

Desenvolvimento de óvulo, fruto e semente de espécies de Poaceae (Poales)¹

ADRIANA TIEMI NAKAMURA^{2,4}, HILDA MARIA LONGHI-WAGNER³ e VERA LUCIA SCATENA²

(recebido: 20 de dezembro de 2007; aceito: 20 de janeiro de 2009)

ABSTRACT – (Ovule, fruit and seed development in species of Poaceae (Poales)). We selected *Olyra humilis* Nees and *Sucrea monophylla* Soderstr. (Bambusoideae), *Axonopus aureus* P. Beauv. and *Paspalum polyphyllum* Nees ex Trin. (Panicoideae), *Chloris elata* Desv. and *Eragrostis solida* Nees (Chloridoideae) to study their ovule, fruit and seed development in order to characterize the embryology of these subfamilies within Poaceae. Like other Poaceae that have already been studied, these species present bitegmic ovule, micropyle formed by the inner integument, megagametophyte of the *Polygonum* type, starchy nuclear endosperm, and lateral, developed embryo. In specimens of Bambusoideae and Panicoideae, the ovule is hemianatropous and pseudocrassinucellate, whereas in Chloridoideae, it is campylotropous and tenuinucellate. The outer integument is restricted to the ovule base in Bambusoideae; it reaches up to one third of the nucellus in Panicoideae and extends to the micropyle in Chloridoideae. *O. humilis* and *S. monophylla* (Bambusoideae) present a more developed nucellus than the other species studied here. Each subfamily varies with regard to its mature caryopsis type. In Bambusoideae, the fruit has a phenolic endocarp and ategmic seeds; Panicoideae have compressed, adnate pericarp and tegmen; Chloridoideae present a free exocarp and a phenolic endotegmen. The overall features are diagnostic for the Poaceae subfamilies studied here.

Key words - Bambusoideae, Chloridoideae, embryology, Panicoideae

RESUMO – (Desenvolvimento do óvulo, fruto e semente de espécies de Poaceae (Poales)). O desenvolvimento de óvulo, fruto e semente de *Olyra humilis* Nees e *Sucrea monophylla* Soderstr. (Bambusoideae), *Axonopus aureus* P. Beauv. e *Paspalum polyphyllum* Nees ex Trin. (Panicoideae), *Chloris elata* Desv. e *Eragrostis solida* Nees (Chloridoideae) foram estudados visando à caracterização embriológica dessas subfamílias de Poaceae. As espécies apresentam óvulo bitegumentado, micrópila formada pelo tegumento interno, megagametófito tipo *Polygonum*, endosperma nuclear e amiláceo, embrião lateral e desenvolvido, caracteres comuns às demais espécies de Poaceae já estudadas. Destacam-se diferenças como: óvulo hemianátropo e pseudocrassinucelado nas espécies de Bambusoideae e Panicoideae, campilótropo e tenuinucelado, nas de Chloridoideae; tegumento externo restrito à base do óvulo em Bambusoideae, até um terço do nucelo em Panicoideae e próximo à região micropilar em Chloridoideae. *O. humilis* e *S. monophylla* (Bambusoideae) apresentam maior desenvolvimento do nucelo do que as demais espécies. A variação no tipo de cariopse separa as subfamílias de Poaceae estudadas, pois Bambusoideae apresenta endocarpo fenólico e semente ategumentada; Panicoideae apresenta pericarpo comprimido e adnato ao tégmen; e Chloridoideae apresenta exocarpo livre e endotégmen fenólico. Esses caracteres são diagnósticos para as subfamílias de Poaceae estudadas.

Palavras-chave - Bambusoideae, Chloridoideae, embriologia, Panicoideae

Introdução

Poaceae é uma família monofilética e apresenta características únicas, como fruto do tipo cariopse e embrião lateral bem diferenciado, combinação única entre as monocotiledôneas (GPWG 2001). Os caracteres

morfológicos e anatômicos têm contribuído para a elucidação das relações taxonômicas entre as categorias infra-familiares em Poaceae (GPWG 2001), auxiliando estudos filogenéticos de Poales (APG II 2003, Soltis *et al.* 2005). A importância econômica e ecológica de Poaceae contribuíram para que esta seja uma das famílias de Angiospermas mais conhecidas e estudadas.

Estudos em Poaceae demonstraram que caracteres relacionados ao desenvolvimento do óvulo e do fruto podem ser diagnósticos para as subfamílias (Bhanwra 1988). A morfologia da cariopse apresentou diferenças significativas entre as espécies de Chloridoideae e foi utilizada para caracterizar gêneros e espécies (Liu *et al.* 2005). Além disso, estudos anteriores utilizaram dados morfológicos da cariopse para resolver problemas

1. Parte da tese de doutorado do primeiro autor, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Rio Claro.
2. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Avenida 24-A, 1515, Bela Vista, 13506-900 Rio Claro, SP, Brasil.
3. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, Agronomia, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil.
4. Autor para correspondência: tieminak@yahoo.com.br

taxonômicos infra-familiares (Barthlott 1981, Terrell & Peterson 1993).

Representantes de Poaceae, em geral, apresentam fruto do tipo cariopse (GPWG 2001). Para espécies de Bambusoideae, foram relatados diversos tipos carpológicos (Filgueiras 1986), desde frutos secos até carnosos (Dahlgren *et al.* 1985). Frutos carnosos foram considerados basais por Holtum (1956) e, por outro lado, especializados por Hari Gopal & Mohan Ram (1987). Bambusoideae *sensu lato* já foi considerada grupo basal em Poaceae e sua circunscrição foi alterada pelos estudos do GPWG (2001), com a separação de alguns gêneros nele inclusos e elevados à categoria de subfamília: Anomochlooideae, Pharioideae e Puelioideae. Atualmente Anomochlooideae é considerada basal de Poaceae e apresenta frutos do tipo cariopse (GPWG 2001).

Poaceae apresenta 13 subfamílias (Sánchez-Ken *et al.* 2007), porém neste trabalho foram selecionadas espécies de Bambusoideae, Chloridoideae e Panicoideae, grupos filogeneticamente distintos, com o objetivo de verificar se existem diferenças embriológicas. Neste contexto, Bambusoideae foi considerada basal, Panicoideae intermediária e Chloridoideae derivada (GPWG 2001).

A fim de verificar a existência de padrões embriológicos em Poaceae e de estabelecer características diagnósticas para as três subfamílias citadas, são analisados o desenvolvimento do óvulo, fruto e semente de *Olyra humilis* Nees, *Sucrea monophylla* Soderstr. (Bambusoideae – Olyreae), *Axonopus aureus* P. Beauv., *Paspalum polyphyllum* Nees ex Trin. (Panicoideae – Paniceae), *Eragrostis solida* Nees (Chloridoideae – Eragrostidae) e *Chloris elata* Desv. (Chloridoideae – Cynodonteae).

