-28, 2002.