Material e métodos

Exemplares de cada espécie foram coletados, herborizados e incluídos no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) e no Herbário Rioclarense (HRCB). *Olyra humilis*: BRASIL. RIO GRANDE DO SUL: Morro Reuter, Morro Embratel, 25-IX-2004, H.M. Longhi-Wagner 9258 (ICN); RIO GRANDE DO SUL: Sapiranga, Morro Ferrabraz, 25-IX-2004, H.M. Longhi-Wagner 9259 (ICN). *Sucrea monophylla*: BRASIL. BAHIA: Itapebi, Fazenda Guarani, 12-III-2004, H.M. Longhi-Wagner & R.P. de Oliveira 9332 (ICN). *Axonopus aureus*: BRASIL. SÃO PAULO: Pratânia, Fazenda Palmeira da Serra, 10-II-2005, A.T. Nakamura & C.J. Campos *s.n.* (HRCB 41668); BRASIL. SÃO PAULO: Pedregulho, Estação Ecológica de Furnas do Bom Jesus, 18-IV-2005, A.T. Nakamura & E. Simão *s.n.* (HRCB 41661). *Paspalum polyphyllum*: BRASIL. MINAS GERAIS: Santana do Riacho, Serra do Cipó, 11-V-2003, A.I. Coan *et al.* 8 (HRCB). *Chloris elata*: BRASIL. SÃO PAULO: Franca,

Rodovia Cândido Portinari, km 322, 14-XI-2005, A.T. Nakamura & E. Simão *s.n.* (HRCB 45417). *Eragrostis solida*: BRASIL. SÃO PAULO: Pedregulho, Estação Ecológica de Furnas do Bom Jesus, 18-IV-2005, A.T. Nakamura & E. Simão *s.n.* (HRCB 41667).

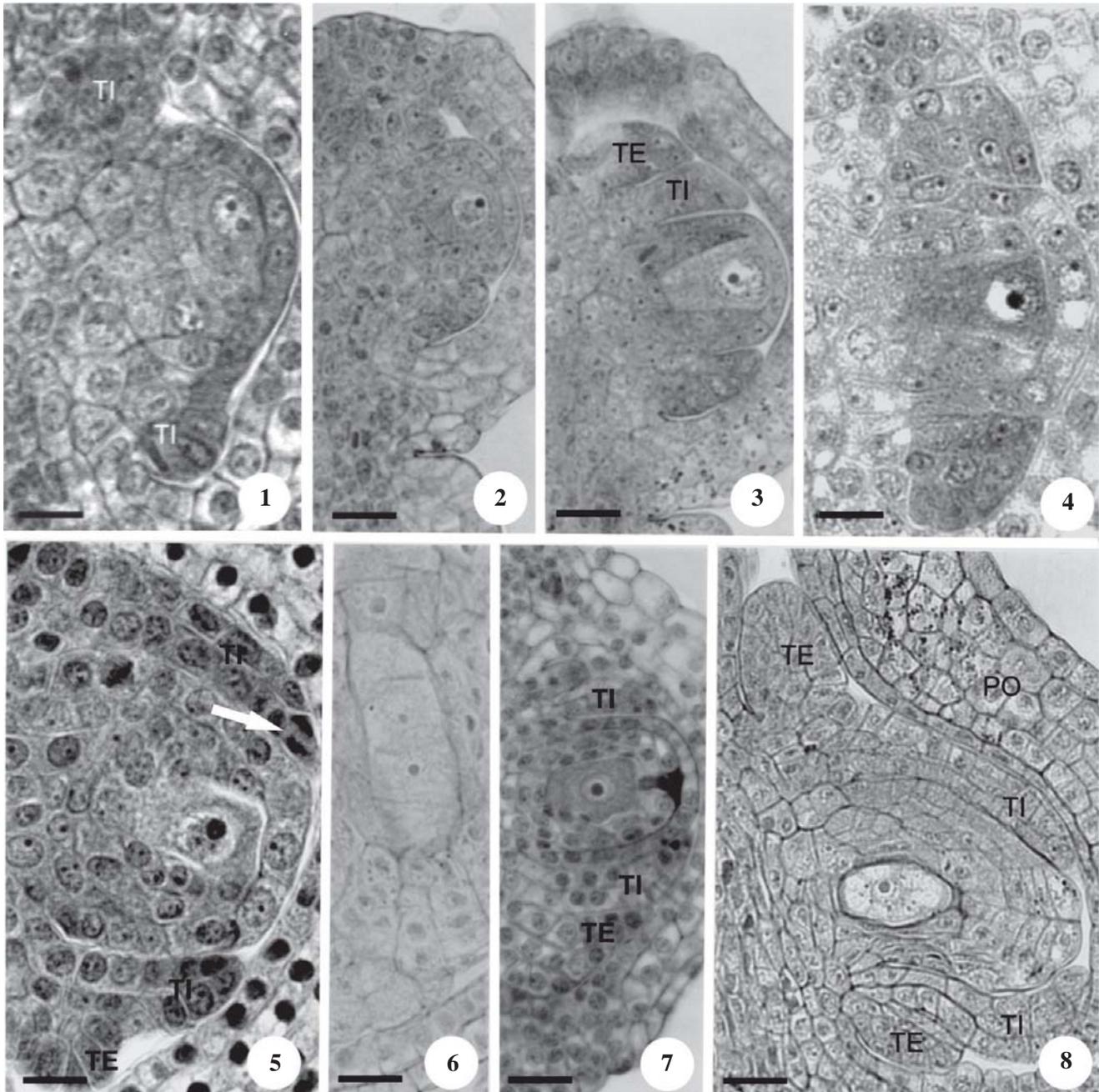
Para este estudo, foram obtidos das espiguetas das espécies selecionadas, carpelos, frutos jovens e maduros, em diversas fases do desenvolvimento. Estes foram fixados em FAA em etanol 50% (Johansen 1940), conservados em etanol 70%, desidratados em série etílica, incluídos em metacrilato Leica® e processados segundo o protocolo do fabricante. O material obtido foi seccionado em micrótomo rotativo Reichert-Jung, modelo 2040, com 4-8 µm de espessura, obtendo-se seções longitudinais e transversais, as quais foram imersas em solução de ácido periódico – reativo de Schiff (PAS) e azul de toluidina, segundo protocolo de Feder & O'Brien (1968), e montadas com Entellan.

As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Olympus, modelo PM-20 e as escalas obtidas nas mesmas condições ópticas.

Resultados

Ontogênese do óvulo (figuras 1-13) – O primórdio do óvulo, nas seis espécies, forma-se a partir de um tecido meristemático bizonado, localizado na região placentária da parede ovariana. Uma única célula arqueosporial, de origem subepidérmica, destaca-se das demais por apresentar tamanho maior e núcleo conspícuo (figuras 1, 2), atuando diretamente como célula-mãe de megásporos (figuras 3-5). Enquanto se estabelece os tegumentos externo e interno, o primórdio se mostra ortótropo (figuras 1-5). O tegumento interno inicia seu desenvolvimento antes do tegumento externo (figuras 1, 2), ambos de origem protodérmica; apresenta duas a três camadas de células (figura 2) que se dividem anticlinalmente e periclinalmente (figura 5) envolvendo o nucelo no final da megasporogênese (figura 8). Na região micropilar, em estádios mais avançados de desenvolvimento, o tegumento interno apresenta uma proliferação celular, formando cerca de três a cinco camadas celulares (figura 9).

O tegumento externo que também possui origem dérmica (figura 5), varia em extensão e não participa da delimitação da micrópila (figuras 9, 10). Em *Olyra humilis* e *Sucrea monophylla* (Bambusoideae), fica restrito à base do óvulo (figuras 8, 9). Em *Axonopus aureus* e *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae), se estende até um terço do nucelo e, na região micropilar, encobre a endóstoma formando uma capa protetora (figura 13). Em *Chloris elata* (figura 11) e *Eragrostis solida* (figura 12) (Chloridoideae), se alonga até próximo da região micropilar, mas não participa de sua formação.



Figuras 1-8. Desenvolvimento do óvulo e megasporogênese de espécies de Poaceae, em secções longitudinais. 1. *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae). 2, 3. *Eragrostis solida* (Chloridoideae). 4. *Axonopus aureus* (Panicoideae). 5. Detalhe dos tegumentos de *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae), evidenciando divisão periclinal de célula do tegumento interno (seta). 6. Tétrades de megásporos em *Sucrea monophylla* (Bambusoideae). 7. Megásporo funcional em *Eragrostis solida* (Chloridoideae). 8. Megásporo funcional de *Olyra humilis* (Bambusoideae). (PO = parede ovariana; TE = tegumento externo; TI = tegumento interno). Barra = 15 μm (1-7), 30 μm (8).

Figures 1-8. Ovule development and megasporogenesis of Poaceae species – longitudinal sections. 1. *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae). 2, 3. *Eragrostis solida* (Chloridoideae). 4. *Axonopus aureus* (Panicoideae). 5. Integuments details of *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae), showing periclinal division of the inner integument cell. 6. Megaspores tetrads of *Sucrea monophylla* (Bambusoideae). 7. Functional megaspore in *Eragrostis solida* (Chloridoideae). 8. Functional megaspore in *Olyra humilis* (Bambusoideae). (PO = ovary wall; TE = outer integument; TI = inner integument). Bar = 15 μm (1-7), 30 μm (8).

No nucelo, a epiderme nucelar que em estádios iniciais do desenvolvimento é unisseriada, torna-se multisseriada devido a sucessivas divisões periclinais, nas espécies de Bambusoideae e Panicoideae, caracterizando o óvulo pseudocrassinucelado (figuras 6, 8, 9, 13). Nas espécies de Chloridoideae, a epiderme

continua unisseriada, sendo o óvulo tenuinucelado (figuras 10-12).

Durante o desenvolvimento, ocorre proliferação das células nucleares na região da anti-rafe provocando a curvatura do óvulo, resultando o tipo hemianátropo em Bambusoideae e Panicoideae; e em *Chloris elata* e *Eragrostis solida* (Chloridoideae) ocorre, além da curvatura gerada pela proliferação desigual do nucelo, a curvatura do gametófito feminino, caracterizando o óvulo campilótropo (figura 12).

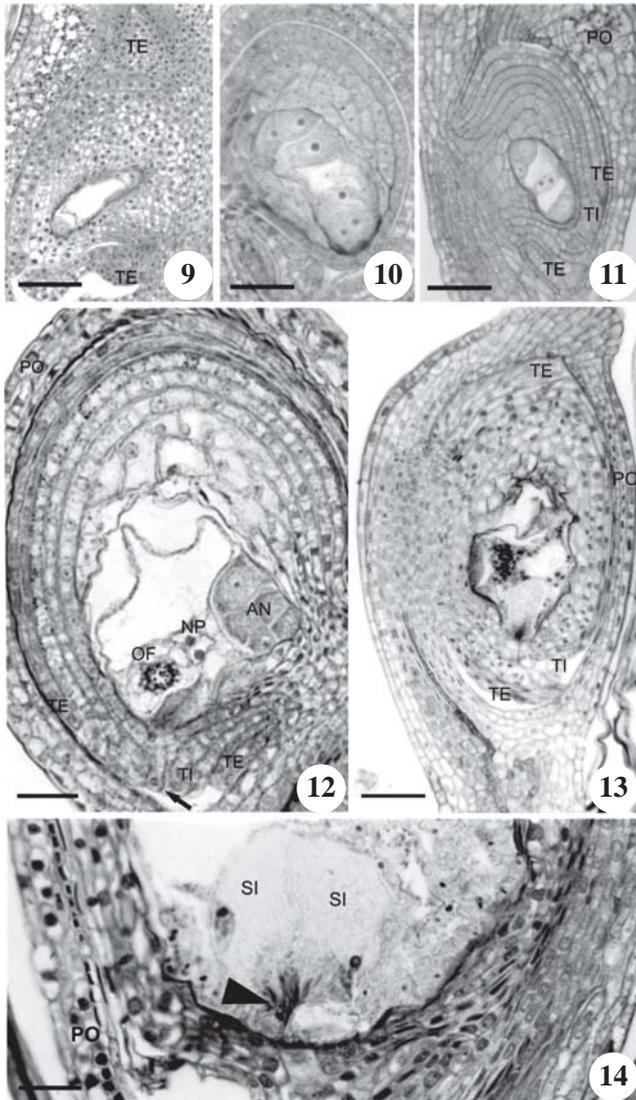
É evidente a diferença em tamanho entre os óvulos das espécies de Bambusoideae e de Panicoideae e Chloridoideae. Esse fato deve-se ao nucelo mais desenvolvido nas primeiras.

Os óvulos formados são bitegumentados, sendo hemianátropo e pseudocrassinucelado em *Olyra humilis*, *Sucrea monophylla* (Bambusoideae), *Axonopus aureus* (figura 13) e *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae) (figura 9), e campilótropo e tenuinucelado em *Chloris elata* e *Eragrostis solida* (Chloridoideae) (figuras 10-12).

Todas as espécies estudadas apresentam ovário súpero bicarpelar e unilocular, com um único óvulo de inserção parietal (figuras 10, 12).

Megasporogênese e megagametogênese (figuras 1-14) – A megasporogênese e megagametogênese são semelhantes entre as espécies estudadas. A célula arquesporial (figuras 1, 2) alonga-se e funciona diretamente como célula-mãe de megásporos (figuras 3-5) que apresenta citoplasma denso e núcleo conspícuo (figuras 3-5). A célula-mãe de megásporos sofre meiose, formando uma tétrade linear (figura 6). Dos quatro megásporos formados, apenas o calazal torna-se funcional, enquanto os demais se desintegram (figura 7). O megásporo funcional, então, devido à formação de vacúolos, aumenta em volume, tendo o seu núcleo posicionado centralmente (figura 8).

O megagametófito desenvolve-se conforme o tipo *Polygonum*. A primeira divisão mitótica do núcleo do megásporo dá origem a dois núcleos, caracterizando o



Figuras 9-14. Megagametogênese em espécies de Poaceae, em secções longitudinais. 9. *Olyra humilis* (Bambusoideae). 10. *Eragrostis solida* (Chloridoideae). 11. *Chloris elata* (Chloridoideae). 12. Óvulo campilótropo e tenuinucelado em *E. solida* (Chloridoideae). 13. Óvulo hemianátropo pseudocrassinucelado de *Axonopus aureus* (Panicoideae). 14. Sinérgides e aparelho filiforme (ponta de seta) em *P. polyphyllum* (Panicoideae). (AN = antípodas; NP = núcleos polares; OF = oosfera; PO = parede ovariana; SI = sinérgide; TE = tegumento externo; TI = tegumento interno; seta = micrópila). Barra = 250 µm (9), 50 µm (10, 11, 13), 25 µm (12, 14).

Figures 9-14. Megagametogenesis in Poaceae species – longitudinal sections. 9. *Olyra humilis* (Bambusoideae). 10. *Eragrostis solida* (Chloridoideae). 11. *Chloris elata* (Chloridoideae). 12. Campylotropous and tenuinucellate ovule in *E. solida* (Chloridoideae). 13. Hemianatropous and crassinucellate ovule in *Axonopus aureus* (Panicoideae). 14. Synergids and filliform apparatus (arrow tip) in *P. polyphyllum* (Panicoideae). (AN = antipodal cells; NP = polar nuclei; OF = egg cell; PO = ovary wall; SI = synergid; TE = outer integument; TI = inner integument; arrow = micropyle). Bar = 250 µm (9), 50 µm (10, 11, 13), 25 µm (12, 14).

estádio de megagametófito binucleado. Um grande vacúolo central se desenvolve e provoca a migração dos dois núcleos para pólos contrários da célula e, da mesma forma, desloca o citoplasma, que se posiciona próximo à periferia (figura 9). Os núcleos do megagametófito sofrem nova mitose, passando para o estágio tetranuclear (figura 9), os núcleos dividem-se novamente, dando origem a oito núcleos, indicando o gametófito octanucleado.

Após a formação dos oito núcleos, dois deles, um do pólo micropilar e outro do calazal (figura 10), migram para a região central e constituem os núcleos polares (figuras 11, 12), os quais, antes da fecundação, fundem-se dando origem ao núcleo secundário conspícuo (figura 27). Para o estabelecimento da oosfera e das sinérgides durante o processo de celularização, os três núcleos micropilares são incorporados individualmente, estabelecendo uma oosfera (figuras 12, 13) e duas sinérgides laterais (figura 14), as quais posicionam-se lateralmente. Com relação às sinérgides, observa-se em sua porção micropilar o aparelho filiforme, que se caracteriza por apresentar projeções de parede para o interior do citoplasma (figura 14). No pólo calazal, ocorre o processo de formação das antípodas, as quais inicialmente incorporam, no processo de celularização, os três núcleos calazais (figuras 10, 11), que, posteriormente, proliferam-se, como visível na figura 12.

Desenvolvimento do fruto e semente (figuras 7-42) – O número de camadas de células da parede ovariana das espécies de Poaceae estudadas pode variar, ao longo do seu eixo longitudinal, mas nunca ocorre menos de quatro camadas de células.

A epiderme externa e interna do ovário é unisseriada, com células de menor tamanho que as do mesofilo (figuras 7, 8). O mesofilo apresenta duas camadas de células em *Eragrostis solida* (Chloridoideae) (figura 12) e em *Axonopus aureus* (figura 13) e *Paspalum polyphyllum* (figura 14) (Panicoideae), não variando ao longo da face dorsal do ovário. Em *Chloris elata* (Chloridoideae) (figura 10) e em *Olyra humilis* e *Sucrea monophylla* (Bambusoideae) (figuras 15, 16), ao longo da face dorsal do ovário, o número de camadas celulares é variável, principalmente na região apical. As células do mesofilo podem apresentar idioblastos fenólicos e grãos de amido, sendo este último mais facilmente observado nas espécies de Chloridoideae (figuras 27, 28).

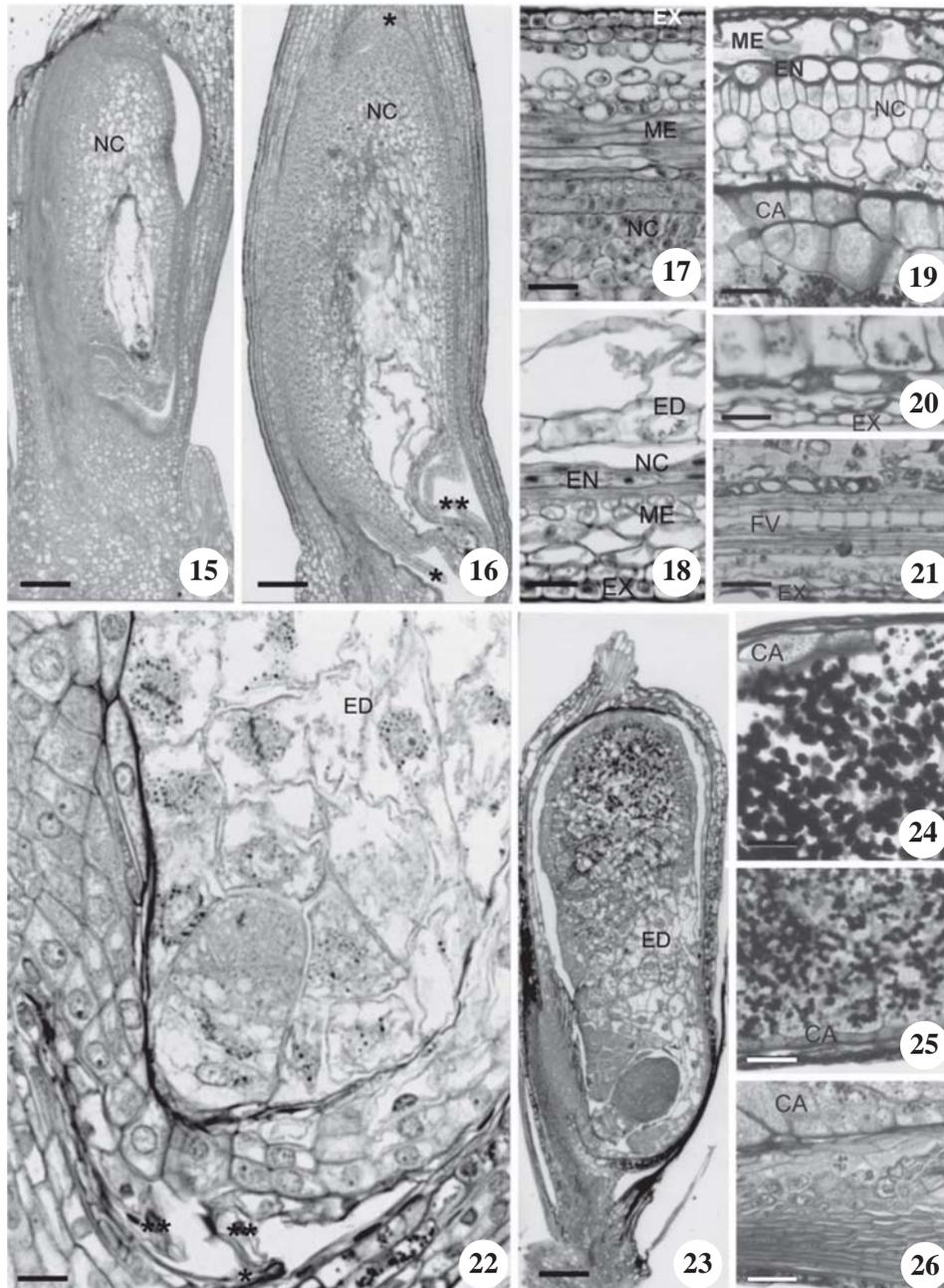
Em *Olyra humilis* e *Sucrea monophylla* (Bambusoideae), o fruto maduro apresenta tamanho maior quando em comparação com as demais espécies, isso se deve ao significativo desenvolvimento da semente (figuras 15, 16). Durante o desenvolvimento, o exocarpo

permanece unisseriado (figuras 17-19, 21); o mesocarpo apresenta espaços intercelulares e o tecido ganha um aspecto esponjoso (figura 17); o endocarpo é unisseriado, com células alongadas tangencialmente (figura 17). Ambos os tegumentos se desintegram. Com relação à epiderme nucelar, esta alonga-se radialmente (figuras 17, 19), exceto na região micropilar (figura 18); já na face dorsal, mostra-se delgada e com menor número de camadas de células do que a região ventral (figuras 18, 20). No fruto maduro, observa-se a persistência do exocarpo, parte do mesocarpo e do endocarpo, estes dois últimos com conteúdo fenólico (figuras 19-21). O mesocarpo, restrito a duas camadas de células frouxamente dispostas, apresenta um vigoroso feixe vascular (figura 21). Na região ventral apical da semente madura, cerca de três a quatro camadas de células do nucelo persistem e formam o perisperma (figura 19).

Em *Axonopus aureus* e *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae) o pericarpo dos frutos jovens se assemelham ao descrito anteriormente para as espécies de Bambusoideae, a exceção da ausência de mesocarpo com aspecto esponjoso (figura 23). No pericarpo da cariopse madura o exocarpo apresenta células com compostos fenólicos; mesocarpo, endocarpo e tégmen com células colapsadas e adnatas (figuras 24, 25), sendo a testa totalmente desintegrada. Porém, na região hilar há persistência de células parenquimáticas do mesocarpo e do tecido vascular (figura 26).

Em *Chloris elata* e *Eragrostis solida* (Chloridoideae) o exocarpo é a única camada do pericarpo que se mantém sendo as demais desintegradas (figura 33), devido à quebra das paredes de suas células. A testa também é desintegrada no processo de ontogênese da semente. Durante o desenvolvimento do fruto, as células das duas camadas do tégmen alongam-se tangencialmente em sua extensão, exceto na região hilar, a qual permanece cubóide (figuras 28, 29). O exotégmen exibe células fortemente reagidas com PAS, devido ao conteúdo péctico presente nas paredes (figura 33) e o endotégmen apresenta células com deposição de compostos fenólicos (figuras 31-33).

Todas as espécies estudadas apresentam semente com embrião lateral (figuras 32, 40-42). O endosperma é do tipo nuclear (figuras 16, 29, 37). Os núcleos livres recém formados ocupam posição periférica na célula primária do endosperma (CPE), devido à presença de um grande vacúolo central. O processo de celularização é centrípeto, ou seja, inicia-se da periferia para a região central da CPE, e após sua conclusão, as células dividem-se em todas as direções (figura 22). Com o cessar da divisão, a camada mais externa forma a camada de



Figuras 15-26. Desenvolvimento do fruto em espécies de Bambusoideae e Panicoideae, em secções longitudinais. 15. Fruto jovem de *Olyra humilis*. 16. Fruto jovem de *Sucrea monophylla*, evidenciando núcleos livres do endosperma. 17, 18. Pericarpo jovem de *Olyra humilis*, região ventral (hilar) e dorsal, respectivamente. 19. Pericarpo maduro de *Olyra humilis*, na região ventral-apical. 20, 21. *Sucrea monophylla*, região dorsal e hilar, respectivamente. 22-24. *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae). 25, 26. *Axonopus aureus* (Panicoideae). (CA = camada de aleurona; ED = endosperma; EN = endocarpo; EX = exocarpo; FV = feixe vascular; ME = mesocarpo; NC = nucelo; * = testa; ** = tégmen). Barra = 60 μm (15, 16, 23), 30 μm (17-19, 24-26), 15 μm (20-22).

Figures 15-26. Fruit development in Bambusoideae and Panicoideae species – longitudinal sections. 15. Young fruit of *Olyra humilis*. 16. Young fruit of *Sucrea monophylla*, showing free nuclei of endosperm. 17, 18. Young pericarp of *Olyra humilis*, ventral (hilar) region and dorsal region, respectively. 19. Mature pericarp of *Olyra humilis*, in ventral-apical region. 20, 21. Dorsal and hilar region of *Sucrea monophylla*, respectively. 22-24. *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae). 25, 26. *Axonopus aureus* (Panicoideae). (CA = aleurone layer; ED = endosperm; EN = endocarp; EX = exocarp; FV = vascular bundle; ME = mesocarp; NC = nucellus; * = testa; ** = tegmen). Bar = 60 μm (15, 16, 23), 30 μm (17-19, 24-26), 15 μm (20-22).



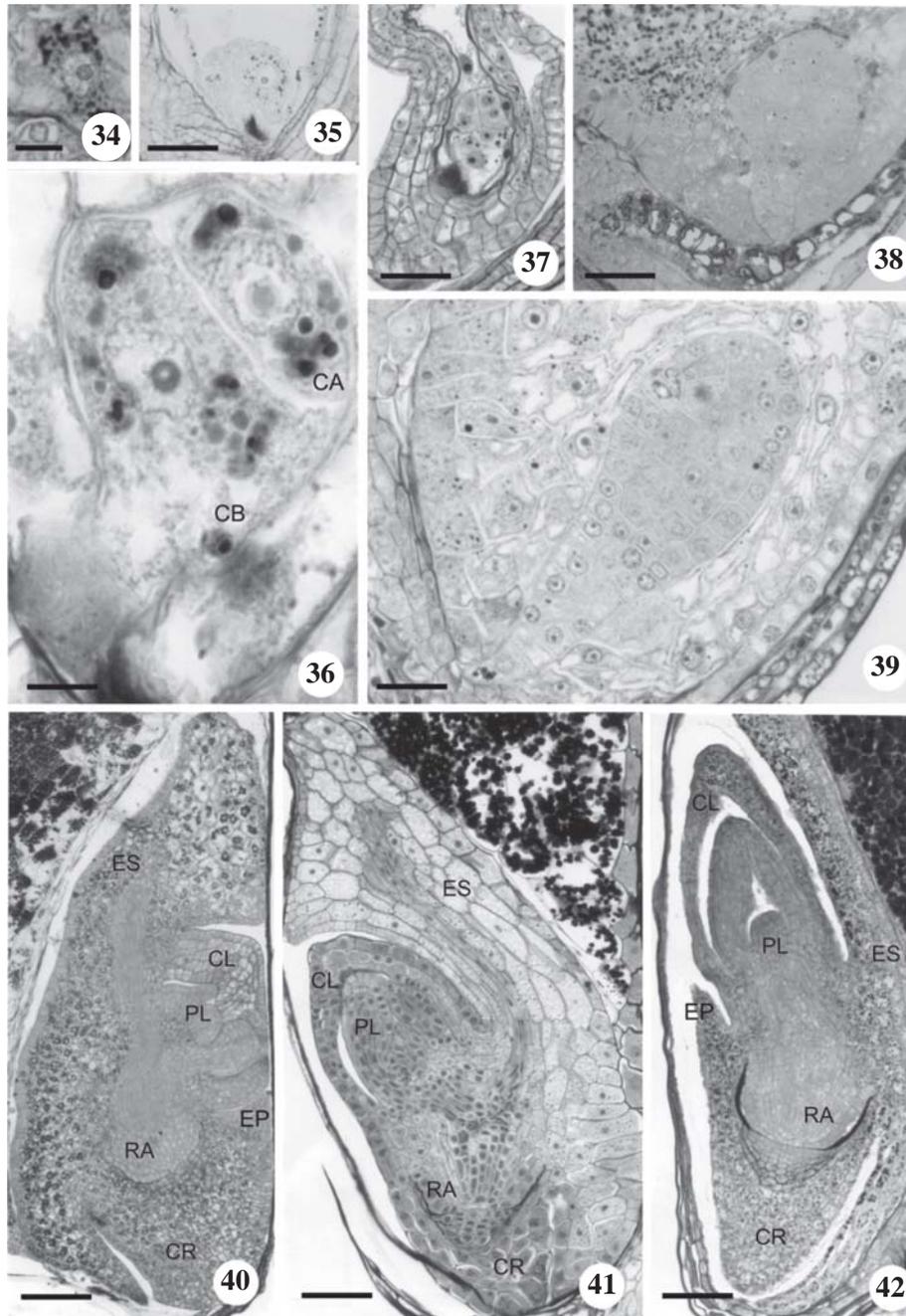
Figuras 27-33. Desenvolvimento do fruto de espécies de Chloridoideae, em secções longitudinais. 27. Ovário e óvulo de *Chloris elata*. 28. Detalhe da semente jovem de *Eragrostis solida*. 29, 30. Vista geral do fruto jovem de *E. solida* e *C. elata*, respectivamente. 31. Fruto jovem de *E. solida*. 32. Detalhe do embrião maduro de *C. elata*. 33. Detalhe da parede do fruto maduro de *E. solida*. (ED = endosperma; EX = exocarpo; NC = nucelo; TG = tégmen; cabeça de seta = célula primária do endosperma; seta = grãos de amido). Barra = 50 µm (27, 28), 100 µm (29-32), 25 µm (33).

Figures 27-33. Fruit development in Chloridoideae species – longitudinal sections. 27. Ovary and ovule of *Chloris elata*. 28. Detail of young seed in *Eragrostis solida*. 29, 30. General view of *E. solida* e *C. elata* young fruit, respectively. 31. Young fruit of *E. solida*. 32. Detail of mature embryo in *C. elata*. 33. Detail of the mature fruit wall in *E. solida*. (ED = endosperm; EX = exocarp; NC = nucelo; TG = tegmen; arrow = starch grains; arrow tip = endosperm primary cell). Bar = 50 µm (27, 28), 100 µm (29-32), 25 µm (33).

aleurona, constituída de células retangulares, de paredes finas, citoplasma denso e núcleo grande (figuras 20, 24-26, 41). Durante o desenvolvimento da semente, no endosperma há formação de grãos de amido, os quais

na maturidade preenchem por completo suas células (figuras 24, 25, 40-42).

No início da formação do embrião, observa-se que o zigoto (figuras 34, 35) divide-se transversalmente



Figuras 34-42. Desenvolvimento do embrião em espécies de Poaceae, em secções longitudinais. 34, 35. Zigoto de *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae) e *Eragrostis solida* (Chloridoideae). 36. Embrião bicelular de *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae). 37. Pró-embrião de *Sucrea monophylla* (Bambusoideae). 38, 39. Pró-embrião piriforme de *Eragrostis solida* (Chloridoideae) e *Axonopus aureus* (Panicoideae). 40-42. Embrião de *Sucrea monophylla* (Bambusoideae), *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae) e *Chloris elata* (Chloridoideae). (CA = célula apical; CB = célula basal; CL = coleóptilo; CR = coleorriza; ES = escutelo; EP = epiblasto; PL = plúmula; RA = raiz adventícia). Barra = 15 µm (34), 100 µm (40), 50 µm (35, 37-39, 41, 42), 10 µm (36).

Figures 34-42. Embryo development in Poaceae species – longitudinal sections. 34, 35. Zygote of *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae) and *Eragrostis solida* (Chloridoideae). 36. Bicellular embryo of *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae). 37. Proembryo of *Sucrea monophylla* (Bambusoideae). 38, 39. Pyriform proembryo of *Eragrostis solida* (Chloridoideae) and *Axonopus aureus* (Panicoideae). 40-42. Embryo of *Sucrea monophylla* (Bambusoideae), *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae) and *Chloris elata* (Chloridoideae). (CA = apical cell; CB = basal cell; CL = coleoptile; CR = coleorrhiza; ES = escutelum; EP = epiblast; PL = plumule; RA = adventitious root). Bar = 15 µm (34), 100 µm (40), 50 µm (35, 37-39, 41, 42), 10 µm (36).

resultando numa célula basal (CB) maior e numa célula apical (CA) menor (figura 36). A segunda divisão é longitudinal, e ocorre em CA, e a terceira é transversal, em CB, formando uma tétrade, como observado em *Surea monophylla* (figura 37). O desenvolvimento do embrião é do tipo Onagráceo.

O pró-embrião sofre várias divisões tornando-se piriforme (figuras 38, 39) e, posteriormente, reniforme (figura 31). O embrião maduro apresenta escutelo, coleóptilo, primórdios foliares, meristema apical, mesocótilo, coleorriza e raiz adventícia (figuras 40-42). Em *Olyra humilis*, *Surea monophylla* (Bambusoideae) e *Chloris elata* e *Eragrostis solida* (Chloridoideae), observa-se o epiblasto, localizado do lado oposto ao escutelo (figuras 40, 42).

Discussão

O desenvolvimento do primórdio de óvulo apresenta dois padrões em Angiospermas, bizonado e trizonado, segundo Bouman (1984). As espécies aqui estudadas apresentam primórdio de óvulo bizonado, que é o tipo menos freqüente e considerado derivado (Bouman 1984). Para as espécies de Bambusoideae observou-se que, apesar de possuírem primórdio bizonado, o óvulo apresenta nucelo desenvolvido em relação às demais espécies estudadas, além do óvulo e da semente apresentarem tamanho maior. Nas espécies de *Pharus*, atualmente pertencentes à Pharoideae, e antes incluídos em Bambusoideae, o óvulo também apresenta nucelo desenvolvido (Sajo *et al.* 2007). Em espécies de Ecdiocolaceae, grupo irmão de Poaceae, pertencente ao clado “graminédeo”, este caráter também foi relatado (Linder & Rudall 2005) e pode ser compartilhado entre as espécies das duas famílias.

O óvulo das espécies estudadas de Bambusoideae e Panicoideae é hemianátropo e difere das espécies de Chloridoideae, que apresentam óvulo campilótropo. Para as espécies de Poaceae, Dahlgren *et al.* (1985) citaram óvulos ortótropos, anátropos, hemianátropos e campilótropos, sendo os três últimos os mais citados na literatura, para esta família (Narayanaswami 1954, Mengesha & Guard 1966, Bhanwra 1988).

Para as espécies de Chloridoideae estudadas, o óvulo é campilótropo, devido à curvatura do megagametófito. A curvatura do megagametófito do óvulo campilótropo e anfítropo é considerada caráter derivado (Bouman 1984), o que corrobora estudos que enfatizam a divergência tardia de Chloridoideae, dentro de Poaceae (GPWG 2001).

Todas as espécies analisadas no presente trabalho são bitegmentadas, com micrópila formada apenas pelo

tegumento interno. Para algumas espécies de Bambusoideae foram observados óvulos unitegmentados (Rudall & Dransfield 1989, Hari Gopal & Mohan Ram 1987) e sem delimitação da micrópila (Hari Gopal & Mohan Ram 1987). Todos os membros de Poales, com exceção de Poaceae e Flagellariaceae, que pertencem ao clado “graminédeo” (Linder & Rudall 2005), têm os tegumentos externo e interno envolvendo completamente o nucelo (Linder & Rudall 1993). Nos óvulos de representantes de Poaceae, a micrópila, formada apenas pelo tegumento interno, pode ser considerada uma sinapomorfia (Linder & Rudall 1993).

Em Angiospermas, Bouman (1984) verificou a tendência da unitegmentação em óvulos bitegmentados, através da supressão do tegumento externo. Em Poaceae, ocorre uma variação no comprimento do tegumento externo, como observado nas espécies das subfamílias aqui estudadas, indicando a tendência da perda do tegumento externo nos óvulos da família. Entretanto, a supressão do tegumento externo em Poaceae é um caráter que ocorre independentemente da evolução dos grupos em Poaceae.

A divisão periclinal da epiderme nucelar que caracteriza os óvulos pseudocrassinucelados das espécies de Bambusoideae e Panicoideae estudadas foi descrita também para outras espécies de Panicoideae estudadas por Bhanwra (1988). O autor sugeriu ser essa uma característica exclusiva da subfamília Panicoideae. Porém, com os resultados obtidos neste estudo, verificou-se a presença desse caráter também em *Olyra humilis* e *Surea monophylla* (Bambusoideae).

O óvulo pseudocrassinucelado é normalmente encontrado em Poaceae e também em táxons basais de monocotiledôneas e eudicotiledôneas (Endress & Igersheim 2000). Porém, em Poales o óvulo tenuinucelado ocorre em Ecdiocolaceae (Rudall *et al.* 2005), Eriocaulaceae (Scatena & Bouman 2001), Mayacaceae (Venturelli & Bouman 1986), Xyridaceae (Rudall & Sajo 1999), todas representantes do clado “xyrídeo”. No clado “restídeo”, o óvulo tenuinucelado encontra-se em Anarthriaceae, Centrolepidaceae e Restionaceae (Rudall 1997). Considera-se esse caráter o mais comum para a ordem Poales, assim como também o é para outras ordens de monocotiledôneas, como Orchidales e Arales (Kapil & Bhatnagar 1991).

Durante o desenvolvimento do megagametófito de *Olyra humilis*, *Surea monophylla* (Bambusoideae), *Eragrostis solida* e *Chloris elata* (Chloridoideae) foi observada a proliferação das antípodas. Devido à presença dessa característica, Anton & Cocucci (1984) utilizaram para a família o tipo “Poaceae variante”. A proliferação

de antípodas em representantes da família foi associada à condição ancestral, presente nas espécies de bambus (Bambusoideae) (Davis 1966, Hari Gopal & Mohan Ram 1987), considerados, até recentemente, subfamília basal de Poaceae. Com os estudos filogenéticos (GPWG 2001), considera-se Anomochloideae o grupo ancestral de Poaceae. Além de contrariar a associação da proliferação de antípodas à ancestralidade, Diboll & Larson (1966) e You & Jensen (1985) demonstraram que estas células desempenham papel de nutrição do megagametófito e são consideradas células de transferência por Pate & Gunning (1972).

Nas espécies aqui estudadas, os frutos apresentam algumas variações na constituição do pericarpo e tégmen para cada subfamília. Características como tégmen persistente e exocarpo livre, observadas em *Eragrostis solida* e *Chloris elata* (Chloridoideae), também foram observadas em outras espécies da subfamília e são consideradas sinapomorfias (Bhanwra 1986, Bhanwra *et al.* 1981, 1991). Em *Setaria italica* (L.) P. Beauv. (Panicoideae), segundo Narayanaswami (1956), os frutos apresentam tégmen livre do pericarpo, não sendo considerados, portanto, uma cariopse verdadeira.

Em espécies de *Sporobolus*, *Eragrostis* e *Eleusine* (Chloridoideae), Rosengurt *et al.* (1982) denominaram o fruto de aquênio, e Lawrence (1951), de utrículo, somente para o último gênero. Filgueiras (1986) refutou o uso desses dois termos para os frutos de Poaceae e ratificou que cariopse é o tipo básico de fruto para Poaceae, e os casos que fogem desse padrão são considerados variações da mesma, assim como sugeriram Tselev (1983) e Izaguirre & Laguardia (1987).

Em espécies de *Melocanna*, *Dinochloa*, *Ochlandra*, *Olmeca*, *Melocamus* e *Alvinia* (Bambusoideae), Filgueiras (1986) citou a ocorrência de frutos carnosos. Além da suculência dos frutos, em espécies de *Ochlandra* e *Melocamus*, os tegumentos externo e interno do óvulo degeneram durante o desenvolvimento caracterizando sementes nuas, ou seja, ategumentadas (Hari Gopal & Mohan Ram 1987), sendo o mesmo observado em *Olyra humilis* e *Sucrea monophylla* (Bambusoideae). Dessa forma, a proteção do fruto é conferida pelas brácteas estéreis, que estão presentes nas unidades de dispersão de Poaceae (GPWG 2001).

A diversidade de frutos em Bambusoideae (Dahlgren *et al.* 1985, Filgueiras 1986) pode ser considerada um caráter importante para o entendimento da filogenia da subfamília, gerando discussões quanto à condição ancestral ou derivada deste fruto (Holtum 1956), que, todavia, é considerado por outros autores como especializado dentro da subfamília (Filgueiras 1986,

Hari Gopal & Mohan Ram 1987). Essa especialização poderia estar associada à condição vivípara de algumas espécies de Bambusoideae (Stapf 1904) ou ao seu modo de dispersão (Filgueiras 1986).

A morfologia de frutos visando à caracterização taxonômica de grupos infra-familiares em Poaceae vem sendo estudada, e demonstrou ser uma ferramenta útil para o grupo (Terrell & Peterson 1993, Liu *et al.* 2005), como também evidenciado no presente trabalho.

Na semente madura, observou-se em *Chloris elata* e *Eragrostis solida* (Chloridoideae) que o endotégmen apresenta compostos fenólicos. Este caráter também foi observado em *Sporobolus diander* (Retz.) P. Beauv., *Leptochloa chinensis* (L.) Nees e *Chloris barbata* Sw. (Chloridoideae) por Bhanwra *et al.* (1981). Chloridoideae apresenta alguns caracteres exclusivos entre as Poaceae, como óvulo campilótropo, depósito de compostos fenólicos no endotégmen e pericarpo livre do tégmen (Bhanwra *et al.* 1991). A presença de compostos fenólicos no tégmen foi relatada também em Restionaceae (Rudall & Linder 1988), em Centrolepidaceae (Hamann 1975) e em Eriocaulaceae (Scatena & Bouman 2001), e pode ser um caráter importante para definir Poales.

A proporção que o endosperma ocupa na semente em relação ao embrião pode indicar a evolução de Poaceae. A maior dimensão deste tecido comparado ao embrião é considerada condição ancestral (Filgueiras 1986), confirmando a primitividade das espécies de Bambusoideae em relação às espécies de Panicoideae e Chloridoideae.

O desenvolvimento do embrião em *Paspalum polyphyllum* (Panicoideae) é do tipo Onagráceo, em que a célula basal não desempenha papel importante na formação do embrião, sendo um tipo comum de desenvolvimento em monocotiledôneas (Dahlgren *et al.* 1985). Este caráter também foi observado em outras Poaceae, como em espécies de *Poa* (Souèges 1924) e em *Hordeum vulgare* L. (Norstog 1972), da subfamília Pooideae, e nas espécies de Panicoideae, *Paspalum scrobiculatum* L. (Narayanaswami 1954) e *Setaria italica* (L.) P. Beauv. (Narayanaswami 1956). Entretanto, nas espécies aqui estudadas, não foi observada a uniformidade no desenvolvimento do embrião, corroborando estudos preliminares que constataram que a embriogênese é um processo variável, em nível de gênero e também em nível familiar (Randolph 1936, Merry 1941, Bennett 1944).

Os resultados obtidos neste estudo são importantes na caracterização da família, pois foram constatadas diferenças no tipo do óvulo, no tipo do nucelo, no tamanho do óvulo, comprimento do tegumento externo e no pericarpo. Diferenças no tipo do óvulo (hemianátropo e

crassinucelado, campilótrofo e tenuinucelado), no desenvolvimento do nucelo, conseqüentemente no tamanho do óvulo, no comprimento do tegumento externo e na parede do fruto podem ser utilizadas como caráter diagnóstico das subfamílias estudadas e podem auxiliar na taxonomia de Poaceae.

Agradecimentos – Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida à primeira autora (proc. 140022/2004-0), bolsa de produtividade em pesquisa à terceira autora (proc. 301404/2004-6) e auxílio financeiro (proc. 471809/2004-7), à Fapesp pelo auxílio financeiro (proc. 2005/02141-4).

Referências Bibliográficas

- ANTON, A.M. & COCUCCHI, A.E. 1984. The grass megagametophyte and its possible phylogenetic implications. *Plant Systematics and Evolution* 146: 117-121.
- APG II – ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 2003. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the order and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141:399-436.
- BARTHLOTT, W. 1981. Epidermis and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nordic Journal of Botany* 1:345-355.
- BENNETT, H.W. 1944. Embryology of *Paspalum dilatatum*. *Botanical Gazette* 105:40-45.
- BHANWRA, R.K. 1986. Embryological studies in five species of *Eragrostis* Beauv. (Gramineae). *Research Bulletin (Science) of the Panjab University* 37:17-23.
- BHANWRA, R.K. 1988. Embryology in relation to systematics of Gramineae. *Annals of Botany* 62:215-233.
- BHANWRA, R.K., CHODA, S.P. & DEORI, R. 1981. Embryological studies in some grasses. *Proceedings of the Indian National Academy of Sciences. Part B. Biological Sciences* 47:408-418.
- BHANWRA, R.K., SONI, D.V. & GARG, A. 1991. Comparative embryology of some grasses. *Himalayan Botanical Researches* 425-433.
- BOUMAN, F. 1984. The ovule. In *Embryology of angiosperms* (B.M. Johri, ed.). Springer-Verlag, Berlin, p.123-157.
- DAHLGREN, R.M.T., CLIFFORD, H.T. & YEO, P.F. 1985. The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin.
- DAVIS, G.L. 1966. *Systematic embryology of the angiosperms*. John Wiley & Sons, New York.
- DIBOLL, A.G. & LARSON, D.A. 1966. An electron microscopic study of the mature megagametophyte in *Zea mays*. *American Journal of Botany* 53:391-402.
- ENDRESS, P.K. & IGERSEIM, A. 2000. Gynoecium structure and evolution in basal angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 161:S211-S223.
- FEDER, N. & O'BRIEN, T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55:123-142.
- FILGUEIRAS, T.S. 1986. O conceito de fruto em gramíneas e seu uso na taxonomia da família. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 21:93-100.
- GPWG – GRASS PHYLOGENY WORKING GROUP. 2001. Phylogeny and subfamilial classification of grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88:373-457.
- HAMANN, U. 1975. Neue untersuchungen zur embryologie und systematik der Centrolepidaceae. *Botanische Jahrbucher fur Systematik* 96:154-191.
- HARI GOPAL, B. & MOHAN RAM, H.Y. 1987. Fruit development and structure in some indian bamboos. *Annals of Botany* 60:477-483.
- HOLTUM, R.E. 1956. The classification of bamboos. *Phytomorphology* 6:73-90.
- IZAGUIRRE, P. & LAGUARDIA, A. 1987. Un nuevo enfoque hacia la definicion del fruto de las Gramineas. *Boletin de Investigacion* 3:1-15.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York.
- KAPIL, R.N. & BHATNAGAR, A.K. 1991. Embryological evidence in angiosperm classification and phylogeny. *Botanische Jahrbucher fur Systematik* 113:309-338.
- LAWRENCE, G.H.M. 1951. *Taxonomy of vascular plants*. Harvard University Press, Cambridge.
- LINDER, H.P. & RUDALL, P.J. 1993. The megagametophyte in *Anarthria* (Anarthriaceae, Poales), and its implications for the phylogeny of the Poales. *American Journal of Botany* 80:1455-1464.
- LINDER, H.P. & RUDALL, P.J. 2005. Evolutionary history of Poales. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36:107-124.
- LIU, Q., ZHAO, N., HAO, G., HU, S. & LIU, Y. 2005. Caryopsis morphology of the Chloridoideae (Gramineae) and its systematic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* 148:57-72.
- MENGESHA, M.H. & GUARD, A.T. 1966. Development of the embryo sac and embryo of teff, *Eragrostis tef*. *Canadian Journal of Botany* 44:1071-1075.
- MERRY, J. 1941. Studies on the embryo of *Hordeum sativum* – I. The development of the embryo. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 68:585-598.
- NARAYANASWAMI, S. 1954. The structure and development of the caryopsis in some Indian millets. III. *Paspalum scrobiculatum* L. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 81:288-299.
- NARAYANASWAMI, S. 1956. Structure and development of the caryopsis in some indian millets. VI. *Setaria italica*. *Botanical Gazette* 118:112-122.
- NORSTOG, K. 1972. Early development of the barley embryo: fine structure. *American Journal of Botany* 59:123-132.

- PATE, J.S. & GUNNING, B.E.S. 1972. Transfer cells. *Annual Review of Plant Physiology* 23:173-196.
- RANDOLPH, L.F. 1936. Developmental morphology of the caryopsis in maize. *Journal of Agricultural Research* 53:881-916.
- ROSENGURTT, B., PUERTO, O., MAFFEI, B.A. & LOMBARDO, A. 1982. Gramíneas. Universidad de la República, Montevideo.
- RUDALL, P.J. 1997. The nucellus and chalaza in monocotyledons: structure and systematics. *Botanical Review* 63:140-184.
- RUDALL, P.J. & DRANSFIELD, S. 1989. Fruit structure and development in *Dinochloa* and *Ochlandra* (Gramineae-Bambusoideae). *Annals of Botany* 63: 29-38.
- RUDALL, P.J. & LINDER, H.P. 1988. Megagametophyte and nucellus in Restionaceae and Flagellariaceae. *American Journal of Botany* 75:1777-1786.
- RUDALL, P.J. & SAJO, M.G. 1999. Systematic position of *Xyris*: flower and seed anatomy. *International Journal of Plant Sciences* 160:795-808.
- RUDALL, P.J., STUPPY, W., CUNNIFF, J., KELLOGG, E.A. & BRIGGS, B.G. 2005. Evolution of reproductive structures in grasses (Poaceae) inferred by sister-group comparison with their putative closest living relatives, Ecdeiocoleaceae. *American Journal of Botany* 92:1432-1443.
- SAJO, M.G., LONGHI-WAGNER, M.H. & RUDALL, P.J. 2007. Floral development and embryology in the early-divergent grass *Pharus*. *International Journal of Plant Sciences* 168:181-191.
- SÁNCHEZ-KEN, J.G., CLARK, L.G., KELLOGG, E.A. & KAY, E.E. 2007. Reinstatement and emendation of subfamily Micrairoideae (Poaceae). *Systematic Botany* 32:71-80.
- SCATENA, V.L. & BOUMAN, F. 2001. Embryology and seed development of *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus* (Koer) Ruhland (Eriocaulaceae). *Plant Biology* 3:341-350.
- SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S., ENDRESS, P.K. & CHASE, M.W. 2005. Phylogeny and evolution of Angiosperms. Sinauer Associates, Sunderland.
- SOUÈGES, R. 1924. Embryogénie des Graminées. Développement de l'embryon chez le *Poa annua* L. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* 178: 860-862.
- STAPF, O. 1904. On the fruit of *Melocanna bambusoides* Trin., an endospermles, viviparous genus of Bambuseae. *Transactions of the Linnean Society of London (Botany)* 6:401-425.
- TERRELL, E.E. & PETERSON, P.M. 1993. Caryopsis morphology and classification in the Triticeae (Pooideae: Poaceae). *Smithsonian Contributions to Botany* 83: 1-25.
- TSVELEV, N.N. 1983. Grasses of the Soviet Union. Oxonian Press, New Delhi.
- VENTURELLI, M. & BOUMAN, F. 1986. Embryology and seed development in *Mayaca fluviatilis* (Mayacaceae). *Acta Botanica Neerlandica* 35:497-516.
- YOU, R. & JENSEN, W.A., 1985. Ultrastructural observations of the mature gametophyte and the fertilization in wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Botany* 63:163-178.